

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA**

MARCELO DOMINGOS

Estudo do crescimento de *Ceriporiopsis subvermispora* em culturas submersas para a produção de inóculos destinados ao processo de biopolpação

**LORENA
2009**

MARCELO DOMINGOS

Estudo do crescimento de *Ceriporiopsis subvermispora* em culturas submersas para a produção de inóculos destinados ao processo de biopolpação

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Área de Concentração: Conversão de biomassa

Orientador: Prof. Dr. André Ferraz

**LORENA
2009**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL
DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU
ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE
CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação

Biblioteca Universitária

Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Domingos, Marcelo

Estudo do crescimento de *Ceriporiopsis subvermispota* em culturas submersas para a produção de inóculos destinados ao processo de biopolpação / Marcelo Domingos ; orientador André Luis Ferraz. – Lorena: 2009.

77 f. : fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de Concentração: Conversão de biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

1. *Ceriporiopsis subvermispota*
2. Fermentação submersa
3. Biopolpação
4. Reatores bioquímicos. I. Título.

66.098 - CDU

Aos meus pais João e Terezinha, e meus irmãos Mauricio e Jaqueline pelo esforço e incentivo incondicionais.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. André Luis Ferraz pela orientação, confiança, amizade, paciência e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Arnaldo Márcio Ramalho Prata pela co-orientação, ensinamentos e amizade.

Aos amigos do laboratório de Ciências da madeira da EEL/USP, Gina e Fernando pelo companheirismo, ensinamentos e bons momentos de descontração.

Pelos amigos que passaram pelo laboratório de Ciências da madeira EEL/USP, Marcos Paulo, André, Maria Augusta e Priscila que com sua experiência e ensinamentos fizeram toda diferença.

Aos técnicos do laboratório “Zé Gambira” e “Zé Cobrinha” pela amizade e assistência técnica.

Aos amigos de fora do Debiq companheiros de República, Neto, Leandro, Nelson, Walney, Bruno, Guilherme e Diego, pelas grandes e inesquecíveis amizades.

A Nina, pelo apoio, carinho e paciência.

Aos colegas, professores e funcionários do Departamento de Biotecnologia que me auxiliaram.

À CAPES pela bolsa e auxílio financeiro concedido.

RESUMO

DOMINGOS, M. **Estudo do crescimento de *Ceriporiopsis subvermispota* em culturas submersas para a produção de inóculos destinados ao processo de biopolpação.** 2009. 77f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2009.

No presente trabalho buscaram-se formas adequadas de produzir micélio de *Ceriporiopsis subvermispota* em culturas submersas, com o objetivo de preparar inóculo destinado ao processo de biopolpação. A obtenção de inóculo pode ser considerada uma etapa chave na biopolpação, visto que atualmente não existem processos industriais estabelecidos para a produção de micélio de basidiomicetos em quantidades compatíveis com a demanda prevista no processo. Mesmo uma planta industrial pequena de biopolpação (200 ton de polpa/dia) pode demandar cerca de 1 kg de micélio seco/dia, considerando-se as cargas de inoculação de 5 g de micélio seco/ton de madeira tratada. Desta forma, o sucesso desse processo pode depender de um baixo custo da produção dos inóculos fúngicos em larga escala. Os experimentos realizados consistiram inicialmente no crescimento do fungo em Erlenmeyers de 250 mL contendo 20 mL de meio líquido. Numa segunda etapa, os experimentos foram conduzidos em biorreatores de 1,5 L (Bioflo-NewBrunswick) e por último em um biorreator de 14 L. No último caso, o biorreator em questão foi especialmente desenhado e construído com o intuito de minimizar efeitos de cisalhamento da hifa durante o cultivo, mantendo ainda níveis adequados de aeração. Em Erlenmeyer foram feitos cultivos utilizando meio composto por 2,4% de extrato de batata e 0,7% de extrato de levedura (DB-EL), além de um meio potencialmente de menor custo que era composto por 2,0% de sacarose e 3,2% de milhocina (SM). A biomassa total obtida nos cultivos com meio SM foi compatível com aquela obtida no meio DB-EL. Os cultivos subsequentes realizados em biorreator utilizaram então o meio SM. O maior nível de biomassa fúngica obtida nos cultivos com biorreator agitado por pás (1,5 L) foi de 7,0 g/L, após 12 dias de crescimento. As maiores produtividades foram observadas a partir do 7º dia de cultivo, atingindo 0,93 g/L.dia quando a biomassa total era de 6,5 g/L. No biorreator de 14 L foram realizados 3 cultivos em condições diferenciadas (denominados de *A*, *B* e *C*). No *cultivo A* não houve intervenção em relação à correção de pH ou nível de nutrientes disponíveis ao longo de 14 dias. No *cultivo B* foi realizado o controle do pH a fim de mantê-lo entre 4,0 e 5,0. No *cultivo C* foi realizada a adição de sacarose correspondente a uma reposição de 5 g/L após 5 dias de crescimento. Os cultivos foram monitorados quanto à biomassa produzida, o pH, o teor de açúcar residual e o nível de O₂ dissolvido. De forma geral, o acúmulo de biomassa sempre foi seguido pelo consumo de açúcares, pela diminuição nos níveis de O₂ dissolvido e pela tendência de elevação do pH. A maior quantidade de biomassa foi obtida no *cultivo C* (14,1 g/L), correspondendo a uma produtividade de 1,72 g/L.dia. O surgimento de clamidósporos foi verificado em todos os tipos de cultivo, sendo que no *cultivo C* (em biorreator de 14 L) foi observada a menor quantidade de clamidósporos. Isso sugeriu que nessa situação houve melhores condições de crescimento para o fungo e menor estresse nutricional ou induzido por cisalhamento. A viabilidade dos inóculos preparados para a efetiva colonização da madeira foi testada e indicou que o inóculo produzido no biorreator de 14 L, tanto micélio como clamidósporos, foi efetivo para colonizar *Eucalyptus grandis*.

PALAVRAS-CHAVE: *Ceriporiopsis subvermispota*. Biopolpação. Reatores Bioquímicos. Fermentação submersa.

ABSTRACT

DOMINGOS, M. **Studies on the submerged culturing of *Ceriporiopsis subvermispora* for inoculum production used in biopulping processes.** 2009. 77p. Dissertation (Master of Science in Industrial Biotechnology) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2009.

The present work evaluated suitable systems for producing *Ceriporiopsis subvermispora* mycelium in submerged cultures. Mycelium produced was used in subsequent inoculation of wood chips in biopulping processes. The development of appropriated technologies for producing large amounts of inoculum may be a key step in biopulping, since currently there are no established processes designed to produce basidiomycetes mycelium to supply biopulping demands. Even a small biopulping plant (200 ton pulp / day) may require about 1 kg of dry mycelium/day, taking into account inoculation of 5 g of dry mycelium/ton of wood to be biotreated. Thus, the success of this process may depend on the low cost of large scale fungal inoculum production. The experiments were conducted initially in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 20 mL of liquid medium. In a second step, the experiments were conducted in bioreactors of 1.5 L (Bioflo-NewBrunswick) and finally in a bioreactor of 14 L. In the latter case, the bioreactor has been designed and constructed in order to minimize the effects of shear stress during cultivation and supply suitable aeration levels. Culture broths were composed of 2.4% potato extract and 0.7% yeast extract (BD-EL) or 2.0% sucrose and 3.2% of corn steep liquor (SM) that represent a potentially lower cost culture broth. The total biomass obtained in flask-cultures with SM broth was similar to that obtained with DB-EL. Cultures performed in the subsequent bioreactor used then the SM broth. The higher level of fungal biomass obtained in the cultures performed in the 1.5 L-stirred bioreactor was 7.0 g/L after 12 days. The highest mycelium yield was observed from the 7th day of cultivation, reaching 0.93 g/L.day and 6.5 g/L total biomass. In the 14 L-bioreactor, 3 experiments were performed in different conditions (called A, B and C). In *cultivation A*, no interventions were performed to correct the culture pH or the level of available nutrients over 14 days of culturing. In *culture B* pH was controlled to keep it between 4.0 and 5.0. *Cultivation C* was carried out with addition of sucrose (final concentration of 5 g/L) after 5 days of growth. All cultures were monitored with basis on the biomass produced, culture pH, residual sugar content and dissolved O₂ levels. In general, biomass accumulation was always followed by sugar consumption, decrease in dissolved O₂ levels and a rising tendency for the pH values. The highest biomass amount was obtained in *culture C* (14.1 g / L), corresponding to a yield of 1.72 g/L.day. The presence of clamydospores was observed in all cultures, whereas in *culture C* (in 14 L bioreactor) it appeared at the lowest amounts. This fact suggested that *culture C* presented the lowest stress level for the fungus, including low hypha shear stress and low nutritional depletion. The viability of inoculum prepared, both mycelium and clamydospores, was checked by culturing them on *Eucalyptus grandis* wood chips. Both inoculum types (prepared from the 14 L-bioreactor) were efficient on colonizing wood chips and to produce the manganese peroxidase enzyme.

Keywords: *Ceriporiopsis subvermispora*. Biopulping. Biochemical Reactor. Submerge Fermentation.

Lista de Figuras

Figura 1 - Fluxograma de uma planta piloto do processo de biopolpação.....	15
Figura 2 – Fluxograma de uma planta piloto do processo de biopolpação por inoculação por semente.....	17
Figura 3 - Resistências associadas à dissolução e ao consumo de oxigênio em processos aeróbios (BAILEY E OLLIS, 1986).	21
Figura 4 - Biorreator Biofflo III, New Brunswick Scientific Co. Inc utilizado nos cultivos descritos no item 4.4.1.....	34
Figura 5 - Biorreator de baixo cisalhamento (BBC) de 14L com agitação e aeração por tubo em “L”.....	37
Figura 6 - Projeto da rolha e da haste usada no biorreator.....	38
Figura 7 – Classificação visual da quantidade de clamidósporos em (D) muito (++++), (C) médio (+++),.....	42
Figura 8 - Curva de crescimento e consumo de açúcares por <i>C. subvermispora</i> SS3 em meio composto por 2,4% de dextrose/extrato de batata e 0,7% de extrato de levedura, tamponado com acetato de sódio 10 mM (pH 4,0). Cultivos realizados em Erlenmeyers de 250 mL com 20 mL de meio mantidos estáticos a 27°C.....	46
Figura 9 - Curva de crescimento e consumo de açúcares por <i>C. subvermispora</i> SS3 em meio composto por 2% de sacarose e 3,2% de milhocina. Cultivos realizados em Erlenmeyers de 250 mL com 20 mL de meio mantidos estáticos a 27 °C.....	48
Figura 10 – Curva de crescimento e consumo de açúcares por <i>C. subvermispora</i> SS3 em meio composto por 2% de sacarose e 3,2% de milhocina. Cultivos realizados em biorreator de 1.5 L agitado por pás a 166 rpm e aeração contínua de 1,16 vvm.	51
Figura 11 – Formação de aglomerado de micélio no interior de um biorreator agitado por pás de 1,5 L durante o crescimento de <i>C. subvermispora</i> em meio composto por 2,0% de sacarose e 3,2% de milhocina.	53
Figura 12 – Dados referentes à concentração de O ₂ dissolvido em um biorreator de baixo cisalhamento de 14 L durante um ensaio característico de determinação de KLa para um fluxo de entrada de ar de 1,0 vvm. Os dados mostrados se referem à média de 2 experimentos realizados em condições idênticas com o reator carregado com 10 L de meio composto por 2,0 % de sacarose e 3,2% de milhocina cujo pH era igual a 4,5.	54
Figura 13 - Curva de crescimento, consumo de açúcares, variação da concentração de O ₂ dissolvido e pH durante o cultivo A de <i>C. subvermispora</i> SS3 em meio composto por 2% de sacarose e 3,2% de milhocina. Cultivos realizados em biorreator de 14 L agitado por aeração com tubo em “L” a 1 vvm.	55

Figura 14 - Formação de “pellets” no crescimento miceliano de *C. subvermispota* em um biorreator de baixo cisalhamento de 14 L. Meio composto por 2% de sacarose e 3,2% de milhocina. A foto corresponde ao 5º dia de cultivo aerado a 1 vvm. 57

Figura 15 – Micrografias ilustrativas de “pellets” de *C. subvermispota* (aumento de 40X) formados em um biorreator de baixo cisalhamento de 14 L aerado a 1 vvm. Meio composto por 2% de sacarose e 3,2% de milhocina. 57

Figura 16 - Curva de crescimento, consumo de açúcares, variação da concentração de O₂ dissolvido e pH durante o cultivo B de *C. subvermispota* SS3 em meio composto por 2% de sacarose e 3,2% de milhocina. Cultivos realizados em biorreator de 14L agitado por aeração com tubo em “L” a 1 vvm. 58

Figura 17 - Curva de crescimento, consumo de açúcares, variação da concentração de O₂ dissolvido e pH durante o cultivo C de *C. subvermispota* SS3 em meio composto por 2% de sacarose e 3,2% de milhocina. Cultivos realizados em biorreator de 14 L agitado por aeração com tubo em “L” a 1 vvm. 60

Figura 18 – Produtividade de micélio de *C. subvermispota* produzido em cultivos realizado em: (E1) Erlenmeyer de 250mL, meio de cultivo DB-EL tamponado em pH 4,1 com acetato de sódio 10 mM; (E2) Erlenmeyer de 250mL, meio de cultivo SM; (B1) Biorreator agitado por pás de 1,5L, meio de cultivo SM; (B2A) Biorreator de 14L, agitado por aeração com tubo em “L” e meio de cultivo SM, cultivo A; (B2B) Biorreator de 14L, agitado por aeração com tubo em “L” e meio de cultivo SM, cultivo B; (B2C) Biorreator de 14L, agitado por aeração com tubo em “L” e meio de cultivo SM, cultivo C. 61

Figura 19 – Biomassa seca e açúcar redutor consumido nos cultivos de *C. subvermispota* em: (E1) Erlenmeyer de 250mL, meio de cultivo DB-EL tamponado em pH 4,1 com acetato de sódio 10 mM; (E2) Erlenmeyer de 250mL, meio de cultivo SM; (B1) Biorreator agitado por pás de 1,5L, meio de cultivo SM e; (B2B) Biorreator de 14L, agitado por aeração com tubo em “L” e meio de cultivo SM, cultivo B; (B2C) Biorreator de 14L, agitado por aeração com tubo em “L” e meio de cultivo SM, cultivo C. 63

Figura 20 – Microscopia ótica de fragmentos de hifas com clamidósporos, após o micélio cultivado em biorreator de 14 L ter sido batido por 10 ciclos de 15 segundos em liquidificador. Hifa (seta vermelha) e clamidósporos (seta preta). Aumento 400X. 66

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Composição típica de milhocina (AKHATAR <i>et al.</i> , 1998).....	24
Tabela 2 – Composição aminoácidos, vitaminas e sais minerais de milhocina obtida pela Corn Products Brasil Ltda.	25
Tabela 3 – Quantidade de clamidósporos observada em micélio de <i>C. subvermispora</i> ao longo do crescimento em meio de cultura líquido.....	65
Tabela 4 – Atividade enzimática de manganês peroxidase (MnP) encontrada nos extratos obtidos após 14 dias de cultivo de <i>C. subvermispora</i> SS3 sobre <i>E. grandis</i> , com os inóculos convencional e de clamidósporos.	66

Lista de Abreviações

DB-EL: Meio de cultura composto por 2,4% de dextrose/extrato de batata e 0,7% de extrato de levedura

SM: Meio de cultura composto por 3,21% de milhocina e 2% sacarose

STR: Biorreator agitado com turbina de pás

BBC: Biorreator de baixo cisalhamento

K_{La} : Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio

CDH : Celobiose Desidrogenase

LiP : Lignina Peroxidase

MnP : Manganês Peroxidase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1. Biopolpação	14
2.2. Produção de inóculo a partir de basidiomicetos	17
2.2.1. Biorreatores	18
2.2.2. Transferência de oxigênio em bioprocessos	20
2.2.3. Efeito do pH	22
2.2.4. Utilização de milhocina como fonte de nitrogênio	23
2.3. <i>Ceriporiopsis subvermispota</i>	25
2.4. Clamidósporos	26
2.5. Cultivo submerso de basidiomicetos em biorreatores	27
3. OBJETIVOS	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1. Fungo estudado e manutenção do cultivo	31
4.2. Meios de cultura utilizados nos ensaios	31
4.3. Cultivos de <i>c. subvermispota</i> em meio líquido contido em Erlenmeyers de 250 ml	32
4.4. Cultivos de <i>c. subvermispota</i> em meio líquido contido em biorreatores	32
4.4.1. Biorreator agitado de 1,5 L	32
4.4.2. Cultivos em biorreator de 14 L	35
4.5. Métodos analíticos	41
4.5.1. Determinação de açúcares redutores	41
4.5.2. Determinação da biomassa	41
4.5.3. Determinação dos clamidósporos	41
4.5.4. Determinação do pH	42
4.6. Preparação das madeiras para a biodegradação	42
4.7. Experimentos de biodegradação de madeira e viabilidade dos clamidósporos na colonização da madeira	43
4.7. 1 Extração das enzimas	43
4.7. 2 Determinação da atividade da enzima MnP	44

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1 Crescimento de <i>C. subvermispora</i> em cultivos sem agitação conduzidos em Erlenmeyers	46
5.2 – Crescimento de <i>C. subvermispora</i> em biorreator de 1,5 L com meio agitado por turbina de pás (STR)	51
5.3 – Crescimento de <i>C. subvermispora</i> em biorreator de 14 L.....	53
5.4 – Comparativo dos fatores de produtividade e consumo de açúcares entre os cultivos.....	61
5.5 – Análise de clamidósporos dos cultivos.....	63
5.6 - Teste de viabilidade do micélio e dos clamidósporos produzidos em biorreator para colonizar madeira	65
6. CONCLUSÕES.....	68
REFERÊNCIAS	70

1. INTRODUÇÃO

O presente trabalho aborda a produção de micélio de um basidiomiceto de decomposição branca, *Ceriporiopsis subvermispora*, a partir de culturas submersas. O basidiomiceto em questão tem sido amplamente utilizado em um processo experimental denominado de biopolpação. Esse processo compreende o pré-tratamento da madeira com fungos pré-selecionados para a posterior produção de polpas mecânicas ou químicas. O uso do pré-tratamento biológico permite uma redução expressiva no consumo de energia em processos de polpação mecânica (até 40%) e, no caso da polpação química, permite reduzir a demanda por produtos químicos durante o processo de cozimento da madeira (AKHTAR et al., 1998; FERRAZ et al., 2008).

O sucesso do processo de biopolpação depende da efetiva colonização da madeira por um fungo de decomposição branca que seja seletivo para a degradação de lignina. A inoculação da madeira corresponde ao início do processo de biopolpação e pode ser conduzida a partir de micélio fúngico, esporos ou mesmo clamidósporos da espécie de interesse. Dessa forma, é relevante avaliar tecnologias que sejam adequadas para a produção dos inóculos em larga escala e com custos competitivos. A cultura submersa é uma das alternativas para a produção eficiente dos micélios demandados. Nesse contexto, o presente trabalho inclui uma breve revisão bibliográfica sobre a biopolpação e sobre os cultivos de basidiomicetos em meio líquido. Na parte experimental desenvolvida avaliou-se a produção de micélio de *Ceriporiopsis subvermispora* em cultivos submersos a partir de experimentos conduzidos inicialmente em pequena escala (Erlenmeyers de 250 mL) e, posteriormente, em biorreatores de 1,5 L e de 14 L. Os biorreatores em questão apresentaram sistemas de agitação e aeração diferenciados. O de maior volume foi especialmente desenhado e construído para a execução desse trabalho e visou minimizar os danos às hifas fúngicas usualmente causado pelo cisalhamento decorrente da agitação do meio por pás em movimento circular.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biopolpação

A indústria de celulose e papel utiliza os métodos de polpação química ou mecânica, ou a combinação deles, para a produção de polpas de várias características. A polpação química envolve o uso de reagentes químicos para degradar e dissolver a lignina, soltando as fibras celulósicas. Esse processo produz polpa com resistência mecânica elevada e apresenta um rendimento que pode variar entre 45 e 55% de massa de polpa em relação à massa de madeira que entra no digestor. A polpação mecânica envolve o uso de força mecânica para separar as fibras celulósicas. Esse processo proporciona um rendimento de cerca de 95% e produz papel com boa opacidade, porém de menor resistência mecânica e grande tendência ao amarelamento devido à presença de lignina. Os custos de instalação de uma planta de polpação mecânica são muito menores do que aqueles requeridos por uma indústria de polpação química (BIERMANN, 1993). Por outro lado, o processo de polpação mecânica envolve um elevado consumo de energia elétrica (FENGEL; WEGENER, 1989).

A biopolpação é um pré-tratamento dos cavacos de madeira com fungos selecionados que degradam preferencialmente a lignina e apresenta um grande potencial para resolver problemas associados com a polpação química e mecânica convencionais. Esse tratamento biológico tem sido bastante estudado nos últimos anos devido aos benefícios que ele proporciona. Mesmo com períodos curtos de biodegradação (15 a 30 dias), a madeira biotratada já apresenta um “amolecimento” característico que permite maior facilidade de desfibramento mecânico, ou, no caso da polpação química, maior facilidade de penetração dos reagentes, bem como maior susceptibilidade da lignina parcialmente degradada à solubilização pelos licores de polpação. Este pré-tratamento biológico permite então uma redução de até 40% no consumo de energia para o desfibramento e refino mecânico posterior, ou, no caso da polpação química, diminuição no tempo, na temperatura de reação ou mesmo

na carga de reagentes químicos utilizados. Esta “amenização” nas condições necessárias para a produção de polpas celulósicas ainda proporciona a obtenção de polpas com melhor resistência mecânica (AKHTAR et al., 1998; FERRAZ et al., 2008).

A biopolpação tem sido realizada principalmente em escala de bancada, mas ensaios em biorreatores e também em escala ampliada, especificamente em pilhas de 50 ton de cavacos, têm sido efetuados e apresentaram resultados satisfatórios (AKHTAR et al., 1998; FERRAZ et al., 2008). Atualmente, a biopolpação prévia ao tratamento mecânico da madeira atingiu um grau de desenvolvimento que permitiu a ampliação de escala do processo para nível piloto e semi-industrial. Por exemplo, mesmo com o biotratamento em escala piloto e a polpação mecânica em escala industrial, Ferraz et al. (2008) observaram economias de energia da ordem de 25%, que foram similares aos dados obtidos em escala de laboratório.

No Brasil, a empresa Melhoramentos Ltda iniciou o processo de biopolpação em escala piloto (50 toneladas de cavacos biotratados) e a Figura 1 mostra as operações dessa planta em um fluxograma básico (PAVAN, 2008).

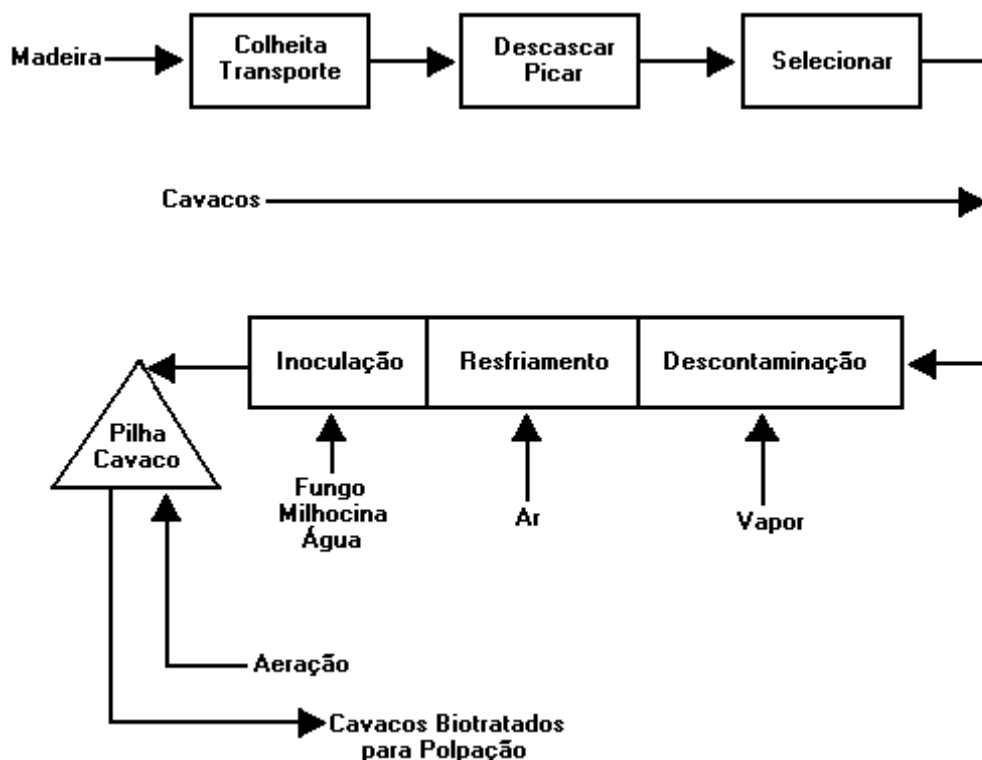


Figura 1 - Fluxograma de uma planta piloto do processo de biopolpação.

Até o momento a operacionalização dessa planta piloto mostrou que é possível reproduzir os resultados obtidos anteriormente em escala de laboratório. No entanto, uma série de problemas de contaminação da madeira inoculada têm sido observados (FERRAZ et al., 2008; MASARIN et al., 2008, 2009). A assepsia deve ser mantida para possibilitar que apenas o fungo de interesse se desenvolva, restringindo a colonização por outros microrganismos oportunistas que competem pelo substrato. Além disso, alguns fungos competidores podem produzir toxinas que impedem o desenvolvimento do fungo de interesse (FERRAZ et al., 2008; MASARIN, 2006). A utilização de co-substratos para acelerar o crescimento fúngico tem sido bastante estudada e, até o momento, a milhocina tem proporcionado resultados satisfatórios (AKHTAR et al., 1998; FERRAZ et al., 2008; MASARIN, 2006; VICENTIM, 2007). Esse nutriente é gerado nas indústrias de beneficiamento do milho e serve como promotor de crescimento, porém sua utilização sobre cavacos não esterilizados propaga maior contaminação (MASARIN, 2006).

Uma alternativa para contornar os problemas de contaminação observados foi descrita inicialmente em 2006 (GUERRA; PAVAN; FERRAZ, 2006; FERRAZ et al., 2008). Nesse caso, foi demonstrado que é possível alterar a forma de inoculação, a fim de minimizar problemas de contaminação associados ao uso de milhocina como co-substrato. Para isso, cavacos de madeira pré-cultivados em laboratório foram usados como “semente” de inoculação de quantidades maiores de madeira, já em planta piloto, como ilustrado na Figura 2.

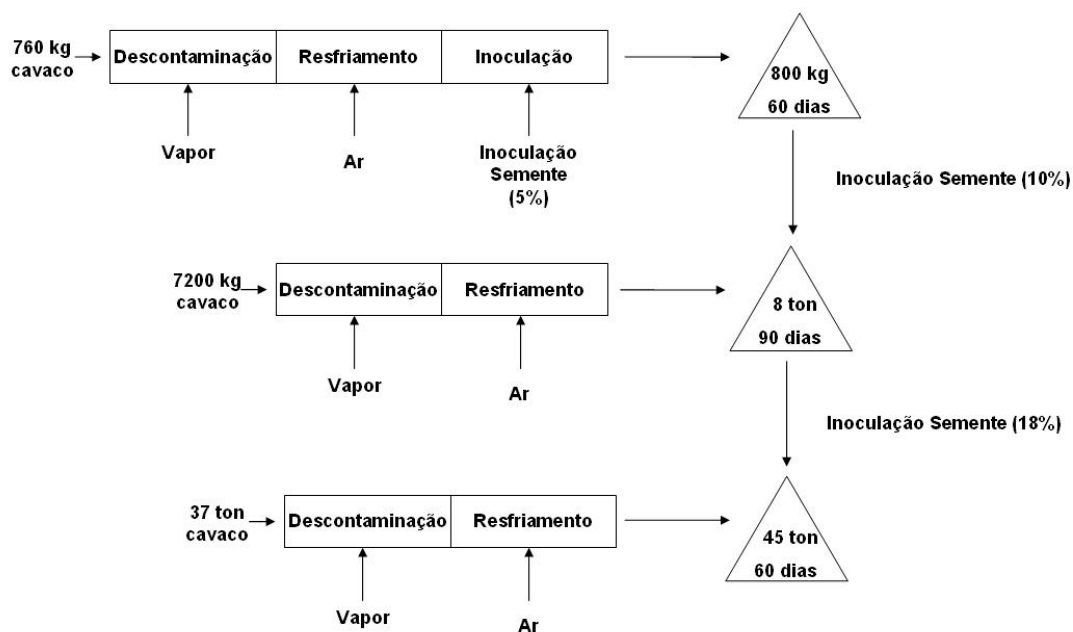


Figura 2 – Fluxograma de uma planta piloto do processo de biopolpação por inoculação por semente.

A tecnologia atualmente estabelecida da biopolpação resultou de um desenvolvimento de cerca de 25 anos, e teve início em um consórcio que envolveu o Forest Products Laboratory, em Madison (Wisconsin, EUA) e várias empresas do setor de celulose e papel. Como parte desse desenvolvimento, o fungo *C. subvermispora* foi selecionado como o mais eficiente para o processo de biopolpação (AKHTAR et al., 1998). No entanto, até os dias de hoje não se tem reportado dados com formas adequadas de produzir micélio de *Ceriporiopsis subvermispora* em culturas submersas para a preparação de inóculo destinado ao processo de biopolpação.

2.2 – Produção de inóculo a partir de basidiomicetos

No cultivo de basidiomicetos em meio líquido, a biomassa produzida pode ser diretamente usada como inóculo em novos processos produtivos, como a biopolpação, a preparação de metabólitos intermediários, a produção de rações enriquecidas ou mesmo de flavorizantes (MAZIERO et al., 1999; ROSADO et al., 2003). A grande vantagem do micélio

obtido em meio líquido é que ele pode ser facilmente manuseado e homogeneizado (PAPAGIANNI, 2004). De acordo com Guillén-Navarro et al. (1998), a cultura submersa, comercialmente, é mais vantajosa do que os cultivos em meio sólido, em função dos seguintes fatores: facilidade de separação do micélio do meio de cultura, ocupação de uma área relativamente pequena para o crescimento do micélio, esterilização do meio de crescimento no biorreator e a manutenção da cultura asséptica e possibilidade de maior controle das condições de cultivo durante o processo de fermentação.

Qualquer das aplicações de um fungo vivo na forma de micélio ou esporo que requer a transmissão do laboratório para escala industrial necessita um método econômico para sua produção, que pode ser realizado por aumento da escala laboratorial de frascos para fermentadores de larga escala. Essa transmissão não é geralmente problemática se houver um entendimento das características de crescimento do organismo em frascos menores, que pode ser transferido para crescimento em fermentadores (JONES, 1998).

2.2.1 – Biorreatores

Biorreatores são equipamentos usados para o cultivo de microrganismos, células animais ou vegetais. Existem diversos tipos de biorreatores empregados em processos biotecnológicos. Entre eles podem-se destacar os tanques agitados e aerados “STR”, os sistemas agitados por aeração “Airlift” e os de coluna de bolhas (JONES, 1998). Segundo Schügerl (1987), os biorreatores têm por objetivo proporcionar as condições adequadas de temperatura, pH, concentração de substrato, sais minerais, vitaminas e oxigênio, para organismos aeróbios, para que microrganismos e células cresçam e produzam os metabólitos de interesse.

Embora existam poucos estudos sobre biorreatores apropriados para o crescimento de basidiomicetos, a estrutura do equipamento é de fundamental importância na medida em que

interfere na morfologia e na quantidade de biomassa formada. O mecanismo de agitação e aeração pode determinar o tipo de crescimento e influenciar na produtividade (MARTIN, 1996).

A agitação é um parâmetro importante, contribuindo com uma adequada homogeneidade do caldo de cultivo, auxiliando na aeração, possibilitando com que os nutrientes cheguem mais facilmente à célula, evitando gradientes de pH e auxiliando na transferência de calor. A agitação também pode causar mudanças na morfologia celular, variação na taxa de crescimento micelial e na formação de produtos (PARK et al., 2002). Em produções industriais envolvendo cultura submersa, a morfologia micelial varia entre a formação de grumos e formas filamentosas dispersas, dependendo das condições de cultivo e da espécie fúngica em uso (MÁRQUEZ-ROCHA et al., 1999).

Os caldos fermentativos contendo microrganismos filamentosos exibem frequentemente um comportamento pseudo-plástico não convencional, ou diferente daquele observado no cultivo de organismos unicelulares como as bactérias. Este comportamento pseudo-plástico exerce um profundo efeito no desempenho do biorreator, afetando o padrão de mistura e os processos de transferência de massa e energia (GAVRILESCU et al., 1993). O aumento na viscosidade do caldo fermentativo em biorreatores convencionais tipo tanque agitado e aerado pode ser parcialmente compensado pelo aumento no valor das variáveis operacionais (frequência de rotação do eixo contendo as pás e vazão específica de alimentação de ar), a fim de manter um adequado coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$). Contudo, segundo Merchuk e Gluz (1999), altas frequências de rotação do eixo contendo as pás levam à alta taxa de cisalhamento, o que pode causar mudanças morfológicas irreversíveis no microrganismo, mudanças reológicas no caldo fermentativo, e, por consequência, prejuízo no desempenho do cultivo e no aumento de biomassa. O excesso

de cisalhamento pode ainda resultar em rompimento celular e decréscimo da biomassa (CONTRERAS et al., 1999).

A agitação e a aeração têm que atuar em sinergia para disponibilizar oxigênio dissolvido para as células. A interface entre as bolhas de ar e a fase líquida é onde o gás oxigênio é transferido para a forma dissolvida. Assim, bolhas grandes, com baixa área de superfície e pouco tempo de residência não resultam em uma boa transferência de oxigênio para a fase líquida. Se essas bolhas podem ser quebradas em pequenas bolhas, tendo maior área superficial e maior tempo de residência na fase líquida, então a taxa de transferência de oxigênio pode ser aumentada. Uma taxa de aeração muito elevada pode resultar não unicamente em uma transferência de oxigênio inadequada, mas também em formação de espuma na superfície do meio. Uma espuma incontrolável pode provocar um vazamento, no qual a cultura é perdida diretamente na linha de exaustão de gases. Se essa espuma voltar na forma de líquido ao fermentador é possível que ocorra contaminação (JONES, 1998).

2.2.2 Transferência de oxigênio em bioprocessos

Em bioprocessos que envolvem o cultivo de células aeróbias, o oxigênio apresenta-se como um elemento essencial para o metabolismo celular. Este está envolvido no processo de reoxidação das coenzimas que participam das reações de desidrogenação ao longo da glicólise, no ciclo de Krebs e no processo de produção de energia “química”, transformando as moléculas de ADP em moléculas de ATP, sendo fundamental para o crescimento celular, síntese de produtos, transporte e outras atividades celulares (SCHMIDELL, 2001).

Um problema peculiar relacionado ao oxigênio em bioprocessos é sua baixa solubilidade quando comparado a outros nutrientes presentes em meios fermentativos. A baixa solubilidade associada à grande demanda provocada por altas velocidades globais de respiração celular podem agravar o problema da baixa disponibilidade de oxigênio dissolvido

nos cultivos. Concentrações de oxigênio dissolvido em torno de 300 $\mu\text{moles/L}$, comuns nos meios de cultivo, chegam a ser 1.000 a 10.000 vezes menores do que as concentrações de outros componentes do meio como a glicose (BAILEY; OLLIS, 1986). Além da baixa solubilidade, o processo de transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase líquida, no caso de cultivos de fungos filamentosos, enfrenta resistências físicas devido à geração de caldos mais viscosos à medida que o cultivo evolui. Ainda, com o aumento da concentração celular e o aumento da velocidade específica de respiração celular, o consumo global de oxigênio aumenta.

É possível, portanto, imaginar que existam muitas resistências associadas ao transporte de oxigênio da fase gasosa até o seu consumo final. A Figura 3 ilustra algumas dessas possíveis resistências.

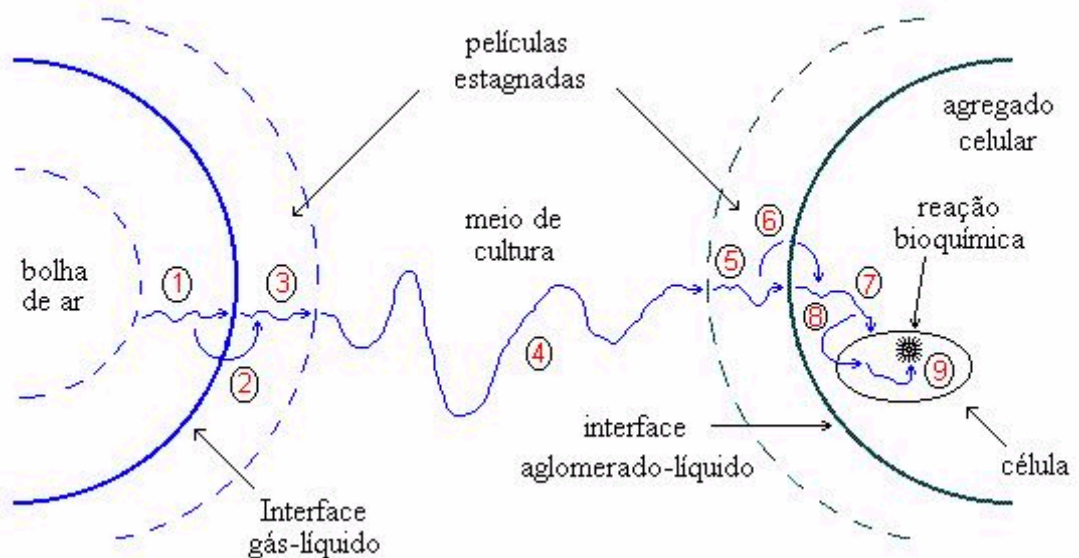


Figura 3 - Resistências associadas à dissolução e ao consumo de oxigênio em processos aeróbios (BAILEY E OLLIS, 1986).

A Figura 3 descreve um caminho típico para a transferência de oxigênio da bolha de gás até a célula. Há nove principais resistências: (R1) difusão através da película estagnada de gás; (R2) interface gás-líquido; (R3) difusão através da película estagnada de líquido; (R4) difusão de oxigênio até o agregado celular; (R5) difusão através da película líquida em torno

do agregado celular; (R6) passagem pela interface caldo-agregado celular; (R7) difusão através do agregado celular; (R8) passagem pela membrana celular; (R9) difusão no citoplasma. De acordo com Kargi e Moo-Young (1985), a resistência global à transferência de oxigênio é igual à soma das resistências individuais e suas magnitudes dependem das condições hidrodinâmicas prevalentes no biorreator, da composição e reologia do caldo fermentativo e da concentração e atividade celular.

2.2.3 - Efeito do pH

Na produção de inóculo fúngico em cultivo submerso, o pH é um importante parâmetro ambiental que pode ser usado como uma variável de controle fisiológico e morfológico do fungo, ou como um agente de aceleração do crescimento das células. Esse pode ser também usado para induzir ou controlar a esporulação no crescimento de biomassa. De fato, o pH é provavelmente o parâmetro mais fácil para manipular, controlar e aumentar a escala para nível industrial, para fermentações em cultivo submerso (JONES, 1998).

Fungos apresentam um pH ótimo para o crescimento, e isso pode ser realmente determinado por execução de certo número de fermentações em pequena escala. Souza-Cruz (2005) realizou experimentos com culturas de *C. subvermispota* em meio ágar-milhocina com valores de pH que variaram entre 3,0 e 5,5 e a maior taxa de crescimento encontrada para este fungo foi em meio com valores de pH entre 3,5 e 5,0. Lin e Sung (2006) estudaram valores de pH entre 4 e 6 para o cultivo do basidiomiceto *Antrodia cinnamomea* e encontraram maior acúmulo de biomassa em pH 5,5. Lee et al. (2004), em cultivos de *Grifola frondosa*, determinaram que o melhor pH para crescimento de biomassa deste fungo foi de 5,5.

2.2.4 Utilização de milhocina como fonte de nitrogênio.

O conhecimento nutricional dos fungos é de grande importância, pois permite o crescimento e o desenvolvimento de um fungo em laboratório (PUTZKE; PUTZKE, 2002). Para cultivá-los em laboratório é necessário ter o conhecimento sobre quais nutrientes podem ser utilizados e quais são exigidos por eles (GRIFFIN, 1994). Assim, os componentes do meio de cultura devem suprir as exigências nutricionais necessárias ao microrganismo para formação da massa celular, satisfazer suas necessidades energéticas e desempenhar suas funções metabólicas, sendo necessário, portanto, fornecer carbono, nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, vitaminas e micronutrientes (ROITMAN et al., 1987).

Comparando fontes de nitrogênio orgânico com fontes de nitrogênio inorgânico, verificou-se que as últimas permitem uma produção de biomassa micelial relativamente baixa (BANO; RAJARATHNAM, 1988). Lee *et al.* (2004) também observaram baixa produção de biomassa quando nitrogênio inorgânico foi testado em substituição ao orgânico. É importante ressaltar que a fonte de nitrogênio também produz mudanças no pH do meio, influenciando no crescimento e rendimento micelial (BANO; RAJARATHNAM, 1988). Fang e Zhong (2002), ao comparar o efeito de fontes inorgânicas de nitrogênio (sulfato de amônio e cloridrato de amônio) com fontes orgânicas (extrato de levedura, peptona e caseína) sobre a produção de biomassa de *G. lucidum*, observaram maior crescimento micelial nos meios contendo nitrogênio orgânico.

A milhocina é um subproduto da produção de amido de milho. Industrialmente, o milho seco é macerado em uma solução de ácido sulfúrico a quente; a fração solúvel sofre uma suave fermentação láctica natural que ocorre devido à presença de bactérias na solução, e é, então, submetida a uma operação de evaporação, na qual a milhocina é concentrada. A milhocina é usada principalmente como suplemento alimentício para ruminantes, fonte de

nutrientes para aves, na confecção de iscas atrativas para as moscas das frutas e fonte de nutrientes para o processo de fermentação industrial (FILIPOVIC; RISTIC; SAKC, 2002).

A composição da milhocina é muito variável, dependendo da origem da matéria-prima e de seu processamento. Uma composição típica é mostrada na Tabela 1. Dentre os compostos variados encontram-se íons metálicos, vitaminas e outros compostos em pequenas quantidades.

Tabela 1– Composição típica de milhocina (AKHTAR *et al.*, 1998).

Substâncias	Porcentagem
Milhocina em base seca	50,7
pH	3,9
Proteína	40,8 (base seca)
Ácido láctico	16,0 (base seca)
Açúcares redutores	12,8 (base seca)
Compostos variados	30,4 (base seca)

A milhocina concentrada obtida pela Corn Products do Brasil Ltda, que foi utilizada nos experimentos deste trabalho, possui, além dos componentes majoritários, uma gama variada de vitaminas e minerais, os quais estão listados na Tabela 2. Na Tabela 2 encontra-se ainda a composição em aminoácidos da fração protéica da milhocina mencionada, que era de 33% (m/m, base seca). A composição pode ainda variar devido às diferenças entre as plantações de milho de região para região (MASARIN, 2006).

Tabela 2 – Composição aminoácidos, vitaminas e sais minerais de milhocina obtida pela Corn Products Brasil Ltda.

Aminoácidos (g de aminoácido/100g de proteína)

Alanina	9,83	Glicina	5,27	Metionina	1,98
Arginina	3,68	Histidina	3,72	Fenilalanina	2,85
Ácido aspártico	5,82	Isoleucina	3,07	Prolina	9,64
Cistina	2,20	Leucina	8,28	Serina	5,18
Ácido glutâmico	18,07	Lisina	4,75	Treonina	4,08
Triptofano	-	Tirocina	3,09	Valina	5,16

Vitaminas (mg/kg)

Biotina	0,3	Ácido pantotênico	15,0
Cholina	3.500,0	Piridoxina	9,0
Inositol	6.000,0	Riblovavina	6,0
Niacina	80,0	Tiamina	3,0

Minerais

Cálcio (%)	0,14	Magnésio (%)	0,6	Selênio (mg/kg)	0,3
Cobre (mg/kg)	15,0	Potássio (%)	2,8	Zinco (mg/kg)	60,0
Manganês (mg/kg)	20,0	Sódio (%)	0,1	Enxofre (%)	0,6
Ferro (mg/kg)	100,0	Fósforo (%)	1,8		

2.3 *Ceriporiopsis subvermispora*

Ceriporiopsis Dom. é um gênero poróide que pertence à família Polyporaceae (BURDSALL, 1998). *C. subvermispora* é uma espécie rara, encontrada em regiões temperadas e distribui-se no sul do Canadá, no norte da América do Norte e na Europa Central (Gilbertson e Ryvarden, 1986). Esse fungo é conhecido por sua grande seletividade na degradação de lignina (AKHTAR et al., 1998; FERRAZ et al., 2008).

Muitos estudos avaliaram os sistemas enzimáticos produzidos por essa espécie, quer em cultivos em meio líquido ou agindo diretamente sobre madeira. Atualmente está claro que as enzimas extracelulares produzidas por esse fungo compreendem as lacases, manganês peroxidase (MnP), xilanases, mananases e as enzimas do complexo celulolítico endoglicanases e β -glicosidases, enquanto as celobiohidrolases são produzidas em pequenas quantidades (FERRAZ; CÓRDOVA; MACHUCA, 2003; FERRAZ et al., 2008; GUERRA; MENDONÇA; FERRAZ, 2003; HEIDORNE et al., 2006; LOBOS et al., 1994;

RÜTTIMANN-JOHNSON et al., 1993; SETHURAMAN; AKIN; ERIKSSON, 1998; SOUZA-CRUZ et al., 2004). Recentemente, Harreither et al. (2009) relataram a secreção de celobiose desidrogenase em meio líquido a base de extrato de levedura e α -celulose em culturas com *C. subvermispora*. A atividade de LiP não foi detectada a partir de diversos meios e formas de cultivo desse fungo (ENOKI M. et al., 1999; JENSEN et al., 1996; LOBOS et al., 1994; RÜTTIMANN-JOHNSON et al., 1993; SOUZA-CRUZ et al., 2004) e a detecção de lacases, durante o biotratamento de materiais lignocelulósicos, foi estabelecida somente na presença de co-substratos de fácil assimilação como glicose e milhocina (CUNHA, 2008; ENOKI M. et al., 1999; FERRAZ; CÓRDOVA; MACHUCA, 2003; MASARIN, 2006; VICENTIM, 2007; VICUÑA et al., 1996).

Vários trabalhos desenvolvidos por nosso próprio grupo de pesquisa têm estudado, além do metabolismo, as alterações químicas e físicas de madeira biodegradada por *C. subvermispora*, principalmente com relação à degradação de lignina. Em geral, pode-se afirmar que o fungo despolimeriza lignina rapidamente a partir da quebra de ligações β -O-4 (GUERRA et al., 2004; GUERRA; MENDONÇA; FERRAZ, 2002; VICENTIM, 2007). Apesar de o fungo causar pequena perda de massa nos polissacarídeos, a celulose sofre despolimerização já a partir de 30 dias de cultivo sobre madeira (GUERRA; MENDONÇA; FERRAZ, 2003).

2.4 Clamidósporos

Clamidósporos correspondem a células vegetativas de parede espessa e citoplasma condensado que se formam dentro da hifa, sendo sua localização no meio ou na ponta da hifa. Foram observados clamidósporos nas três classes principais do reino fúngico. Como exemplo, podem-se citar os basidiomicetos *Coprinus cinereus*, *Cryptococcus laurenti* e *C. subvermispora* (KUES, 2000; KURTZMAN, 1973, SOUZA CRUZ, 2005), o ascomiceto

Duddingtonia flagrans (PARAUD et. al, 2005), e o zigomiceto *Rhizopus schipperae* (ANSTEAD et. al, 1999).

A capacidade do fungo de produzir clamidósporos, através de indução (provocando estresse ao fungo), pode minimizar problemas na produção de inóculo e estocagem, como demonstrado por Saxena e colaboradores (2001), onde os clamidósporos foram separados do micélio, estocados por longos períodos como um pó seco, à temperatura ambiente, mantendo-se viáveis.

Saxena e colaboradores (2001) induziram a formação de clamidósporos em *C. subvermispora* pela manipulação de diferentes parâmetros como estresse nutricional e osmótico. Dentre os diferentes meios de estresse testados o mais eficiente produziu cerca de $3,08 \times 10^6$ esporos/ml em 60 horas. Os clamidósporos foram separados do micélio por tratamento enzimático, liofilizados e estocados por até 6 meses à temperatura ambiente depois de empacotados.

2.5 Cultivo submerso de basidiomicetos em biorreatores

Os cultivos de basidiomicetos em biorreatores são realizados com os mais diferentes objetivos, alguns para produzir biomassa, outros para maximizar a produção de metabólitos de interesse e outros para o entendimento de como diferentes variáveis afetam a sua produção.

Tang e Zhong (2002) realizando o cultivo de *G. lucidum* em meio com extrato de levedura, dextrose/extrato de batata e lactose, em biorreator STR de 2 L, utilizando 180 rpm e aeração de 0,5 vvm, obtiveram 16,7 g de micélio/L após 10 dias de cultivo. Os mesmos autores, utilizando-se das mesmas condições, suplementaram o cultivo com 15 g/L de lactose no 10º dia e conseguiram 21,9 g/L de biomassa em 12 dias. Quando Kim et al. (2006) realizaram cultivos com *Ganoderma resinaceum* em meio com glicose e peptona de soja em biorreator STR de 5 L, com 2 vvm de aeração e 150 rpm de agitação, e suplementaram o

cultivo com 50 g/L de glicose aos 6 dias de cultivo, conseguiram 42 g/L de biomassa micelial. Tang e Zhong (2003), em cultivo com *G. lucidum*, variaram a taxa de aeração de 0,1 a 1 vvm em biorreator de 3,5 L com agitação de 200 rpm, e conseguiram um valor de biomassa máxima de 15,6 g/L em 10 dias de cultivo usando 0,5 vvm de aeração. Mao e Zhong (2004) realizaram o crescimento de *Cordyceps militares* variando o k_{La} de 11,5 a 113 h⁻¹ em biorreator STR de 5 L e conseguiram maiores valores de biomassa (20,12 g/L) com k_{La} 113 h⁻¹. Lee et al. (2004) otimizaram as condições de cultivo em meio submerso, em biorreator STR de 5 L para o crescimento de *Grifola frondosa* e conseguiram um máximo de biomassa de 16,8 g/L em 9 dias de cultivo, utilizando pH 5,0, taxa de aeração de 1,16 vvm e agitação de 166 rpm. Park et al. (2002) investigaram o efeito da intensidade da agitação na produção de micélio de *C. militares* em biorreator STR de 5L variando de 50 a 300 rpm, e obtiveram maior valor de biomassa (22,2 g/L) em 8 dias de cultivo utilizando 300 rpm. Xu et al. (2006) também obtiveram um máximo de concentração de biomassa (21,06 g/L) para a agitação de 300 rpm, cultivando *Paecylomyces tenuipes*.

Anterior à execução do presente trabalho, somente em um artigo descreveu-se o cultivo de *C. subvermispora* em biorreator agitado e aerado. Nesse caso, cultivos agitados a 150 rpm e aerados a 1 vvm foram conduzidos em biorreator do tipo STR de 40 L com a finalidade de produzir a enzima celobiose desidrogenase. O meio utilizado era composto de α -celulose e extrato de levedura, ambos a uma concentração de 30 g/L. Nesse experimento não foi descrita a biomassa acumulada ao longo do cultivo (HARREITHER et al. 2009).

Embora todos os cultivos descritos anteriormente tenham empregado basidiomicetos, nota-se que existe uma grande variação nas quantidades de biomassa máxima encontrada pelos autores devido ao fato de cada espécie necessitar de condições ótimas específicas de aeração, agitação, pH e nutrição, dentre outros fatores. O fato é que se sabe muito pouco sobre o comportamento de *C. subvermispora* em cultivos submersos em biorreatores e esta

dissertação vem elucidar um pouco sobre formas adequadas de se produzir micélio deste fungo em culturas submersas.

3. OBJETIVOS

O objetivo principal dessa dissertação foi buscar formas adequadas de produzir micélio de *Ceriporiopsis subvermispota* em culturas submersas para a preparação de inóculo destinado ao processo de biopolpação.

Para atingir esse objetivo, o presente trabalho foi dividido nas seguintes etapas:

- Avaliar o crescimento de *C. subvermispota* em culturas submersas conduzidas em Erlenmeyers de 250 mL mantidos sem agitação;
- Avaliar o crescimento de *C. subvermispota* em culturas submersas conduzidas em biorreator agitado por pás, de 1,5 L.
- Avaliar o crescimento de *C. subvermispota* em culturas submersas conduzidas em um biorreator de 14 L especialmente desenhado para minimizar o efeito de cisalhamento das hifas fúngicas, mantendo níveis elevados de aeração.
- Monitorar a formação de clamidósporos nos cultivos citados anteriormente
- Verificar a capacidade inoculante de madeira para o micélio e os clamidósporos obtidos

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Fungo estudado e manutenção do cultivo

O fungo utilizado nesse trabalho foi o basidiomiceto de decomposição branca *Ceriporiopsis subvermispora* (Pilát.) Gilbn. & Ryv., cepa SS-3. A cepa foi mantida realizando-se repiques sucessivos sobre meio composto por extrato de malte (2%) e extrato de levedura (0,2%). Em tubos de ensaio com o fungo em fase de crescimento foram adicionados pequenos cavacos de madeira de *Pinus taeda*, com aproximadamente 0,2 x 2,4 x 0,2 cm. Após colonização desses cavacos, os tubos foram estocados em refrigerador a 4 °C por períodos de até 6 meses. Cada procedimento de repique de manutenção foi realizado pela transferência dos cavacos colonizados para placas de Petri com o mesmo meio de manutenção e, após o crescimento, novos tubos foram preparados a partir de micélio oriundo das bordas da placa em fase de crescimento.

4.2 Meios de cultura utilizados nos ensaios

Os meios de cultura utilizados corresponderam a meios complexos compostos por uma fonte de carbono principal e uma fonte de nitrogênio mais micronutrientes. Um dos meios em questão foi denominado de BD-EL e continha 2,4% de extrato de batata (Difco) e 0,7% extrato de levedura (Oxoid). Esse meio foi testado ainda na forma tamponada com acetato de sódio 10 mM. Para isso, 0,048% (v/v) de ácido acético glacial e 0,0207% (p/v) de acetato de sódio foram adicionados ao meio recém preparado. O pH desse meio tamponado foi verificado e, quando necessário, foi corrigido para 4,0 com HCl 1,0 M. O outro meio utilizado foi denominado de SM e continha 2% de sacarose e 3,21% de milhocina (base úmida). A milhocina utilizada foi obtida junto à empresa Corn Products do Brasil e continha 47% de matéria seca e 33% de proteína total.

4.3 Cultivos de *C. subvermispora* em meio líquido contido em Erlenmeyers de 250 mL

A partir dos cultivos-estoque de *C. subvermispora*, foram preparados repiques em placas de Petri contendo 2,4% de extrato de batata (Difco) e 0,7% de extrato de levedura (Oxoid) e 2% de ágar (Vetec). Após o crescimento do micélio até as bordas da placa (cerca de 7 dias) foram retirados discos de 8 mm de diâmetro dessas placas os quais foram inoculados em Erlenmeyers de 250 mL contendo 20 mL de meio líquido DB-EL tamponado com 10 mM de acetato de sódio em pH 4,0 para um grupo de experimentos e SM para outro grupo de experimentos. Os meios utilizados foram previamente autoclavados, já no interior dos Erlenmeyers, a 121 °C por 15 min. Cada Erlenmeyer foi inoculado com 2 discos. Os cultivos foram mantidos estáticos a 27 °C por períodos variáveis até 22 dias. Após períodos definidos, o conteúdo de cada frasco foi transferido para uma proveta de 50 mL, o volume da suspensão foi ajustado a 20 mL para compensar eventuais perdas de volume por evaporação ocorrida ao longo do período de incubação e a mistura foi filtrada sobre papel de filtro qualitativo. Para cada período de amostragem foram inoculados 3 frascos. Os dados descritos no capítulo de resultados e discussão correspondem às médias e os respectivos desvios padrão das triplicatas.

4.4 Cultivos de *C. subvermispora* em meio líquido contido em biorreatores

4.4.1 Biorreator Agitado de 1,5 L

- **Preparo do inóculo:** A partir dos cultivos-estoque de *C. subvermispora*, foram preparados repiques em placas de Petri contendo 2,4% de extrato de batata (Difco) e 0,7% de extrato de levedura (Oxoid) e 2% de ágar (Vetec). Após o crescimento do micélio até as bordas da placa (cerca de 7 dias) foram retirados discos de 8 mm de diâmetro dessas placas os quais foram inoculados em Erlenmeyers de 250 mL contendo 20 mL de meio líquido SM. O inóculo

permaneceu em incubação estática por 15 dias em estufa a 27 ± 2 °C. O micélio que foi obtido do cultivo em meio líquido foi então batido 10 vezes em um liquidificador com copo de aço inox (METVISA) de 3 L. Cada ciclo de homogeneização em liquidificador foi de 15 segundos com intervalos sem agitação de 45 segundos para evitar o aquecimento. Uma alíquota do inóculo em questão foi utilizada para a determinação da massa seca de fungo presente na suspensão. Para determinar a massa seca, a alíquota foi filtrada em papel de filtro previamente seco e tarado. O material retido no filtro, juntamente com o papel, foram secos, inicialmente a 60 °C e posteriormente a 100 °C, até atingir massa constante.

- Inoculação do biorreator: o biorreator utilizado foi do tipo agitado por pás e aerado (STR) (Bioflo III, New Brunswick Scientific Co. Inc.) apresentado na Figura 4.



Figura 4 - Biorreator Bioflo III (New Brunswick Scientific Co.) utilizado nos cultivos descritos no item 4.4.1.

O biorreator apresenta volume total de 1,5 L, diâmetro interno de 12 cm, fundo arredondado, agitador do tipo turbina de seis pás planas com diâmetro de 5,4 cm e quatro chicanas diametralmente opostas. O aspersor de ar utilizado foi do tipo anel de aço inox e está localizado na base do biorreator. Na saída de ar do biorreator foi acoplado um condensador refrigerado com água para minimizar as perdas de água por evaporação ao longo do cultivo.

O meio de cultura utilizado no biorreator foi o SM adicionado do anti-espumante adecanol a 0,77 mL/L. O meio de cultivo foi autoclavado em Erlenmeyer de 2 L a

121 °C/1atm por 15 min. O biorreator foi autoclavado separadamente do meio de cultura a 121 °C por 30 min. O volume de meio adicionado ao biorreator foi de 1,3 L.

O cultivo foi iniciado com a adição de 40 mL de inóculo de micélio batido em liquidificador, correspondendo a 3% (v/v) ou 0,16 g de micélio seco/L de meio inoculado. A velocidade de agitação das pás foi de 166 rpm e a aeração foi de 1,16 vvm (LEE et. al, 2004). O cultivo foi realizado a 27 °C por um período de 12 dias e, em períodos definidos, foram retiradas amostras para determinação de pH, açúcares redutores e biomassa. Das amostras, um pequeno fragmento de micélio foi retido e observado por microscopia ótica. No final do experimento, o conteúdo do biorreator foi filtrado e o micélio foi lavado com água, seco inicialmente a 60 °C e posteriormente a 100 °C até massa constante.

4.4.2 Cultivos em biorreator de 14 L

- **Desenho do biorreator:** o biorreator utilizado foi desenhado e construído no Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena -USP. O desenho do biorreator está mostrado na Figura 5. As partes, numericamente indicadas, estão descritas a seguir:

1 – Tanque de vidro em forma cilíndrica com 420 mm de altura e 220 mm de diâmetro. O tanque apresenta uma capacidade de 14 L e volume operante de 10 L e foi adquirido diretamente do fabricante (Pyrex).

2 - Eixo central rotacional oco de aço inoxidável 316 em forma de “L” com o comprimento e diâmetro mostrados na Figura 5, fechado em cima e aberto embaixo para saída do ar.

- 3 - Motor com rotor central passível de ajuste na velocidade de rotação (Fisaton);
- 4 – Entrada de ar ligada ao eixo rotacional em “L”
- 5 – Bico para a retirada de amostra acoplada a uma torneira de bronze;
- 6 – Tubo de alimentação de líquidos através do qual foi possível adicionar soluções de nutrientes ou ácido quando demandado. A adição nesse caso foi feita com o auxílio de uma bomba peristáltica (VELP SCIENTIFICA)
- 7 – Tubo de saída de ar

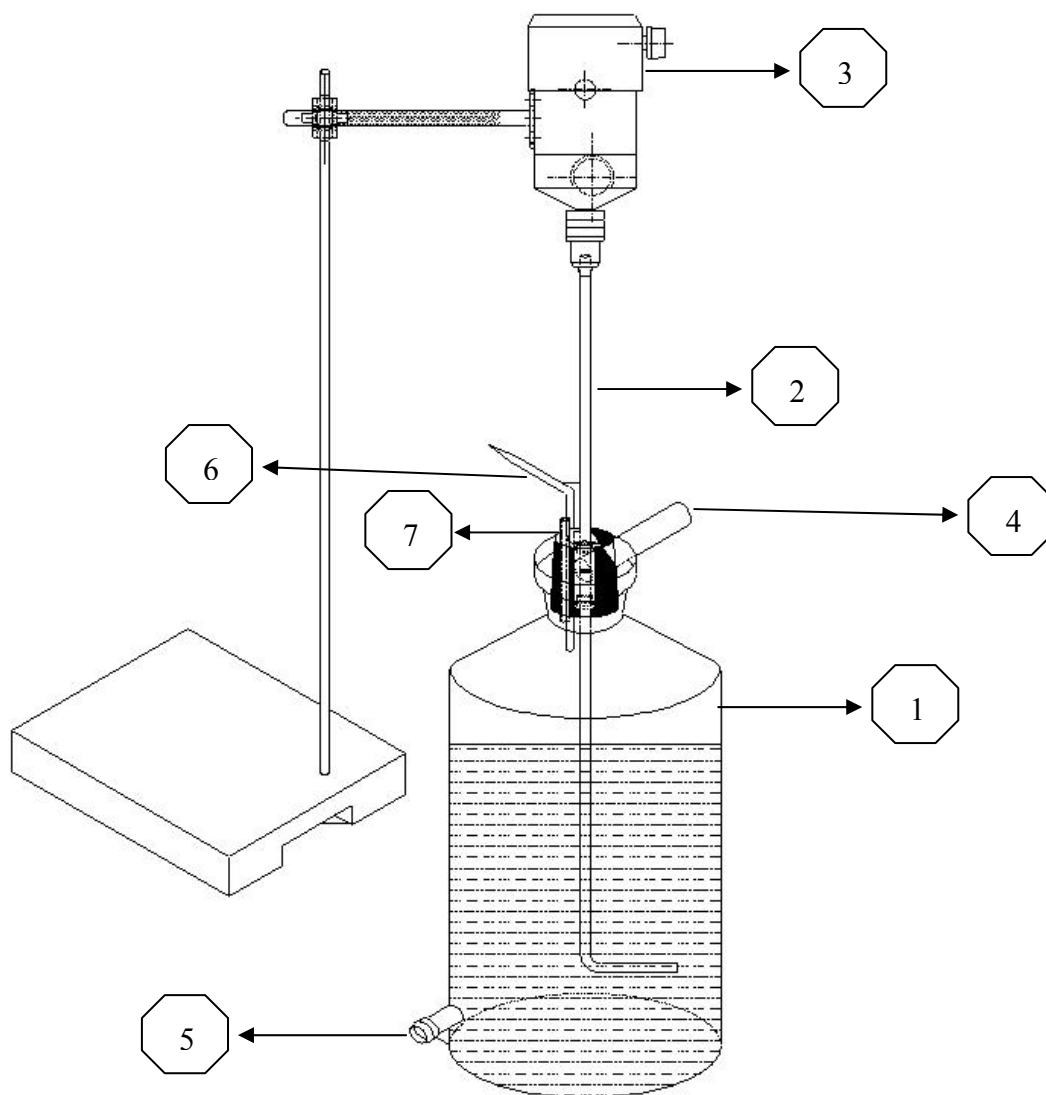


Figura 5 - Biorreator de baixo cisalhamento (BBC) de 14 L com agitação e aeração por tubo em “L”.

O biorreator descrito anteriormente foi idealizado para que o cisalhamento das hifas fosse mínimo, mas ainda mantivesse a aeração eficiente e permitisse certo grau de agitação. O funcionamento do biorreator tal como proposto, somente foi possível pelo invento da “rolha” (tampa que fecha o biorreator na parte superior), cujo projeto aparece na Figura 6, permitindo

a aeração e a agitação simultaneamente. A entrada de ar no tubo em “L”, que está sob rotação, ocorre através de micro-orifícios distribuídos ao longo de toda a circunferência da parte do tubo que fica no interior da “rolha”.

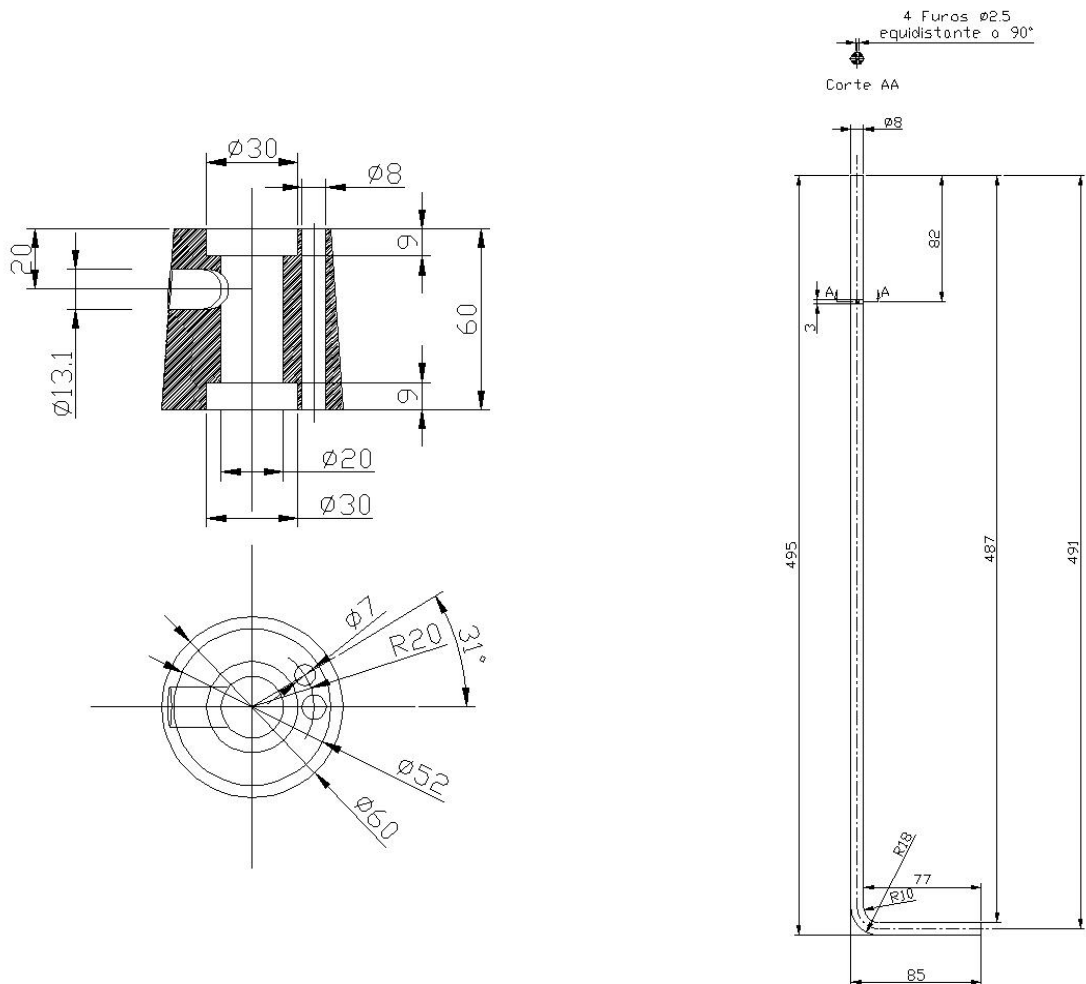


Figura 6 - Projeto da rolha e da haste usada no biorreator.

- **Determinação do k_{La} :** O k_{La} (coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio) no biorreator de 14 L foi determinado a partir da medida de O_2 dissolvido no meio obtida com o auxílio de um eletrodo específico imerso no líquido submetido à aeração (SCHMIDELL, 2001). Inicialmente, injetou-se nitrogênio no meio líquido composto de 2% de sacarose e 3,21% de milhocina, pH 4,5, até a sonda, previamente calibrada no líquido saturado de O_2 , indicar o valor de corrente zero, indicando a eliminação do O_2 dissolvido. A seguir, iniciou-se

a aeração do meio a 1 vvm, 166 rpm de rotação da haste a 27 °C, passando-se a registrar o sinal da sonda em função do tempo. O $k_L a$ foi obtido através da Equação (1).

$$\ln\left(1 - \frac{C}{C_s}\right) = -k_L a \cdot t \quad (1)$$

Onde: C é a concentração de oxigênio no líquido, C_s é a concentração de saturação de oxigênio.

- **Preparo do inóculo:** O inóculo foi preparado da mesma forma que o descrito no item 4.4.1, exceto que o pré-cultivo em meio líquido foi conduzido em 200 mL de meio contido em Erlenmeyers de 2 L inoculados com 20 discos retirados das placas de Petri pré-cultivadas com *C. subvermispora*.

- **Inoculação do biorreator e condução do cultivo:** Para um volume de operação de 10 litros contendo meio MS e 10 mL de antiespumante Antifoam 204 (Sigma), o biorreator foi inoculado com o conteúdo de dois frascos de inóculo provenientes de cultivos em Erlenmeyers de 2 L, correspondendo a 4% (v/v) ou 0,25 g de micélio seco/L de meio inoculado. As condições estabelecidas para o cultivo foram: temperatura de 27 ± 2 °C, frequência de giro do tubo em “L” de 166 rpm e aeração de 1 vvm, mantidas até o final do período de cultivo. Não houve controle do pH. A aeração foi controlada por rotâmetro apropriado (New Brunswick Scientific Co.). O ar injetado no biorreator passou previamente por um frasco de vidro com água autoclavada (saturação com água para evitar perda de volume no biorreator) e por um filtro autoclavado com membrana de 0,22 μ m de poro.

Em períodos definidos, foram retiradas amostras para determinação de pH, açúcares redutores, biomassa, clamidósporos e O_2 dissolvido. A concentração de O_2 dissolvido foi determinada em amostras coletadas em um tubo que foi preenchido até o seu volume máximo

e imediatamente fechado com tampa de borracha. A amostra foi então transferida, sem agitação, para a cela de um oxímetro (Hansasetch). A cela foi lacrada e o teor de O₂ dissolvido foi medido contra calibração do oxímetro com água deionizada saturada de O₂.

De todas as amostras retiradas, durante o período de crescimento do fungo no biorreator de 14 L, um pequeno fragmento de micélio foi retido e observado por microscopia ótica. No final do experimento o conteúdo do biorreator foi filtrado e o micélio foi lavado com água, seco inicialmente a 60 °C e posteriormente a 100 °C até massa constante.

Foram feitos três cultivos neste biorreator (*A*, *B* e *C*), descritos a seguir:

- **Cultivo A:** foi feito seguindo exatamente todas as condições acima descritas.

- **Cultivo B:** foi feito seguindo todas as condições do *A*, porém com controle de pH.

Para isso, as amostras retiradas em intervalos de tempo pré-determinados foram avaliadas quanto ao pH. Quando apresentavam valor superior a 4,5, a amostra foi titulada com HCl 2 M até que o pH voltasse a 4,5. O volume de HCl 2 M usado na titulação foi anotado e a partir de um cálculo de proporcionalidade foi definido o volume total de HCl 2 M a ser adicionado ao biorreator. O volume de HCl 2 M definido foi autoclavado a 121 °C por 15 min e então injetado no biorreator pelo tubo de alimentação com o auxílio de uma bomba peristáltica. O volume total injetado foi sempre acrescido de 5 mL que representava o volume “morto” da tubulação empregada.

- **Cultivo C:** foi realizado com as mesmas condições de *A*, porém ao quinto dia de cultivo foi introduzida no biorreator, pelo tubo de alimentação, 100 mL de uma solução contendo 50 g de sacarose previamente autoclavada de modo a suprir deficiências de fonte de carbono no meio.

4.5 Métodos analíticos

4.5.1 Determinação de açúcares redutores

Os filtrados dos cultivos foram recolhidos para determinação de açúcares redutores totais e o micélio foi lavado com água. A determinação de açúcares redutores foi feita após pré-hidrólise ácida, diluindo-se o caldo com HCl 1 M e mantendo-se a mistura por 10min em banho maria a 100 °C e neutralizando-se posteriormente com NaOH 1 M. A determinação de açúcares redutores foi feita de acordo com o método do DNS, conforme descrito por Souza-Cruz et al. (2004).

4.5.2 Determinação da biomassa

Nos cultivos com Erlenmeyer, os discos de inóculo proveniente das placas foram removidos e a biomassa retida no filtro de papel, previamente seco e tarado, foi seca inicialmente a 60 °C e posteriormente a 100 °C até massa constante. As amostras coletadas nos biorreatores também foram filtradas e feitas análises iguais às anteriores.

4.5.3 Determinação dos clamidósporos

Um pequeno fragmento do micélio retido no filtro foi removido antes da secagem e observado por microscopia ótica, utilizando uma gota de solução aquosa de floxina 1% (p/v) como corante (GILBERTSON; RYVARDEN, 1986). A determinação dos clamidósporos foi feita pela estimativa da sua quantidade por observação visual, de acordo com o seguinte critério: muito (++++), médio (+++), pouco (++) , pouquíssimo (+) e ausência (-) (Figura 6).

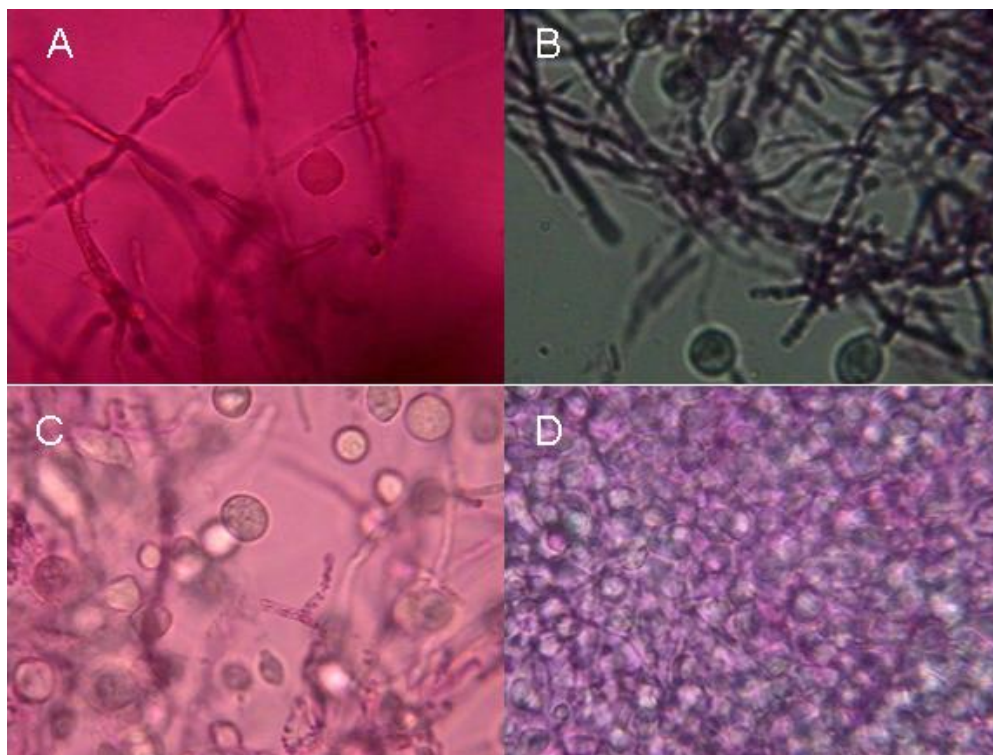


Figura 7 – Classificação visual da quantidade de clamidósporos em (D) muito (++++), (C) médio (+++), (B) pouco (++) e (A) pouquíssimo (+).

4.5.4 Determinação do pH

O pH de cada amostra foi determinado em pH-metro digital da marca Quimis, modelo Q-400.

4.6. Preparação das madeiras para a biodegradação

As madeiras de *Eucalyptus grandis* foram fornecidas pela empresa Melhoramentos Ltda. (Caieiras – SP). Cavacos dessa madeira medindo cerca de 3,0 x 1,2 x 0,2 cm foram secos ao ar e estocados em condições isentas de umidade. Previamente aos experimentos de biodegradação, os cavacos foram imersos em água por um período de 16 horas. O excesso de água foi então drenado e os cavacos foram esterilizados no interior de Erlenmeyers de 2 L a 121 °C por 15 minutos.

4.7. Experimentos de biodegradação de madeira e viabilidade dos clamidósporos na colonização da madeira

Erlenmeyers de 2 L foram carregados com 50 g de cavacos (base seca) de *Eucalyptus grandis* e inoculados com uma suspensão de micélio e clamidósporos de 500 mg de fungo/kg de madeira. O inóculo foi proveniente do *cultivo C* (biorreator de 14 L) no 14º dia de fermentação. Para testar a viabilidade do clamidósporo foram feitos dois tipos de cultivo, em triplicata: um com micélio normal, imediatamente após ser retirado do biorreator, e outro com micélio que foi triturado em liquidificador por 10 ciclos de 15 segundos, com intervalos de 45 s, após ser retirado do biorreator. O inóculo assim preparado continha essencialmente clamidósporos viáveis e não hifas, que foram cortadas pela ação das lâminas do liquidificador. Os cultivos foram incubados por períodos de 15 dias e ficaram acondicionados em câmaras de crescimento (27 ± 2 °C) com saturação de umidade do ar para prevenir a perda de água da madeira. Após 15 dias de cultivo a atividade enzimática de MnP produzida nesses cultivos foi determinada.

4.7. 1 Extração das enzimas

A extração das enzimas foi conduzida com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,5, adicionado de 0,01% de Tween 60 (MACHUCA; FERRAZ, 2001; SOUZA-CRUZ et al. 2004). Ao término de 15 dias de incubação foram adicionados 200 mL de solução de extração aos Erlenmeyers. Foi realizada uma extração de 5 horas, sob agitação (120 rpm) a 14 °C. Foi utilizado o período de 5 horas de extração com base no estudo realizado por SOUZA-CRUZ et al. (2004), que demonstraram que cerca de 50% da atividade enzimática de MnP contida no cultivo é extraída nesse período. A atividade enzimática foi expressa como unidades internacionais (UI) por quilograma de madeira inicial.

4.7. 2 Determinação da atividade da enzima MnP

A MnP foi determinada pela oxidação de vermelho de fenol 0,1%. A reação foi conduzida em tubos de ensaio que continham 1,5 mL de tampão succinato de sódio 20 mM (pH 4,5), 1,5 mL de lactato de sódio 50 mM, 0,5 mL de extrato, 0,5 mL de vermelho de fenol 0,1%, 0,5 mL de MnSO_4 1 mM, 0,25 mL de albumina bovina 2 mM e 0,25 mL de peróxido de hidrogênio 2 mM (LUNDELL et al.,1990). Em intervalos de tempo definidos entre 1 e 10 minutos, 1 mL da solução contida no tubo de ensaio foi removida e a esse volume foram adicionados 30 μL de hidróxido de sódio 6,5 M para interromper a reação e realizar a leitura no espectrofotômetro. A cinética da reação foi avaliada medindo-se a absorbância do produto de reação a 610 nm. A atividade de MnP foi calculada com base na absortividade molar do vermelho de fenol oxidado ($22.000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) (KHINDARIA et al., 1994).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação de meios de cultivo e condições apropriadas para a produção de micélio de *C. subvermispora* abordadas nessa dissertação, tomou como base uma série de trabalhos anteriores que visavam essencialmente estudar a fisiologia do fungo em questão ou produzir micélio em escala laboratorial para inoculação de madeira destinada a processos de biopolpação. O meio mais comumente utilizado nesses estudos é composto por 2,4% de dextrose/extrato de batata e 0,7% de extrato de levedura (DB-EL) (SOUZA-CRUZ et al., 2004). Quando os cultivos são realizados em Erlenmeyers de 2 L contendo 200 mL de meio DB-EL, a produção de micélio é baixa, sendo da ordem de 3,5 g/L após 12 dias de crescimento, correspondendo a uma produtividade aproximada de 0,3 g/L.dia (SOUZA-CRUZ, 2005). Cultivos similares, conduzidos em Erlenmeyers de 250 mL contendo 20 mL de meio, podem produzir quantidades proporcionalmente maiores de micélio em tempos mais curtos de crescimento. Macedo e Ferraz (2002) obtiveram 9,6 g/L aos 10 dias de cultivo em 2 mL de meio DB-EL em Erlenmeyers de 250 mL. Cunha (2008) obteve 7 g/L após 9 dias de cultivo em meio composto por 2% de extrato de malte e 0,2% de extrato de levedura. Nos dois casos anteriores, o pH inicial do meio era de 5,0-5,5. Aguiar et al. (2006) obtiveram 3,6 g/L aos 6 dias de cultivo em meio composto por sais inorgânicos e 1% de glicose como a única fonte de carbono. Nesse caso, o pH inicial do meio era de 4,1, o que ocasionou uma maior velocidade inicial de crescimento, porém a biomassa acumulada final foi menor, visto que o fungo acidificou ainda mais o meio nos primeiros dias de crescimento.

Partindo dos experimentos descritos anteriormente e considerando uma otimização do crescimento de *C. subvermispora* em placas de Petri, que indicou uma velocidade máxima de crescimento em pHs entre 3,5 e 5,0 (SOUZA-CRUZ, 2005), na presente dissertação buscou-se avaliar condições de crescimento de *C. subvermispora* adequadas para uma maior produtividade de micélio. Para isso, foram avaliados cultivos em biorreatores agitados,

incluindo um biorreator com desenho inédito, além de meios de cultivo potencialmente de menor custo.

5.1 Crescimento de *C. subvermispora* em cultivos sem agitação conduzidos em Erlenmeyers

Num primeiro grupo de experimentos avaliou-se o crescimento de *C. subvermispora* ainda em culturas sem agitação, porém utilizando meio DB-EL tamponado em pH 4,0, a fim de verificar se a produção de micélio poderia ser aumentada com um controle mais adequado de pH durante o cultivo. O acúmulo de biomassa e o consumo de açúcares redutores durante esse cultivo são mostrados na Figura 8.

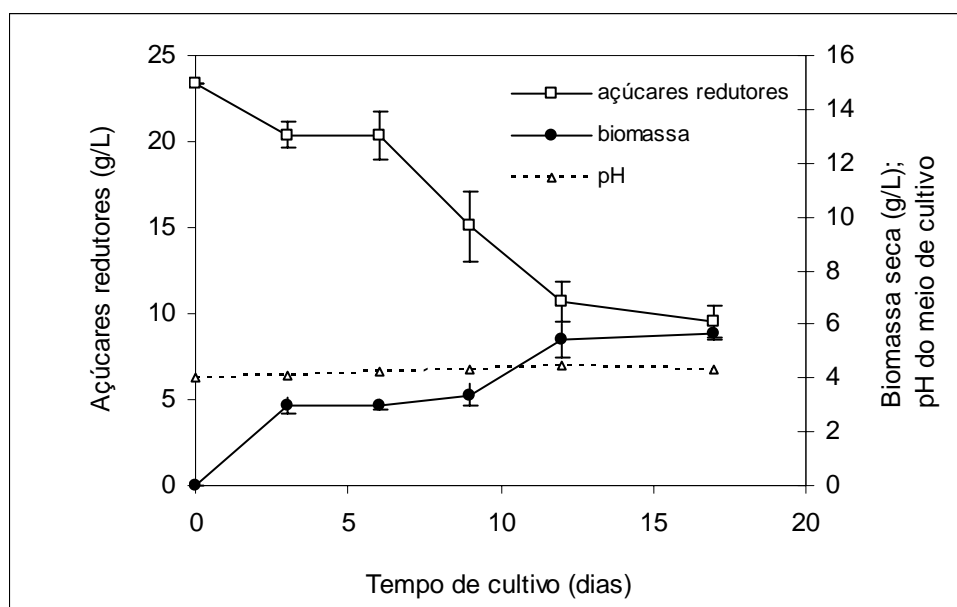


Figura 8 - Curva de crescimento e consumo de açúcares por *C. subvermispora* SS3 em meio composto por 2,4% de dextrose/extrato de batata e 0,7% de extrato de levedura, tamponado com acetato de sódio 10 mM (pH 4,0). Cultivos realizados em Erlenmeyers de 250 mL com 20 mL de meio mantidos estáticos a 27 °C.

Os dados mostrados na Figura 8 indicam que a biomassa máxima obtida neste cultivo foi de 5,69 g/L com 17 dias de cultivo. A Figura 8 mostra ainda que o consumo de açúcar não foi completo quando o crescimento fúngico estava na região de máximo. Com 17 dias de cultivo, somente 59% do açúcar inicial foi consumido, sugerindo que o crescimento foi limitado por algum outro fator que não fosse a disponibilidade de fonte de carbono, ou que os açúcares restantes no meio estejam em uma forma não metabolizável (polissacarídeos que o fungo não consegue utilizar, por exemplo). No mesmo meio de cultivo (BD-EL), porém sem tampão acetato, Macedo e Ferraz (2002) obtiveram 9,6 g/L de micélio aos 10 dias de cultivo, o que indica que o acetato pode ter atuado como inibidor do crescimento de *C. subvermispora*.

Alguns cultivos similares reportados para outros basidiomicetos servem de parâmetro comparativo para o presente trabalho. Por exemplo, Burns et al. (1994) também observaram que a produção de biomassa foi limitada após 20 dias de cultivo de *Pleurotus ostreatus* var *florida*, mesmo com a presença de glicose no meio. Os autores sugeriram que o crescimento limitado era decorrência da secreção de um exopolissacarídeo comumente produzido por basidiomicetos. Esse exopolissacarídeo poderia funcionar como uma barreira física para a difusão de nutrientes presentes no meio líquido. Gern et al. (2008), utilizando *Pleurotus ostreatus*, observaram que apenas 67% da concentração inicial de glicose foi consumida num cultivo em meio líquido. Os autores também sugeriram que o aumento da viscosidade no meio, decorrente da secreção de exopolissacarídeos, levou a uma dificuldade de absorção dos nutrientes pela célula.

Ainda em cultivos sem agitação em Erlenmeyers, avaliou-se uma alternativa potencialmente mais barata de meio de cultura. O meio em questão foi composto com 2% de sacarose como principal fonte de carbono e 3,2% de milhocina como fonte complexa de nitrogênio e micronutrientes (meio SM). Nesse caso não se utilizou tampão acetato para o controle do pH em vista da potencial inibição do crescimento observada nos experimentos

anteriores. O pH inicial do meio em questão é igual a 4,5 e não foi ajustado, pois a velocidade máxima de crescimento de *C. subvermispota* ocorre em valores de pH entre 3,5 e 5,0 (SOUZA-CRUZ, 2005). Os resultados para um cultivo conduzido em Erlenmeyers de 250 mL com 20 mL desse meio são mostrados na Figura 9. Vale ressaltar que o monitoramento analítico de açúcares redutores nesses cultivos foi feito após uma etapa de pré-hidrólise ácida (ver parte experimental).

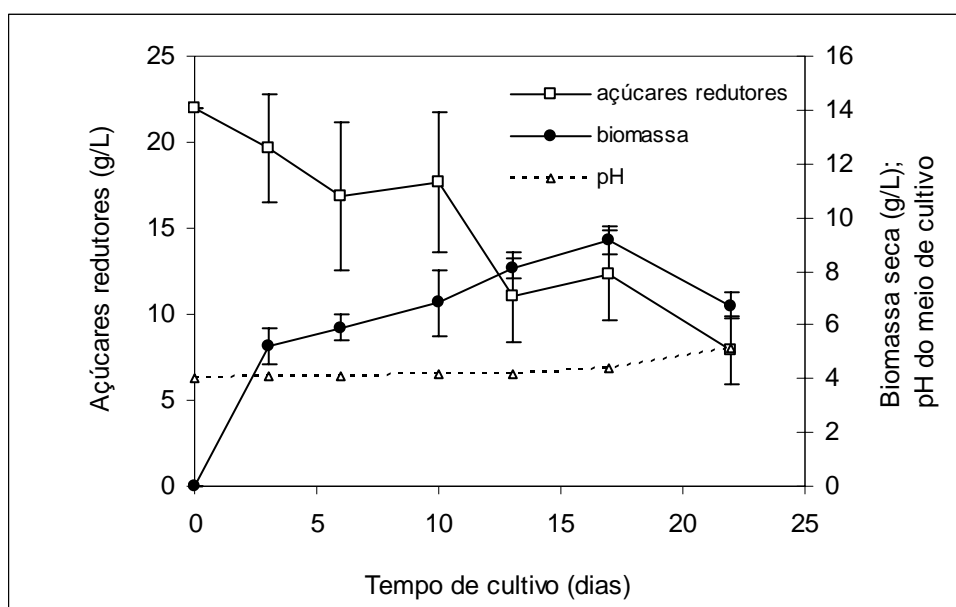


Figura 9 - Curva de crescimento e consumo de açúcares por *C. subvermispota* SS3 em meio composto por 2% de sacarose e 3,2% de milhocina. Cultivos realizados em Erlenmeyers de 250 mL com 20 mL de meio mantidos estáticos a 27 °C.

É possível observar na Figura 9 que o valor máximo de biomassa fúngica obtida foi de 9,2 g/L aos 17 dias de cultivo. Esse dado foi similar ao obtido por Macedo e Ferraz (2002) em meio BD-EL, que apresenta valor comercial significativamente maior do que o meio SM.

Essencialmente, a alteração do meio BD-EL para o SM significa uma mudança expressiva na qualidade da fonte de nitrogênio e na disponibilidade de micronutrientes, visto que em termos da fonte de carbono, tanto sacarose como dextrose podem ser assimiladas por

C. subvermispora e foram mantidas em 2%. Vale ressaltar que no caso do nutriente extrato de batata/dextrose, 2,4% de concentração total corresponde a 2% de dextrose e 0,4% de extrato de batata (informação disponível no rótulo do produto marca DIFCO). A relação C/N foi mantida aproximadamente constante nos dois meios, tomando-se como base os teores de nitrogênio total descritos para cada uma das fontes de nitrogênio usadas. O extrato de levedura contém 9,8% (m/m) de nitrogênio total (informação disponível no rótulo do produto usado, marca Oxoid), correspondendo a uma concentração final no meio de 0,07% (m/v). No caso da milhocina, o teor de proteína total reportado pelo fabricante (folheto informativo - Corn Products do Brasil) é de 33% (m/m) que, convertido em teor nitrogênio total, indica um teor de 4,9% de N (g/100g de milhocina seca). Como o teor de sólidos na milhocina usada era de 47%, os 3,21% de milhocina *in natura* correspondem a aproximadamente 0,07% de N (m/v) no meio SM usado.

Gern et al. (2008) também avaliaram a substituição de extrato de levedura por milhocina em meios de cultura destinados a produção de biomassa e exopolissacarídeos por *P. ostreatus*. Nesse caso, a substituição do extrato de levedura por milhocina resultou uma maior biomassa no final dos cultivos. Estes dados corroboram com Kim et al. (2005), que estudaram diferentes fontes de nitrogênio para cultivos com *Agrocybe cylindracea* e constataram valores maiores de biomassa usando milhocina ao invés de extrato de levedura.

Também nos cultivos com o meio SM, o açúcar disponível não foi completamente consumido após o final do crescimento, sendo que somente 42% do açúcar inicial foi assimilado pelo fungo (Figura 9). Kim et al. (2005), comparando sete fontes de carbono com concentração de 20 g/L nos meios de cultivo, encontraram valores maiores de biomassa em glicose do que em sacarose, para *A. cylindracea*. Joo et al. (2004), também investigando os efeitos de diferentes fontes de carbono em concentração de 20 g/L sobre o crescimento micelial de *Sarcodon aspratus*, verificaram que o máximo crescimento micelial (10,62 g/L)

foi obtido com glicose. Esses dados sugerem que alguns fungos assimilam glicose de forma mais eficiente do que sacarose (que requer a secreção de invertases para conversão em monômeros), o que também pode acontecer com *C. subvermispora*. No entanto, vale ressaltar que a preferência por glicose parece ser característica de algumas espécies, pois resultados contrários foram encontrados por Xu e Yun (2003) que, ao avaliarem seis diferentes fontes de carbono para o crescimento de *Auricularia polytrichae* em frascos agitados, encontraram maiores níveis de biomassa micelial (8,26 g/L) quando sacarose foi testada em concentração de 10 g/L.

Nos cultivos em meio SM o pH se manteve praticamente constante durante 17 dias (Figura 9), o que pode ser decorrente de certo efeito tamponante causado pela milhocina, a qual contém uma mistura de polipeptídios. Com base nos experimentos conduzidos em cultivos sem agitação, ficou claro que deve haver uma limitação nutricional no meio em uso e/ou há uma limitação de O₂ dissolvido que faz com que não ocorra o consumo total da fonte de carbono disponível. Considerando que os meios em questão apresentam fontes de nitrogênio complexas (extrato de levedura ou milhocina) e que estas carregam ainda micronutrientes diversos, avaliou-se inicialmente se o crescimento fúngico estava sendo prejudicado pela limitação de O₂ dissolvido. Para fungos aeróbios, a disponibilidade de O₂ dissolvido é uma das mais importantes variáveis que afetam o crescimento. No caso dos basidiomicetos que degradam madeira, o crescimento se torna muito limitado quando os níveis de umidade do substrato ultrapassam o ponto de saturação das fibras (geralmente acima de 60% m/m), justamente porque nessas situações são criados ambientes anaeróbios no interior dos poros da madeira (LEVY, 1987). O efeito da aeração nos cultivos pode ser avaliado em pequena escala utilizando Erlenmeyers em agitadores orbitais para manter o nível de O₂ dissolvido acima daqueles usualmente encontrados em cultivos sem agitação (MAO; ZHONG, 2004). No entanto, estudos anteriores com *C. subvermispora*, em nosso próprio

grupo de pesquisas, mostraram que cultivos agitados dessa espécie raramente eram reprodutíveis em termos de crescimento fúngico (dados não publicados). Dessa forma, passou-se a avaliar cultivos em biorreatores agitados, onde os níveis de aeração podem ser eficientemente controlados.

5.2 – Crescimento de *C. subvermispota* em biorreator de 1,5 L com meio agitado por turbina de pás (STR)

Um novo grupo de experimentos foi realizado, correspondendo a cultivos em biorreator agitado de 1,5 L contendo 1,3 L de meio SM. Os resultados obtidos para biomassa seca, consumo de açúcares redutores e pH estão apresentados na Figura 10.

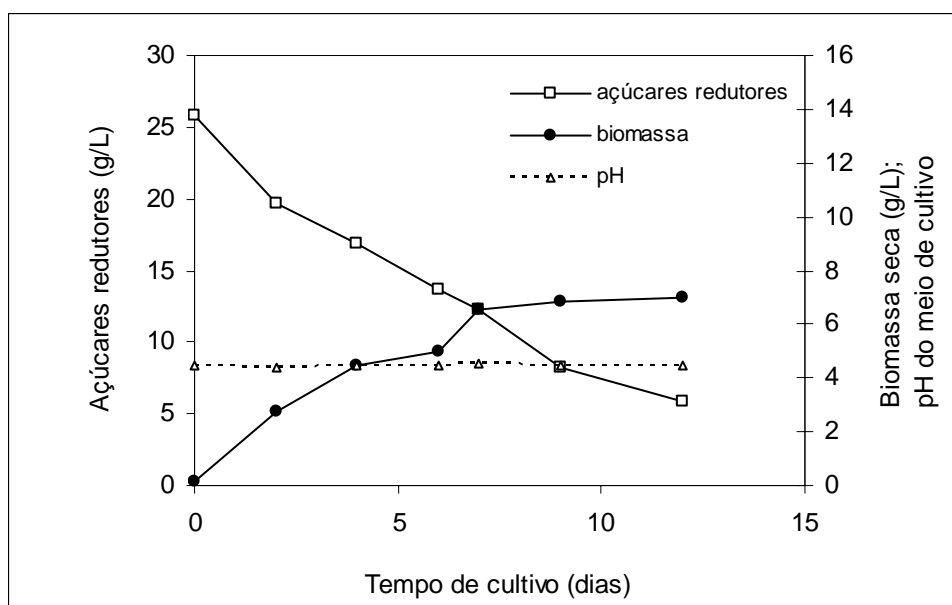


Figura 10 – Curva de crescimento e consumo de açúcares por *C. subvermispota* SS3 em meio composto por 2% de sacarose e 3,2% de milhocina. Cultivos realizados em biorreator de 1,5 L agitado por pás a 166 rpm e aeração contínua de 1,16 vvm.

O valor máximo de biomassa obtido em biorreator de 1,5 L foi de 7,0 g/L, e o consumo de açúcar foi de 77% com 12 dias de cultivo, enquanto que o pH se manteve em 4,5

durante todo o tempo de cultivo. Pode-se observar que a biomassa final obtida no biorreator foi inferior àquela observada nos cultivos estáticos em Erlenmeyer de 250 mL utilizando meio SM, que foi de 9,2 g/L. Por outro lado, o crescimento foi mais rápido, visto que no 7º dia de cultivo já se obteve praticamente a quantidade máxima de biomassa que foi de 6,5 g/L, correspondendo uma produtividade de 0,93 g/L.dia.

A velocidade de agitação e o fluxo de aeração selecionados para a execução desse experimento (166 rpm e 1,16 vvm, respectivamente) corresponderam às condições previamente otimizadas para o crescimento do basidiomiceto *Grifola frondosa*, conforme descrito por Lee et al. (2004). Para se chegar a essas condições, Lee et al. (2004) otimizaram o processo para a reposta “crescimento fúngico” utilizando um biorreator STR de 5 L, chegando a um valor máximo de biomassa de 16,8 g/L. Apesar das condições utilizadas supostamente minimizarem a deficiência de O₂ dissolvido ao longo do cultivo, a agitação de cultivos de basidiomicetos é problemática devido à formação não homogênea de "pellets" e a danificação das hifas por efeito de cisalhamento causado pelas pás do biorreator agitado, ambos provocando perdas de eficiência no crescimento. Por exemplo, Gong e Zhong (2005) avaliaram o efeito do cisalhamento em biorreator STR de 5 L para cultivos do basidiomiceto *Ganoderma lucidum*. Os autores avaliaram níveis de agitação variáveis entre 150 e 450 rpm e obtiveram os maiores acúmulos de biomassa quando a agitação era mínima (nesse caso 13,8 g/L de micélio após 9 dias de cultivo). Nos cultivos de *C. subvermispora* em biorreator de 1,5 L agitado por pás (STR) foi observado que a partir do sexto dia de cultivo já se formavam “pellets” de grande volume, os quais começaram a se juntar, formando aglomerados que se fixaram em quaisquer peças metálicas presentes no interior do biorreator, como exemplificado na Figura 11. O aumento no tamanho desses aglomerados implica na redução da absorção de nutrientes pelo fungo. O resultado final é a limitação de substrato no centro do aglomerado, prejudicando o crescimento. Adicionalmente, no centro desse

aglomerado de biomassa, a oxigenação se torna quase nula (GRIMM et al., 2005).

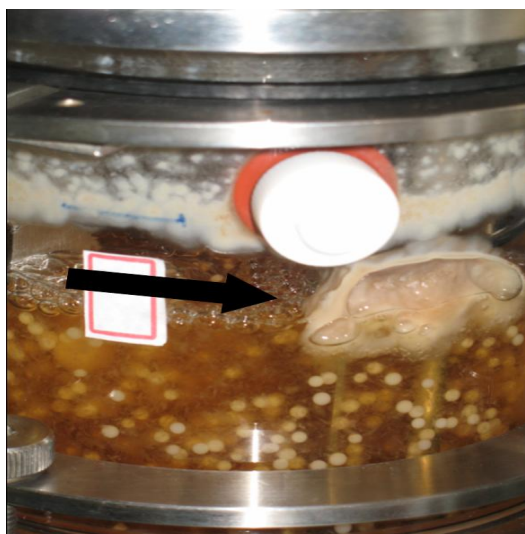


Figura 11 – Formação de aglomerado de micélio no interior de um biorreator agitado por pás de 1,5 L durante o crescimento de *C. subvermispora* em meio composto por 2,0% de sacarose e 3,2% de milhocina.

Com o intuito de evitar o cisalhamento da hifa de *C. subvermispora* pela pá de um reator agitado e minimizar a formação e fixação dos aglomerados de “pellets” no interior do biorreator, mas ainda mantendo um nível eficiente de agitação e oxigenação, foi desenhado um novo tipo de biorreator. O reator em questão foi detalhado em Material e Métodos, e os resultados obtidos estão apresentados no item subsequente.

5.3 – Crescimento de *C. subvermispora* em biorreator de 14 L

O biorreator construído foi projetado a partir de tentativas anteriores de cultivos em reatores do tipo “air-lift” que resultaram em enormes aglomerados de micélio, obstruindo o tubo central do biorreator (dados não publicados). O projeto do novo biorreator contou com a participação direta do Dr. Arnaldo Márcio Ramalho Prata do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena. Essencialmente, o projeto tinha o objetivo de promover

aeração eficiente ao meio de cultivo com o menor nível possível de cisalhamento de micélio. Isso foi obtido a partir da injeção de ar ao biorreator através de um tubo em “L”, que apresentava movimento giratório (Figura 5). O movimento giratório do tubo em “L” promoveu ainda certo nível de agitação da massa micelial crescida no interior do biorreator. Esse biorreator passou a ser denominado de BBC, que corresponde ao termo “biorreator de baixo cisalhamento”. O k_{La} deste biorreator foi determinado para uma vazão específica de ar igual a 1,0 vvm, de acordo com os dados mostrados na Figura 12, chegando-se ao valor de $9,36 \text{ h}^{-1}$, obtido a partir da inclinação da curva apresentada.

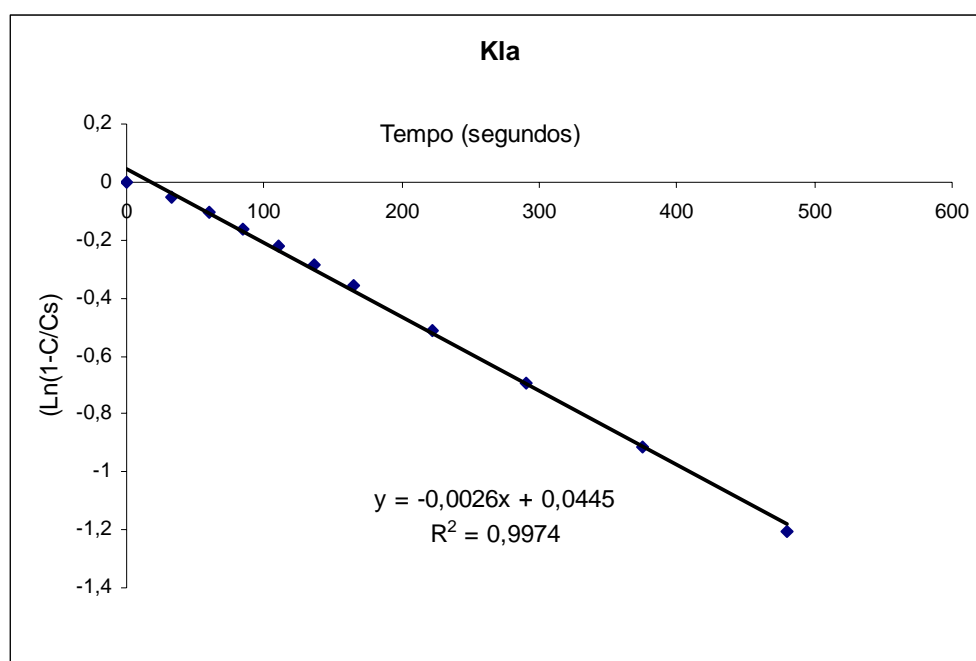


Figura 12 – Dados referentes à concentração de O_2 dissolvido em um biorreator de baixo cisalhamento de 14 L durante um ensaio característico de determinação de k_{La} para um fluxo de entrada de ar de 1,0 vvm. Os dados mostrados se referem à média de 2 experimentos realizados em condições idênticas com o reator carregado com 10 L de meio composto por 2,0 % de sacarose e 3,2% de milhocina cujo pH era igual a 4,5.

O primeiro cultivo (*cultivo A*) realizado com esse biorreator foi monitorado ao longo de 14 dias e os resultados obtidos para biomassa acumulada, consumo de açúcares redutores, pH e O_2 dissolvido são mostrados na Figura 13.

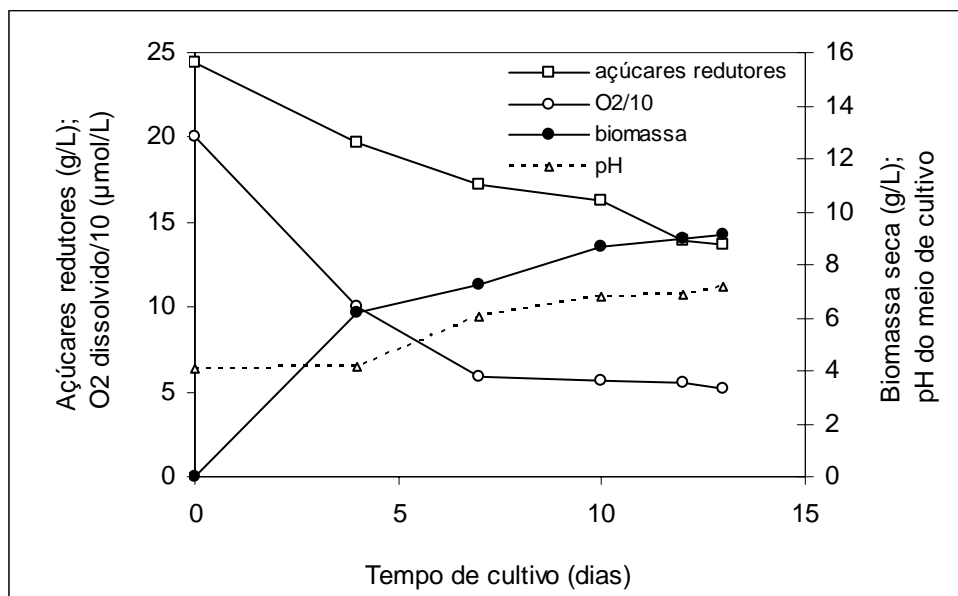


Figura 13 - Curva de crescimento, consumo de açúcares, variação da concentração de O₂ dissolvido e pH durante o cultivo A de *C. subvermispora* SS3 em meio composto por 2% de sacarose e 3,2% de milhocina. Cultivos realizados em biorreator de 14 L agitado por aeração com tubo em “L” a 1 vvm.

O valor máximo de biomassa obtida nesse cultivo foi de 9,1 g/L, com 13 dias. Esse valor foi mais elevado do que aquele obtido em biorreator 1,5 L agitado com pás (7,0 g/L). Entretanto, tomando como base os pontos onde a biomassa acumulada já se encontrava perto do nível máximo nos dois sistemas avaliados (7 dias no biorreator STR de 1,5 L e 10 dias no biorreator BBC de 14 L), podemos observar produtividades similares, sendo 0,93 g/L.dia e 0,87 g/L.dia para os biorreatores STR e BBC, respectivamente.

Também no reator BBC de 14 L não houve o consumo total do açúcar disponível, sendo que somente 44% do açúcar inicial foi consumido (Figura 13). Um problema adicional observado no cultivo A, utilizando o biorreator BBC de 14 L, foi a elevação significativa do pH a partir do 4º dia de cultivo (Figura 13). Simultaneamente à elevação do pH notou-se um forte odor de amônia na saída de ar do biorreator, o que sugeriu a ocorrência de lise celular já nos períodos iniciais de cultivo. Logo a seguir (a partir do 7º dia de cultivo) foi observado um aumento marcante na viscosidade do meio. Isso pode ter ocasionado uma menor taxa de

transferência de O_2 , que, associada com o rápido crescimento fúngico e a elevação do pH, poderiam explicar a diminuição significativa nas concentrações de O_2 detectadas (Figura 13). Pode-se observar que os níveis iniciais de O_2 dissolvido, que eram de 200 $\mu\text{moles/L}$, diminuíram para 59 $\mu\text{moles/L}$ após 7 dias de cultivo, restando somente 29,5% da saturação possível de oxigênio no meio contido no biorreator. Os menores níveis de O_2 dissolvido podem ter prejudicado significativamente, o crescimento do fungo.

Embora tenham ocorrido mudanças reológicas no meio de cultivo a partir do sétimo dia (aumento da viscosidade), o biorreator BBC de 14 L proporcionou a formação de um grande número de “pellets” de pequeno tamanho e em forma de estrela (Figura 14 e Figura 15). Esses “pellets” não formaram aglomerados e permaneceram distribuídos de forma homogênea no interior do biorreator, ao longo dos 13 dias de cultivo. De uma forma geral, todos os cultivos realizados nesse tipo de biorreator (BBC de 14 L) continham “pellets” que, ao serem observados no microscópio ótico, apresentaram dimensões que variaram entre 0,5 e 0,75 mm de largura e 0,75 e 1,75 mm de comprimento, independentemente do tempo de cultivo avaliado (Figura 15).

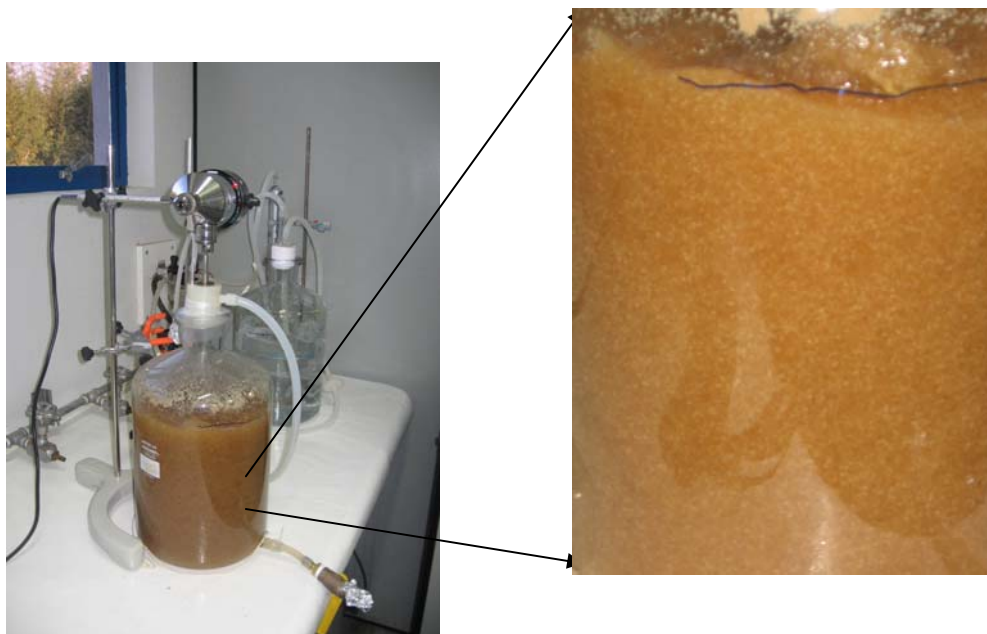


Figura 14 - Formação de “pellets” no crescimento miceliano de *C. subvermispora* em um biorreator de baixo cisalhamento de 14 L. Meio composto por 2% de sacarose e 3,2% de milhocina. A foto corresponde ao 5º dia de cultivo aerado a 1 vvm.

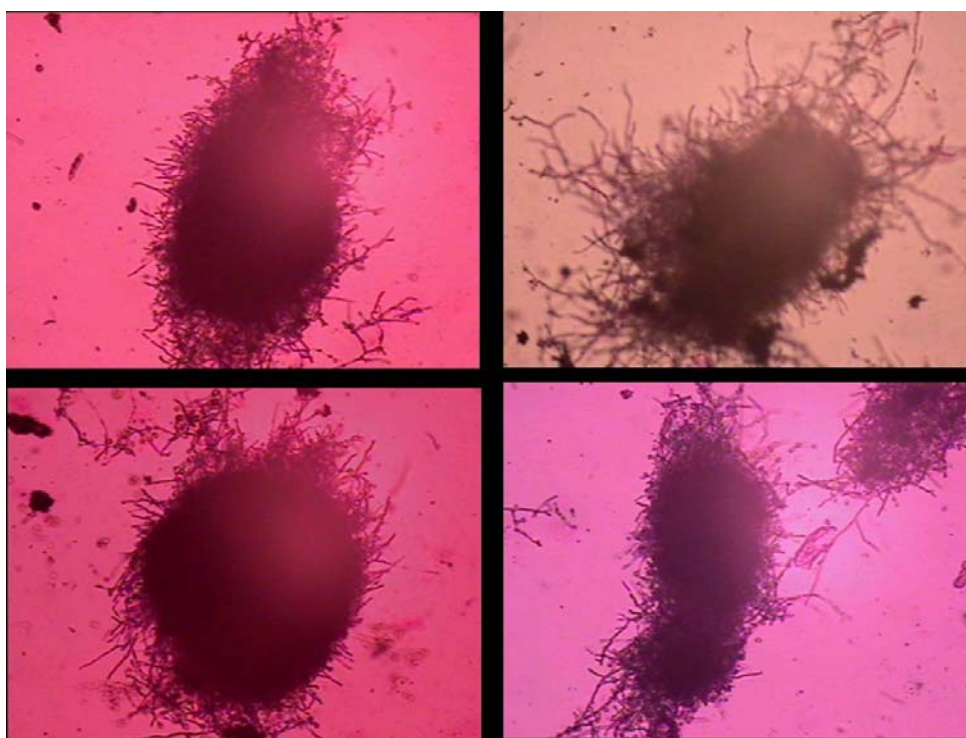


Figura 15 – Micrografias ilustrativas de “pellets” de *C. subvermispora* (aumento de 40X) formados em um biorreator de baixo cisalhamento de 14 L aerado a 1 vvm. Meio composto por 2% de sacarose e 3,2% de milhocina.

Lee et. al. (2004), analisaram a morfologia de “pellets” do basidiomiceto *Grifola frondosa* em cultivos cujos níveis de aeração e agitação por pás foram variados. Os autores verificaram que o maior acúmulo de biomassa ocorreu nos cultivos que apresentaram “pellets” de pequeno tamanho e em formato de estrela, exatamente como os observados nos cultivos de *C. subvermispora* conduzidos no reator BBC de 14 L.

Fang e Zong (2002), em fermentação com *G. lucidum*, calcularam que o diâmetro crítico do “pellet” é de 10 mm. A partir desse diâmetro, o centro do “pellet” pode sofrer limitação de substrato e oxigênio, evitando que as células do centro cresçam e fazendo com que estas sofram autólise.

Tendo em vista que a elevação do pH no *cultivo A* atingiu valores fora da faixa ótima de crescimento de *C. subvermispora* (3,5 a 5,0 - SOUZA-CRUZ, 2005), um segundo cultivo foi realizado. Nesse cultivo buscou-se controlar o pH com a adição intermitente de solução de HCl ao biorreator (*cultivo B*). O cultivo em questão foi monitorado ao longo de 12 dias e os resultados obtidos para biomassa acumulada, consumo de açúcares, pH e O₂ dissolvido são mostrados na Figura 16.

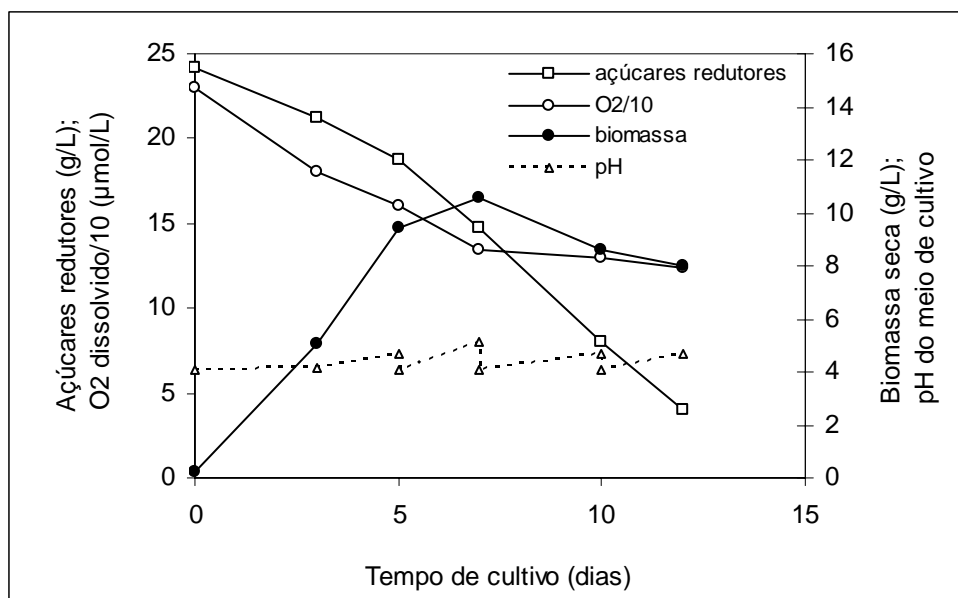


Figura 16 - Curva de crescimento, consumo de açúcares, variação da concentração de O₂ dissolvido e pH durante o *cultivo B* de *C. subvermispora* SS3 em meio composto por 2% de sacarose e 3,2% de milhocina. Cultivos realizados em biorreator de 14L agitado por aeração com tubo em “L” a 1 vvm.

O valor máximo de biomassa obtida no cultivo B foi de 10,6 g/L em 7 dias de fermentação. Esse valor foi maior do que o obtido no *cultivo A*, realizado no biorreator BBC, e o tempo demandado para esse acúmulo de biomassa foi menor. O *cultivo B* proporcionou uma produtividade de 1,51 g/L.dia, calculada no ponto máximo de biomassa acumulada: 7 dias. Neste cultivo houve um consumo de 83,5% do açúcar total disponível (Figura 16). Esse foi o maior consumo de açúcar disponível entre os cultivos realizados. Por outro lado, o máximo de biomassa neste cultivo foi obtido no sétimo dia, quando o fungo havia consumido apenas 39% do açúcar total disponível, significando que a partir do sétimo dia o fungo deve ter utilizado o substrato para outra finalidade que não fosse o crescimento celular. O mais provável é que a partir desse momento teve início o metabolismo secundário, no qual o fungo pára de crescer e começa a produzir algum tipo de produto específico que pode ser uma enzima ou um polissacarídeo (GRIFFIN, 1994). Os valores de pH aumentaram a partir do quarto dia da mesma forma que havia sido observado no *cultivo A*, porém com a medida de controle periódico do pH, o mesmo não ultrapassou 5,1, mantendo-se na faixa ótima de crescimento de *C. subvermispora* (Figura 16). O oxigênio dissolvido manteve-se com 54% de saturação ao final do experimento, chegando a 124 $\mu\text{moles/L}$ de 230 $\mu\text{moles/L}$ no início do cultivo, conforme mostrado na Figura 16.

Apesar de ter havido controle periódico no valor do pH no *cultivo B*, pela Figura 16 verifica-se que sempre houve a tendência do valor voltar a subir com o decorrer do tempo. Isso sugere que mesmo havendo maior acúmulo de biomassa e maior produtividade nesse cultivo, comparado ao *cultivo A*, ainda seria possível otimizar o processo no sentido de minimizar a via metabólica que levava ao incremento de pH. Fang e Zhong (2002) cultivando *G. lucidum*, notaram um aumento similar nos valores de pH que chegou a 7,0 entre o 10^o e o 14^o dia de cultivo. Para explicar a razão pela qual o pH aumentava ao final do cultivo, os autores conduziram outros experimentos adicionando 5 e 10 g/L de glicose ao 8^o dia de

fermentação, obtendo como resultado um cultivo sem o aumento substancial do pH no decorrer da fermentação. Os autores atribuíram o fato a uma baixa taxa de consumo de substrato pelo fungo quando a glicose se encontra em baixas concentrações no meio. Tomando como base os experimentos de Fang e Zhong (2002), um terceiro cultivo (*cultivo C*) foi realizado no reator BBC de 14 L, no qual foi adicionado 100 mL de uma solução de sacarose a 5 g/L no quinto dia de cultivo. Esse cultivo foi monitorado ao longo de 14 dias e os resultados obtidos para biomassa acumulada, consumo de açúcares, pH e O₂ dissolvido são mostrados na Figura 17.

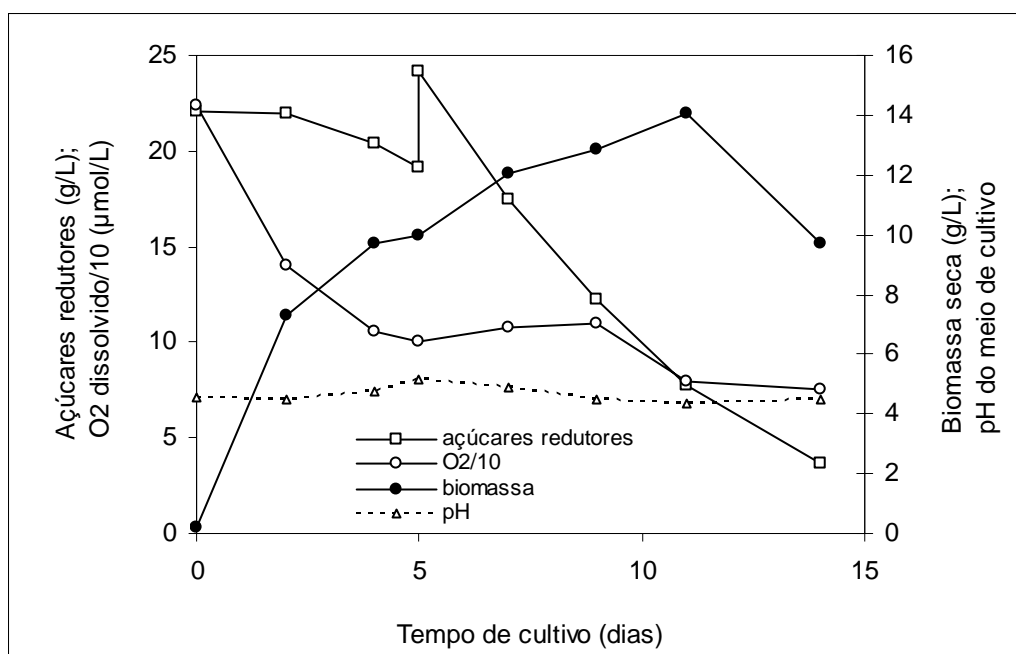


Figura 17 - Curva de crescimento, consumo de açúcares, variação da concentração de O₂ dissolvido e pH durante o *cultivo C* de *C. subvermispora* SS3 em meio composto por 2% de sacarose e 3,2% de milhocina. Cultivos realizados em biorreator de 14 L agitado por aeração com tubo em “L” a 1 vvm.

O valor máximo de biomassa obtida no *cultivo C* foi de 14,1 g/L em 11 dias de fermentação e o fungo consumiu 86,28% de sacarose ao final do cultivo, considerando a quantidade total de sacarose (inicial e adicionada). Esse cultivo proporcionou o maior valor de biomassa acumulada e também a maior produtividade (1,72 g/L.dia), considerando o sétimo

dia de cultivo, momento em que a maior parte da biomassa fúngica já havia sido produzida. O pH começou a subir a partir do quarto dia, como nos outros cultivos realizados neste biorreator, porém, com a adição de sacarose no quinto dia, o valor diminuiu e manteve-se na faixa ótima de crescimento (Figura 17). A concentração de oxigênio dissolvido chegou a 33,5% da saturação ao final do experimento, e, após o quinto dia, com a adição de sacarose, este valor chegou a aumentar, mas diminuiu em seguida, conforme pode ser observado na Figura 17.

5.4 – Comparativo dos fatores de produtividade e consumo de açúcares entre os cultivos

Um comparativo entre os fatores de produtividade calculados a partir de cada experimento descrito anteriormente é mostrado na Figura 18.

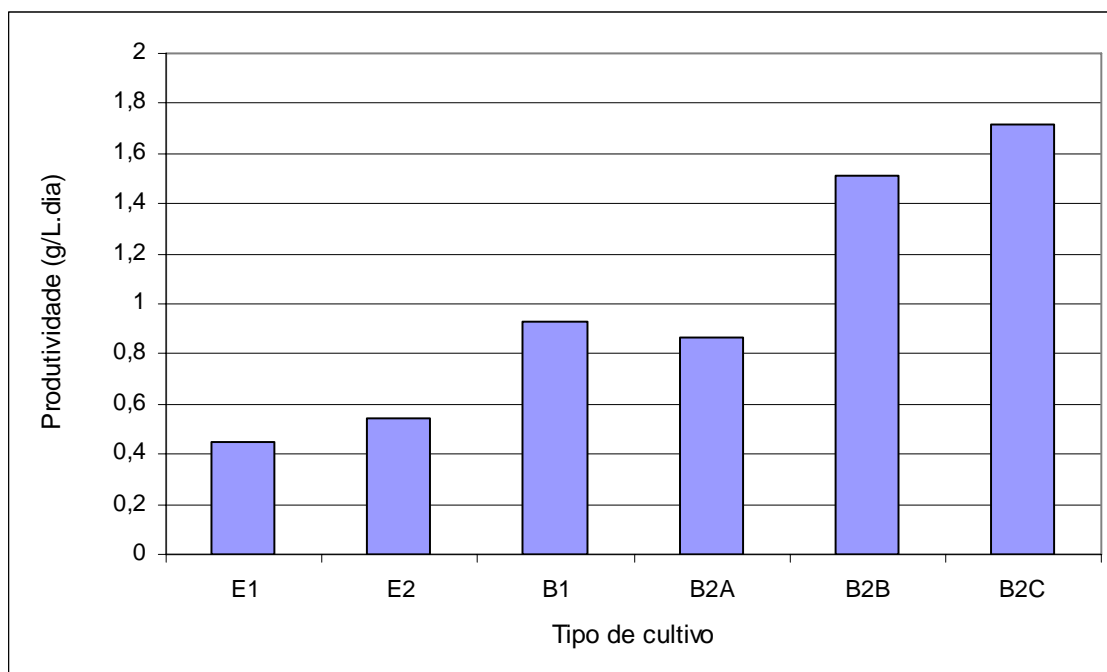


Figura 18 – Produtividade de micélio de *C. subvermispora* produzido em cultivos realizado em: (E1) Erlenmeyer de 250 mL, meio de cultivo DB-EL tamponado em pH 4,1 com acetato de sódio 10 mM; (E2) Erlenmeyer de 250 mL, meio de cultivo SM; (B1) Biorreator agitado por pás de 1,5 L, meio de cultivo SM; (B2A) Biorreator de 14 L, agitado por aeração com tubo em “L” e meio de cultivo SM, *cultivo A*; (B2B)

Biorreator de 14 L, agitado por aeração com tubo em “L” e meio de cultivo SM, *cultivo B*; (B2C) Biorreator de 14 L, agitado por aeração com tubo em “L” e meio de cultivo SM, *cultivo C*.

Os dados da Figura 18 mostram que entre os cultivos feitos em Erlenmeyer o de maior produtividade foi o E2, indicando que o meio SM é uma alternativa eficiente para se cultivar *C. subvermispora*, além do tradicionalmente usado DB-EL. A Figura 18 mostra também a diferença de produtividade entre os cultivos em Erlenmeyer e os em biorreator, demonstrando a falta de eficiência de oxigenação nos cultivos em Erlenmeyer, quando comparado com o biorreator. O cultivo B2C, realizado em biorreator de 14 L (BBC) e condições de *cultivo C*, resultou a maior produtividade. Os *cultivos A e B*, realizados no mesmo biorreator, proporcionaram menor valor de produtividade, provavelmente devido ao não controle adequado do pH e algum desbalanceamento nutricional, respectivamente. O cultivo realizado em biorreator agitado por pás de 1,5 L foi prejudicado pela formação de aglomerados de “pellets”, que impedem um maior acúmulo de biomassa, demandam tempos mais longos de cultivo e estão sujeitos ao cisalhamento das hifas, ocorrido quando em contato com as pás da turbina de agitação. Com isso, uma menor produtividade foi observada.

A Figura 19 compila os dados referentes à máxima biomassa acumulada em cada cultivo avaliado, bem como a extensão do consumo dos açúcares disponíveis. Os dados indicam que o sistema ainda demanda otimização, pois o ideal seria que todo o açúcar disponível no cultivo fosse consumido, com a máxima conversão possível em biomassa.

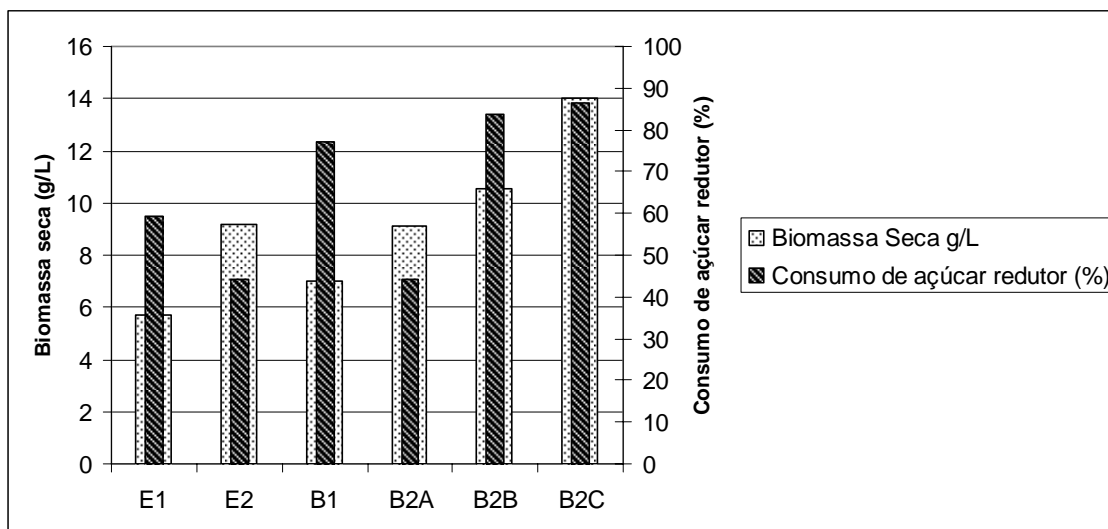


Figura 19 – Biomassa seca e açúcar redutor consumido nos cultivos de *C. subvermispora* em: (E1) Erlenmeyer de 250 mL, meio de cultivo DB-EL tamponado em pH 4,1 com acetato de sódio 10 mM; (E2) Erlenmeyer de 250 mL, meio de cultivo SM; (B1) Biorreator agitado por pás de 1,5 L, meio de cultivo SM e; (B2B) Biorreator de 14 L, agitado por aeração com tubo em “L” e meio de cultivo SM, cultivo B; (B2C) Biorreator de 14 L, agitado por aeração com tubo em “L” e meio de cultivo SM, cultivo C.

O cultivo B1 proporcionou maior consumo de açúcar do que o B2A e resultou a menor quantidade de biomassa final. Isso poderia ser explicado pelo fato de o biorreator usado em B1 ser um reator de agitação com pás planas que causam cisalhamento das hifas, levando a um maior consumo de açúcares para os processos de “reparação” celular e não para o crescimento. O cultivo B2C foi o que aparentemente mais se aproximou do cultivo ideal, pois houve consumo quase que total do açúcar disponível e foi atingida a maior quantidade de biomassa seca dentre os experimentos avaliados.

5.5 – Análise de clamidósporos dos cultivos

O micélio de todos os cultivos estudados foi observado ao microscópio óptico e, em todas as situações, observou-se a ocorrência de clamidósporos, que são esporos de resistência.

O aparecimento de clamidósporos em um cultivo remete a uma situação de estresse vivida pelo fungo, indicando que há alguma limitação para o perfeito crescimento e geração de biomassa do fungo, que pode ser descrita por inúmeros fatores desfavoráveis como falta de substrato, pH inadequado, limitação de oxigênio e outros (SAXENA et al., 2001). Porém, cada clamidósporo é uma hifa em potencial e por isso pode ser usado como inóculo para outro cultivo. As vantagens da utilização de clamidósporos como inóculo estão relacionadas ao fato destes esporos poderem ser liofilizados e estocados por longos períodos como um pó seco, a temperatura ambiente, mantendo-se viáveis (SAXENA et al., 2001).

Em cultivos em Erlenmeyers, tanto usando o meio DB-EL como o meio SM, os clamidósporos foram encontrados a partir do 6º dia, embora em pequena quantidade (Tabela 3). Com 12 dias já havia muitos desses esporos de resistência na cultura até o final dos 17 dias de cultivo. Nos cultivos em Erlenmeyer usando meio SM, aparentemente o fungo alcançou um nível de estresse um pouco mais elevado do que o observado no meio DB-EL. Em biorreator agitado B1 os clamidósporos começaram a se formar já no terceiro dia de cultivo e no 8º dia já se observava uma grande quantidade destes, o que se seguiu até o tempo final do cultivo. Esses dados sugerem que, dentre outros fatores, deve ter havido intenso estresse causado ao fungo em função do cisalhamento das hifas devido à rotação das pás planas. No *cultivo A* (B2A), apareceram clamidósporos a partir do 5º dia, momento no qual o pH começou a subir. Como o cultivo foi realizado sem controle de pH, nota-se que no 9º dia a quantidade de clamidósporos já era grande. O *cultivo B* (B2B) acarretou numa quantidade média de clamidósporos, mesmo em tempos longos de crescimento fúngico. Já o *cultivo C* (B2C) apresentou uma quantidade muito pequena de clamidósporos, mesmo após longos tempos de crescimento, indicando ter sido o cultivo em houve o menor nível de estresse ao fungo.

Tabela 3 – Quantidade de clamidósporos observada em micélio de *C. subvermispora* ao longo do crescimento em meio de cultura líquido.

Dias	Tipo de cultivo					
	E1	E2	B1	B2A	B2B	B2C
3	-	-	+	-	-	-
6	++	++	+++	+	+	-
7	++	++	+++	++	++	+
8	++	+++	++++	+++	++	+
9	+++	+++	++++	++++	+++	+
12	++++	++++	++++	++++	+++	++

(- até +++) representam a quantidade de clamidósporos observada a partir de uma avaliação visual ao microscópio, conforme ilustração mostrada na parte experimental.

5.6 - Teste de viabilidade do micélio e dos clamidósporos produzidos em biorreator para colonizar madeira

O teste de viabilidade foi realizado utilizando como inóculo o micélio e clamidósporos provenientes do cultivo realizado em biorreator de 14 L, correspondente ao *cultivo C* descrito anteriormente. Para avaliar a viabilidade, principalmente dos clamidósporos, o inóculo foi batido em liquidificador por 10 ciclos de 15 segundos, situação na qual a maioria das hifas são destruídas e somente clamidósporos inteiros permanecem (Figura 20). Como o corante floxina cora apenas citoplasma (GILBERTSON; RYVARDEN 1986), percebe-se que as hifas não coraram devido ao fato de terem sido cortadas pelas lâminas do liquidificador e seu citoplasma ter vazado, tornando-as inviáveis. Um experimento paralelo utilizou inóculo do mesmo biorreator, porém não submetido ao processo de danificação das hifas com liquidificador. Nesse caso, tanto micélio como hifas estavam viáveis no inóculo.



Figura 20 – Microscopia ótica de fragmentos de hifas com clamidósporos, após o micélio cultivado em biorreator de 14 L ter sido batido por 10 ciclos de 15 segundos em liquidificador. Hifa (seta vermelha) e clamidósporos (seta preta). Aumento 400X.

Como parâmetro para comparar a eficiência do inóculo utilizou-se a atividade enzimática de MnP, pois, além de apresentar o pico de atividade enzimática aos 14 dias, é a principal enzima oxidativa produzida por esta espécie de fungo (SOUZA-CRUZ et al., 2004). Na tabela 4 estão apresentadas as atividades de MnP encontradas nos extratos enzimáticos obtidos após 14 dias de cultivo sobre madeira de *Eucalyptus grandis*.

Tabela 4 – Atividade enzimática de manganês peroxidase (MnP) encontrada nos extratos obtidos após 14 dias de cultivo de *C. subvermispora* SS3 sobre *E. grandis*, com os inóculos convencional e de clamidósporos.

Substrato	Atividade de MnP (UI/kg de madeira)	
	Tipo de inóculo	
	Convencional*	Clamidósporos**
<i>E. grandis</i>	579±67	553±12

*Convencional = micélio cultivado por 14 dias em biorreator de 14L.

**Clamidósporos = micélio cultivado por 14 dias em biorreator de 14L, batido por 10 ciclos de 15 s para garantir somente clamidósporos.

A atividade enzimática de MnP encontrada no extrato obtido a partir da biodegradação de *E. grandis* por *C. subvermispora* foi semelhante para os dois tipos de inóculo. Através deste ensaio foi possível verificar que o inóculo preparado no biorreator de 14 L é viável.

Observou-se ainda que é possível utilizar como inóculo somente os clamidósporos. No entanto, é necessário que seja aperfeiçoada a técnica de separação destes das hifas e que novos experimentos testando a carga de inóculo (clamidósporos) sejam realizados.

Em escala industrial, as vantagens de liofilizar e estocar esses inóculos na forma de clamidósporos facilitaria o processo de inoculação e transporte.

6. CONCLUSÕES

Nos cultivos realizados em Erlenmeyer, o meio SM se mostrou efetivo para o crescimento de *C. subvermispora* proporcionando uma biomassa final máxima de 9,2 g/L, similar ao que foi obtido por Macedo e Ferraz (2002) em meio com BD-EL (9,6 g/L). O consumo de açúcar no meio SM foi menor que no meio contendo BD-EL, 44% e 59% respectivamente, demonstrando uma dificuldade maior na assimilação de sacarose por *C. subvermispora* em cultivos estáticos em Erlenmeyer.

O cultivo realizado em biorreator STR de agitação convencional de 1,5 L, atingiu melhores resultados de produtividade do que os cultivos realizados em Erlenmeyers, ou seja, atingiu valores maiores de acúmulo de biomassa em menor tempo, diminuindo a limitação de oxigênio dissolvido, proporcionado por cultivos estáticos. Porém, a quantidade final de biomassa fúngica obtida foi menor, devido, provavelmente, ao cisalhamento das hifas ocasionado pela agitação por pás planas e à formação não homogênea de “pellets” que resultaram em agregados celulares de grande tamanho, prejudicando a alimentação e a oxigenação no centro dos “pellets”.

O biorreator de 14 L construído no Departamento de Biotecnologia se mostrou mais adequado para o cultivo de *C. subvermispora* do que o biorreator de agitação convencional STR. Isso foi demonstrado de várias formas, incluindo uma maior quantidade de biomassa ao final do cultivo, uma maior produtividade, formação de “pellets” pequenos e homogêneos, não existência de agregados celulares e menor quantidade de clamidósporos ao longo do cultivo.

Entre os cultivos realizados no biorreator de 14 L o cultivo que apresentou os melhores resultados foi o cultivo C, em que se empregou meio suplementado com 5 g/L de sacarose no 5º dia, proporcionando uma biomassa final de 14,1 g/L e produtividade de

1,72 g/L.dia. Nessa condição o consumo de sacarose foi de 86,2% e não houve a elevação de pH observada nos experimentos anteriores conduzidos no mesmo biorreator.

Os clamidósporos se mostraram eficientes no teste de viabilidade do inóculo, crescendo quase que da mesma forma que quando cultivado com micélio comum.

- Sugestões para trabalhos futuros

Como perspectivas para a continuidade de pesquisas sobre a produção de biomassa de *C. subvermispora* em meio líquido, pode-se sugerir as seguintes atividades:

- Otimizar as condições de cultivo, utilizando o biorreator de 14 L, a partir de ajustes nos parâmetros: velocidade de agitação, taxa de aeração e balanço de nutrientes no meio de cultivo a partir de diferentes razões de C/N;
- Testar novas fontes de carbono e nitrogênio e analisar o rendimento de biomassa fúngica;
- Realizar estudos no novo biorreator utilizando regime descontínuo alimentando com concentrações maiores de sacarose durante a alimentação, visando à maior produção de biomassa fúngica;
- Analisar a secreção de outros metabólitos por *C. subvermispora* durante o cultivo (como enzimas e polissacarídeos) para verificar se a produção de micélio poderia ser acompanhada da produção de algum subproduto de interesse comercial;
- Otimizar a separação dos clamidósporos das hifas e testar cargas diferentes de inóculo de clamidósporo nos cultivos sobre madeira;
- Liofilizar os clamidósporos e testar a durabilidade após certo tempo e a capacidade de crescimento após esse tempo;

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A.; SOUZA-CRUZ, P.B.; FERRAZ, A. Oxalic acid, Fe³⁺-reduction activity and oxidative enzymes detected in culture extracts recovered from *Pinus taeda* wood chips biotreated by *Ceriporiopsis subvermispora*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p.873-878, 2006.
- AGUIAR A. **Importância dos mediadores de baixa massa molar na biodegradação de madeira por Ceriporiopsis subvermispora**. 2008. 121p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2008.
- AKHTAR, M. *et al.* An overview of biomechanical pulping research. In: RAYMOND, A. YOUNG.; AKHTAR, M. **Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry**. New York: John Wiley and Sons, 1998. p. 309-339.
- AKHTAR, M.; ATTRIDGE, M.C.; MYERS, G.C.; KIRK, T.K.; BLANCHETTE, R.A. Biomechanical pulping of loblolly pine with different strains of the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora*. **Tappi Journal**, v. 75, n.2, p.105-109, 1992.
- AKHTAR, M.; ATTRIDGE, M.C.; MYERS, G.C.; BLANCHETTE, R.A. Biomechanical pulping of loblolly pine chips with selected white-rot fungi. **Holzforschung**, v. 47, p. 36-40, 1993.
- ANSTEAD, G. M., *et al.* Disseminated zygomycosis due to *Rhizopus schipperae* after heatstroke. **J. Clin. Microbiol.**, v.37, p.2656–2662, 1999.
- BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. **Bioch. Eng.** New York: MCGraw Hill, 1986, cap. 8.
- BANO, Z.; RAJARATHNAM, S. *Pleurotus* mushrooms. Part IA. Morphology, life, cycle, taxonomy, breeding, and cultivation. **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutrition**. v.26, p.157-221, 1987.
- BIERMANN, C. Pulping fundamentals. In: BIERMANN, C. **Essentials of Pulping and Papermaking**. New York: Academic Press, 1993. p. 55-100.
- BURDSALL H. S. Jr Taxonomy of industrially important white-rot fungi. In: **Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry**. New York: John Wiley and Sons, 1998, p.259-272.
- BURNS, P.J., *et al.* Physiological studies of exopolysaccharide production from basidiomycetes *Pleurotus* sp. Florida; effect of C and N source on polysaccharide production for potential as a hypocholesterolemic, antitumor and a fat mimetic. **Enzyme Microbial. Technol.** v. 34, p. 566–572, 1994.
- CONTRERAS, A. *et al.* Influence of sparger on energy dissipation, shear rate, and mass transfer to sea water in a concentric-tube airlift bioreactor. **Enz. Micr. Tech.**, v. 25, p. 820-830, 1999.

CUNHA, G.G.S. **Atividade Peroxidativa de extratos enzimáticos obtidos a partir de cultivos de *Ceriporiopsis subvermispota* e sua relação com a degradação de lignina**. 2008. 66f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2008.

ENOKI, M. *et al.* Extracellular lipid peroxidation of selective white-rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispota*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 180, p. 205-211, 1999.

FANG, Q. H.; ZHONG, J. J. Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites—ganoderic acid and polysaccharide. **Biochem. Eng. J.** v.10, p. 61-65, 2002.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Pulping processes. In: FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood Chemistry, Ultrastructure and Reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989. p. 414-473.

FERRAZ, A. Aplicações da biotecnologia na produção de papel e celulose. In: LIMA U. A.; AQUARONE E.; BOORZANI W.; SCHMIDELL W. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2001. v. 1. p. 465-484.

FERRAZ, A., CHRISTOV, L., AKHTAR, M. Fungal pretreatment for organosolv pulping and dissolving pulp production. In: **Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry**, New York: John Wiley & Sons, 1998, p. 421-447.

FERRAZ, A.; CÓRDOVA, A.M.; MACHUCA, A. Wood biodegradation and enzyme production by *Ceriporiopsis subvermispota* during solid-state fermentation of *Eucalyptus grandis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 59-65, 2003.

FERRAZ, A. *et al.* Technological advances and mechanistic basis for fungal biopulping. **Enzyme and Microbial Technology**. v .43, p. 178–185, 2008.

FILIPOVIC S. S.; RISTIC, M. D.; SAKAC M. B. Technology of Corn Steep Application in Animal Mash and their Quality. **Roumanian Biotechnology Letters**, v. 7. p. 705-710, 2001.

GAVRILESCU, M.; ROMAN, R. V.; EFIMOV, V. The volumetric oxygen mass transfer coefficient in antibiotic biosynthesis liquids. **Acta Biotech.**, v. 13, p.59-70, 1993.

GERN, R.M.M. Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. **Bioresource Technology**, v. 99, p.76–82, 2008.

GILBERTSON, R. L ; RYVARDEN.L. North America polypores. *Abortiporus – Lindtneria*. **Fungiflora**, v.1, p.433-440, 1986.

GONG, H.; ZHONG, J.J. Hydrodynamic shear stress affects cell growth and metabolic production by medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. **Chinese J. Chem. Eng.**, v. 13, n. 3, p. 426-428, 2005.

GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology**. New York: John Wiley-Liss, 1994, p. 458

GUERRA, A.; MENDONÇA, R.; FERRAZ, A. Characterization of the residual lignins in *Pinus taeda* biodegraded by *Ceriporiopsis subvermispota* by using *in situ* CuO oxidation and DFRC methods. **Holzforschung**, v. 56, p. 157-160, 2002.

GUERRA, A.; MENDONÇA, R.; FERRAZ, A. Molecular weight distribution of wood components extracted from *Pinus taeda* biotreated by *Ceriporiopsis subvermispota*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 12-18, 2003.

GUERRA, A. *et al.* Structural characterization of lignin during *Pinus taeda* wood treatment with *Ceriporiopsis subvermispota*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 4073-4078, 2004.

GUERRA, A.; PAVAN, P.C.; FERRAZ, A. Bleaching, brightness stability and chemical characteristics of *Eucalyptus grandis*-bio-TMP pulps prepared in a biopulping pilot plant **Appita Journal**, v. 59, p. 412-415, 2006

GUILLÉN-NAVARRO, G. K. *et al.* Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. **Rev. Iberoam. Mycologia**, v.15, p. 302-306, 1998.

GRIMM, L.H., *et al.* Morphology and productivity of filamentous fungi. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 69, p. 375–384, 2005.

HAMMEL, K.E. *et al.* Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 445-453, 2002.

HARREITHER, W., *et al.* Cellobiose Dehydrogenase from the Lignolytic Basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispota*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 9, p. 2750–2757, 2009

HEIDORNE, F.O. *et al.* Characterization of hemicellulases and cellulases produced by *Ceriporiopsis subvermispota* grown on wood under biopulping conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 436-442, 2006.

HOFRICHTER, M. Review: lignin conversation by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 454-466, 2002.

JENSEN, K.A. *et al.* Manganese-dependent cleavage of nonphenolic lignin structures by *Ceriporiopsis subvermispota* in the absence of lignin peroxidase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 3679-3686, 1996.

JONES A., Large-Scale Production of Fungal Inoculum. *In: Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry*. Ed. R. Young e M. Akhtar, New York: John Wiley and Sons, 1998. p. 481-504.

JOO, J. H. *et al.* Optimization of submerged culture conditions for exopolysaccharide production in *Sarcodon aspratus* (Berk) S. Ito TG-3. **World J. Microbiol. Biotechnol.** v. 20, p. 767-773, 2004.

KAPICH, A.N.; JENSEN, K.A.; HAMMEL, K.E. Peroxyl radicals are potential agents of lignin biodegradation. **FEBS Letters**, v. 461, p. 115-119, 1999.

KARGI, F.; MOO-YOUNG, M. Transport phenomena in bioprocesses. In: MOO-YOUNG, M.; **Comprehensive biotechnology: the principles, applications & regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine**. USA, Pergamon Press Inc, 1985, p.6-54

KHINDARIA, A., et al. Oxalate-dependent reductive activity of Manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 314, p. 301-306, 1994.

KIM H.O.; LIM, J.M.; JOO, J.H. Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharide by *Agrocybe cylindracea*, **Bioresour. Technol.**, v. 96, p. 1175–1182, 2005.

KIM, H.M., et al. Enhanced Production of Exopolysaccharides by Fed-batch Culture of *Ganoderma resinaceum* DG-6556. **The Journal of Microbiology**, v. 44, n 2, p.233-242, 2006

KUES, U. Life history and developmental processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 64, p.316–353, 2000.

KURTZMAN, C. P. Formation of hyphae and chlamydospores by *Cryptococcus laurentii*. **Mycologia**, v. 65, p.388–395, 1973.

LEE, B.C., et. al. Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. **Enz. Micr. Tech.**, v. 35, p. 369-376, 2004.

LEONOWICZ, A. et al. Higher fungi as a potential feed and food source from lignocellulosic wastes. **Environ Biotechnol.**, v.5, p. 229-253, 1990.

LEVY, J.F. The natural-history of the degradation of wood. **Philosophical Transactions Of The Royal Society Of London Series A-Mathematical Physical And Engineering Sciences**, v. 321, p. 423-433, 1987

LIN, E.S.; SUNG, S.C. Cultivating conditions influence exopolysaccharide production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, p.182–187, 2006.

LOBOS, S. *et al.* Isoenzymes of manganese-dependent peroxidase and laccase produced by the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. **Microbiology**, v. 140, p. 2691-2698, 1994.

LUNDELL, T. et al. Formation and action of lignin-modifying enzymes in cultures of *Phlebia radiata* supplemented with veratric acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2623-2629, 1990.

MACEDO, V.A.P.; FERRAZ, A. Estudo do crescimento de *Ceriporiopsis Subvermispora* SS-3 em diferentes meios de cultivo In: SEMINÁRIO DE HIDROLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS VII Sheb, 2002, Maringá. **Anais...**, 2002.

MACHUCA, A.; FERRAZ, A. Hydrolytic and oxidative enzymes produced by white- and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid state medium. **Enzyme Microbial Technology**, v. 29, p. 386-391, 2001.

MAO, X.B.; ZHONG, J.J. Hyperproduction of cordycepin by two-stage dissolved oxygen control in submerged cultivation of medicinal mushroom *Cordyceps militaris* in bioreactors, **Biotechnol. Progr.**, v.20, p.1408–1413, 2004.

MÁRQUEZ-ROCHA, F. J. et al. Growth characteristics of *Pleurotus ostreatus* in bioreactors. **Biotechnol. Tech.**, v.13, p. 29-32, 1999.

MARTIN, A. M. A review of fundamental process aspects for the production of mushroom mycelium. **J. Food Eng.**, v. 8, p.81-96, 1996.

MASARIN, F. **Habilidade degradativa de *Ceriporiopsis subvermispora* e *Phanerochaete chrysosporium* em cultivos sobre madeira de *Eucalyptus grandis* não autoclavada.** 2006. 89f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2006.

MASARIN, F; FERRAZ, A. Evaluation of *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden biopulping with *Ceriporiopsis subvermispora* under non-aseptic conditions. **Holzforschung**, v. 62, p. 1–7, 2008

MASARIN, F et al. Laboratory and mill scale evaluation of biopulping of *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden with *Phanerochaete chrysosporium* RP-78 under non-aseptic conditions. **Holzforschung**, v. 63, p. 259–263, 2009.

MAZIERO, R, et. al. Screening of basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. **Rev. Microbiol.**, v. 30, p. 77-84, 1999.

MENDONÇA, R.; GUERRA, A., FERRAZ, A. Delignification of *Pinus taeda* wood chips treated with *Ceriporiopsis subvermispora* for preparing high-yield kraft pulps. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 77, p. 411-418, 2002.

MENDONÇA, R.; FERRAZ, A.; KORDSACHIA, O.; PATT, R. Alkaline sulfite/anthraquinone pulping of pine wood chips biotreated with *Ceriporiopsis subvermispora*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 79, n. 6, p. 584-589, 2004.

MERCHUK, J. C.; GLUZ, M. Bioreactors, air-lift reactors. In: **ENCYCLOPEDIA OF BIOPROCESS TECHNOLOGY**, New York: John Willey & Sons, Inc, 1999, p. 320-353, v.1-5.

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

PARAUD, C., H. et al. Administration of *Duddingtonia flagrans* chlamydozoospores to goats to control gastro-intestinal nematodes: dose trials. **Vet. Res.**, v. 36, p.157– 166, 2005.

PARK, J. P et al. Effect of agitation intensity on exo-biopolymer production and mycelial morphology in *Cordyceps militaris*. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.34, p. 433-438, 2002.

PAVAN, P.C. **Desenvolvimento do processo de biopolpação de eucalipto em escala piloto para a produção de polpas termomecânicas e quimiotermodinâmicas**. 2008. 150f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial)- Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2008.

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

ROITMAN et al. **Tratado de microbiologia**. São Paulo. Editora Manoele Ltda, 1987. v.1.

ROSADO, F. R. et al. Biomass and exopolysaccharide production in submerged cultures of *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. and *Pleurotus ostreatus* "florida" (Jack.: Fr.) Kummer. **J. Basic Microbiol.**, v.43, p. 230-237, 2003.

RÜTTIMANN-JOHNSON, C. et al. Extracellular enzyme production and synthetic lignin mineralization by *Ceriporiopsis subvermispota*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p.1792-1797, 1993.

SAXENA, R.K., et al. Induction and mass sporulation in lignin degrading fungus *Ceriporiopsis subvermispota* for its potential usage in pulp and paper industry. **Current Science**, v. 81, p. 591-594, 2001.

SCHÜGERL, K. **Bioreaction engineering: characteristic features of bioreactors**. New York: John Wiley & Sons, 1987, v.2.

SCOTT, G.M., AKHTAR, M., LENTZ, M., SYKES, M., ABUBAKR, S. Biosulfite pulping using *Ceriporiopsis subvermispota*. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOTECHNOLOGY IN THE PULP AND PAPER INDUSTRY, 1995, Vienna, **Proceedings**. Viena: Facultas-Universitätsverlag, 1996. p. 217-220.

SETLIFF, E.C., MARTON, R., GRANZOW, S.G., ERIKSSON, K.L. Biomechanical pulping with white-rot fungi. **Tappi Journal**, v. 73, n. 8, p. 141-147, 1992.

SETHURAMAN, A.; AKIN, D.E.; ERIKSSON, K.E.L. Plant-cell-wall-degrading enzymes produced by the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispota*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 27, p. 37-47, 1998.

SCHMIDELL, W. Agitação e aeração em biorreatores. In: **BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL Vol II: Engenharia Bioquímica**. Eds. W. Schmidell, U.A, Lima, E. Aquarone, W. Borzani, São Paulo: Ed. Edgard Blücher Ltda., 2001. p. 277-331.

SOUZA-CRUZ, P.B. *et al.* Extraction and determination of enzymes produced by *Ceriporiopsis subvermispota* during biopulping of *Pinus taeda* wood chips. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 34 p. 228-234, 2004.

SOUZA-CRUZ, P.B. **Morfo-Fisiologia da biodegradação de madeiras por *Ceriporiopsis subvermispota* (Pil.) Gibn & Ryv. e *Phlebia tremellosa* (Schrad.: Dr.) Nakas & Burds.** 2005. 91f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia Industrial, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2005.

SREBOTNIK, E. *et al.* Evidence that *Ceriporiopsis subvermispota* degrades nonphenolic lignin structure by a one-electron-oxidation mechanism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 4435-4440, 1997.

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

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**, v. 32, p. 478–484, 2003.

VICENTIM, M.P. **Secreção diferenciada de enzimas lignocelulolíticas durante a biodegradação de madeira por *Ceriporiopsis Subvermispota* e resposta da madeira biotratada frente a processos posteriores de polpação.** 2007. 139f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia Industrial, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2007.

VINCENTIM, M.P; FERRAZ, A. Enzyme production and chemical alterations of *Eucalyptus grandis* wood during biodegradation by *Ceriporiopsis subvermispota* in cultures supplemented with Mn²⁺, corn steep liquor and glucose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 645–652, 2007

VICUÑA, R. *et al.* Culture conditions of *Ceriporiopsis subvermispota* determine the pattern of MnP isoenzymes. In: Srebotnik, E., **Biotechnology in the Pulp and Paper Industry: Recent Advances in Applied and Fundamental Research.** Vienna: Facultas-Universitätsverlag, 1996, p. 345-350.

XU, C.P.; YUN, J.W. Optimization of submerged-culture conditions for mycelial growth and exo-biopolymer production by *Auricularia polytricha* (wood ears fungus) using the methods of uniform design and regression analysis. **Biotechnol. Appl. Biochem**, v. 38, p.193-199, 2003.

XU, C.P., *et al.* Production of exopolysaccharides by submerged culture of an entomopathogenic fungus, *Paecilomyces tenuipes* C240 in stirred-tank and airlift reactors. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 770–777, 2006