

CRYSTIAN BARTSCH PARODI

**Otimização dos processos *upstream* para obtenção de β -
glucanas de *Schizophyllum commune* utilizando licor de
maceração de milho**

Curitiba
2024

CRYSTIAN BARTSCH PARODI

Otimização dos processos *upstream* para obtenção de β -glucanas de *Schizophyllum commune* utilizando licor de maceração de milho

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Clínica Odontológica Integrada, Subárea de Cirurgia Bucomaxilofacial

Orientador: Prof. Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa

Curitiba

2024

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central
Gisele Alves – CRB 9/1578

P257o 2024	Parodi, Crystian Bartsch Otimização dos processos upstream para obtenção de β-glucanas de <i>Schizophyllum commune</i> utilizando licor de maceração de milho / Crystian Bartsch Parodi ; orientador : Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa. – 2024. 32 f. : il. ; 30 cm Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2024 Bibliografia: f. 28-32 1. Odontologia. 2. Glucanas. 3. Cogumelos. 4. Licor de maceração de milho. 5. Biomassa. I. Rosa, Edvaldo Antonio Ribeiro. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título. CDD. 20. ed. – 617.6
---------------	---



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
Escola de Medicina e Ciências da Vida

TERMO DE APROVAÇÃO

CRYSTIAN BARTSCH PARODI

OTIMIZAÇÃO DOS PROCESSOS UPSTREAM PARA OBTENÇÃO DE β -GLUCANAS DE
SCHIZOPHYLLUM COMMUNE UTILIZANDO LICOR DE MACERAÇÃO DE MILHO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de **Mestre em Odontologia**, Área de Concentração em **Clínica Odontológica Integrada - Cirurgia Bucomaxilofacial**.

Orientador: Prof Dr Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

Profª Drª Aline Cristina B. R. Johann
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

Profª Drª Lorena Carolina Peña
Pós Doutoranda *Stricto Sensu* PPGO, PUCPR

Curitiba, 14 de novembro de 2024



Rua Imaculada Conceição, 1155 | Prado Velho | Curitiba | Paraná
Cep 80215-901 | Tel. 41 3271-1555 | www.pucpr.br

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	6
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	11
5 CONCLUSÃO.....	15
6 REFERÊNCIAS.....	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Efeitos das variáveis concentração de CSL, pH e temperatura na obtenção de biomassa de *S. commune* FCSC1 crescida em fermentação submersa.11

Figura 2: Rendimento de biomassa de *S. commune* FCSC1 crescida em fermentação submersa, sob condições otimizadas.....14

Figura 3: Rendimento de biomassa de *S. commune* FCSC1 crescida em fermentação submersa, sob condições otimizadas com 15% de CSL, CSL reutilizado e SDB 2%. .15

RESUMO

Introdução: As β -glucanas são polissacarídeos biologicamente ativos com propriedades imunomoduladoras e cicatrizantes, sendo promissoras para o tratamento de úlceras de difícil cicatrização e queimaduras. Este estudo busca otimizar os bioprocessos de produção de β -glucanas utilizando *Schizophyllum commune* como fungo produtor e licor de maceração de milho (CSL), um subproduto agroindustrial, como substrato. **Material e métodos:** A metodologia adotada para a otimização da produção de biomassa utilizando CSL como meio envolveu a abordagem de um-fator-por-tempo (OFAT), variando a concentração de CSL, pH, temperatura e tempo de incubação respectivamente. Os cultivos foram conduzidos em fermentação submersa, e a biomassa foi quantificada por gravimetria após secagem. Os valores de média e desvio padrão foram determinados, e a normalidade verificada pelo teste de Shapiro-Wilk ($\alpha = 0,05$). A comparação dos dados foi feita pelo teste One-Way ANOVA, considerando significativos os resultados com $p \leq 0,05$, utilizando o pacote Prism 10.2.3®. **Resultados:** A maior produção de biomassa foi alcançada com 15% de CSL, pH 6,0, a 28 °C, após 144-168 horas de incubação. Também foi avaliada a produção de biomassa utilizando CSL, CSL reutilizado e Caldo Sabouraud Dextrose (SDB), onde constatou a inviabilidade de reutilização do meio de cultivo sem ajustes nutricionais e a superioridade no rendimento de biomassa do CSL quando comparado ao CSL reutilizado e SDB. **Conclusão:** A eficiência do CSL como meio de cultivo se mostrou vantajosa em termos econômicos e de rendimento, além disso, demonstrou superioridade quando comparado ao SDB em rendimento de biomassa. A utilização de subprodutos agroindustriais, como o CSL, representa uma alternativa sustentável para a produção de β -glucanas.

Palavras-chave: β -glucanas. *Upstream*. *Schizophyllum commune*. Licor de maceração de milho (CSL). Produção de biomassa.

1. INTRODUÇÃO

β -glucanas são polissacarídeos biologicamente ativos (BAPs) que fazem parte da parede celular de cereais, bactérias e fungos e que contém somente glucose como unidade monomérica (Rop *et al.*, 2009). Em particular, cogumelos, fungos filamentosos e leveduras apresentam variantes moleculares nas quais predominam cadeias principais de β -1,3-D-glucanas com ramificações curtas e de posição variável de β -1,6-D-glucanas (Seo *et al.*, 2019). O *Schizophyllum commune* (cogumelo esquizófilo comum) é um fungo formador de cogumelos conhecido por sua capacidade de degradar materiais lignocelulósicos e produção de esquizofilana, uma β -glucana formada por unidade básica de três moléculas de glucose unidas por ligações β -1,3 e uma ramificação com uma glucose conectada à glucose central da cadeia principal da unidade básica por ligação β -1,6 (Thongsiri *et al.* 2021).

Dentre as propriedades farmacológicas de interesse das β -glucanas, destaca-se a interação com o receptor tipo-Toll-2 (TLR2), que pode induzir a ativação de células dendríticas via TLR2, resultando em alta produção de IL-10 e um marcante efeito anti-inflamatório (Okada *et al.*, 2021). Além disso, as β -glucanas possuem notável atividade indutora de reparo em feridas. Através da interação com o receptor dectina-1 em queratinócitos, ocorre a migração dessas células através de lesões cutâneas para realizar a reconstrução do epitélio perdido (Van den Berg *et al.*, 2014). Foi demonstrado que a ativação de macrófagos via dectina-1 eleva a produção de óxido nítrico (NO) e a secreção de IL-10, TNF- α e IL-1 β (Jellmayer *et al.*, 2017). β -glucanas fúngicas também podem induzir um aumento na síntese de colágeno (Wei *et al.*, 2002; Portera *et al.*, 1997), colaborando no processo de reparo.

A aplicação de β -glucanas diretamente sobre úlceras crônicas, ferimentos de difícil cicatrização ou queimaduras é uma estratégia terapêutica simples (Rajarajan & Dakshanamoorthy, 2020; Majtan & Jesenak, 2018; Delatte *et al.*, 2001), menos dispendiosa (Cutting, 2017) e tem demonstrado ser bastante eficaz no reparo (Grip *et*

al., 2021), em períodos relativamente curtos (Zykova *et al.*, 2014). Os ferimentos de difícil cicatrização se tornaram um problema de saúde pública e se estima um montante mundial de 20-60 milhões de pessoas acometidas para 2026 (da Silva *et al.*, 2019).

A produção de β -glucanas oriundas de cogumelos pode se dar por processos *upstream* de fermentação em estado sólido (SSF) e envolvem o emprego de substrato sólido e particulado, geralmente oriundo da atividade agrícola ou industrial (Letti *et al.*, 2018), ou submersa (SmF), conduzida em biorreatores contendo carga líquida (Chegwin-Angarita *et al.*, 2021; Petre & Petre, 2016).

O licor de maceração de milho (CSL) consiste em um subproduto agroindustrial rico em nutrientes importantes para crescimento de microrganismos heterotróficos (Zhao *et al.*, 2023). Esses nutrientes se apresentam como açúcares redutores, proteínas, peptonas, aminoácidos livres, ácidos orgânicos e minerais, que são facilmente absorvíveis pelos microrganismos, potencializando o crescimento e a produção de biomassa (Taiwo e Musonge, 2024). Além disso o custo reduzido ser uma opção ecologicamente viável são outros fatores que o tornam atrativo para usos bioindustriais (Huang *et al.* 2020; Zhou *et al.* 2022).

Diversas variações foram avaliadas no intuito de se incrementar a obtenção de biomassa. Combinações de tipo de biorreator, modo de operação, temperatura, aeração, taxa de cisalhamento, pH e tempo de fermentação, próprias para cada espécie fúngica, permitem maximizar o recolhimento de micélio (Bakratsas *et al.*, 2021; Tang *et al.*, 2007).

Diante das propriedades cicatrizantes das β -glucanas, o objetivo deste estudo é aprimorar os bioprocessos de produção de β -glucanas (esquizofilana) a partir de *S. commune*. Para isso, será utilizado o licor de maceração de milho, um subproduto agroindustrial de baixo custo proveniente da indústria de amidos, como alternativa aos meios de cultivo tradicionais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O método empregado para otimização das condições de fermentação foi a de um-fator-por-tempo (OFAT): Concentração de CSL, pH, temperatura e tempo de incubação respectivamente.

2.1 Cepa fúngica

A cepa de *S. commune* FCSC1 utilizada foi adquirida junto ao site Fungicultura (fungicultura.com.br). Essa foi mantida em placas de Petri (90 mm Ø) com meio ágar batata dextrose (BDA) a 27 °C com repiques a cada sete dias. Além disso a cepa também foi armazenada através do método de Castellani (De Capriles *et al.* 1989).

2.2 Meio de cultivo

O licor de maceração de milho (CSL) Farma[®] HSW-3742 (Ingredion Ltd, Balsa Nova, Brasil) foi investigado como fonte de nutrientes. Esse CSL continha originalmente 16,4 % de proteínas solubilizadas e °Brix de 41,0%, em pH 4,2. As formulações de CSL investigadas nos experimentos subsequentes foram esterilizadas em volumes de 90 mL em frascos cônicos de 250 mL a 121°C, 1 psi e 15 min.

2.3 Inóculo

Um cultivo de *S. commune* FCSC1 de crescimento de 7 dias em uma placa com BDA foi colhido com 20 mL de água destilada estéril e duas gotas de Tween[™] 20 e um *cell scraper* de 18 mm (Corning Inc., Glendale, AZ). O conteúdo foi homogeneizado em Tenbroeck de vidro SKU 1982-10040 (Bellco Glass, Vineland, NJ). Foram utilizadas alíquotas de 1 mL de suspensão equivalente ao tubo #5 de McFarland para a inoculação em frascos cônicos de 250 mL contendo 90 mL de CSL estéril. Por fim, foram incubadas a 110 rpm com variações dos seguintes parâmetros: Concentração de CSL, pH, temperatura e tempo de incubação respectivamente.

2.4 Determinação de biomassa

Os ensaios subsequentes demandaram a determinação da quantidade de biomassa obtida. Após os tempos estipulados de incubação, as biomassas miceliais

foram coletadas e lavadas por imersão em 1 L de água corrente. As biomassas totais foram recuperadas por filtração em papel de filtro #3 Whatman® (Cytiva Inc, Marlborough, MA) e deixadas secar a 50 °C por 48 h. As massas secas foram determinadas com balança analítica U210A (BelMark Eng Co, Monza, Itália). As massas secas foram determinadas por gravimetria e pulverizadas em moinho de facas SL-30 (Solab Equip. Lab., Piracicaba, Brasil) até se tornarem pó finamente particulado.

2.5 Determinação da melhor condição de crescimento

2.5.1 Efeito da fonte de N e C (Meio de Cultura)

O CSL teve seu pH corrigido para 5,0 com NaOH 1 M. Em seguida, foi combinado com volumes de água destilada até se obter concentrações de 5%, 10% e 15% de meio CLS. As formulações esterilizadas receberam os inóculos e foram incubadas a 28 °C e 110 rpm em incubadora orbital TE-420 (Tecnal Ltd, Piracicaba, Brasil), por 120 horas. Os cultivos foram conduzidos em triplicata, para cada concentração.

2.5.2 Efeito do pH inicial

Uma vez conhecida a concentração de CLS que fornecia a maior quantidade de biomassa, os efeitos do pH inicial foram avaliados através da correção do pH do meio para 4,0, 5,0 ou 6,0 com HCl 1 M ou NaOH 1 M, empregando um potenciômetro PH-500B-I (Ionlab Ltda, Araucária, Brasil). As formulações esterilizadas receberam os inóculos e foram incubadas a 28 °C e 110 rpm em incubadora orbital, por 120 horas. Os cultivos foram conduzidos em triplicata, para cada valor de pH (Intiaj *et al.* 2008)

2.5.3 Efeito da temperatura

Utilizando os melhores parâmetros de concentração de CSL e melhor pH inicial. As formulações esterilizadas receberam os inóculos e foram incubadas a 25 °C, 28 °C ou 30 °C em 110 rpm em incubadora orbital, por 120 horas. Os cultivos foram conduzidos em triplicata, para cada temperatura. (Nasreen *et al.*, 2015)

2.5.4 Efeito do tempo de incubação

Uma vez conhecida a concentração, pH e temperatura que forneciam a maior quantidade de biomassa, as formulações esterilizadas receberam os inóculos e foram incubadas na melhor temperatura, em 110 rpm, em incubadora orbital. A cada 24 h, foram retirados grupos de triplicatas para a determinação da massa seca, de forma a se obter biomassas crescidas em 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h, 192 h, 216 h e 240 h (Nasreen *et al.*, 2015).

2.6 Reuso do meio de cultivo

A combinação de todos os parâmetros testados que proporcionou obtenção de maior biomassa foi denominada “condição otimizada”. Inóculos foram adicionados ao CSL de melhor concentração e com pH corrigido. As incubações se deram na condição otimizada, a 110 rpm, em incubadora orbital, pelo melhor tempo.

As biomassas miceliais foram recolhidas e os sobrenadantes (50 mL) foram transferidos para novos frascos cônicos de 250 mL. Não foram realizados ajustes de pH e cada frasco recebeu 1 mL de inóculo. As incubações se deram na melhor temperatura, em 110 rpm, em incubadora orbital, pelo melhor tempo. Os recultivos foram conduzidos em triplicata.

Para fim de comparação de rendimento, também foi realizado um cultivo em meio de cultura amplamente utilizado em laboratórios de biotecnologia microbiana e bioprocessos, o Caldo Sabouraud Dextrose (SDB) 2%. Frascos com 90 mL de SDB esterilizado (pH 6,0) receberam os inóculos e foram incubados a 28 °C, em 110 rpm, por 144 horas. Os cultivos foram conduzidos em triplicata.

2.7 Análise estatística

Foram determinados os valores de média e de desvio padrão. A normalidade foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk, com alfa de 0,05. A comparação dos dados foi realizada pelo teste One-Way ANOVA, com dados paramétricos. O resultado foi

considerado significativo estatisticamente quando $p \leq 0,05$. As análises foram realizadas pelo pacote estatístico Prism 10.2.3® (GraphPad Software, La Jolla, CA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração de CSL 15% foi responsável pela maior produção de biomassa fúngica de *S. commune* FCSC1, com $15,79 \pm 0,75 \text{ g}_{\text{massa seca}} \text{ L}^{-1}$ (figura 1a). O rendimento de biomassa se mostrou invariável quando comparado as concentrações de 5% e 10% onde apresentaram $11,16 \pm 1,572 \text{ g}_{\text{massa seca}} \text{ L}^{-1}$ e $12,14 \pm 0,360 \text{ g}_{\text{massa seca}} \text{ L}^{-1}$ respectivamente ($p > 0,05$).

Além da biomassa micelial, a obtenção de esquizofilana pode ser incrementada pela substituição de fontes tradicionais de nitrogênio e carbono, como extrato de malte, por CSL (Kumar *et al.*, 2022).

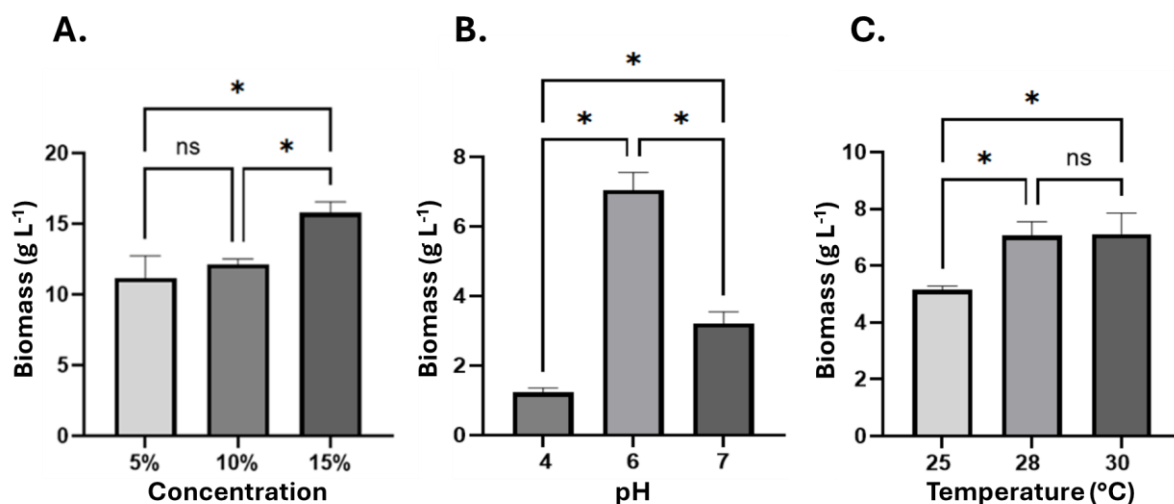


Figura 1. Efeitos das variáveis concentração de CSL (A), pH (B) e temperatura (C) na obtenção de biomassa de *S. commune* FCSC1 crescida em fermentação submersa. Onde “*” representa valor de $p < 0,05$ e “ns” representa valor de $p > 0,05$.

Além dos aspectos tecnológicos, o emprego de CSL como fonte de nutrientes se mostra vantajoso em termos de custo, já que seu preço é de aproximadamente US\$ 200 por tonelada, aproximadamente um quinto do valor do extrato de levedura (Tan *et al.*, 2016).

Tão importante quanto a disponibilidade de nutrientes em concentrações adequadas, o pH do caldo pode interferir para maior ou menor crescimento microbiano (Rosso *et al.*, 1995). No caso de fungos filamentosos, essa variável é um dos fatores cruciais a serem controlados no início das fermentações submersas (SmF), pois o pH influencia no crescimento das hifas, na produção de metabólitos e na reologia do caldo (Kim *et al.*, 2006).

Neste estudo, o crescimento em diferentes valores de pH variou significativamente ($p < 0,05$), sendo a maior biomassa obtida em pH 6, com rendimento de $7,05 \pm 0,50 \text{ g}_{\text{massa seca}} \text{ L}^{-1}$ já em pH 4 e pH 7, foram obtidas $1,22 \pm 0,1310 \text{ g}_{\text{massa seca}} \text{ L}^{-1}$ e $3,21 \pm 0,3396 \text{ g}_{\text{massa seca}} \text{ L}^{-1}$ (figura 1b). Comportamento semelhante foi descrito para outro microrganismo da ordem *Agaricales*, o *Lentinula edodes* (*shitake*), onde o aumento do pH resultou em maior rendimento de biomassa, atingindo produção máxima em pH 6,5 e com decaimento em pH 7 ou maior (Ghada, 2011).

O *S. commune* FCSC1 apresentou melhor desempenho germinativo quando em 28 °C e 30 °C, com rendimento de $7,10 \pm 0,53 \text{ g}_{\text{massa seca}} \text{ L}^{-1}$ e $7,11 \pm 0,71 \text{ g}_{\text{massa seca}} \text{ L}^{-1}$, respectivamente (figura 1c); indiferentes entre si ($p > 0,05$), mas maiores que em 25 °C onde apresentou rendimento de $5,14 \pm 0,1420 \text{ g}_{\text{massa seca}} \text{ L}^{-1}$ ($p < 0,05$).

Esse resultado diverge daqueles publicados anteriormente para *S. commune*, e que indicaram 25 °C para um maior rendimento na produção de biomassa (Nasreen *et al.*, 2015). Contudo, tal divergência de resultados decorre de uma somatória de fatores, sendo determinantes as fontes de carbono e nitrogênio, o pH e a disponibilidade de oxigênio, além de características intrínsecas da cepa empregada (Xu & Yun, 2003).

O fato de não haver divergências nas temperaturas que propiciaram os crescimentos máximos é interessante, pois com menor *input* energético (em 28 °C) é possível se obter praticamente a mesma biomassa, o que é bastante desejado quando se operam biorreatores industriais (Schmidt, 2005).

Com o conhecimento das melhores condições, foi verificado o intervalo de tempo existente entre a inoculação e a obtenção de biomassa máxima. A figura 2 mostra que o tempo de incubação que forneceu os maiores valores para biomassa foi 144 h (6 d), com $6,27 \pm 0,33 \text{ g}_{\text{massa seca}} \text{ L}^{-1}$, e 168 h (7 d), com $6,77 \pm 0,19 \text{ g}_{\text{massa seca}} \text{ L}^{-1}$, sem diferenças entre eles ($p > 0,05$). Os demais intervalos de tempo propiciaram menores quantidades de biomassa ($p < 0,05$). Esses valores contrastam com outros que empregaram caldo de cultura de composição *quase*-definida e que geraram até $12,36 \pm 0,3 \text{ g}_{\text{massa seca}} \text{ L}^{-1}$, dependendo da cepa e da aeração (Smirnou *et al.*, 2011). A que se lembrar, porém, que este estudo buscou empregar um subproduto agroindustrial somente diluído e sem correções percentuais de nutrientes e somente uma cepa foi testada. Ainda, nosso estudo não avaliou o impacto da aeração no crescimento, visto que os crescimentos se deram em frasco cônico, que limitam a oferta do gás (de Oliveira *et al.*, 2023). Esse é um ponto determinante que deve ser explorado em estudo subsequente.

A elevação gradual de biomassa em função do tempo é um fenômeno esperado e seguiu o padrão da curva de crescimento alternativa (*i.e.*, não-Buchanan) para um sistema fechado de batelada simples (Vrabl *et al.*, 2019). Porém, em intervalos de tempo superiores a 168 h, a biomassa tornou a reduzir. Essa queda de rendimento pode estar relacionada à depleção de nutrientes (Domingos *et al.*, 2017), acúmulo de metabólitos tóxicos (Klaus *et al.*, 2021), redução na taxa de transferência de oxigênio (Nitayavardhana *et al.*, 2013) e produção de moléculas supressoras de crescimento quando em *quorum sensing* (Albuquerque & Casadevall, 2012). Contudo, tais suposições estão associadas à inibição de crescimento e não explicam a redução em uma biomassa já formada. Autólise é um fenômeno a muito descrito para micélios de fungos de interesse industrial (Lahoz *et al.*, 1976; Harvey *et al.*, 1998; White *et al.*, 2002) onde a privação de nutrientes e o estresse físico são os principais fatores extrínsecos desencadeadores de autólise, provocando a desrepressão de enzimas líticas como proteases, quitinases e glucanases, e, conseqüentemente causando a degradação de

biomassa já formada para obtenção de carbono e nitrogênio (White *et al.* 2002). Sendo assim, o aporte de nutrientes adequado é essencial não apenas para a produção da biomassa, mas também para preservação da mesma.

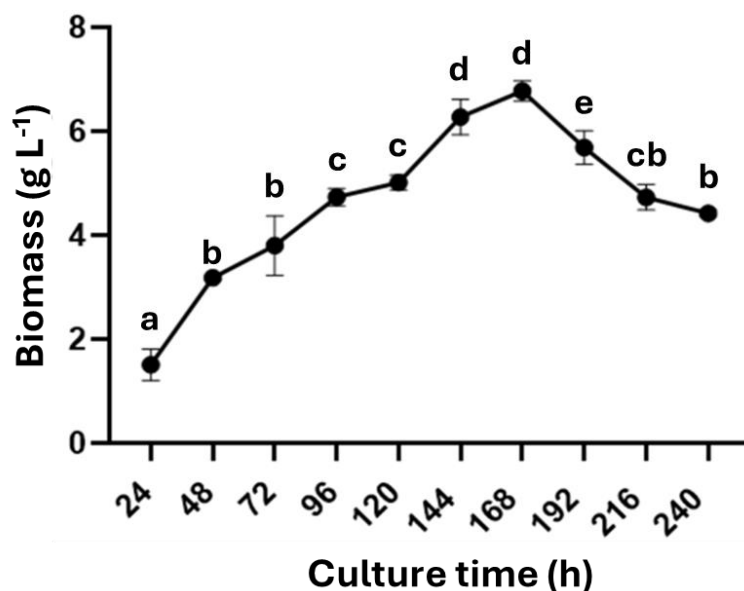


Figura 2. Rendimento de biomassa de *S. commune* FCSC1 crescida em fermentação submersa, sob condições otimizadas. Onde letras iguais representam dados sem diferença estatística entre os dois momentos.

A obtenção de biomassa máxima se deu em 144 h-168 h. Esse período pode parecer um tanto longo, se comparado com o de bactérias (Baccante *et al.*, 2023) ou de leveduras (Vandermies & Fickers, 2019), quando em condições otimizadas; no entanto, esse mesmo período foi considerado satisfatório para produção de esquizofilana (Kumari *et al.*, 2008; Smirnou *et al.*, 2011).

Buscando atender questões de sustentabilidade, nosso grupo avaliou a possibilidade de se reutilizar o caldo otimizado, sob condições otimizadas, para produzir mais biomassa. Também, foi realizada a comparação com um meio padrão de crescimento fúngico, o SDB 2%. Os resultados mostraram que o caldo feito a partir de CSL 15% e o cultivo em condições otimizadas geraram uma biomassa de $22,80 \pm 2,318$ g_{massa seca} L⁻¹, já a biomassa obtida com SDB 2% $2,39 \pm 0,7184$ g_{massa seca} L⁻¹, utilizando

o caldo CSL reusado foi obtido $1,64 \pm 0,3806 \text{ g}_{\text{massa seca}} \text{ L}^{-1}$ (figura 3). Esses resultados mostram que não é possível se obter uma quantidade apreciável de biomassa de *S. commune* em um caldo cujos nutrientes já se exauriram e não sofreram qualquer correção. Além disso, o CSL 15% com pH 6,0 se mostrou bastante superior ao SDB. Tal constatação é muito útil para laboratórios que avaliam crescimento fúngico, posto que o SDB custa cerca de US\$ 220,00 o quilograma, suficiente para se produzir 20 L de caldo. Com um empenho financeiro muito próximo se pode produzir até 6600 L de CSL 15%.

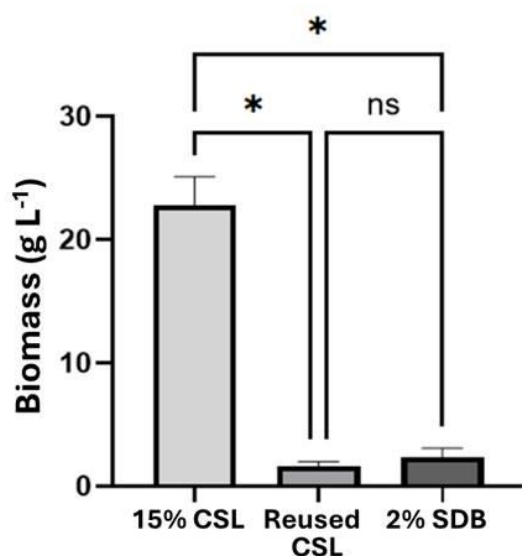


Figura 3. Rendimento de biomassa de *S. commune* FCSC1 crescida em fermentação submersa, sob condições otimizadas com 15% de CSL, CSL reutilizado e SDB 2%. Onde “*” representa valor de $p < 0,05$ e “ns” representa valor de $p > 0,05$.

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o subproduto agroindustrial CSL, quando utilizado em condições otimizadas, não apenas proporciona um rendimento satisfatório na obtenção de biomassa de *S. Commune* FCSC1, mas também como uma alternativa sustentável e economicamente viável para a produção de esquizofilana.

ABSTRACT

Introduction: β -glucans are biologically active polysaccharides with immunomodulatory and wound-healing properties, making them a promising for the treatment of hard-to-heal ulcers and burns. This study aims to optimize the bioprocesses for β -glucan production using *Schizophyllum commune* as the producing fungus and Corn Steep Liquor (CSL), an agro-industrial by-product, as a substrate. **Material and methods:** The optimization of biomass production using CSL as a culture medium followed the one-factor-at-a-time (OFAT) approach, varying CSL concentration, pH, temperature, and incubation time sequentially. The cultures were carried out via submerged fermentation, and biomass was quantified gravimetrically after drying. The mean and standard deviation values were determined, and normality was assessed using the Shapiro-Wilk test ($\alpha = 0.05$). Data were analyzed using one-way ANOVA, with statistically significant results defined as $p \leq 0.05$, using the Prism 10.2.3® software package. **Results:** The highest biomass production was achieved with 15% CSL at pH 6.0, 28 °C, after 144–168 hours of incubation. Additionally, biomass production was evaluated using CSL, reused CSL, and Sabouraud Dextrose Broth (SDB). The results indicated that medium reuse without nutritional adjustments was not practicable and that CSL yielded superior biomass production compared to both reused CSL and SDB. **Conclusion:** CSL proved to be an economically viable and efficient culture medium, demonstrating superior biomass yield compared to SDB. The use of agro-industrial by-products such as CSL represents a sustainable alternative for β -glucan production.

Keywords: β -glucans. *Upstream*. *Schizophyllum commune*. Corn steep liquor (CSL). Biomass production.

1. INTRODUCTION

β -Glucans are biologically active polysaccharides (BAPs) that constitute part of the cell wall of cereals, bacteria, and fungi, containing only glucose as a monomeric unit (Rop *et al.*, 2009). Specifically, mushrooms, filamentous fungi, and yeasts exhibit molecular variants predominantly composed of β -1,3-D-glucan main chains with short and variably positioned β -1,6-D-glucan branches (Seo *et al.*, 2019). *Schizophyllum commune* (common Splitgill mushroom) is a mushroom-forming species known for its capacity to degrade lignocellulosic materials and for the production of schizophyllan, a β -glucan consisting of a basic unit of three glucose molecules linked by β -1,3 bonds, with a single glucose branch connected to the central glucose of the main chain via a β -1,6 bond (Thongsiri *et al.*, 2021).

Among the pharmacological properties of β -glucans, their interaction with Toll-like receptor 2 (TLR2) is particularly noteworthy, as it can induce dendritic cell activation via TLR2, leading to high IL-10 production and a pronounced anti-inflammatory effect (Okada *et al.*, 2021). Additionally, β -glucans exhibit remarkable wound-healing activity. Through interaction with the Dectin-1 receptor in keratinocytes, these cells migrate across skin lesions to reconstruct the lost epithelium (Van den Berg *et al.*, 2014). It has been demonstrated that macrophage activation via Dectin-1 enhances nitric oxide (NO) production and the secretion of IL-10, TNF- α , and IL-1 β (Jellmayer *et al.*, 2017). Furthermore, fungal β -glucans can stimulate collagen synthesis (Wei *et al.*, 2002; Portera *et al.*, 1997) contributing to tissue repair.

The direct application of β -glucans to chronic ulcers, hard-to-heal wounds, or burns represents a simple (Rajarajan & Dakshanamoorthy, 2020; Majtan & Jesenak, 2018; Delatte *et al.*, 2001), cost-effective (Cutting, 2017), and highly efficient therapeutic strategy (Grip *et al.*, 2021) that promotes tissue repair within relatively short timeframes (Zykova *et al.*, 2014). Chronic wounds have become a significant public health concern,

with a projected global prevalence of 20–60 million affected individuals by 2026 (da Silva *et al.*, 2019).

The production of mushroom-derived β -glucans can be achieved through *upstream* fermentation processes, including Solid State Fermentation (SSF), which employs solid and particulate substrates, typically derived from agricultural or industrial activities (Letti *et al.*, 2018), or Submerged Fermentation (SmF), which is conducted in bioreactors containing liquid substrates (Chegwin-Angarita *et al.*, 2021; Petre & Petre, 2016).

Corn Steep Liquor (CSL) is an agro-industrial by-product rich in essential nutrients for the growth of heterotrophic microorganisms (Zhao *et al.*, 2023). These nutrients include reducing sugars, proteins, peptones, free amino acids, organic acids, and minerals all of which are readily absorbed by microorganisms, thereby enhancing growth and biomass production (Taiwo & Musonge, 2024). Additionally, its low cost and environmental sustainability make CSL an attractive option for bio industrial applications (Huang *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2022).

Various optimization strategies have been explored to enhance biomass production. The combination of reactor type, operational mode, temperature, aeration, shear rate, pH, and fermentation duration each tailored to specific fungal species allows for maximal mycelial yield (Bakratsas *et al.*, 2021; Tang *et al.*, 2007).

Given the healing properties of β -glucans, the objective of this study is to improve the bioprocesses of β -glucan production (schizophylan) from *S. commune*. For this, corn step liquor (CSL), a low-cost agro-industrial by-product from the starch industry, will be used as an alternative to traditional cultivation means.

2 MATERIAL AND METHODS

The method used to optimize the fermentation conditions was the one-factor-per-time (OFAT): CSL concentration, pH, temperature and incubation time respectively.

2.1 Fungal strain

The *S. commune* strain FCSC1 used was purchased from the Fungicultura website (fungicultura.com.br). This was maintained in Petri dishes (90 mm Ø) with half agar potato dextrose (APD) at 27 °C with rebounds every seven days. In addition, the strain was also stored using the Castellani method (De Capriles et al., 1989).

2.2 Growing medium

Corn steep liquor (CSL) Farmal® HSW-3742 (Ingredion Ltd, Balsa Nova, Brazil) was investigated as a nutrient source. This CSL originally contained 16.4% solubilized proteins and 41.0% °Brix at pH 4.2. The CSL formulations investigated in the subsequent experiments were sterilized in volumes of 90 mL in conical vials of 250 mL at 121°C, 1 psi and 15 min.

2.3 Inoculum

A 7-day growing *S. commune* FCSC1 culture on a APD plate was harvested with 20 mL of sterile distilled water and two drops of Tween™ 20 and an 18 mm *cell scraper* (Corning Inc., Glendale, AZ). The contents were homogenized in Tenbroeck Glass SKU 1982-10040 (Bellco Glass, Vineland, NJ). Aliquots of 1 mL of suspension equivalent to McFarland tube #5 were used for inoculation in 250 mL conical flasks containing 90 mL of sterile CSL. Finally, they were incubated at 110 rpm with variations of the following parameters: CSL concentration, pH, temperature and incubation time respectively.

2.4 Biomass Determination

Subsequent trials required the determination of the amount of biomass obtained. After the stipulated incubation times, the mycelial biomasses were collected and washed by immersion in 1 L of running water. The total biomasses were recovered by filtration on #3 Whatman® filter paper (Cytiva Inc, Marlborough, MA) and allowed to dry at 50 °C

for 48 h. Dry masses were determined with an analytical balance U210A (BelMark Eng Co, Monza, Italy). The dry masses were determined by gravimetry and pulverized in an SL-30 knife mill (Solab Equip. Lab., Piracicaba, Brazil) until they became finely particulate powder.

2.5 Determination of the best growth condition

2.5.1 N and C Source Effect (Culture Medium)

The pH of the CSL was corrected to 5.0 with NaOH 1 M. It was then combined with volumes of distilled water until concentrations of 5%, 10% and 15% of CLS medium were obtained. The sterile formulations were inoculated and incubated at 28 °C and 110 rpm in a TE-420 orbital incubator (Tecnal Ltd, Piracicaba, Brazil) for 120 hours. The cultures were conducted in triplicate for each concentration.

2.5.2 Initial pH Effect

Once the concentration of CLS that provided the largest amount of biomass was known, the effects of the initial pH were evaluated by correcting the pH of the medium to 4.0, 5.0 or 6.0 with 1 M HCl or 1 M NaOH, using a PH-500B-I potentiometer (Ionlab Ltda, Araucária, Brazil). The sterilized formulations received the inoculum and were incubated at 28 °C and 110 rpm in an orbital incubator for 120 hours. The cultures were conducted in triplicate for each pH value (Intiaj *et al.* 2008)

2.5.3 Temperature Effect

Using the best CSL concentration parameters and best initial pH. The sterile formulations were inoculated and incubated at 25 °C, 28 °C or 30 °C at 110 rpm in an orbital incubator for 120 hours. The cultures were conducted in triplicate for each temperature. (Nasreen *et al.*, 2015)

2.5.4 Incubation time Effect

Once the concentration, pH and temperature that provided the largest amount of biomass were known, the sterilized formulations received the inoculum and were incubated at the best temperature, at 110 rpm, in an orbital incubator. Every 24 h, groups

of triplicates were removed to determine the dry mass, to obtain biomass grown in 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h, 192 h, 216 h and 240 h (Nasreen *et al.*, 2015) element.

2.6 Reuse of the growing medium

The combination of all the parameters tested that provided higher biomass was called "optimized condition". Inoculums were added to the CSL of better concentration and with corrected pH. The incubations took place in the optimized condition, at 110 rpm, in an orbital incubator, for the best time.

The mycelial biomasses were collected, and the supernatants (50 mL) were transferred to new 250 mL conical flasks. No pH adjustments were made and each vial received 1 mL of inoculum. The incubations took place at the best temperature, at 110 rpm, in an orbital incubator, for the best time. The experiment was conducted in triplicate.

To yield comparison, a culture was also carried out in a culture medium widely used in microbial biotechnology and bioprocess laboratories, Sabouraud Dextrose Broth (SDB) 2%. Flasks with 90 mL of sterile SDB (pH 6.0) were inoculated and incubated at 28 °C at 110 rpm for 144 hours. The cultures were conducted in triplicate.

2.7 Statistical analysis

The mean and standard deviation values were determined. Normality was verified by the Shapiro-Wilk test, with an alpha of 0.05. Data comparison was performed using the One-Way ANOVA test with parametric data. The result was considered statistically significant when $p \leq 0.05$. The analyses were performed using the Prism 10.2.3® statistical package (GraphPad Software, La Jolla, CA).

3. RESULTS AND DISCUSSION

The concentration of 15% CSL was responsible for the highest production of fungal biomass of *S. commune* FCSC1 with $15,79 \pm 0,75$ g_{dry weight} L⁻¹ (figure 1a). The biomass yield was invariable when compared to the concentrations of 5% and 10% where they presented $11,16 \pm 1,572$ g_{dry weight} L⁻¹ e $12,14 \pm 0,360$ g_{dry weight} L⁻¹ respectively ($p > 0.05$).

In addition to mycelial biomass, the obtaining of schizophyll can be increased by replacing traditional sources of nitrogen and carbon, such as malt extract, with CSL (Kumar *et al.*, 2022).

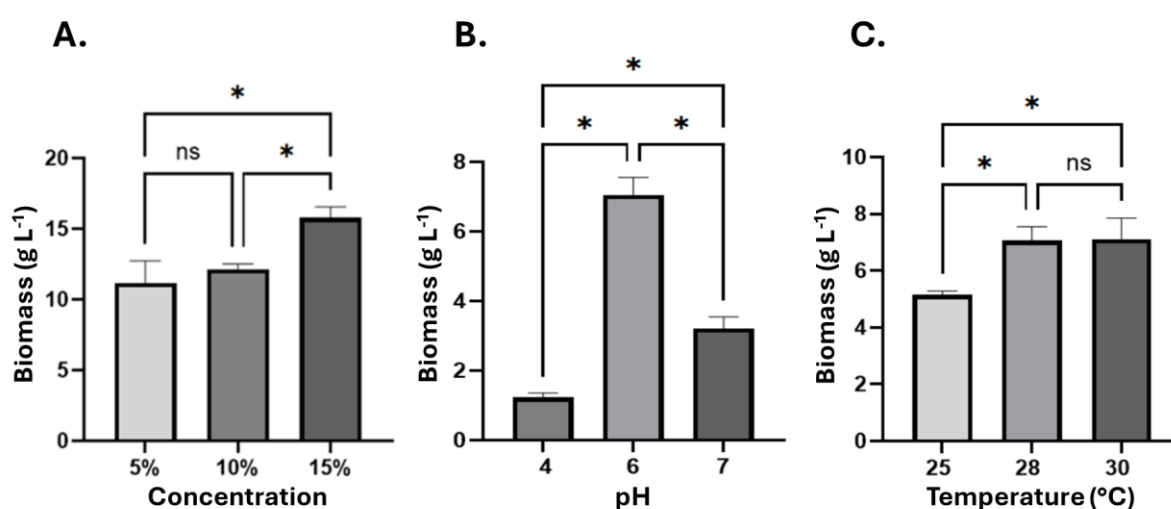


Figure 1. Effects of the variables CSL concentration (A), pH (B) and temperature (C) on obtaining biomass of *S. commune* FCSC1 grown in submerged fermentation. Where "*" represents p -value < 0.05 and "ns" represents p -value > 0.05 .

In addition to the technological aspects, the use of CSL as a source of nutrients is valuable in terms of cost, since its price is approximately US\$ 200 per ton, approximately one fifth of the value of yeast extract (Tan *et al.*, 2016).

As important as the availability of nutrients in adequate concentrations, the pH of the broth can interfere with greater or lesser microbial growth (Rosso *et al.*, 1995). In the case of filamentous fungi, this variable is one of the crucial factors to be controlled at the beginning of submerged fermentations (SmF), as pH influences hyphal growth, metabolite production, and broth rheology (Kim *et al.*, 2006).

In this study, the growth at different pH values varied significantly ($p < 0.05$), with the highest biomass obtained at pH 6, with a yield of $7.05 \pm 0.50 \text{ g}_{\text{dry weight}} \text{ L}^{-1}$ where in pH 4 e pH 7, were obtained $1.22 \pm 0.1310 \text{ g}_{\text{dry weight}} \text{ L}^{-1}$ and $3.21 \pm 0.3396 \text{ g}_{\text{dry weight}} \text{ L}^{-1}$ respectively (Figure 1b). Similar behavior was described for another microorganism of the order *Agaricales*, *Lentinula edodes* (*shiitake*), where the increase in pH resulted in higher biomass yield, reaching maximum production at pH 6.5 and with decay at pH 7 or higher (Ghada, 2011).

S. commune FCSC1 showed better growth performance when at 28 °C and 30 °C, with a yield of $7.10 \pm 0.53 \text{ g}_{\text{dry weight}} \text{ L}^{-1}$ and $7.11 \pm 0.71 \text{ g}_{\text{dry weight}} \text{ L}^{-1}$, respectively (figure 1c); indifferent to each other ($p > 0.05$), but higher than at 25 °C where it presented a yield of $5.14 \pm 0.1420 \text{ g}_{\text{dry weight}} \text{ L}^{-1}$ ($p < 0.05$).

This result differs from those previously published for *S. commune*, which indicated 25 °C for a higher yield in biomass production (Nasreen *et al.*, 2015). However, this divergence of information results from an number of factors, being determinant the sources of carbon and nitrogen, pH and oxygen availability, as well as intrinsic characteristics of the strain used (Xu & Yun, 2003).

It is interesting the fact that there are no divergences in the temperatures that favored the maximum growth, because with a lower *energy input* (at 28 °C) it is possible to obtain practically the same biomass, which is very required when operating industrial bioreactors (Schmidt, 2005).

With the best conditions defined, the time interval between inoculation and obtaining maximum biomass was verified. Figure 2 shows that the incubation time that provided the highest values for biomass was 144 h (6 d), with $6.27 \pm 0.33 \text{ g}_{\text{dry weight}} \text{ L}^{-1}$, and 168 h (7 d) with $6.77 \pm 0.19 \text{ g}_{\text{dry weight}} \text{ L}^{-1}$, no differences between them ($p > 0.05$). The other time intervals provided lower amounts of biomass ($p < 0.05$). These values contrast with others that used culture broth of *quasi-defined* composition and that generated even $12.36 \pm 0.3 \text{ g}_{\text{dry weight}} \text{ L}^{-1}$, depending on the strain and aeration (Smirnou *et al.*, 2011). It

should be remembered, however, that this study sought to employ an agro-industrial by-product only diluted and without percentage corrections of nutrients and only one strain was tested. Also, our study did not evaluate the impact of aeration on growth, since the growths occurred in a conical flask, which limits the supply of gas (de Oliveira *et al.*, 2023). This is a determining point that should be explored in a subsequent study.

The gradual rise of biomass as a function of time is an expected phenomenon and followed the pattern of the alternative (*i.e.*, non-Buchanan) growth curve for a closed single-batch system (Vrabl *et al.*, 2019). However, in time intervals of more than 168 h, the biomass reduced again. This drop in yield may be related to nutrient depletion (Domingos *et al.*, 2017), accumulation of toxic metabolites (Klaus *et al.*, 2021), reduction in oxygen transfer rate (Nitayavardhana *et al.*, 2013), and production of growth suppressor molecules when in *quorum sensing* (Albuquerque & Casadevall, 2012).

However, such assumptions are associated with growth inhibition and do not explain the reduction in an already formed biomass. Autolysis is a phenomenon that has long been described for mycelia of fungi of industrial interest (Lahoz *et al.*, 1976; Harvey *et al.*, 1998; White *et al.*, 2002) where nutrient deprivation and physical stress are the main extrinsic factors triggering autolysis, provoking the depreciation of lytic enzymes such as proteases, chitinases and glucanases, and consequently causing the degradation of already formed biomass to obtain carbon and nitrogen (White *et al.* 2002). Therefore, adequate nutrient intake is essential not only to produce biomass, but also for its preservation.

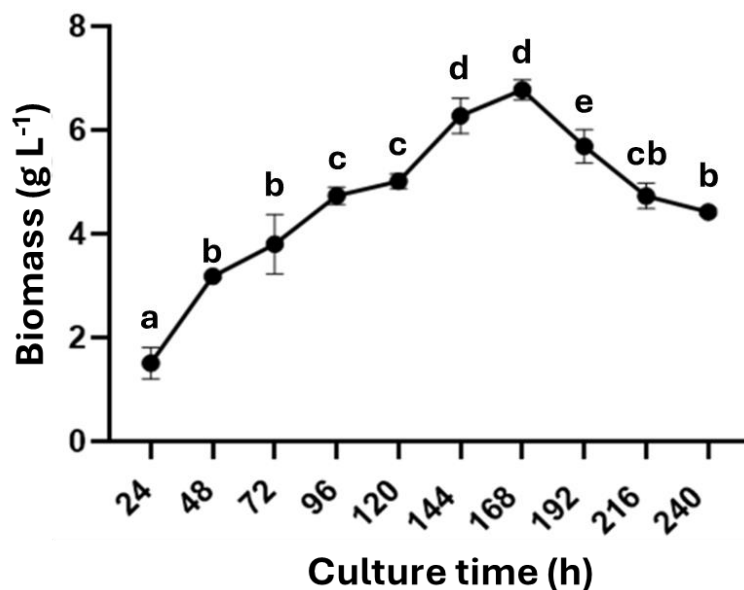


Figure 2. Biomass yield of *S. commune* FCSC1 grown in submerged fermentation, under optimized conditions. Where equal letters represent data with no statistical difference between the two moments.

The maximum biomass was obtained at 144 h-168 h. This period may seem somewhat long, if compared to that of bacteria (Baccante *et al.*, 2023) or yeasts (Vandermies & Fickers, 2019), when under optimal conditions; however, this same period was considered satisfactory for schizophyllan production (Kumari *et al.*, 2008; Smirnou *et al.*, 2011).

Seeking to achieve sustainability issues, our group evaluated the possibility of reusing the optimized juice, under optimized conditions, to produce more biomass. Also, a comparison was made with a standard fungal growth medium, SDB 2%. The results showed that the 15% CSL cultivation under optimized conditions generated a biomass of $22,80 \pm 2,318 \text{ g}_{\text{dry weight}} \text{ L}^{-1}$, and the biomass obtained with SDB 2% $2,39 \pm 0,7184 \text{ g}_{\text{massa seca}} \text{ L}^{-1}$, using the reused CSL was obtained $1,64 \pm 0,3806 \text{ g}_{\text{dry weight}} \text{ L}^{-1}$ (figure 3). These results show that it is not possible to obtain an appreciable amount of *S. commune* biomass in a broth whose nutrients have already been exhausted and have not undergone any correction. In addition, the 15% CSL with pH 6.0 was shown to be much higher than the SDB. This finding is very useful for laboratories that evaluate fungal

growth, since SDB costs about US\$ 220.00 per kilogram, enough to produce 20 L of broth. With a very close financial commitment, up to 6600 L of CSL 15% can be produced.

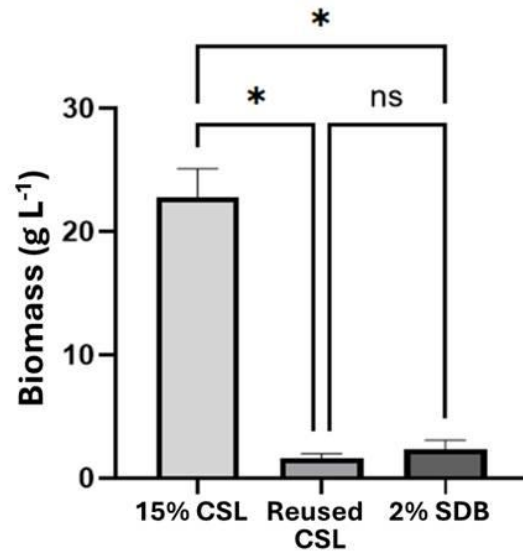


Figure 3. Biomass yield of *S. commune* FCSC1 grown in submerged fermentation, under optimized conditions with 15% CSL, reused CSL and 2% SDB. Where "*" represents p-value < 0.05 and "ns" represents p-value > 0.05.

4. CONCLUSION

The results obtained in this study demonstrated that the agro-industrial by-product CSL, when used under optimized conditions, not only provides a satisfactory yield in obtaining *S. Commune* FCSC1 biomass, but also as a sustainable and economically viable alternative to produce schizophylan.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albuquerque P, Casadevall A. Quorum sensing in fungi—a review. *Med Mycol*. 2012;50(4):337-345.

Baccante A, Petruccelli P, Saudino G, Ragnoni E, Johansson E, Di Cioccio V, Mazarakis K. Optimization of a bacterial cultivation medium via a design-of-experiment approach in a Sartorius Ambr® 15 fermentation microbioreactor system. *Fermentation*. 2023;9(12):1002.

Bakratsas G, Polydera A, Katapodis P, Stamatis H. Recent trends in submerged cultivation of mushrooms and their application as a source of nutraceuticals and food additives. *Future Foods*. 2021;4:100086.

Chegwin-Angarita C, Bello-Forero RA, Serrato-Bermúdez JC. Optimization of culture conditions in a bioreactor for the production of biomass and metabolites of the macromycete *Lentinula edodes*. *Res Square*. 2021;2-20.

Cutting KF. The cost-effectiveness of a novel soluble beta-glucan gel. *J Wound Care*. 2017;26(5):228-234.

da Silva LP, Reis RL, Correlo VM, Marques AP. Hydrogel-based strategies to advance therapies for chronic skin wounds. *Annu Rev Biomed Eng*. 2019;21:145-169.

De Capriles CH, Mata S, Middelveen M. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. *Mycopathologia*. 1989;106(2):73-79.

de Oliveira NS, da Silva GPL, Furlan O, Peña LC, Bianchini LF, Parahitiyawa N, Rosa EAR. The song remains the same. The lab bench dilemma of using shaken flasks in microbial biotransformation experiments. *Biocatal Biotransform*. 2023;1-26.

Delatte SL, Evans J, Hebra A, Adamson W, Othersen HB, Tagge EP. Effectiveness of beta-glucan collagen for treatment of partial-thickness burns in children. *J Pediatr Surg*. 2001;36:113-118.

Domingos M, de Souza-Cruz PB, Ferraz A, Prata AMR. A new bioreactor design for culturing basidiomycetes: Mycelial biomass production in submerged cultures of *Ceriporiopsis subvermispora*. Chem Eng Sci. 2017;170:670-676.

Ghada MM. Optimization of submerged culture conditions for mycelial biomass production by shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). Res J Agric Biol Sci. 2011;7(4):350-356.

Grip J, Steene E, Engstad RE, Hart J, Bell A, Skjæveland I, Basnet P, Škalko-Basnet N, Holsæter AM. Development of a novel beta-glucan supplemented hydrogel spray formulation and wound healing efficacy in a db/db diabetic mouse model. Eur J Pharm Biopharm. 2021;169:280-291.

Harvey LM, McNeil B, Berry DR, White S. Autolysis in batch cultures of *Penicillium chrysogenum* at varying agitation rates. Enzyme Microb Technol. 1998;22(6):446-458.

Huang J, Zhu S, Li C, Zhang C, Ji Y. Cost-effective optimization of gellan gum production by *Sphingomonas paucimobilis* using corn steep liquor. Preparative Biochemistry & Biotechnology. 2020;50(2):191-197.

Imtiaj A, Jayasinghe C, Lee GW, Kim HY, Shim MJ, Rho HS, Lee HS, Hur H, Lee MW, Lee UY, Lee TS. Physicochemical Requirement for the Vegetative Growth of *Schizophyllum commune* Collected from Different Ecological Origins. Mycobiology. Capítulo 1. 2008; 36(1):34-39.

Jellmayer JA, Ferreira LS, Manente FA, Gonçalves AC, Polesi MC, Batista-Duharte A, Carlos IZ. Dectin-1 expression by macrophages and related antifungal mechanisms in a murine model of *Sporothrix schenckii* sensu stricto systemic infection. Microb Pathog. 2017;110:78-84.

Kim HM, Park MK, Yun JW. Culture pH affects exopolysaccharide production in submerged mycelial culture of *Ganoderma lucidum*. Appl Biochem Biotechnol. 2006;134:249-262.

Klaus A, Wan-Mohtar WAAQI, Nikolić B, Cvetković S, Vunduk J. Pink oyster mushroom *Pleurotus flabellatus* mycelium produced by an airlift bioreactor—the evidence of potent in vitro biological activities. *World J Microbiol Biotechnol*. 2021;37:1-14.

Kumar A, Bharti AK, Bezie Y. *Schizophyllum commune*: A fungal cell-factory for production of valuable metabolites and enzymes. *BioResources*. 2022;17(3).

Kumari M, Survase SA, Singhal RS. Production of schizophyllan using *Schizophyllum commune* NRCM. *Bioresour Technol*. 2008;99(5):1036-1043.

Lahoz R, Reyes F, Leblis MP. Lytic enzymes in the autolysis of filamentous fungi. *Mycopathologia*. 1976 Jan;60:45-9.

Letti LA Jr, Destéfani-Vitola M, Melo Pereira GV, Karp SG, Pedroni Medeiros AB, Ferreira da Costa ES, Bissoqui L, Soccol CR. Solid-state fermentation for the production of mushrooms. *Curr Dev Biotechnol Bioeng*. Capítulo 14. 2018; 285-318.

Majtan J, Jesenak M. β -glucans: multi-functional modulator of wound healing. *Molecules*. 2018;(23):806.

Nasreen Z, Khan SJ, Yasmeen A, Shafique M, Usman S, Ali S. Optimization of submerged culture conditions for biomass production in *Schizophyllum commune*, a medicinal mushroom. *Int J Curr Microbiol App Sci*. 2015;4:258-266.

Nitayavardhana S, Issarapayup K, Pavasant P, Khanal SK. Production of protein-rich fungal biomass in an airlift bioreactor using vinasse as substrate. *Bioresour Technol*. 2013;133:301-306.

Okada Y, Tsuzuki Y, Sugihara N, Nishii S, Shibuya N, Mizoguchi A, Itoh S, Tanemoto R, Inaba K, Hanawa Y, Horiuchi K, Wada A, Higashiyama M, Watanabe C, Kurihara C, Komoto S, Tomita K, Miura S, Hokari R. Novel probiotic yeast from Miso promotes regulatory dendritic cell IL-10 production and attenuates DSS-induced colitis in mice. *J Gastroenterol*. 2021;56(9):829-842.

Petre M, Petre V. Biotechnology of mushroom growth through submerged cultivation. *Mushroom Biotechnol*. 2016:1-18.

Portera CA, Love EJ, Memore L, Zhang L, Müller A, Browder W, Williams DL. Effect of macrophage stimulation on collagen biosynthesis in the healing wound. *Am Surg*. 1997;63(2):125-131.

Rajarajan A, Dakshanamoorthy A. Beta-glucans: a biomimetic approach for reducing chronicity in delayed wound healing. *J Dermatol Skin Sci*. 2020;2(3):16-21.

Rop O, Mlcek J, Jurikova T. Beta-glucans in higher fungi and their health effects. *Nutr Rev*. 2009;67(11):624-631.

Rosso L, Lobry JR, Bajard S, Flandrois JP. Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth. *Appl Environ Microbiol*. 1995;61(2):610-616.

Schmidt FR. Optimization and scale up of industrial fermentation processes. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005;68:425-435.

Seo G, Hyun C, Choi S, Kim YM, Cho M. The wound healing effect of four types of beta-glucan. *Appl Biol Chem*. 2019;62(20):1-6.

Smirnou D, Krcmar M, Prochazkova EVA. Chitin-Glucan complex production by *Schizophyllum commune* submerged cultivation. *Polish J Microbiol*, 2011;60(3):223-228.

Taiwo AE, Musonge P. Valorization of corn steep liquor for improved value-added products: a review. *Recent Innov Chem Eng*. 2024;17(1):27.

Tang YJ, Zhu LW, Li HM, Li DS. Submerged culture of mushrooms in bioreactors - challenges, current state-of-the-art, and future prospects. *Food Technol Biotechnol*, 2007;45(3):221-229.

Thongsiri C, Nagai-Yoshioka Y, Yamasaki R, et al. *Schizophyllum commune* β -glucan: Effect on interleukin-10 expression induced by lipopolysaccharide from periodontopathic bacteria. *Carbohydrate Polymers*. 2021;253:117285.

Van den Berg LM, Zijlstra-Willems EM, Richters CD, Ulrich MM, Geijtenbeek TB. Dectin-1 activation induces proliferation and migration of human keratinocytes enhancing wound re-epithelialization. *Cell Immunol*, 2014;289(1-2):49-54.

Vandermies M, Fickers P. Bioreactor-scale strategies for the production of recombinant protein in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microorganisms*, 2019;7(2):40.

Vrabl P, Schinagl CW, Artmann DJ, Heiss B, Burgstaller W. Fungal growth in batch culture—what we could benefit if we start looking closer. *Front Microbiol*, 2019;10:2391.

Wei D, Zhang L, Williams DL, Browder IW. Glucan stimulates human dermal fibroblast collagen biosynthesis through a nuclear factor-1 dependent mechanism. *Wound Repair Regen*, 2002;10(3):161-168.

White S, McIntyre M, Berry DR, McNeil B. The autolysis of industrial filamentous fungi. *Crit Rev Biotechnol*, 2002;22(1):1-14.

Xu CP, Yun JW. 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*, 2003;38(2):193-199.

Zhao L, Fan B, Fengjun Y, *et al*. Pathways and mechanisms of improving carbon and nitrogen conversion by core fungal community driven during co-composting of spent mushroom substrate and corn steep liquor. *Research Square*, preprint, 2023.

Zhou K, Yu J, Ma Y, *et al*. Corn Steep Liquor: Green Biological Resources for Bioindustry. *Appl Biochem Biotechnol*. 2022;194(7):3280-3295.

Zykova SN, Balandina KA, Vorokhobina NV, Kuznetsova AV, Engstad R, Zykova TA. Macrophage stimulating agent soluble yeast β -1,3/1,6-glucan as a topical treatment of diabetic foot and leg ulcers: A randomized, double blind, placebo-controlled phase II study. *J Diabetes Invest*, 2014;5:392-399.