



CULTIVO SUBMERSO DE *Ganoderma lucidum* EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

Leandro da Silva Clementino¹; Fabio Rogério Rosado²

RESUMO: O fungo basideomicete *Ganoderma lucidum* vem sendo amplamente utilizado no mundo todo, mas principalmente nos países orientais, devido as suas inúmeras propriedades medicinais. Conhecido popularmente como Reishi, este organismo é alvo de muitas pesquisas que estão permitindo conhecer melhor seus princípios ativos para o tratamento de doenças como o câncer, alergias, hipertensão arterial e outras, ou mesmo no sentido de prevenção destas doenças. Além disso, os fungos em geral despertam grande interesse por sua capacidade biodegradadora que pode ser utilizada para o tratamento de resíduos agroindustriais. Existem poucos dados sobre o cultivo submerso de *Ganoderma lucidum*. Deste modo, é de grande interesse desenvolver condições necessárias para se obter substâncias de interesse farmacológico e biotecnológico desse fungo. Este trabalho tem por objetivo testar fontes de carbono e nutrientes alternativos, oriundos de meios de cultivo líquidos diferentes: dextrose, melaço de cana-de-açúcar e o lodo (um subproduto do processamento da cana) na produção de biomassa e exopolissacarídeos (EPSs) de *G. lucidum* em 14 dias de cultivo. A biomassa foi produzida em erlenmeyers contendo meios de cultivo com diferentes concentrações de fontes de carbono: 10 e 30g/L. A biomassa foi separada do filtrado cultural através de filtração a vácuo, desidratada e pesada. Os polissacarídeos extracelulares (EPSs) foram precipitados com solvente orgânico resfriado (etanol). A variação de pH do meio também foi acompanhada. Os meios de cultivo utilizados permitem a produção de biomassa e EPSs por *G. lucidum*. De acordo com os resultados obtidos, a produção de biomassa e exopolissacarídeos são melhores favorecidas quando se faz a correlação entre o subproduto do processamento da cana (lodo) na concentração de 30g/L.

PALAVRAS-CHAVE: Cultivo submerso; *Ganoderma lucidum*; Biomassa; Exopolissacarídeos.

INTRODUÇÃO

Ganoderma lucidum é o cogumelo medicinal mais vendido no mundo, movimentando bilhões de dólares ao ano (URBEN, 2004). É utilizado pelos chineses há milênios devido às inúmeras propriedades terapêuticas atribuídas a esse fungo, sem nenhum efeito colateral constatado, o que despertou o interesse pelos ocidentais nas últimas décadas (RUBEL, 2006).

Tão amplo uso popular incentivou pesquisas principalmente em relação às atividades antitumorais e imunomoduladoras de *G. lucidum*. Destacam-se também sua ação antialérgica comprovada cientificamente, hipotensiva, hipoglicêmica, antibacteriana e antioxidante (URBEN, 2004). Entre os diversos metabólitos de *G. lucidum*, os polissacarídeos e triterpenos são importantes princípios ativos responsáveis por suas atividades farmacológicas (RUBEL, 2006).

A extração de polissacarídeos de fungos basidiomicetos vem sendo estudada de longa data. Essa e outras substâncias são utilizadas no tratamento de doenças em humanos, principalmente o câncer. Já foi demonstrada a eficácia nas respostas do sistema imunológico em tratamentos de tumores malignos. Pesquisadores americanos e chineses têm demonstrado em seus estudos as atividades antitumorais dos polissacarídeos e triterpenóides extraídos de várias espécies do gênero *Ganoderma*.

¹ Acadêmico do Curso de Biomedicina do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR; Maringá – PR. Programa de Bolsas de Iniciação Científica do Cesumar (PROBIC). leandro_mga18@hotmail.com.

² Orientador e Docente do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR; Maringá – PR. fabiorosado@cesumar.br.

Além disso, substâncias extraídas de outras espécies de basidiomicetos são aplicadas para a diminuição do colesterol, redutores de pressão sanguínea, potencializadores do sistema imunológico e também como drogas para controle cardíaco (SILVA; COELHO, 2006).

O acúmulo de resíduos agrícolas como palha de arroz, trigo e outros cereais, e também dos resíduos agroindustriais dentre eles, tortas de algodão, soja e bagaço de cana-de-açúcar, além de serragem de madeira, muitas vezes representam problemas ambientais porque são substratos persistentes no meio ambiente difícil de serem degradados. Devido à capacidade de converter lignina e celulose em gás carbônico e água, fungos basidiomicetos são muito utilizados em processos biotecnológicos a fim de degradar substratos lignocelulósicos. E muitas vezes, são utilizados como substratos para a produção de cogumelos comestíveis ou ainda para produção de biomassa fúngica a ser empregada em processos industriais (SILVA; COELHO, 2006).

Pertencendo a esse grupo o *G. lucidum*, é capaz de degradar componentes lignolíticos complexos, por isso o substrato de cultura para o desenvolvimento do corpo de frutificação de *G. lucidum* são troncos de árvores constituídas por madeiras duras e serragens (SEO; KIRK, 2000 apud RUBEL, 2006).

Os polissacarídeos e outros princípios ativos de *G. lucidum* podem ser encontrados e isolados a partir do basidioma e do micélio (corpo vegetativo do fungo), mas extrair essas substâncias é mais difícil podendo conter toxinas ou metais pesados, e a produção é anual podendo levar de três a seis meses, isso vale tanto para o cultivo *in natura* quanto para o cultivo em fermentação de estado sólido. Desta forma, há um recente interesse na produção de micélio em fermentação submersa, que ocupa espaços reduzidos, menos custos e diminuição das chances de contaminação, o que possibilita uma total recuperação de várias substâncias de *G. lucidum* como os endopolissacarídeos, isolados do micélio, e dos exopolissacarídeos (EPSs), isolados do caldo de cultivo, que são biomoléculas de grande interesse farmacológico (RUBEL, 2006)

A produção de EPSs é um processo mais simples em relação à endopolissacarídeo, já que sua recuperação é mais fácil e não requer múltiplas etapas de extração, sendo mais atrativa para a produção em escala industrial (LEE; LEE; LEE, 1999 apud RUBEL, 2006).

Na composição do meio de cultura submerso as concentrações iniciais de açúcar, além do pH e a agitação também atuam de forma decisiva sobre o processo fermentativo do fungo. Os carboidratos desempenham um papel importante no crescimento dos cogumelos, proporcionando energia às células e a síntese de diversas moléculas que resultam em aproximadamente metade do peso da matéria seca dos corpos de frutificação, em carbono (RUBEL, 2006).

Considerando que a indústria canavieira no Brasil está em processo de expansão, principalmente quanto à produção de álcool, é interessante testar fontes de nutrientes provenientes da cana-de-açúcar para o cultivo de fungos com potencial farmacológico e biotecnológico. Um exemplo é o melaço de cana-de-açúcar e um subproduto conhecido como lodo resultado do processo de decantação do caldo de cana-de-açúcar, fontes ricas principalmente em carboidratos (SILVA *et al.*, 2003; RHEE *et al.*, 1984, apud NETO *et al.* 2005; REVISTA RURAL, 2005).

Assim é possível que estas diferentes fontes de açúcares importantes para a produção de biomoléculas e para o metabolismo celular dos fungos, possam ser utilizadas para a produção de biomassa e EPSs, utilizando soluções aquosas do melaço e iodo de cana em cultivo submerso de *G. lucidum*.

Song e colaboradores (1987 apud ROSSI *et al.*, 2001) mostraram que a solução aquosa de melado de cana na concentração de 30,0g/L é capaz de manter o crescimento

micelial vigoroso de *Lentinula edodes*; Para Zanetti e Ranal (1997 apud ROSSI *et al.*, 2001) a glucose e a frutose são importantes fontes de energia para a atividade metabólica dos cogumelos; Wasser (2005 apud RUBEL, 2006) diz que um importante aspecto ecológico dos cogumelos em cultivo artificial, é a possibilidade de propagá-los em resíduos provenientes da agroindústria e sem emissão de lixo no final do processo.

MATERIAL E MÉTODOS

O isolado de *Ganoderma lucidum* foi cedido pelo Centro Universitário de Maringá – Coleção de Cultura de Basidiomicetes. Este foi cultivado em meio sólido por sete (7) dias utilizando BDA (batata, dextrose e ágar) em placas de Petry como meio de cultura. As culturas foram repicadas a cada 3 meses para a manutenção do vigor do fungo.

Após o crescimento do micélio, tubos de ensaio contendo 5 mL do meio líquido BD (dextrose há 60g/L), da espécie a ser testada, receberam um disco com aproximadamente 1cm de diâmetro de meio de cultura batata dextrose ágar (BDA recém-colonizado pelo micélio, após 7 dias de incubação, a 25°C, no escuro), e incubado no escuro de forma estática por 14 dias.

Para o preparo do meio de cultura líquido 150g de batatas (inglesa) foram picadas e cozidas por 30 minutos em 1L de água deionizada. Depois o caldo foi coado em gaze e foram diluídas as fontes de carbono (dextrose, melado e iodo de cana-de-açúcar) em diferentes concentrações (10 e 30g/L). O pH foi ajustado para 6,0, com NaOH e ácido acético. Os meios de cultivo adicionados aos erlenmeyers foram esterilizados em autoclave a 121°C, 1 atm., por 15 minutos. O meio BD (batata e dextrose) foi usado como controle.

Erlenmeyers de 250 mL contendo 150 mL meio de cultura líquido estéril com diferentes concentrações de dextrose, melado e iodo de cana-de-açúcar foram inoculados com 5 mL de cultura líquida (um tubo de inóculo líquido, após 14 dias de crescimento) sobre condições estéreis em Câmara de Fluxo Laminar Vertical.

A incubação foi realizada em agitador mecânico rotatório (Shaker) com velocidade de 100 rpm durante 7 dias com temperatura média de 26°C ($\pm 5^\circ\text{C}$), e mais 7 dias sobre cultura estática a temperatura ambiente. Durante o cultivo, a luminosidade constituiu de 12 horas claro intercaladas com 12 horas no escuro. Os frascos foram tamponados com algodão (para aeração adequada), para o crescimento dos fungos em cultura submersa.

Após o período de incubação a biomassa foi separada por filtração (com auxílio de funil de porcelana contendo papel de filtro Whatman n° 1. O peso seco da biomassa foi obtido com o auxílio de balança analítica usando uma bomba de vácuo, após secagem do material em estufa à 100°C, por 8 horas.

Os polissacarídeos foram precipitados adicionando-se etanol resfriado ao filtrado cultural (2:1, v.v.) e separados por filtração com auxílio de funil de porcelana contendo papel de filtro previamente pesados, usando uma bomba de vácuo. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso esquema fatorial 3x2 (3 substratos versus 2 concentrações). Cada tratamento foi repetido 3 vezes.

Os dados foram analisados por análise de variância e as médias entre tratamentos comparados pelo teste de Scott Knott a 5%. Para a análise foi utilizado o programa Sisvar da Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pode ser observado que o tratamento com lodo de cana-de-açúcar proporcionou maior valor de biomassa do fungo *G.lucidum* após 14 dias de cultivo. Este valor foi diferente estatisticamente dos encontrados nos tratamentos com dextrose e melado de cana-de-açúcar. Entre as concentrações, foi detectada que a maior concentração de lodo (30g/L) favoreceu o crescimento micelial do fungo. Não houve diferença estatística entre os tratamentos com dextrose e melado (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios de biomassa(g) de *Ganoderma lucidum* após 14 dias de cultivo em diferentes tratamentos.

Tratamentos	Concentrações	
	10g/L	30g/L
Dextrose	0, 4040 aA	0, 4690 bA
Melado de cana-de-açúcar	0, 3734 aA	0, 5140 bA
lodo de cana-de-açúcar	0, 4694 aB	0, 6948 aA

*Letras minúsculas iguais nas colunas representam tratamentos iguais estatisticamente

*Letras maiúsculas iguais nas linhas representam concentrações iguais estatisticamente

Na produção de EPSs, obteve-se maior valor no tratamento com lodo de cana-de-açúcar em maior concentração (30g/L). Não houve diferença estatística entre os tratamentos com dextrose e melado.

Tabela 2. Valores médios de EPS(g) de *Ganoderma lucidum* após 14 dias de cultivo em diferentes tratamentos.

Tratamentos	Concentrações	
	10g/L	30g/L
Dextrose	0, 0069 aA	0, 0230 bA
Melado de cana-de-açúcar	0, 0056 aA	0, 0170 bA
lodo de cana-de-açúcar	0, 0077 aB	0, 0610 aA

*Letras minúsculas iguais nas colunas representam tratamentos iguais estatisticamente

*Letras maiúsculas iguais nas linhas representam concentrações iguais estatisticamente

No tratamento com dextrose obteve-se maior variação do pH, considerando a diferença do pH no início do cultivo (pH=6,0) ao pH no final do cultivo (pH=5,0). Sendo a maior variação detectada na concentração maior de dextrose (30g/L) como vemos na Tabela 3.

Tabela 3. Valores médios de pH de *Ganoderma lucidum* após 14 dias de cultivo em diferentes tratamentos.

Tratamentos	Concentrações	
	10g/L	30g/L
Dextrose	5,20 bA	5,00 cB
Melado de cana-de-açúcar	5,47 aA	5,40 bA
lodo de cana-de-açúcar	5,43 aA	5,53 aA

*Letras minúsculas iguais nas colunas representam tratamentos iguais estatisticamente

*Letras maiúsculas iguais nas linhas representam concentrações iguais estatisticamente

Tang e Zhong (2002 apud RUBEL, 2006) relatam que altas concentrações iniciais de glicose e também de sacarose em meio de cultura submerso, aumentam a produção de EPSs de *G. lucidum*, mas diminuíram drasticamente a produção de biomassa. A produção de EPS atingiu $0,87 \pm 0,05\text{g/L}$ e $0,75 \pm 0,05\text{g/L}$.

O melaço de cana-de-açúcar utilizado para o cultivo do fungo é uma rica fonte de açúcares, possuindo no mínimo 60% de açúcares totais sendo o principal a sacarose, além de 15% de açúcares redutores, glucose e frutose (SILVA *et al.*, 2003). O melaço de cana-de-açúcar é um subproduto da indústria do açúcar, apresenta uma alta concentração de sacarose, além de outras substâncias importantes para processos fermentativos (RHEE *et al.*, 1984, apud NETO *et al.* 2005.).

De acordo com Tan & Wahab (1997) apud Silva *et al* (2007), os fungos de podridão branca exibem baixa atividade celulolítica relativa no estágio anamórfico ou assexuado, pois se desenvolvem, principalmente, em substratos altamente lignificados como a madeira e a serragem, além de produzirem enzimas ligadas à polimerização da lignina. Por isso o meleco e a dextrose não tenham sido tão eficientes no cultivo do fungo.

O resultado do processo de decantação do caldo de cana-de-açúcar forma um subproduto conhecido como lodo. Como esse lodo possui altas concentrações de açúcares, palha, terra, cera e outros resíduos provenientes do processo de moagem, o caldo que fica da decantação precisa passar por um filtro rotativo com placas que retém a passagem desses resíduos, formando uma massa chamada de Torta (REVISTA RURAL, 2005). A presença da palha e outros resíduos do processo de moagem presentes no lodo podem ter contribuído para uma melhor produção de biomassa e EPSs pelo fungo testado em relação às outras fontes de carbono (Tabela 1-2)

Reginato (1992 apud SILVA *et al.*, 2007) relatou que flutuações ou oscilações nas atividades enzimáticas durante o crescimento de um microrganismo podem ser devido a diversos fatores, tais como: a variação do pH pode causar inativação de algumas enzimas e estimular a secreção de outras; algumas formas de enzimas podem sofrer ataque proteolítico preferencial; durante o crescimento do microrganismo estas enzimas podem ser adsorvidas pelos substratos insolúveis e serem liberadas após a exaustão da celulose.

Lee e colaboradores (1999) verificaram que o pH controlado definitivamente afeta o crescimento micelial e da produção de EPSs no cultivo submerso de *G. lucidum*. Eles definiram uma técnica onde é mantido e na fase inicial do cultivo um pH=3 e foi aumentado exponencialmente até 6,0 no final do cultivo, o que aumentou a produção de EPS de 20,1g/L para 4,1g/L além de promover baixa viscosidade e elasticidade do caldo de cultura. Isso se deve porque o pH=3,0 favorece o crescimento micelial e o pH=6,0 promove a produção de EPSs.

A agitação também influi no cultivo submerso de *G. lucidum*, onde alguns pesquisadores observaram que a produção de EPSs pelo fungo é diretamente proporcional ao tempo de agitação do meio de cultura, já em condições estáticas o crescimento micelial foi favorecido (RUBEL, 2006).

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, a produção de biomassa e exopolissacarídeos são melhores favorecidas quando se utiliza o subproduto do processamento da cana (lodo) na concentração de 30g/L, em relação aos outros meios de cultura testados.

Apesar alta concentração de sacarose, além de outras substâncias importantes para processos fermentativos, o melaço não promoveu uma melhor produção de biomassa e EPSs *G. lucidum* em relação à dextrose.

O meio de cultura com o lodo, por conter resíduos lignocelulósicos possivelmente permitiu a formação de um ambiente favorável ao desenvolvimento do fungo, e a atuação de suas enzimas e produção de EPSs.

No tratamento onde ocorreu maior produção de EPSs e biomassa (cultura com lodo) houve pouca variação do pH no meio de cultivo no final do processo fermentativo (após 14 dias de incubação).

REFERÊNCIAS

LEE, Kyu Min; LEE, Shin Young; LEE, Hyeon Yong. Bistage control of pH for improving exopolysaccharide production from mycelia of *Ganoderma lucidum* in an air-lift fermentor. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 88, p. 646-650, 1999.

MAZEIRO, Rosana. **Produção de exopolissacarídeos por basideomicetos em cultura submersa: “screening”, caracterização química preliminar e estudo de produção utilizando *irpex lacteus*(fr.:fr.) fr.** Tese(Doutorado em Botânica). Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo. São Paulo, 1996.

NETO, Doumit Camilios et al.LLIGOI, Maria Antonia Pedrine Colabone; OLIVEIRA, Marcos Roberto. Otimização da produção de etanol por *Zymomonas mobilis* na fermentação do melaço de cana-de-açúcar. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 26, n. 1, p. 17-22, jan./jun. 2005.

MOAGEM: a transformação da cana em riqueza. **Revista Rural**, São Paulo, n. 86, abril 2005.

ROSSI, Ivan H.; MONTEIRO, Antonio C; MACHADO, José O. Desenvolvimento micelial de *Lentinula edodes* como efeito da profundidade e suplementação do substrato. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, 2001, v. 36, n. 6, p. 887-891.

RUBEL, Rosália. **Produção de compostos bioativos de *Ganoderma lucidum* por fermentação em estado sólido: avaliação da ação antitumoral, imunomoduladora e hipolipidêmica.** Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos). Setor de Tecnologia. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

SILVA, Fábio C. da.; CESAR, Mario A. A.; SILVA, Carlos A. B. **Pequenas indústrias rurais de cana-de-açúcar**: melado, rapadura e açúcar mascavo. Brasília: Embrapa Informação Tecnologia, 2003.

SILVA, K. R. I.; DURRANT, L. R.; MENEZES, C. R. Produção de enzimas lignocelulolíticas por fungos basidiomicetos de degradação branca cultivados em bagaço de cana-de-açúcar através de fermentação semisólida. In: WORKSHOP INTERNACIONAL BRASIL-JAPÃO EM BIOCOMBUSTÍVEL, MEIO-AMBIENTE E NOVOS PRODUTOS DE BIOMASSA, 4, 2007, Campinas. **Anais...** Campinas: Unicamp, 2007. v. 1.

SILVA, R. R.; COELHO, G. D. **Fungos principais grupos e aplicações biotecnológica**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2006.

URBEN, Arailde F. **Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada**. 2. ed. Brasília: Embrapa recursos genéticos e biotecnologia. 2004.