

Alterações Morfológicas de *Ganoderma lucidum* em Fermentação Submersa

Ricardo Wagner¹, David A. Mitchell¹, Guilherme Lanzi Sasaki¹, Maria Angela Lopes de Almeida Amazonas²

¹ Universidade Federal do Paraná – Depto de Bioquímica e Biologia Molecular
Caixa Postal 19046 – 81530-990 Curitiba – PR – Email: davidmitchell@ufpr.br

² Centro Nacional de Pesquisa de Florestas – EMBRAPA Floresta – Colombo – PR

RESUMO

O corpo de frutificação do basidiomiceto *Ganoderma lucidum* é utilizado no Oriente há mais de 2000 anos para o tratamento de diversas doenças. Há atualmente um grande interesse no desenvolvimento da fermentação submersa para a produção de micélio e produtos bioativos como polissacarídeos e terpenóides. Este trabalho mostra que alterações morfológicas presenciadas durante a fermentação submersa ocorrem de forma simultânea à alterações fisiológicas. Após 15 dias de cultivo ocorre a fragmentação dos pellets e é somente então que a glucose do meio passa a ser consumida. A produção ou liberação de polissacarídeos extracelulares parece ser influenciada por estas alterações, pois a sua presença no caldo aumenta de forma proporcional à biomassa somente após o 15º dia de fermentação. O melhor entendimento sobre a influência de fatores morfológicos e fisiológicos na produção de polissacarídeos poderá ser uma ferramenta útil para o desenvolvimento de processos em larga escala.

INTRODUÇÃO

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

Ainda hoje o corpo de frutificação de *G. lucidum* é um remédio popular usado no tratamento de doenças como hepatopatia, hepatite crônica, nefrite, hipertensão, hiperlipidemia, artrite, neurastenia, insônia, asma, bronquite, úlcera gástrica, arteriosclerose, leucopenia, diabetes, anorexia (Jong e Birmingham, 1992) e câncer (Stamets, 1993; Mizuno *et al.*, 1995). Tão amplo uso popular levou à pesquisa e à descoberta de várias substâncias com atividade biológica. Dentre estas destacam-se as frações polissacarídicas contendo β -D-glucanas-(1 \rightarrow 3), que podem ser ramificadas, O-substituídas, por outras unidades de glucose no C-6 da cadeia principal do polissacarídeo, as quais demonstram alta atividade antitumoral (Sone e Misaki, 1985) e terpenóides com atividade citotóxica (Lin, 1991) (Mizuno, 1995).

Embora polissacarídeos com atividade biológica tenham sido encontrados tanto no corpo de frutificação como no micélio (Mizuno *et al.*, 1999); (Jong e Birmingham, 1992), a maioria dos produtos de *G. lucidum* disponíveis no mercado derivam do corpo de frutificação. Desta forma, há um recente interesse na produção de micélio e polissacarídeos deste fungo através de técnicas de fermentação submersa (Yang e Liau, 1998a, 1998b); (Lee *et al.*, 1999); (Yang *et al.*, 2000); (Fang *et al.*, 2002); (Fang e Zhong, 2002a, 2002b, 2002c); (Tang e Zhong, 2002a, 2002b, 2003); (Kim *et al.*, 2002). A produção de micélio e polissacarídeos por fermentação submersa tem se tornado uma alternativa importante devido ao fato de que

em tubo Eppendorf a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior determinação da concentração de glucose no meio pelo método da glucose oxidase. Para tanto utilizou-se o kit de diagnóstico da DiaSys Diagnostic Systems GMBH&Co.KG – Alemanha e espectrofotômetro Femto[®] 700 Plus.

O filtrado do caldo de fermentação e da água de lavagem de todas as frações de biomassa foi reunido e seu volume reduzido a cerca de 50 mL em rotaevaporador. As frações polissacarídicas extracelulares foram obtidas por precipitação ao se adicionar a amostra a 3 volumes de etanol 96° GL. O precipitado obtido na forma de fibras, o qual foi enrolado em bastão de vidro, enxaguado com cerca de 100 mL de etanol 96° GL, redissolvido em água destilada, liofilizado e seu conteúdo de carboidratos quantificado pelo método do fenol-sulfúrico (Dubois, 1956).

RESULTADOS

A Figura 1 mostra a curva de crescimento de *G. lucidum* durante 19 dias de cultivo. Após uma fase lag de 5 dias observou-se uma fase de crescimento rápido, a qual ajustou-se bem à equação logística. O ajuste resultou uma constante da velocidade específica de crescimento de $0,4\text{ g/g/dia}$ e uma biomassa máxima de $13,0\text{ g/L}$. Apesar de a fase estacionária não ter sido atingida, esta fase teve início por volta de 19° dia em repetições deste experimento (dados não mostrados). Neste dia o rendimento de biomassa foi de $12,4 \pm 1,3\text{ g/L}$, muito próximo ao valor máximo teórico calculado.

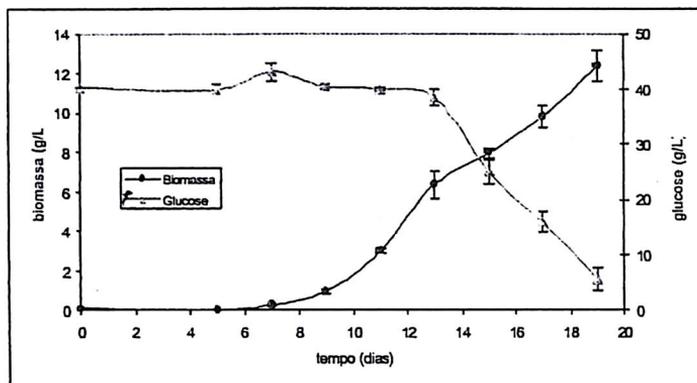


Figura 1 – Curva de crescimento e consumo de glucose ao longo da fermentação

A distribuição das frações de biomassa ao longo da fermentação pode ser vista na Figura 2. Até o 13° dia observou-se um aumento gradativo de biomassa na fração grande, chegando a representar 54 % da biomassa total neste dia. Além disso, o diâmetro dos *pellets* também aumentou dia após dia. A Figura 3 mostra as alterações que ocorrem na superfície dos *pellets* entre o 7° e 13° dia de fermentação. A partir do 7° dia notou-se o surgimento de algumas hifas mais longas que a maioria, crescendo em direção oposta ao centro do *pellet*. Estas hifas longas ramificaram-se originando prolongamentos de micélio que podiam ser vistos a olho nu a partir do 9° dia. Por volta do 13° dia a rigidez dos *pellets* havia diminuído bastante e os prolongamentos de micélio em sua superfície apresentavam um tamanho maior que o observado até o momento. Além disso, alguns destes prolongamentos haviam se desprendido dos *pellets*, encontrando-se dispersos no meio (Figura 4). A partir do 13° dia ocorre uma intensa fragmentação dos *pellets*. Os fragmentos se desenvolveram e ao final da fermentação apresentavam-se como novos *pellets* em formato de grão de arroz. Como visto na Figura 2,

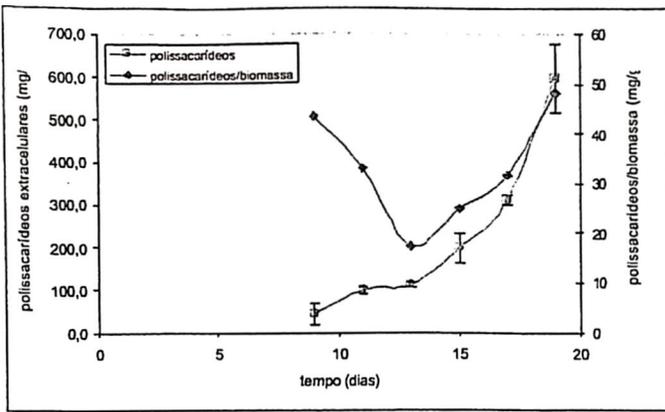


Figura 5 – Produção de polissacarídeos extracelulares e relação polissacarídeos/biomassa ao longo da fermentação

DISCUSSÃO

É possível afirmar que nas primeiras fases de crescimento o fungo prefere utilizar outras fontes de carbono presentes no meio que não a glicose. Esta afirmação se deve ao fato que na Figura 1 pode-se observar que até o 13º dia ocorreu crescimento do fungo sem ter havido consumo de glicose do meio. O motivo pelo qual a glicose não é empregada desde o início da fermentação ainda é desconhecido, entretanto, uma vez que este açúcar passou a ser consumido o fungo sofreu uma drástica alteração morfológica, o que leva a crer que o metabolismo de carboidratos pode estar envolvido com o processo de fragmentação dos *pellets*. Entretanto, ainda não se pode dizer com clareza se a utilização da glicose é uma resposta à nova morfologia adotada, ou se as alterações no metabolismo da glicose, influenciadas por outros fatores, foram as responsáveis pela mudança de morfologia. O fato de o consumo da glicose ocorrer somente após a liberação dos prolongamentos de micélio para o meio e não de forma simultânea ao seu surgimento na superfície dos *pellets* faz com que a primeira hipótese seja a mais provável de ser a verdadeira.

Não há relato na literatura sobre esta alteração fisiológica. Isto se deve provavelmente porque a maioria dos pesquisadores utiliza pré-culturas líquidas como inóculo e o consumo de glicose nestas culturas não é monitorado. Provavelmente a fragmentação dos *pellets* já deve ter ocorrido quando a pré-cultura é usada e nesta fase os novos *pellets* já utilizam a glicose normalmente.

A grande quantidade de micélio que cresce aderido à parede interna do frasco também não é citada nos trabalhos com fermentação submersa de *G. lucidum* tanto em frascos como em biorreatores (Yang e Liao, 1998a, 1998b; Lee *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2000; Fang *et al.*, 2002; Fang e Zhong, 2002a, 2002b, 2002c; Tang e Zhong, 2002a, 2002b, 2003; Kim *et al.*, 2002). Isto talvez se deve a uma característica peculiar da cepa referida neste trabalho ou porque os demais autores simplesmente ignoraram esta característica. A adesão de micélio à superfícies sólidas pode ser prejudicial para o desenvolvimento de fermentações em biorreatores devido ao acúmulo de micélio nas hélices e sensores. Por outro lado esta característica pode indicar que este fungo prefere se desenvolver sobre suportes sólido que dêem sustentação para as hifas. Esta sugestão é também apoiada pelos experimentos de Yang *et al.* (2000) que demonstraram, ao introduzir esponjas de poliuretano no meio de cultivo sob agitação, que todo o micélio se aderiu às esponjas e o crescimento sobre este suporte foi maior que o observado em suspensão.

- Fang, Q. H.; Zhong, J. J. (2002b), Submerged fermentation of higher fungus Ganoderma lucidum for production of valuable bioactive metabolites-ganoderic acid and polysaccharide. *Biochemical Engineering Journal*, v. 10, n. 1, p. 61-65.
- Fang, Q. H.; Zhong, J. J. (2002c), Two-stage culture process for improved production of ganoderic acid by liquid fermentation of higher fungus Ganoderma lucidum. *Biotechnology Progress*, v. 18, n. 1, p. 51-54.
- Gibbs, P. A.; Seviour, R. J.; Schmid, F. (2000), Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 20, n. 1, p. 17-48.
- Jong, S. C.; Birmingham, J. M. (1992), Medicinal benefits of the mushroom Ganoderma. *Advances in Applied Microbiology*, v. 37, p. 101-134.
- Kim, S. W.; Hwang, H. J.; Park, J. P.; Cho, Y. J.; Song, C. H.; Yun, J. W. (2002), Mycelial growth and exo-biopolymer production by submerged culture of various edible mushrooms under different media. *Letters in Applied Microbiology*, v. 34, n. 1, p. 56-61.
- Lee, K. M.; Lee, S. Y.; Lee, H. Y. (1999), 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, n. 6, p. 646-650.
- Lin, C. N.; Tome, W. P. (1991), Novel cytotoxic principles of formosan Ganoderma lucidum. *Journal of Natural Products*, v. 54, n. 4, p. 998-1002.
- Mayzumi, F.; Okamoto, H.; Mizuno, T. (1997), Cultivation of Reishi (Ganoderma lucidum). *Food Reviews International*, v. 13, n. 3, p. 365-382.
- Mizuno, T.; Wang, G. Y.; Zhang, J.; Kawagishi, H.; Nishitoba, T.; Li, J. X. (1995), Reishi, Ganoderma lucidum and Ganoderma tsugae: bioactive substances and medicinal effects. *Food Reviews International*, v. 11, n. 1, p. 151-166.
- Mizuno, T. (1999), The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan (Review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, v. 1, p. 9-29.
- Sone, Y.; Okuda, R.; Wada, N.; Kishida, E.; Misiaki, A. (1985), Structures and antitumor activities of the polysaccharides isolated from fruiting body and the growing culture of mycelium of Ganoderma lucidum. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 49, n. 9, p. 2641-2653.
- Stamets, P. (1993), *Growing gourmet & medicinal mushrooms*, Ten Speed Press, Berkeley, USA.
- Tang, Y. J.; Zhong, J. J. (2002a), Exopolysaccharides biosynthesis and related enzyme activities of the medicinal fungus Ganoderma lucidum grown on lactose in a bioreactor. *Biotechnology Letters*, v. 24, n. 12, p. 1023-1026.
- Tang, Y. J.; Zhong, J. J. (2002b), Fed-batch fermentation of Ganoderma lucidum for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, n.1-2, p. 20-28.
- Tang, Y. J.; Zhong, J. J. (2003), Role of oxygen supply in submerged fermentation of Ganoderma lucidum for production of Ganoderma polysaccharide and ganoderic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 32, n. 3-4, p. 478-484.
- Yang, F. C.; Ke, Y. F.; Kuo, S. S. (2000), Effect of fatty acids on the mycelial growth and polysaccharide formation by Ganoderma lucidum in shake flask cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 27, n. 3-5, p. 295-301.
- Yang, F. C.; Liao, C. B. (1998a), Effects of cultivating conditions on the mycelial growth of Ganoderma lucidum in submerged flask cultures. *Bioprocess Engineering*, v.19, n. 3, p. 233-236.
- Yang, F. C.; Liao, C. B. (1998b), The influence of environmental conditions on polysaccharide formation by Ganoderma lucidum in submerged cultures. *Process Biochemistry*, v. 33, n. 5, p. 547-553.