ISSN: 1696-8352

Triagem de meios de cultivo para a produção de biomassa micelial e exopolissacarídeos por *Ganoderma* spp.

Screening of culture media for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Ganoderma* spp.

Cribado de medios de cultivo para la producción de biomasa micelial y exopolisacáridos por *Ganoderma* spp.

DOI: 10.55905/oelv22n4-174

Originals received: 03/22/2024
Acceptance for publication: 04/15/2024

Danielle Furtado da Silva
Doutoranda pelo Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE
Instituição: Universidade do Estado do Amazonas (UEA)
Endereço: Manaus, Amazonas, Brasil
E-mail: daniellefurtado.silva93@gmail.com

Larissa Ramos Chevreuil
Doutora em Botânica
Instituição: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)
Endereço: Manaus, Amazonas, Brasil
E-mail: chevreuil@inpa.gov.br

Sérgio Dantas de Oliveira Júnior
Doutor em Engenharia Química
Instituição: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)
Endereço: Manaus, Amazonas, Brasil
E-mail: sergiodantas100@hotmail.com

Giovanna Lima da Silva
Doutoranda em Biotecnologia
Instituição: Universidade Federal do Amazonas (UFAM)
Endereço: Manaus, Amazonas, Brasil
E-mail: lima.silva@ufam.edu.br

Luciano Henrique Campestrini
Doutor em Ciências área de concentração em Bioquímica
Instituição: Universidade Federal do Paraná (UFP)
Endereço: Manaus, Amazonas, Brasil
E-mail: lcampestrini@gmail.com

Ceci Sales-Campos
Doutora em Biotecnologia pelo Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE
Instituição: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)
Endereço: Manaus, Amazonas, Brasil
E-mail: ceci@inpa.gov.br

RESUMO
Os cogumelos medicinais, particularmente as espécies do gênero *Ganoderma*, têm emergido como uma alternativa terapêutica promissora para uma variedade de doenças. Nesse estudo, investigamos onze meios de cultivo na fermentação submersa de *G. lingzhi* e *Ganoderma* sp. visando a produção de biomassa micelial e exopolissacarídeos (EPS). Dentre os meios avaliados, apenas dois se mostraram promissores após adaptações. Em 12 dias de fermentação submersa observou-se produção máxima de biomassa micelial e exopolissacarídeos (EPS) por *G. lingzhi* no meio Melin-Norkrans Modificado (MNM), enquanto para o *Ganoderma sp.* o meio POL foi mais promissor no oitavo dia, sugerindo a necessidade de um meio mais completo para um crescimento otimizado. A complexidade da fermentação submersa desses cogumelos é evidenciada por essas diferenças no cultivo e na produção de EPS, ressaltando a importância de ajustar meticulosamente os parâmetros de cultivo para otimizar a produção dos compostos desejados.

Palavras-chave: Cogumelo, Processo fermentativo, Crescimento, Micélio, Glucanas.

ABSTRACT
Medicinal mushrooms, particularly species of the *Ganoderma* genus, have emerged as a promising therapeutic alternative for a variety of diseases. In this study, we investigated eleven culture media for two *Ganoderma* strains: *G. lingzhi* and *Ganoderma* sp., for production. of mycelial biomass and EPS. Among the means tested, two proved to be more promising after adaptations. The kinetics performed demonstrated that at the end of the 12th day of cultivation there was maximum production of EPS biomass of *G. lingzhi* in the MNM medium, while for *Ganoderma* sp. the POL medium showed promise for the growth of mycelial biomass on the 8th day, suggesting the need for a more complete medium for optimized growth.

Keywords: Mushroom, Fermentation Process, Growth, Mycelium, Glucans.

RESUMEN
Los hongos medicinales, particularmente las especies del género *Ganoderma*, han surgido como una alternativa terapéutica prometedora para una variedad de enfermedades. En este estudio, investigamos once medios de cultivo para dos cepas de *Ganoderma*: *G. lingzhi* y *Ganoderma* sp., para la producción de biomasa micelial y EPS. Entre los medios probados, dos resultaron más prometedores después de las adaptaciones. La cinética realizada demostró que al final del día 12 de cultivo hubo máxima producción de biomasa EPS de *G. lingzhi* en el medio MNM, mientras que para *Ganoderma* sp. el medio POL se

mostró prometedor para el crecimiento de la biomasa micelial al octavo día, lo que sugiere la necesidad de un medio más completo para un crecimiento optimizado.

Palabras clave: Hongo, Proceso de Fermentación, Crecimiento, Micelio, Glucanos.

1 INTRODUÇÃO

Os fungos pertencentes ao gênero *Ganoderma* estão entre os cogumelos medicinais mais comercializados globalmente, devido à sua ampla utilização na medicina tradicional chinesa, e poucos relatos de efeitos adversos (Paterson, 2006). Por conseguinte, o interesse por *Ganoderma* aumentou no Ocidente, estimulando pesquisas biomédicas, especialmente em relação às suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antitumorais e imunomoduladoras (Li et al., 2020; Liu et al., 2018; Si et al., 2019; Wen et al., 2022).

O cultivo desses fungos, assim como de outros macrofungos de interesse comercial, é realizado em substratos sólidos, sem a presença de água livre, utilizando resíduos agrícolas como palha de arroz, trigo e outros cereais, além de resíduos agroindustriais como tortas de algodão, soja e bagaço de cana-de-açúcar, e serragem de madeira. No entanto, esses substratos podem representar problemas ambientais devido à sua persistência e difícil degradação (Aguiar et al., 2022; Gouvêa et al., 2024). A pesquisa sobre o cultivo de *Ganoderma* se destaca pela exploração de compostos bioativos, especialmente polissacarídeos e triterpenos, reconhecidos por suas importantes atividades farmacológicas (Hu et al., 2020; Li et al., 2024).

Os polissacarídeos de *Ganoderma* podem ser obtidos de diferentes estruturas e fases de reprodução dos fungos, sendo comum a extração a partir dos basidiomas, que demandam cultivo em substratos sólidos. No entanto, esse método apresenta desvantagens, como maior possibilidade de contaminação por toxinas ou metais pesados nos substratos e longos períodos de cultivo (Esmaeilzadeh et al., 2018; Montoya et al., 2013). Nesse contexto, a produção de biomassa micelial por fermentação submersa destaca-se como uma alternativa viável, ocupando menos espaço, oferecendo maior

rendimento de biomassa, em menor tempo, além de reduzir a probabilidade de contaminantes tóxicos presentes na fermentação em estado sólido (Lau, 2024; Liu; Zhang, 2019; Xu et al., 2024).

A obtenção de exopolissacarídeos em cultura líquida de *Ganoderma* é relativamente mais simples do que a de endopolissacarídeos, uma vez que o processo de extração de endopolissacarídeos demanda múltiplas etapas, aumentando os custos do processo. Portanto, o uso de exopolissacarídeos é atrativo para aplicação em escala industrial (Si et al., 2019; Supramani et al., 2019). Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi selecionar meios adequados para a produção simultânea de biomassa micelial e exopolissacarídeos por duas linhagens de *Ganoderma*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Duas linhagens de *Ganoderma* foram selecionadas, uma comercial, *Ganoderma lingzhi* (=*sichuanense*) (CC22) obtida da Coleção de Cultura de Microrganismos de Interesse Agrossilvicultural, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e, a outra linhagem denominada de *Ganoderma* sp., isolada no Campus 1 do INPA (03°01’48.9’’ S, 59°51’01,6’’ O), Manaus, Amazonas – Brasil.

2.2 FERMENTAÇÃO SUBMERSA DAS LINHAGENS

2.2.1 Avaliação dos Meios de Cultivo

Para a obtenção de biomassa micelial e exopolissacarídeos foram avaliados diferentes meios de cultura (Tabela 1). As fermentações submersas foram realizadas em frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de meio de cultivo e em seguida autoclavados a 1 atm, por 20 min. Para padronização do cultivo foram adicionados 7

discos de micélio (Ø = 7 mm) nos frascos, em seguida estes foram incubados em shaker orbital (TECNAL TE-424) a 26 °C, nas condições indicadas na tabela 1.

Tabela 1. Meios de cultivo utilizados na fermentação submersa de *Ganoderma lingzhi* e *Ganoderma* sp.

Meio de cultivo	Composição do meio (g/L)	Condições de cultivo			Referência
		pH	rpm	dias	
1	Glucose (1,5), MgSO4 (1), KH_2PO_4 (2, 94), glicina (1,3), e Vitamina B1 (0,3)	5.5	150	7	Frases et al. (2009)
2	Sacarose (48), KH_2PO_4•$3H_2O$ (3,9); KH_2PO_4 (3), MgSO4 (1,5) e extrato de levedura (36)	6	120	8	Kirsch (2013)
3	Glucose (20), $MgSO_4$ (0,5), KH_2PO_4 (0,45), KH_2PO_4•$3H_2O$ (1,3), extrato de levedura (2) e peptona de soja (2)	5.5	120	7	Souza et al. (2013)
4	Glucose (20), extrato de levedura (5) e peptona de soja (2,5)	6	120	7	Pessoa et al. (2023)
5	Glucose (25), $MgSO_4$ (0,5), KH_2PO_4 (1), nitrato de sódio (10)	6	120	8	Souza et al. (2018)*
6	Glucose (20); nitrato de amônio (2,5) e peptona de soja (5)	6	120	8	Pessoa et al. (2023)*
7	Sacarose (20), $MgSO_4$ (0,5), KH_2PO_4 (0,45), KH_2PO_4•$3H_2O$ (1,3) e nitrato de amônio (2)	5.5	120	8	Kirsch (2013)*
8	Sacarose (5,1345), glicina (0,97591) e Vitamina B1 (0,000003)	5.5	150	7	Frases et al. (2009)*
9	Glucose (15 mM), nitrato de amônio (3) e Vitamina B1 (0,000003)	5.5	150	7	Frases et al. (2009)*
POL	Sacarose (20), $(NH_4)2HPO_4$ (0,93), KH_2PO_4 (0,5), K_2HPO_4 (0,7), CaCL2•$2H_2O$ (0,05), NaCl (0,025), $MgSO_4$•$7H_2O$ (0,150), $FeCl_3$ (10), Vitamina B1 (0,0001), extrato de castanha (1) e extrato de malte (3)	6	130	14	Marx (1969)
Melin-Norkrans Modificado (MNM)	Glucose (20), Peptona (1), (NH4)2SO_4 (2,5), $MgSO_4$•$7H_2O$ (0,2), K_2HPO_4 (1,3), CaCO3 (1) e extrato de castanha (1)	4	130	14	Rosado et al. (2003)

*: Meios formulados a partir de adaptações dos meios 1 a 4.
Fonte: Autores

Após as fermentações submersas, verificou-se que apenas nos meios POL e MNM as linhagens apresentaram crescimento. Portanto, estes foram selecionados para avaliar o rendimento de biomassa micelial e exopolissacarídeos das duas linhagens de *Ganoderma* ao longo de 14 dias de cultivo (Figura 1).

As biomassas miceliais foram separadas dos caldos de cultivo por centrifugação a 5000 rpm, durante 20 minutos, a 4 °C. Posteriormente, foram filtradas a vácuo e o material foi seco em estufa a 60 °C, até a obtenção de peso constante. O EPS foi obtido a partir da precipitação em álcool etílico 96 GL, na proporção de 1:4 v/v, ao meio de cultivo

resultante da centrifugação/filtração. A precipitação foi mantida a 4ºC, por 24 h. Sequencialmente, o precipitado foi filtrado à vácuo em papel seco e tarado. A massa de EPS foi determinada pela diferença entre as massas.

2.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos foram realizados em quintuplicata (réplicas correspondendo a um frasco Erlenmeyer), para cada meio, a fim de avaliar o comportamento de crescimento e produção de exopolissacarídeos para cada linhagem, fúngica estudada. As médias foram comparadas pelo teste t de Student, ANOVA (análise de variância) e Dunnett (comparação com o controle), ao nível de significância $p \leq 0.05$. As análises estatísticas e gráficos foram executadas no software GraphPad Prism versão 9.5.1.

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

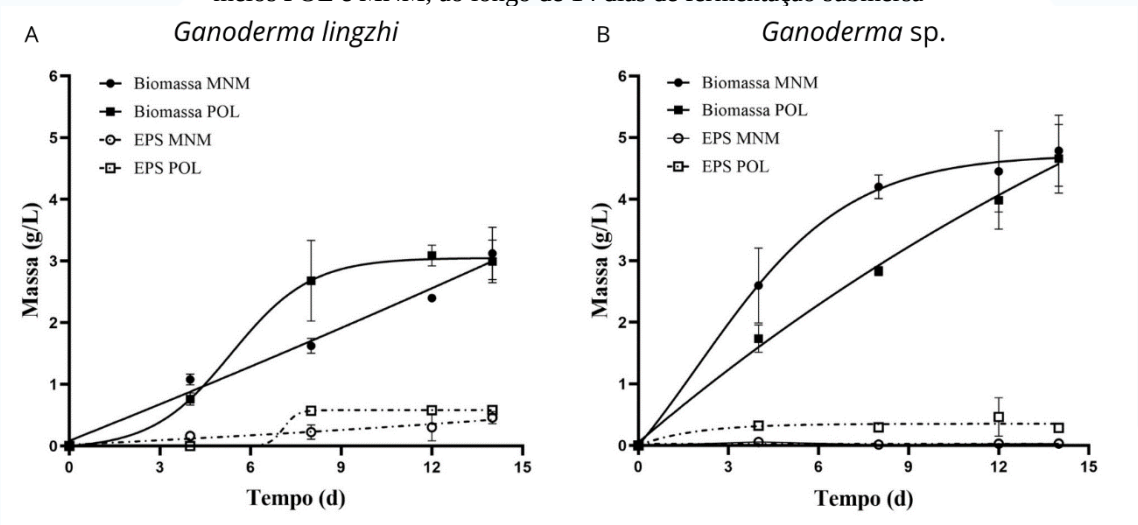
Em vários meios de cultivo avaliados não foi possível observar crescimento fúngico, justificando-se a utilização de meios modificados (Tabela 1, meios 5, 6, 7, 8 e 9), variando-se as fontes de carbono, nitrogênio e minerais. A produção de exopolissacarídeos e biomassa micelial são amplamente influenciados pela concentração desses componentes (Kim et al., 2002; Yang, Liau, 1998). Fhang e Zhong (2002) relatam que o extrato de levedura pode atuar como inibidor da produção de biomassa e exopolissacarídeos. Contudo, notaram que ao combinar esse componente com outra fonte de nitrogênio de origem orgânica, a inibição pode ser revertida.

A concentração de carboidratos também é amplamente descrita como fator fundamental no cultivo de macrofungos, pois atua como principal fonte de energia (Tang; Zhong, 2002). Hassan e colaboradores (2019), ao avaliarem a influência da glucose na produção de biomassa e exopolissacarídeos por *G. lingzhi*, observaram que os rendimento de desses parâmetros aumentaram significativamente ao utilizar concentrações de carbono em torno de 50 g/L. No entanto, no presente estudo, utilizou-se a concentração de carbono de 25 g/L, sugerindo que esse parâmetro influenciou o crescimento fúngico,

uma vez que são espécies que demandam de concentrações mais elevadas de carbono para o seu crescimento (Raseta *et al*., 2017; Shah, Modi, 2018).

A partir da cinética de produção, observou-se diferenças entre o rendimento de biomassa e a indução de exopolissacarídeos entre as espécies. Uma possível explicação para essas variações pode ser a individualidade genética de cada linhagem e a capacidade diferenciada do substrato em induzir diferentes respostas metabólicas (Naranjo-Ortiz; Gabaldon, 2019).

Figura 1. Produção de biomassa micelial e exopolissacarídeos entre *G. lingzhi* e *Ganoderma* sp. nos meios POL e MNM, ao longo de 14 dias de fermentação submersa



Fonte: Autores

Ao avaliar o crescimento das espécies fúngicas, observou-se que *G. lingzhi* exibiu uma menor produção de biomassa, conforme evidenciado pela curva sigmoide e exponencial, com pico de rendimento de 3 g/L (Figura 1A). No entanto, demonstrou uma expressão mais elevada de exopolissacarídeos. Durante os 14 dias de fermentação, o meio POL estimulou seu crescimento, alcançando seu ápice o oitavo dia. Apesar das taxas de crescimento menores, essa espécie apresentou maiores valores de produção de exopolissacarídeos (Figura 1A), também após o oitavo dia. Ao correlacionar esses dados, é possível inferir que a fase estacionária de crescimento favoreceu a expressão dessas moléculas.

Ganoderma sp., por sua vez, exibiu produção de biomassa foi superior, comparada à *Ganoderma lingzhi*, com valores de rendimento mais elevados em ambos os meios de cultura, conforme ilustrado pela curva côncava vertical e exponencial, atingindo valores máximos em torno de 4,5 g/L (Figura 1B). Contudo, não houve produção de exopolissacarídeos no meio MNM, e a produção foi baixa no meio POL (Figura 1B). Apesar disso, as linhagens apresentaram crescimento constante após o décimo quarto dia de incubação.

Estudos envolvendo a otimização da produção de polissacarídeos e biomassa micelial mostram que alguns parâmetros de cultivo em shaker, como pH do meio e agitação, apresentam pouco efeito sobre a biomassa micelial. Em contrapartida, a produção de polissacarídeos é mais sensível a esses fatores, sugerindo que meios com pH ácido e agitações mais vigorosas favorecem a excreção dessas moléculas (Berovič et al., 2003; Supramani et al., 2019). Esses resultados destacam a complexidade da adaptação das espécies estudadas durante o cultivo. Adicionalmente, é evidente que há uma variação significativa entre os parâmetros avaliados, o que aponta para uma certa inflexibilidade nas condições ideais na produção de polissacarídeos.

4 CONCLUSÃO

A composição dos meios de cultivo é fundamental para a produção de biomassa micelial e exopolissacarídeos pelas linhagens de *Ganoderma* spp. A ausência de crescimento observada em muitos meios avaliados levaram à condução de novas fermentações, ressaltando a relevância da formulação dos meios modificados.

G. lingzhi destacou-se pela expressão mais alta de exopolissacarídeos, enquanto *Ganoderma* sp. demonstrou uma maior produção de biomassa. Essas diferenças evidenciam a complexidade da fermentação submersa desses fungos e a importância de ajustar cuidadosamente os parâmetros de cultivo, visando maximizar a produção dos compostos desejados.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, L.V.B. et al. Physico-chemical characterization of lignocellulosic wastes used in the cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *Conjecturas*, v. 22, n. 14, p. 311-332, 2022.

BEROVIČ, M. et al. Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. *Journal of Biotechnology*, v. 103, n. 1, p. 77-86, 2003.

ESMAEILZADEH, M. et al. Ganoderic Acid and Exopolysaccharide Production by *Ganoderma lucidum* from Semi-Solid-State and Submerged Fermentation. *Biological Journal of Microorganism*, v. 7, n. 28, p. 63-75, 2018.

FRASES, S. et al. Capsule of *Cryptococcus neoformans* grows by enlargement of polysaccharide molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 4, p. 1228-1233, 2009.

GOUVÊA, P.R.S. et al. Amazonian residue effect on the production and centesimal composition of *Ganoderma* spp. *International Journal of Agriculture & Biology*. v. 31, p. 77-83, 2024.

HASSAN, N.A. et al. Efficient biomass-exopolysaccharide production from an identified wild-Serbian *Ganoderma lucidum* strain BGF4A1 mycelium in a controlled submerged fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 21, p. 101305, 2019.

HU, Z. et al. Protective effect of triterpenes of *Ganoderma lucidum* on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses and acute liver injury. *Cytokine*, v. 127, p. 154917, 2020.

KIM, S.W. et al. 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, 2002.

KIRSCH, L.S. et al. Produção da biomassa de *Pleurotus albidus* por fermentação submersa para elaboração de barras de cereais. 2013. 124 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

LAU, M.F. et al. Bibliometric, taxonomic, and medicinal perspectives of *Ganoderma neo-japonicum* Imazeki: A mini review. *Mycology*, p. 1-14, 2024.

LI, J. et al. Purification, structural characterization, and immunomodulatory activity of the polysaccharides from *Ganoderma lucidum*. *International journal of biological macromolecules,* v. 143, p. 806-813, 2020.

LI., Q. Z., XIONG, C.; WONG, W. C.; ZHOU, L. W. (2024). Medium composition optimization and characterization of polysaccharides extracted from *Ganoderma boninense* along with iferentete activity. *International Journal of Biological Macromolecules.* v. 260, 2024.

LIU, Y. et al. Triple helix conformation of β-d-glucan from *Ganoderma lucidum* and effect of molecular weight on its immunostimulatory activity. *International journal of biological macromolecules*, v. 114, p. 1064-1070, 2018.

LIU, S.R.; ZHANG, W.R. Optimization of submerged culture conditions involving a developed fine powder solid seed for exopolysaccharide production by the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Food Science and Biotechnology*, v. 28, n. 4, p. 1135-1145, 2019.

MARX, D.H. The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections. I. Antagonism of mycorrhizal fungi to root pathogenic fungi and soil bacteria. *Phytopathology*, v. 59, n. 2, p. 153-163, 1969.

MONTOYA, S.; SÁNCHEZ, O.J.; LEVIN, L. Polysaccharide production by submerged and solid-state cultures from several medicinal higher Basidiomycetes. *International journal of medicinal mushrooms*, v. 15, n. 1, 2013.

NARANJO-ORTIZ, M.A.; GABALDÓN, T. Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biological Reviews*, v. 94, n. 6, p. 2101-2137, 2019.

PATERSON, R.R.M. *Ganoderma*–a therapeutic fungal biofactory. *Phytochemistry*, v. 67, n. 18, p. 1985-2001, 2006.

PESSOA, V.A. et al. Production of mycelial biomass, proteases and protease inhibitors by *Ganoderma lucidum* under different submerged fermentation conditions. *Brazilian Journal of Biology*, v. 83, 270316, 2023.

RAŠETA, M.J. et al. Comparison of antioxidant capacities of two *Ganoderma lucidum* strains of different geographical origins. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, n. 133, p. 209-219, 2017.

ROSADO, F.R. et al. Biomass and exopolysaccharide production in submerged cultures of *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. and *Pleurotus ostreatus* "florida"(Jack.: Fr.) Kummer. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, v. 43, n. 3, p. 230-237, 2003.

SHAH, P.; MODI, H.. Statistical optimization of culture conditions for enhanced mycelial biomass production using *Ganoderma lucidum*. *Journal of Applied Biology and Biotechnology,* v. 6, n. 4, p. 41-45, 2018.

SI, J. et al. Medium composition optimization, structural characterization, and antioxidant activity of exopolysaccharides from the medicinal mushroom *Ganoderma lingzhi*. International journal of biological macromolecules, v. 124, p. 1186-1196, 2019.

SOUSA, C.T.D. et al. Produção de biomassa de *Bacillus* sp. RAB9 por fermentação submersa. 2013. 77 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

SUPRAMANI, S. et al. Pellet diameter and morphology of European *Ganoderma pfeifferi* in a repeated-batch fermentation for exopolysaccharide production. Biocatalysis and agricultural biotechnology, v. 19, p. 101118, 2019.

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

WEN, L. et al. Structure of water-soluble polysaccharides in spore of *Ganoderma lucidum* and their anti-inflammatory activity. *Food Chemistry*, v. 373, p. 131374, 2022.

XU, Z. et al. Effect of liquid fermented chinese edible *Ganoderma lucidum* fungus on wheat bread: A quality improver and staling inhibitor. *Food Control*, v. 155, p. 110060, 2024.

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