

CULTIVO SUBMERSO DO FUNGO *Herichium erinaceus* PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICELIAL E EXOPOLISSACARÍDEO

Iago Montanhini GIL¹, Marcelo Luis Kuhn MARCHIORO¹, Vitor Seiji UEDA¹,
Daiane MENEGUZZI¹, Celso Ferraz BETT², Mário Antônio Alves da CUNHA¹

¹Departamento Acadêmico de Química
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Pato Branco
Pato Branco – Paraná – Brasil

²Centro Universitário de Pato Branco - UNIDEP
Pato Branco – Paraná - Brasil

E-mails: gil@alunos.utfpr.edu.br, marchioro82@gmail.com,
vitorueda@alunos.utfpr.edu.br, daiameneguzzi@gmail.com,
mcunha@utfpr.edu.br

Resumo: O presente estudo teve como objetivo avaliar a produção de biomassa micelial e exopolissacarídeo (EPS) pelo fungo *Herichium erinaceus* (AT-BIO-301 cepa 107001) em diferentes meios de cultivo. Cultivos submersos usando os meios Mínimo de Vogel, Mineral Basal e Melaço de Cana-de-açúcar foram conduzidos em frascos agitados em incubadora shaker (20 °C, 150 rpm por 144 horas). Os resultados demonstraram que o fungo foi hábil em crescer em todos os meios de cultivo estudados, havendo maior crescimento micelial nos meios Mínimo de Vogel e Mineral Basal. Por outro lado, apenas o Meio Mineral Basal proporcionou a produção de exopolissacarídeo (EPS) pelo fungo (0,8 g/L). Elevado conteúdo de proteínas (15,2 g/L) e minerais (5,38 g/L) e reduzido conteúdo de lipídeos (0,2 g/L) foram encontrados na biomassa micelial produzida. Bandas de absorção na região do infravermelho (IV) típicas de carboidratos (3450 cm⁻¹, 3300 cm⁻¹, 2960 cm⁻¹, 2928 cm⁻¹, 2852 cm⁻¹, 1651 cm⁻¹, 1462 cm⁻¹, 844 cm⁻¹, 618 cm⁻¹ e 543 cm⁻¹) foram encontradas na análise por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier. Os resultados da análise de IV sugerem que os monossacarídeos presentes no EPS possivelmente estejam unidos por ligações glicosídicas com configuração β. A produção do EPS pelo fungo estudado parece estar associada a composição do meio de cultivo, sendo necessário estudos mais detalhados para a elucidação de tal fenômeno.

Palavras-chave: *Herichium erinaceus*; Exopolissacarídeos; Fermentação Submersa; Biomassa.

INTRODUÇÃO

O Fungo basidiomiceto *Hericiium erinaceus*, também conhecido como cogumelo Juba de Leão, cabeça de macaco, Yamabushitake ou barba branca (LI et al., 2018), tem recebido destaque em estudos na área de alimentos por sua versatilidade para inserção em produtos alimentícios e apresentar propriedades terapêuticas, as quais incluem benefícios ao sistema nervoso central, imunológico e gastrointestinal (MIZUNO, 1999). O fungo apresenta potencialidades biológicas como atividades antitumorais, anti-hiperglicêmicas, anti-oxidativas e neuroregenerativas, o que tem atraído a atenção no âmbito industrial (WANG; LUO; LIANG, 2004). A produção de moléculas bioativas como lactonas, esteroides, alcaloides, hericerinas, glicoproteínas, β -glucanas, α -glucanas tem sido reportada por HE et al., (2017) em diferentes meios de cultivos. Esses autores também relatam mais de trinta e cinco polissacarídeos isolados do corpo frutificado e micélio do fungo *H. erinaceus*.

O consumo frequente do cogumelo (corpo de frutificação) *Hericiium erinaceus* pode promover diferentes benefícios à saúde (MIZUNO, 1999). Pesquisas têm associada a produção de substâncias bioativas semelhantes à indutores neurotróficos, os quais são aplicados em tratamentos de doenças neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, esclerose múltipla, entre outras (LI et al., 2018).

Neste contexto, o trabalho propôs avaliar diferentes meios de cultivo do fungo *Hericiium erinaceus* em cultura submersa, caracterizar a biomassa micelial obtida quanto a composição proximal, bem como avaliar o potencial de produção de exopolissacarídeo (EPS) pelo fungo.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Os cogumelos comestíveis têm sido considerados como um tipo de superalimento em função das diferentes funcionalidades biológicas. Neste contexto, o ser humano tem buscado uma vida saudável, incluindo uma alimentação mais adequada, com consumo de produtos menos industrializados. Como uma consequência da busca de uma vida saudável é nítido o crescimento regular da longevidade populacional (HAMZA et al., 2023).

A divulgação dos potenciais benefícios do cogumelo Juba de Leão (*Hericiium erinaceus*) a saúde tem contribuído para o aumento de seu consumo. Relatos científicos demonstram que a suplementação dietética com extrato bruto de *H. erinaceus* melhorou significativamente a memória de reconhecimento em ratos. O extrato de cogumelo e seus

componentes ativos ampliam o tamanho dos cones de crescimento, importantes para as células cerebrais sentirem seu ambiente e estabelecerem novas conexões com outros neurônios (MARMOL et al., 2023).

Um estudo *in vitro* também constatou que o extrato desse cogumelo colaborou para diminuir os males gerados pela proteína beta-amiloide aos neurônios, um dos principais fatores da doença de Alzheimer. Tal descoberta mostrou que esse cogumelo pode ter eficácias antioxidantes e neuroprotetores em ratos (MARMOL et al., 2023).

Não é apenas para a memória que o cogumelo Juba de Leão é benéfico, há inúmeros outros benefícios, como potencial antibiótico, anti-fermatório, anti-senescente, antidiabético, nefroprotetor, anti-hiperlipidêmico, cardioprotetor, anticarcinogênico e antifadiga, além de reforçar o sistema imunológico e ser hepatoprotetor. O Cogumelo Juba de Leão tem sido investigado por meio de estudos científicos como suporte à saúde geral do homem, como tratamento de inúmeros problemas voltados ao sistema nervoso e ao funcionamento cognitivo (LI et al., 2018).

METODOLOGIA Microorganismo e Matéria-prima

No presente estudo foi utilizado o fungo *Hericiun erinaceus* AT-BIO-301 cepa 107001 comercializada pela companhia Tyholer Glückspilze, Áustria e fornecido por produtor local de cogumelos. Foram utilizados reagentes com grau de pureza adequados em cada ensaio experimental.

Isolamento do Fungo

Uma pequena porção do corpo de frutificação (basidioma/basidiocarpo) do fungo foi inoculado em placas de Petri contendo meio Ágar Batata Dextrose (BDA). As placas foram cultivadas a 20 °C por 4 dias em incubadora orbital (shaker) com refrigeração. Repiques sucessivos para meio novo foram conduzidos de forma a ser obtida uma cultura pura (Figura 1).

Figura 1 - Micélio do fungo *Hericiun erinaceus* cultivado em meio BDA



Fonte: Autoria própria (2023).

Preparo do inóculo e cultivo submerso

Micélio fúngico cultivado em meio BDA foi transferido para frascos Erlenmeyer com Meio Mínimo de Vogel e glicose. Os frascos foram agitados em shaker a 20 °C e 150 rpm por 144 horas. O micélio foi separado por centrifugação, lavado e homogeneizado em água esterilizada (Perkin Elmer, Waltham, USA). Os cultivos submersos em Meio Mínimo de

Vogel (MMV), Meio Mineral Basal (MMB) e Meio a Base de Caldo de Cana-de-açúcar (MBC) foram conduzidos para avaliar o crescimento micelial e possível produção de exopolissacarídeo pelo fungo. As fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL do meio em estudo e 10 mL de inóculo padronizado (DO: 0,40,5 em 550 nm). Os Meios Mínimo de Vogel e Mineral Basal foram suplementados com 10 % (v/v) de solução de glicose 200 g/L. O meio à base de melaço de cana-de-açúcar foi obtido pela diluição do melaço pré-clarificado até concentração de açúcares totais em torno de 20 g/L. Os frascos foram incubados em incubadora orbital à 20 °C por 144 horas sob agitação de 150 rpm. No final do processo a biomassa micelial foi separada por centrifugação (1500 x g, 30 minutos) do caldo fermentado. A presença de exopolissacarídeo (EPS) foi indicada pela precipitação da macromolécula. O EPS foi seco à 70 °C até massa constante e quantificada gravimetricamente.

O Meio Mínimo de Vogel (VOGEL, 1956) foi preparado pela diluição 1:10 do meio concentrado. O Meio Mineral Basal foi constituído de 2 g/L de KH_2PO_4 , 2 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 2 g/L de Peptona. Após seleção do meio mais adequado para o crescimento micelial e produção de exopolissacarídeo pelo fungo estudado foram conduzidas

fermentações submersas com objetivo de avaliar o perfil cinético do consumo do substrato, crescimento micelial e produção de EPS.

Protocolos Analíticos

A biomassa micelial obtida nas fermentações foi lavada, seca a 70 °C e quantificada gravimetricamente. O sobrenadante das fermentações foi combinado com etanol, refrigerado para precipitar o EPS, que foi filtrado, seco a 70 °C e quantificado gravimetricamente. O consumo de substrato nas fermentações foi estimado através da determinação do conteúdo de açúcares totais (AT) nos caldos fermentados (DUBOIS et al., 1956). As leituras de cada ponto foram realizadas em espectrofotômetro a 490 nm.

Para caracterização da biomassa micelial foram realizadas análises físico-químicas da umidade (secagem a 105 °C), resíduo mineral (incineração à 550 °C), lipídeos (Soxhlet) e proteínas (Kjeldahl) (AOAC, 2016).

No estudo cinético do cultivo submerso do fungo no meio selecionado foram determinados os parâmetros fermentativos Fator de conversão de substrato em biomassa (rendimento) ($Y_{X/S}$); Fator de conversão do substrato em exopolissacarídeo (rendimento) ($Y_{P/S}$); Produtividade volumétrica em biomassa micelial (Q_X); Produtividade volumétrica de exopolissacarídeo (Q_P); Percentual do consumo do substrato (Y_C); Taxa total do consumo de substrato (Q_S) como descrito por Cunha et al. (2012). O espectro de Infravermelho com transformada de Fourier da amostra de EPS produzido, foi obtido em espectrofotômetro Frontier (Perkin Elmer, USA) na faixa de região de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} , com 32 varreduras. Foi utilizado a técnica de discos de KBr.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fungo *Hericiium erinaceus* cresceu em todos os meios de cultivo, destacando os Meios Mínimo de Vogel (MMV) e Mineral Basal (MMB), com produções de 9,95 g/L e 9,86 g/L de biomassa micelial, respectivamente. Em contrapartida, a menor produção de biomassa micelial foi observada em Meio a base de Melaço de Cana-de-açúcar (MMC: 6,92 g/L). Interessante destacar que foi observado produção de exopolissacarídeo somente no meio

MMB, sendo verificado um rendimento de EPS de 0,04 g/g (Tabela 1). Este comportamento sugere que a composição do meio de cultivo além de ter influência no crescimento micelial influencia diretamente a produção de exopolissacarídeo. Diferentes

trabalhos reportam que a composição do meio de fato tem grande influência tanto no crescimento miscelial fúngico, quanto na produção de exopolissacarídeo. Fonseca et al., (2020) verificou que tanto a fontes de carbono e nitrogênio presentes no meio influenciaram a produção de um exopolissacarídeo pelo fungo *Neodeighonia phoenicum* CMIB-151. Esses autores também relataram que não observaram uma correlação direta entre crescimento micelial e produção de EPS.

Tabela 1 - Perfil cinético do cultivo do *Hericiium erinaceus* nos diferentes meios de cultivo

Parâmetros fermentativos	Meios de cultivo	MMV	MMB	MMC
P_x (g/L)		9,95 ^a	9,86 ^a	6,92 ^b
P_F (g/L)		0,00	0,8	0,00
$Y_{P/S}$ (g/g)		0,00 ^b	0,04 ^a	0,00 ^b
$Y_{X/S}$ (g/g)		0,52 ^a	0,51 ^a	0,46 ^b
Q_x (g/Lh ⁻¹)		0,07 ^a	0,07 ^a	0,05 ^b
Q_P (g/Lh ⁻¹)		ND	0,006	ND
Q_s (g/Lh ⁻¹)		0,13 ^a	0,13 ^a	0,10 ^b
Y_c (%)		95,1 ^a	91,4 ^b	93,6 ^a

MMV: Meio Mínimo de Vogel; MMB: Meio Mineral Basal; MMC: Meio básico de Melaço de Cana-de-Açúcar. P_x : Produção de biomassa micelial; P_F : produção e exopolissacarídeo $Y_{x/s}$: Fator de conversão de substrato em biomassa; $Y_{p/s}$: Fator de conversão do substrato em exopolissacarídeo; Q_x : Produtividade volumétrica em biomassa micelial; Q_P : Produtividade volumétrica de exopolissacarídeo Y_c : Percentual do consumo do substrato; Q_s : Taxa total do consumo de substrato. Letras iguais na mesma linha indicam que não há diferença estatística ao nível de 95 % ($p < 0,05$).

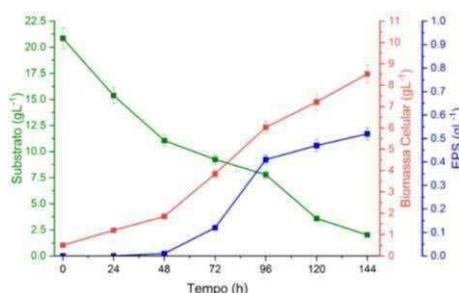
Fonte: Autoria própria (2023).

Similarmente ao observado com o crescimento micelial, os maiores rendimentos em biomassa micelial ($Y_{x/s}$) foram verificados nos meios MMV (0,52 g/g) e MMB (0,51 g/g). Maior produtividade volumétrica em biomassa micelial (Q_x) também foi encontrada em tais meios (0,7 g/Lh⁻¹). Em relação ao consumo do substrato (fonte de carbono) a partir do parâmetro Y_c descrito na Tabela 1, observa-se que o fungo foi eficiente na assimilação dos açúcares independentemente do meio de cultivo. Consumos superiores a 90 % do conteúdo inicial de açúcares totais foram encontrados em todos os meios. Este

comportamento indica que o fungo é hábil em consumir tanto glicose como sacarose, visto que glicose é o açúcar presente nos meios MMV e MMB e a sacarose é o principal açúcar presente no MMC.

O perfil fermentativo da produção de biomassa micelial e exopolissacarídeo pelo *H. erinaceus* cultivado em MMB é mostrado na Figura 2.

Figura 2 – Perfil fermentativo da produção de biomassa e EPS em Meio Mineral Basal.



Fonte: Autoria própria (2023).

Observa-se rápida assimilação dos substratos, sendo verificado um consumo de 44,3 % nas primeiras 48 horas de cultivo. A assimilação do substrato continuou efetiva até o final do processo fermentativo em 144 horas, quando foi verificado um consumo de 90,4 %. Observando as curvas de crescimento micelial e produção de EPS parece haver certa correlação entre crescimento da biomassa e biossíntese do EPS. Um perfil quase linear de crescimento celular é observado ao longo do cultivo com máxima produção de biomassa celular em 144 horas (8,52 g/L). Em relação a produção e exopolissacarídeo, não foi observada a produção nas primeiras 24 horas de cultivo. Apenas um pequeno de acúmulo de EPS (0,01 g/L) no meio foi verificado após 48 horas de cultivo. A produção de EPS ocorre, de fato, após 48 horas, com máxima produção sendo verificada em 144 horas (0,52 g/L). Este comportamento possivelmente pode ser justificado em função da composição do meio de cultivo. Muitos fungos passam a produzir exopolissacarídeos em condições de menor disponibilidade de nitrogênio ou mesmo de limitação. Considerando o efetivo de crescimento celular e o consumo de substrato nas primeiras 48 horas, de fato a partir de 48 horas poderia ter ocorrido certa limitação de nitrogênio no meio.

A composição proximal da biomassa micelial obtida no Meio Mineral Basal (meio selecionado) está descrita na Tabela 2. Elevado conteúdo de umidade (47,36 g/ 100 g) foi

encontrado na amostra liofilizada. Este elevado conteúdo sugere elevada higroscopicidade da biomassa. Apreciável conteúdo de proteína (15,20 g/ 100 g) e baixo conteúdo de lipídeo (2,0 g/ 100 g) também foi verificado. Conteúdos de até 25,45 % de proteína e 6,44 % de lipídeos tem sido descrito no corpo de frutificação do fungo *H. erinaceus*. LIU et al. (2022).

A biomassa micelial também mostrou ser rica em componentes minerais sendo verificado um conteúdo de 5,38 g/ 100g.

Tabela 2 - Composição proximal da biomassa micelial do *Hericiium erinaceus* em Meio Mineral Basal

Parâmetros	Resultados obtidos
Umidade (g/ 100 g)	47,36 ± 0,31
Proteínas (g/ 100 g)	15,20 ± 0,17
Lipídeos (g/ 100 g)	2,0 ± 28,8
Resíduo mineral (g/ 100 g)	5,38 ± 0,28
Carboidratos totais (g/ 100 g)	30,06 ± 0,91

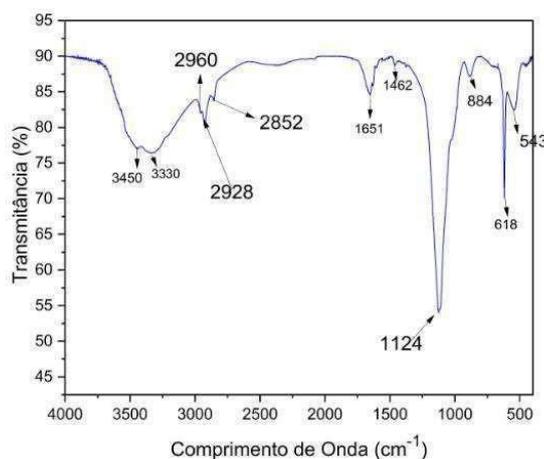
Fonte: Autoria Própria (2023).

Bandas de absorção típicas de polissacarídeo (EPS) na região entre 400 cm^{-1} e 4000 cm^{-1} foram observadas na amostra de EPS produzidas pelo fungo *Hericiium erinaceus* (HOU et al., 2015) (Figura 3). A banda de forte intensidade nas regiões de 3330 cm^{-1} e 3450 cm^{-1} é designada à vibração de estiramento de grupo de hidroxila, grupo este característico em amostra de carboidratos (FONSECA et al., 2020) (ACOSTA et al., 2020).

As bandas de absorção nas regiões de 2928 cm^{-1} e 2852 cm^{-1} são atribuídas a estiramento simétrico e assimétrico de grupo metileno (C-H) (ACOSTA et al., 2020; HOU et al., 2015), respectivamente. A banda em 1651 cm^{-1} é atribuída a vibração de estiramento C=O e a banda 1462 cm^{-1} é causada pela vibração de estiramento C-H (ERMIŞ et al., 2020). A banda em 1651 cm^{-1} também pode estar associada à vibração de flexão do grupo hidroxila da água adsorvida no polissacarídeo (ACOSTA et al., 2020; HOU et al., 2015). Na região de 1124 cm^{-1} uma banda de alta intensidade é observada e sugere que a estrutura monomérica

(monossacarídeo) do EPS é constituída por um anel de piranose (vibração de estiramento C-O, e deformação C-O-H) (HOU et al., 2015). A absorção fraca na região de 884 cm^{-1} é atribuída à ligação glicosídica, possivelmente com configuração β (C-1-H(β)) (ACOSTA; et al., 2020). A banda em 618 cm^{-1} também pode estar associada à configuração beta, característica em subunidades de açúcar. A banda em 543 cm^{-1} é atribuída ao anel de piranose (C=O) e sua deformação assimétrica (MA et al., 2018).

Figura 3- Análise Infravermelho do exopolissacarídeo produzidos em Meio Mineral Basal



Fonte: Autoria própria (2023)

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os diferentes meios de cultivo estudados demonstraram potencial para o cultivo submerso do fungo *Hericium erinaceus* (cepa 107001) O Meio Mínimo de Vogel e o Meio Mineral Basal contribuíram para maior crescimento celular comparado ao Meio de Melaço de Cana-de-açúcar. Produção de exopolissacarídeo também foi verificada, entretanto, apenas no Meio Mineral Basal. A biomassa micelial obtida apresentou elevado conteúdo de proteínas e minerais e um conteúdo relativamente baixo de lipídeos. A análise por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier mostrou bandas típicas de carboidratos na amostra e sugere que os monossacarídeos presentes no EPS possivelmente estejam unidos por ligações glicosídicas com configuração β . A produção do EPS pelo fungo estudado parece estar associada a composição do meio de cultivo, sendo necessário estudos mais detalhados para a elucidação de tal fenômeno.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, S. B. P. et al. Valorization of soybean molasses as fermentation substrate for the production of microbial exocellular β -glucan. *Journal of Polymers and the Environment*, v. 28, n. 8, p. 2149–2160, 2020.
- CUNHA, M. A. A. et al. Lasiodiplodan, an exocellular (1 \rightarrow 6)- β -d-glucan from *Lasiodiplodia theobromae* MMPI: Production on glucose, fermentation kinetics, rheology and antiproliferative activity. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 39, n. 8, p. 1179–1188, 2012.
- DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.
- ERMIŞ, E. et al. Optimization of exopolysaccharide production of *Lactobacillus brevis* E25 using RSM and characterization. *Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, v. 24, n. 1, p. 151–160, 2020.
- FONSECA, M. S. et al. *Neodeightonia phoenicum* CMIB-151: isolation, molecular identification, and production and characterization of an exopolysaccharide. *Journal of Polymers and the Environment*, v. 28, n. 7, p. 1954–1966, 2020.
- HE, X. et al. Structures, biological activities, and industrial applications of the polysaccharides from *Hericium erinaceus* (Lion's Mane) mushroom: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 97, p. 228–237, 2017.
- HOU, Y.; DING, X.; HOU, W. Composition and antioxidant activity of water-soluble oligosaccharides from *Hericium erinaceus*. *Molecular Medicine Reports*, v. 11, n. 5, p. 3794–3799, 2015.
- LI, I-C. et al. Neurohealth properties of *Hericium erinaceus* mycelia enriched with erinacines. *Behavioural Neurology*, v. 2018, 2018.
- MA, Y. et al. Assessment of polysaccharides from mycelia of genus *Ganoderma* by mid-infrared and near-infrared spectroscopy. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, 2018.
- MARMOL, R. M. et al. Hericerin derivatives activates a pan-neurotrophic pathway in central hippocampal neurons converging to ERK1 /2 signaling enhancing spatial memory. *Journal of Neurochemistry*, v. 165, p. 791-808, 2023.
- MIZUNO, T. Bioactive substances in *Hericium erinaceus* (Bull.: Fr.) Pers. (Yamabushitake), and its medicinal utilization. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, v. 1, n. 2, p. 105–119, 1999.
- VOGEL, H. J. A Convenient growth medium for *Neurospora* (Medium and). *Microbial Genetic Bulletin*, v. 13, p. 42–47, 1956.
- WANG, Z.; LUO, D.; LIANG, Z. Structure of polysaccharides from the fruiting body of *Hericium erinaceus* Pers. *Carbohydrate Polymers*, v. 57, n. 3, p. 241–247, 20.