

CRESCIMENTO MICELIAL DE *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. EM RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS DISPONÍVEIS NA AMAZÔNIA

Ana Júlia de Porto Macedo¹
Larissa de Souza Kirsch¹
Rosana Antunes Palheta¹
Jair Putzke²
Maria Francisca Simas Teixeira^{2*}

RESUMO

Neste trabalho avaliou-se o crescimento micelial de *Ganoderma lucidum* DPUA 1694 sob a influência de diferentes concentrações de farelo de arroz em substratos lignocelulósicos da Amazônica. Os substratos foram formulados com casca de cupuaçu e serragem, suplementados com farelo de arroz nas concentrações de 10 e 20%. O crescimento vertical foi medido diariamente durante 15 dias de fermentação, avaliando-se o vigor micelial e crescimento em mm. *G. lucidum* apresentou crescimento em todas as condições experimentais e o micélio foi classificado como fortemente e mediamente adensado nos substratos a base de casca de cupuaçu e serragem suplementado com 10% e 20% de farelo de arroz, respectivamente. O crescimento micelial vertical de *G. lucidum* em casca de cupuaçu foi significativamente maior ($\alpha=5\%$) quando comparado ao substrato a base de serragem. Além disso, foi possível verificar que a adição do farelo de arroz como suplemento nutricional favoreceu o crescimento em ambos os substratos. A espécie estudada apresentou capacidade de colonizar os resíduos lignocelulósicos, evidenciando o potencial de utilização dos resíduos e da espécie em futuras aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: *Ganoderma lucidum*, resíduos lignocelulósicos, crescimento micelial.

¹ Coleção de Culturas DPUA/UFAM, Universidade Federal do Amazonas. Av. Gal. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, 69.077-000, Manaus, AM, Brazil

² Departamento de Biologia, Universidade de Santa Cruz do Sul. Av. Independência, 2293, 69.815-900, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil

(*) Autor para correspondência: Coleção de Culturas DPUA/UFAM, Universidade Federal do Amazonas. Av. Gal. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, 69.077-000, Manaus, AM, Brazil

Tel/Fax: +55 92 3647 4232

E-mail: mteixeira@ufam.edu.br

MYCELIAL GROWTH OF *Ganoderma lucidum* (Curt.; Fr.) P. Karst. IN AMAZON LIGNOCELLULOSIC RESIDUES

ABSTRACT

In this work it was evaluated the mycelial growth of *Ganoderma lucidum* DPUA 1694 under the influence of different concentrations of rice bran in lignocellulosic substrates from Amazon. The substrates were formulated with cupuassu bark and sawdust supplemented with rice bran at concentrations of 10 and 20%. The vertical growth was measured daily for 15 days of fermentation in mm, and the mycelial strength was evaluated. *G. lucidum* showed growth in all experimental conditions and the mycelium was classified as strongly and moderately dense in cupuassu bark and sawdust supplemented with 10% and 20% with rice bran, respectively. The vertical mycelial growth of *G. lucidum* in cupuassu bark was significantly higher ($\alpha = 5\%$) when compared to substrate prepared with sawdust. In addition, it was found that the addition of rice bran as a nutritional supplement favored the mycelial growth on both substrates. The specie studied here had the ability to colonize the lignocellulosic residues, demonstrating the potential use of residues and the specie in future biotechnological applications.

Keywords: *Ganoderma lucidum*, lignocellulose residue, mycelial growth

INTRODUÇÃO

Ganoderma lucidum é comumente utilizado na medicina tradicional chinesa no tratamento de diversas doenças, como hepatite crônica, colesterol, doenças coronárias, hipertensão e tosse brônquica (Chang e Miles, 2004).

A produção a nível comercial desse Aphyllophorales ocorre principalmente em toras de madeira, podendo também ser produzido por fermentação semi-sólida (FSS) utilizando serragens em sacos plásticos ou em garrafas. Este bioprocesso comumente está caracterizado pelo desenvolvimento do organismo sobre materiais sólidos que apresentam a propriedade de absorver ou de conter água, com ou sem nutrientes solúveis, com fluxo de ar contínuo e sem a presença de líquido livre entre as partículas de substrato (Pinto et al., 2005).

Os substratos utilizados na FSS são em geral, resíduos ou subprodutos da agroindústria tais como farelos, cascas, bagaços, resíduos do processamento de alimentos e da indústria de papel e celulose, materiais geralmente encontrados em grandes quantidades gerando problemas de poluição ambiental. Assim estes materiais são considerados viáveis para a biotransformação, contribuindo para o novo conceito de procedimentos tecnológicos sustentáveis na produção de alimentos (Chang e Miles, 2004; Pandey et al., 2000; Santos et al., 2006).

A capacidade de crescimento dos fungos nos substratos está relacionada com o vigor do micélio e com a habilidade do mesmo em ativar mecanismos fisiológicos para utilização dos nutrientes no meio. Além disso, essa colonização torna-se fundamental para o cultivo de cogumelos, pois quanto mais rápido ocorrer o seu desenvolvimento, menor o risco de contaminação por outros fungos ou bactérias (Donini et al. 2006). Esta

forma de crescimento pode ser influenciado pela concentração de nutrientes e oxigênio, acúmulo de produtos finais tóxicos, produção de metabólitos secundários e mudanças de fatores como o pH (Regina, 2001). A miceliação de diferentes espécies de cogumelos tem sido relacionada com a suplementação de substratos utilizando farelo de arroz como fonte de nutrientes (Rossi et al., 2001).

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar o crescimento micelial de *G. lucidum* sob a influência de diferentes concentrações de farelo de arroz em substratos formulados a base de casca de cupuaçu e serragem, resíduos disponíveis na região amazônica.

MATERIAL E MÉTODOS

Basidiomiceto

A espécie utilizada neste estudo foi *Ganoderma lucidum* DPUA 1694 cedida pela Coleção de Culturas DPUA, da Universidade Federal do Amazonas. A cultura preservada em óleo mineral foi reativada em Ágar Batata Dextrose + Extrato de Levedura [0,5% (p/v)-BDA], em placas de Petri (90 mm x 15 mm). Todos os cultivos foram mantidos a 25 °C por cinco dias na ausência de luminosidade, observando-se o crescimento a cada 24 horas. A partir das culturas reativadas foram preparadas culturas estoque em BDA e mantidas nas mesmas condições de reativação.

Resíduos e preparação dos substratos para cultivo

A escolha dos resíduos lignocelulósicos oriundos da agroindústria e indústria madeireira foi baseada na disponibilidade dos mesmos na região Amazônica. Para tanto, os resíduos utilizados foram a serragem de angelim (*Hymenolobium* sp. Ducke), casca de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*, Schum) e farelo de arroz (*Oryza sativa* L.). Os resíduos foram coletados, desidratados e devidamente armazenados em sacos plásticos até o início dos experimentos no Laboratório de Micologia da Universidade Federal do Amazonas. A casca de cupuaçu obtida foi triturada em máquina DPM-2, peneira 25 mm.

Os resíduos lignocelulósicos foram tratados, separadamente, com carbonato de cálcio 0,5% (p/v) durante 12 horas. Após esse tratamento os substratos foram lavados com água de torneira utilizando-se uma peneira com tela de nylon ($\phi = 1\text{mm}$) para a retirada do excesso de carbonato de cálcio.

Com a finalidade de avaliar o crescimento de *G. lucidum* em resíduos lignocelulósicos foram realizadas seis formulações utilizando casca de cupuaçu e serragem, suplementado com 0, 10 % e 20% de farelo de arroz. A tabela 1 indica a formulação dos substratos elaborada neste trabalho.

Cada formulação foi preparada, separadamente, em uma bacia de aço-inox, homogeneizando-se os resíduos de forma a atingir uma umidade de 60%. A umidade [U (%)] foi determinada em 100g de cada resíduo, em forno microondas, em temperatura média durante 15 minutos, pela diferença entre o peso inicial e o peso da amostra desidratada (Rollan, 2003). O pH de cada formulação foi aferido para 6,0.

A partir dos substratos preparados foram acondicionados em tubos de borosilicato (200 mm x 25 mm) formando uma coluna de 130 mm e os frascos foram esterilizados a 121 °C por 45 minutos em dois dias consecutivos. Após resfriamento dos

substratos, em cada tubo de ensaio medindo 200 mm x 25 mm foram coladas três fitas milimetradas medindo 130 mm x 5 mm para avaliação do crescimento micelial vertical.

Avaliação do crescimento micelial vertical

A partir dos substratos esterilizados foram retirados três discos de micélio ($\varnothing = 7$ mm) da periferia das culturas estoque e inoculados nos substratos. A fermentação semi-sólida foi conduzida a 25 °C, na ausência de luz durante 15 dias. O crescimento micelial vertical foi observado a cada 24 horas e determinado em milímetros.

Para avaliar o vigor micelial seguiu-se a classificação feita por Pedra e Marino (2006). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Determinação dos parâmetros físico-químico dos resíduos

A determinação dos conteúdos de proteína bruta, lipídios, minerais, da fração de cinzas, carboidratos totais e umidade dos resíduos utilizados foi realizada segundo metodologia descrito pela A.O.A.C. (1997).

Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5 %), utilizando-se o software STATISTICA 7.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Característica físico-química dos resíduos

A composição centesimal da casca de cupuaçu, farelo de arroz e serragem usados nos cultivos de *G. lucidum* está citada na tabela 4. O teor de nitrogênio (3,130%) proteína (15,37%) lipídeos (19,41%) e cinzas (9,14%) predominou em farelo de arroz. Os valores de carboidratos corresponderam a 81,94% em serragem, registrando redução em casca de cupuaçu (72,20%) e farelo de arroz (44,84%).

Dados da literatura mostram que nutrientes de resíduos lignocelulósicos são importantes para o desenvolvimento das espécies de cogumelos, principalmente o conteúdo de carbono e nitrogênio que favorecem a formação de basidiomas (Gaitán-Hernandez et al., 2009). Além disso, as fontes de carbono fornecem energia para a atividade metabólica e constituem a base para síntese de diversas moléculas, assim como o nitrogênio torna-se essencial para assegurar a síntese de aminoácidos e proteínas (Chang e Miles, 2004).

Crescimento micelial vertical

Nas condições de cultivo *in vitro* verificou-se o crescimento de *G. lucidum* em todos os substratos, contudo a massa micelial apresentou aspecto peculiar nos diferentes substratos (Fig. 1). Dessa forma, as características do micélio foram classificadas de acordo com as seguintes notas (Pedra e Marino, 2006): ① fracamente adensado; ② mediamente adensado e ③ fortemente adensado. Com base nesta classificação, ao final de 15 dias de cultivo o micélio de *G. lucidum* apresentou aspecto do tipo fortemente adensado nos substratos formulados à base de casca de cupuaçu suplementado com 10% e 20% de farelo de arroz enquanto em casca de cupuaçu e serragem sem suplementação

de farelo de arroz foi fracamente adensado e em serragem contendo 10% e 20% de farelo de arroz, mediamente adensado.

Os resultados mostraram que o substrato formulado a base de casca de cupuaçu foi o que apresentou o melhor resultado em relação à serragem (Tab. 2). O crescimento vertical de *G. lucidum* em casca de cupuaçu após 15 dias de cultivo foi significativamente maior ($\alpha=5\%$) em relação a serragem, em todas as condições avaliadas, apontando a casca de cupuaçu como o melhor substrato para micelial desse cogumelo.

A concentração da suplementação do farelo de arroz também influenciou positivamente no crescimento vertical de *G. lucidum* (Tab. 2), observando-se maior crescimento nos substratos com suplementação de farelo de arroz em relação aos substratos sem suplementação. No entanto, não houve diferença significativa entre as concentrações de farelo de arroz sobre o crescimento micelial, de forma que tanto a adição de 10% quanto de 20% de farelo de arroz favoreceu o crescimento do cogumelo de forma semelhante, em ambos os substratos. Isso provavelmente ocorreu devido a maior disponibilidade de nutrientes facilmente assimilável no farelo de arroz. Tal comportamento é verificado na Tab. 3, cujos valores da concentração de nitrogênio (%) no farelo de arroz é de cerca de 3,13 %, enquanto que na casca de cupuaçu e serragem é de 1,98% e 1,25%, respectivamente. Além disso, o farelo de arroz contém elevado teor de lipídeos (19,41%) em relação aos demais resíduos [serragem (2,43%) e casca de cupuaçu (1,98%)], o que também pode ter influenciado no crescimento mais vigoroso de *G. lucidum*.

Em estudo realizado por Marino et al. (2008) os autores relatam que a adição de farelos à serragem de coco reduziu a relação carbono:nitrogênio e teve ação estimulante na velocidade de crescimento e no vigor micelial de *Pleurotus ostreatus*, sendo o máximo crescimento obtido quando o substrato foi suplementado com 20% de farelo de arroz e de trigo.

O efeito estimulatório no crescimento de *P. ostreatus* pela adição de farelos em substratos também foi relatada por Donini et al. (2006). Os resultados mostraram que somente a adição de farelos de trigo e de soja influenciou de forma significativa no crescimento de três linhagens de *P. ostreatus* avaliadas, com resultados mais expressivos para os substratos suplementados com farelo de soja a 20%.

Os resultados obtidos para o crescimento micelial de *G. lucidum* foram ajustados a um modelo linear, conforme indicado na Fig. 2. Para o substrato casca de cupuaçu (Fig. 2a) suplementado com farelo de arroz em ambas as concentrações (10% e 20%) o crescimento micelial manteve-se superior em relação ao substrato sem adição desse farelo durante todo o período de incubação. O mesmo padrão de crescimento micelial também foi verificado para o substrato formulado com serragem (Fig. 2b).

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos conclui-se que a suplementação de resíduos com farelo de arroz mostrou-se um fator importante no crescimento micelial de *G. lucidum* DPUA 1694. Além disso, a suplementação da casca de cupuaçu com 20% de farelo de arroz constitui um potencial substrato para o cultivo de *G. lucidum* DPUA 1694.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o suporte financeiro concedido pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e o apoio técnico da Coleção de Culturas DPUA/UFAM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. *Association Official Analytical Chemists*. Official Methods of analysis of the AOAC. Washington, Ig W.Horwitz. 1997. 850 p.

CHANG, S. T.; MILES, P. G. *Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact*. 2. Ed. London: CRC. 2004. 451p.

DONINI, L. P.; BERNARDI, E.; E NASCIMENTO, J. S. Desenvolvimento *in vitro* de *Agaricus brasiliensis* em meios suplementados com diferentes farelos. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 41, p. 995-999, 2006.

GAITÁN-HERNÁNDEZ; R.; SALMONES, D.; MERLO, R. P.; MATA, G. Evaluación de la eficiencia biológica de cepas de *Pleurotus pulmonarius* em paja de cebada fermentada. *Revista Mexicana de Micología*, 30, p. 63-71, 2009.

MARINO, R. H.; ABREU, L. D.; MESQUITA, J. B.; RIBEIRO, G. T. Crescimento e cultivo de diferentes isolados de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer em serragem da casca de coco. *Arquivos do Instituto Biológico*, 75, p. 29-36, 2008.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; BRAND, D.; MOHAN, R.; ROUSSOS, S. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*, 6, p. 153-162, 2000.

PEDRA, W.N.; MARINO, R.H. Cultivo axênico de *Pleurotus* spp. em serragem da casca de coco (*Cocos nucifera* Linn.) suplementada com farelo de arroz e/ou de trigo. *Arquivos do Instituto Biológico*, 73, p.219-225, 2006.

PINTO, S. A. G.; BRITO, E.S.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. L. B. Fermentação em estado sólido: Uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. Comunicado técnico on line. 2005. Disponível em: <http://www.cnpat.embrapa.br?home/down/index.php?pub/cot_102.pdf>, acesso em 07/06/2010.

REGINA, M. *Cinética do crescimento miceliano de Lentinula edodes (Berk.) Pegler em bagaço de cana-de-açúcar e serragem de eucalipto*. 2001. 87p. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Agronomia- Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, UNESP, 2001.

ROLLAN, G. M. *Cultivo de setas y Trufas*. 4º. Ed. Espanha: Artes Gráficas Cuesta. 2003. 239 p.

ROSSI, I. H.; MONTEIRO, A. C.; MACHADO, J. O. Desenvolvimento micelial de *Lentinula edodes* como efeito da profundidade e suplementação do substrato. Pesquisa agropecuária brasileira, 36, p. 887-891, 2001.

SANTOS, D. T.; SARROUH, B. F.; SANTOS, J. C.; PÉREZ, V. H.; SILVA, S. S. Potencialidades e aplicações da fermentação semi-sólida em biotecnologia. *Janus*, p. 164-183, 2006.

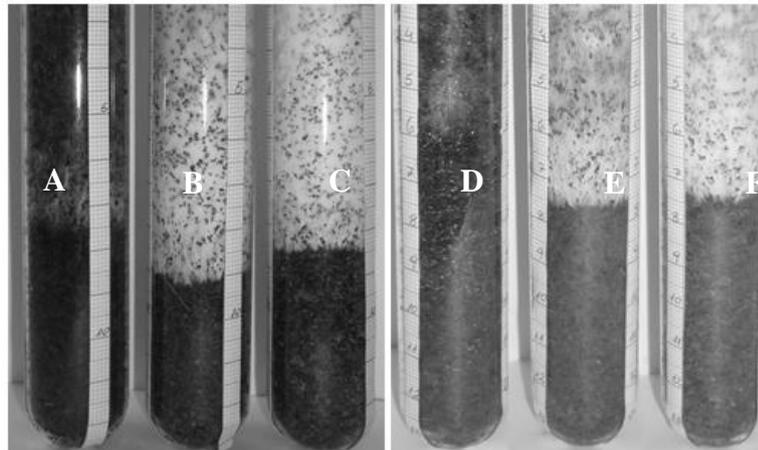


Figura 1 - Cultivo de *G. lucidum* a 25 °C após 15 dias de cultivo: características do desenvolvimento micelial em A (casca de cupuaçu); B (casca de cupuaçu + farelo de arroz 10%); C (casca de cupuaçu + farelo de arroz 20%); D (serragem); E (serragem + farelo de arroz 10%); e F (serragem + farelo de arroz 20%).

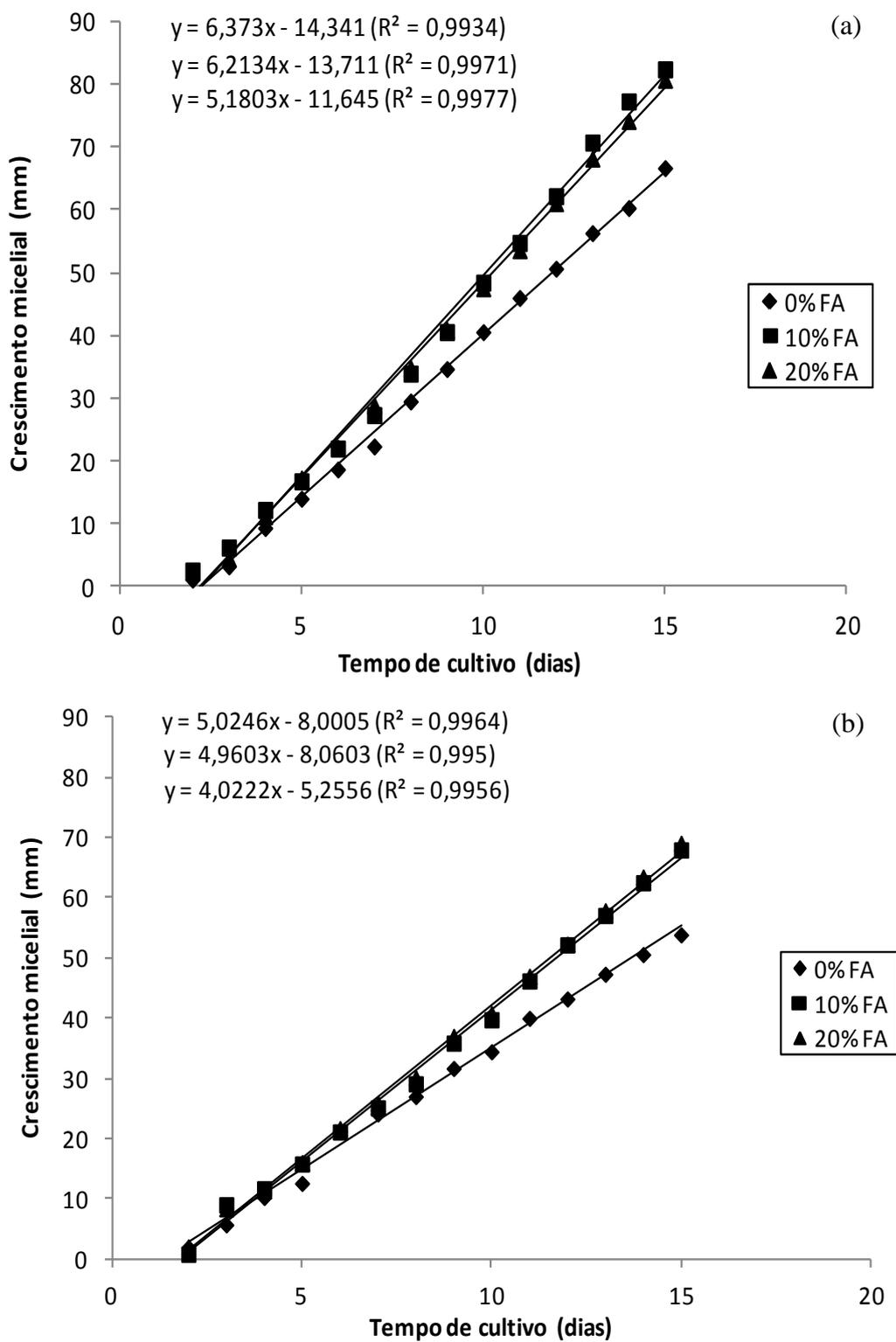


Figura 2- Crescimento micelial de *G. lucidum* durante 15 dias cultivado em substrato a base de casca de cupuaçu (a) e serragem (b) suplementado com farelo de arroz (FA).

Tabela 1- Substratos e concentração do farelo de arroz utilizados na avaliação do crescimento micelial vertical de *G. lucidum*

Tratamento	Resíduos (%)	Suplemento [Farelo de arroz (%)]
1	Serragem (100)	0
2	Serragem (90)	10
3	Serragem (80)	20
4	Casca de cupuaçu (100)	0
5	Casca de cupuaçu (90)	10
6	Casca de cupuaçu (80)	20

Tabela 2. Média do crescimento micelial de *G. lucidum* em diferentes substratos formulados com farelo de arroz após 15 dias de crescimento

Substratos	Suplementação do farelo de arroz		
	0%	10%	20%
Casca de Cupuaçu	63,61 ^{bc}	82,44 ^a	80,77 ^a
Serragem	53,88 ^c	68,00 ^b	69,11 ^b

Médias seguidas por letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

Tabela 3 - Composição centesimal dos resíduos agroflorestais utilizados para cultivo de *G. lucidum*

Amostra	Casca cupuaçu (CC)	Farelo arroz (FA)	Serragem (SE)
Umidade (%)	9,61 ± 0,05	9,24 ± 0,19	7,81 ± 0,08
Cinzas (%)	4,53 ± 0,67	9,14 ± 0,06	0,47 ± 0,04
Lipídios (%)	1,98 ± 0,66	19,41 ± 0,18	2,43 ± 0,07
Proteína (N x 6,25) (%)	12,37 ± 0,07	19,56 ± 1,98	7,81 ± 2,11
Nitrogênio (%)	1,98 ± 0,07	3,13 ± 1,98	1,25 ± 2,11
Carboidrato Total (%)	72,2 ± 0,98	44,84 ± 2,66	81,94 ± 1,93
Fibra (%)	2,02 ± 0,37	2,07 ± 0,14	1,99 ± 0
Energia (kcal)	353,34 ± 4,14	423,35 ± 3,38	379,04 ± 0,67