

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRO-REITORIA DE PESQUISA E GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

Atividade de enzimas pectinolíticas e velocidade de miceliação de *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. em resíduo agroindustrial

Bolsista: Ana Júlia Porto de Macedo, CNPq

**MANAUS  
2010**

**Atividade de enzimas pectinolíticas e velocidade de miceliação de *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. em resíduo agroindustrial**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PRO-REITORIA DE PESQUISA E GRADUAÇÃO  
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

**RELATÓRIO FINAL**

**PIB-B/0046/2009**

Atividade de enzimas pectinolíticas e velocidade de miceliação de *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. em resíduo agroindustrial

Bolsista: Ana Júlia Porto de Macedo, CNPq

Orientadora: Maria Francisca Simas Teixeira

**MANAUS  
2010**

## Resumo

*Ganoderma lucidum*, um cogumelo utilizado tradicionalmente devido às múltiplas propriedades medicinais, tem propriedade de crescimento *in vitro* em resíduos agroindustriais, substratos favoráveis para o desenvolvimento do píleo e produção de compostos de interesse industrial. Este trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento micelial vertical e a produção de enzimas pectinolíticas em substratos oriundos da agroindústria amazônica. As culturas de *G. lucidum* cedidas pela Coleção de Culturas DPUA da Universidade Federal do Amazonas foram subcultivadas em ágar batata dextrose adicionado de 0,5% de extrato de levedura 0,5% (PV) (BDA). Na avaliação do crescimento micelial vertical, três discos das culturas em BDA, medindo 7 mm, foram transferidos para casca de cupuaçu (CC) e serragem (SE), suplementada com farelo de arroz 10% e 20%. A fermentação semi-sólida foi conduzida na ausência de luz, por 15 dias, a 25 °C. O crescimento do cogumelo foi determinado em milímetros-se cada 24 horas. Ao término de cada bioprocessos (5°, 10° e 15° dias), após a extração dos biocatalisadores em água destilada foi determinada a atividade pectinolítica qualitativa e quantitativa de pectinesterase (PE), endopoligalacturonase (EndoPG) e exopoligalacturonase (Exo-PG). Os resultados revelaram que *G. lucidum* apresentou crescimento em todos os substratos e segundo o critério de classificação adotado para avaliar o vigor micelial, na casca de cupuaçu ou serragem suplementado com farelo de arroz 10% e 20% foi do tipo fortemente adensado e mediamente adensado, respectivamente. Nos substratos sem farelo de arroz, o micélio foi fracamente adensado. Com relação as enzimas, em todos os extratos de *G. lucidum* foi determinada a atividade pectinolíticas. Os máximos valores a atividade de pectinesterase foram determinados no 15° dia de cultivo (1,55 U/mL e 1,16 U/mL), em ambos os substratos (CC e SE), sem farelo de arroz. As maiores atividades de exopoligalacturonase (1,22 UV/mL/min e 1,33 UV/mL/min) foram verificadas nos substratos (CC e SE) com farelo de arroz 20%. Também foi verificado que a interação da concentração do suplemento e o tempo de cultivo influenciaram significativamente na produção de endopoligalacturonase, em casca de cupuaçu. Nos cultivos com serragem todas as variáveis foram significativas para a produção das enzimas pectinolíticas. A maior atividade de endopoligalacturonase (5,87 U/mL) foi determinada em casca de cupuaçu com farelo de arroz 20%, no 15° dia de cultivo. Em conformidade com os resultados desta pesquisa, *G. lucidum* se desenvolve e produz enzimas pectinolíticas, por isso tem potencial para ser utilizada em futuras aplicações biotecnológicas, especialmente na indústria alimentícia.

## Lista de tabelas

<b>TABELA 1</b> - Substratos e concentração do farelo de arroz utilizados na avaliação do crescimento micelial vertical de <i>G. lucidum</i>	<b>14</b>
<b>TABELA 2</b> - Delineamento fatorial $2^2$ completo com quatro repetições no ponto central	<b>15</b>
<b>TABELA 3</b> - Composição centesimal dos resíduos agroflorestais utilizados para cultivo de <i>G. lucidum</i>	<b>21</b>
<b>TABELA 4</b> - Halos de degradação em ágar pectina	<b>21</b>

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Cultivo de *G. lucidum* a 25°C/15 dias: características do desenvolvimento micelial em A(CC); B (CC+ FA 10%); C (CC+FA 20%); D (SE); E (SE+FA 10%); e F (SE+FA 20%) **20**
- FIGURA 2** - Crescimento micelial vertical de *G. lucidum* em casca de cupuaçu (a) e serragem (b) **21**
- FIGURA 3** - Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável resposta a produção de pectinesterase em casca de cupuaçu (A) e em serragem (B). (1) FA- Concentração do farelo de arroz (%); (2) T- Tempo de cultivo (dias); (1\*2)- interação entre a concentração do farelo de arroz (%) e o tempo de cultivo (dias). **23**
- FIGURA 4** - Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável resposta a produção de exopoligalacturonase em casca de cupuaçu (A) e em serragem (B). (1) FA- Concentração do farelo de arroz (%); (2) T- Tempo de cultivo (dias); (1\*2)- interação entre a concentração do farelo de arroz (%) e o tempo de cultivo (dias). **24**
- FIGURA 5** - Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável resposta a produção de endopoligalacturonase em casca de cupuaçu (A) e em serragem (B). (1) FA- Concentração do farelo de arroz (%); (2) T- Tempo de cultivo (dias); (1\*2)- interação entre a concentração do farelo de arroz (%) e o tempo de cultivo (dias). **24**

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>9</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>11</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>15</b>
3.1 Obtenção da cultura	15
3.2 Fermentação Semi-Sólida	15
3.2.1 Preparo do substrato	15
3.2.2 Avaliação do crescimento micelial vertical	15
3.2.3 Produção das enzimas pectinolíticas	16
3.3 Obtenção do extrato enzimático	17
3.4 Determinação da atividade pectinolítica	17
3.4.1 Avaliação qualitativa	17
3.4.2 Avaliação enzimática quantitativa	18
3.4.2.1 Determinação da atividade de pectinesterase (PE)	18
3.4.2.2 Determinação da atividade de exopoligalacturonase (Exo-PG)	19
3.4.2.3 Determinação da atividade de endopoligalacturonase (Endo-PG)	19
3.5 Determinação da característica físico química	19
3.6 Análise estatística	20
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>21</b>
4.1 Crescimento micelial vertical	21
4.2 Característica físico-química dos substratos	22
4.3 Determinação da atividade de enzimas pectinolíticas em meio sólido	23
4.4 Atividade de enzimas pectinolíticas (PE, Endo-PG e exo-PG)	24
<b>5. CONCLUSÕES</b>	<b>26</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b>	<b>27</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Ganoderma lucidum*, classificado no filo Basidiomycota, família Polyporacea, ordem Aphyllophorales, estruturalmente tem basidioma grosso, duro, resistente e ocorre principalmente em regiões subtropicais, mas encontrado em zonas temperadas. Nos países Asiáticos (China, Japão e Coréia), tradicionalmente vem sendo reconhecido como fonte de produtos nutracêuticos, medicinais e popularmente conhecido no Japão como “Lingzhi”; na China, “Mannentake” ou “Reishi” e no Brasil, “Cogumelo Rei”, “Cogumelo brilhante” ou “Cogumelo do Imperador” (CHANG; MILES, 2004; RUBEL, 2006).

Com relação à produção de *G. lucidum*, na China, o cultivo vem sendo realizado para utilização no tratamento de insônia, fraqueza, anorexia, hepatite crônica, doenças coronárias, hipertensão, carcinoma, e inibição da síntese de colesterol (CHANG; MILES, 2004). Shiao (2003) relata também a atividade estimuladora da agregação plaquetária de triterpenos e propriedades antitumorais de polissacarídeos isolados de *G. lucidum*.

Em se tratando da produção a nível comercial, os métodos mais utilizados para *G. lucidum* são em toras de madeira. Quando serragens são utilizadas em sacos ou em garrafa, os cultivos são realizados por fermentação semi-sólida, bioprocessos que reconhecidamente reduzem os impactos ambientais, além de ser útil para a produção de biocompostos, alimento humano e ração animal (PANDEY *et al.*, 2000; CHANG; MILES, 2004).

Nos cultivos *in vitro* de *G. lucidum*, além dos vários fatores físicos e químicos que influenciam no desenvolvimento e frutificação. A velocidade de miceliação também pode ser alterada conforme a profundidade do substrato, visto que a suplementação pode modificar estruturalmente o substrato, dificultando as trocas gasosas (Rossi, Monteiro; Machado, 2003).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência de diferentes concentrações de resíduo agroindustrial disponível no Estado do Amazonas para crescimento micelial



vertical de *G. lucidum* com a finalidade de selecionar uma mistura de substrato para produção de inóculo avaliar a produção de enzimas pectinolíticas.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

### 2.1 Fermentação Semi-sólida *versus* produção de cogumelos

O desenvolvimento *in vitro* de cogumelos, em meios líquidos ou sólidos, resulta em um produto com composição mais constante e previsível que os espécimes crescidos *in natura*. Através de processos biotecnológicos adequados pode-se monitorar a produção de cogumelos em três níveis: controle da cepa, controle do processo de produção e controle de produto final (RAI; TIDE; WASSER, 2005).

No bioprocesso utilizando-se fermentação semi-sólida (FSS) o microrganismo se desenvolve na superfície de 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, 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 (SANTOS *et al.*, 2006).

No Brasil há diversas pesquisas utilizando a FSS para a produção de cogumelos principalmente os dos gêneros *Pleurotus* e *Lentinus*. Dentre os substratos utilizados os resíduos da agroindústria são os mais frequentes tais como bagaço de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e resíduo de café (*Coffea* sp.) (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

O desenvolvimento do corpo de frutificação de vários cogumelos, incluindo *G. lucidum*, tem sido produzido em culturas sólidas, usando como substrato gramíneas, grãos de

cereais, serragem ou madeira, porém o seu crescimento pode demorar vários meses (URBEN, 2004). Desse modo o cultivo *in vitro* é visto como uma alternativa promissora para obtenção de princípios ativos em curto espaço de tempo e sob condições controladas (RAI; TIDE; WASSER, 2005).

A fase micelial, no substrato, 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, BERNARDI, NASCIMENTO, 2006). O crescimento miceliano pode ser influenciado pela redução na 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; MONTEIRO; MACHADO, 2001).

## **2.2 Cultivo e Importância de *Ganoderma lucidum***

Dados da literatura mostram que *Ganoderma lucidum* tem ocorrência muito raro na natureza, de forma que não amostras suficientes para exploração comercial. (WAGNER *et al.*, 2003). Para o cultivo *in vitro*, ou seja, crescimento micelial, a temperatura ideal pode ser de 15 a 35 °C, luminosidade, umidade do substrato entre 60 e 65%, a umidade relativa do ar 60 a 70% e o pH do substrato 5,0 a 5,5. A luz também tem ação na diferenciação do píleo e do corpo de frutificação, estrutura de formação anual (CHANG & MILES, 2004; RUBEL, 2006).

Em geral, o cultivo e produção de *G. lucidum* estão voltados para a obtenção de metabólitos com aplicação no desenvolvimento de novos produtos da indústria farmacêutica, uma vez que diversos estudos têm comprovado as múltiplas atividades biológicas relacionadas a esse basidiomiceto (SERNA *et al.*, 2006).

Devido ao grande consumo *G. lucidum* nos países asiáticos esta espécie de cogumelo mostra-se como um importante produto de valor comercial apresentado sob diferentes formulações (bebidas, pós, cápsulas) tanto como suplemento alimentar quanto para fins medicinais (CHIU *et al.*, 2000).

As pesquisas mostram que o cultivo de basidiomicetos não se resume somente a importância alimentar, mas também como fonte de medicamentos, ração animal, produção de enzimas capazes de degradar totalmente polímeros, como lignina, hemicelulose e celulose, o que faz destes organismos candidatos ideais para bioconversão de resíduos lignocelulosicos (SCRASE, 1995).

Além disso, os cultivos permitem a produção de diferentes metabolitos secundários para aplicação nos diversos ramos das indústrias, uma vez que estes têm elevado valor comercial. Assim, várias estratégias têm sido empregadas objetivando aumentar os valores de produtividade deste biocompostos. As enzimas, por exemplo, apresentam no mercado mundial um valor comercial de US\$ 2 bilhões de dólares anuais e vem crescendo anualmente com taxas de 8 a 10% (MARASCHIN; VERPOORTE, 1999; FAPEMIG, 2010).

Atualmente, a indústria alimentícia é uma das principais beneficiárias das enzimas, que podem tornar os alimentos mais saborosos, nutritivos, digestivos e até mais atrativos. As pectinases, por exemplo, são utilizadas para amadurecimento de frutas, clarificação e redução de viscosidade em sucos de frutas, no tratamento preliminar do suco de uva para vinicultura, extração de polpa de tomate, fermentação de chá e chocolate, tratamento de resíduos vegetais, degomagem de fibras na indústria têxtil e de papel, nutrição animal, enriquecimento protéico de alimentos infantis e extração de óleos (UENOJO; PASTORE, 2005).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Obtenção da cultura estoque**

A cultura de *Ganoderma lucidum* DPUA 1694 foi cedida pela coleção de cultura DPUA, da Universidade Federal do Amazonas. Da cultura preservada sob óleo mineral foi retirado fragmento medindo 7 mm de diâmetro e transferido para superfície de ágar Batata Dextrose + Extrato de Levedura 0,5% (p/v)-BDA, em placa de Petri de 90 mm x 12 mm. Todos os cultivos foram mantidos a 25 °C por cinco dias, observando-se o desenvolvimento a cada 24 horas.

#### **3.2 Fermentação semi-sólida**

##### **3.2.1 Preparo do substrato**

Os resíduos agroflorestais, casca de cupuaçu (CC) e serragem (SE) foram tratados com solução de Carbonato de Cálcio a 0,5 % (p/v) por 12 horas. Após este tratamento foram lavados com água de torneira utilizando-se uma peneira com tela de nylon ( $\phi = 1\text{mm}$ ) para a retirada de resíduos e o excesso do Carbonato de Cálcio. A umidade do substrato para fermentação [U (%)] foi determinada em 100g de do substrato, em forno microondas, na temperatura média, após 15 minutos foi determinada pela diferença entre o peso inicial e o peso da amostra desidratada (ROLLAN, 2003). Quando necessário o pH foi aferido para 6,0, com solução de HCl 0,1M. Os substratos utilizados nos experimentos (CC ou SE) suplementados com farelo de arroz (FA) foram acondicionados em tubos de ensaio (200 mm x 25 mm) formando uma coluna de 130 mm e esterilizados a 121 °C por 45 minutos em dois dias consecutivos.

### 3.2.2 Avaliação do crescimento micelial vertical

Para avaliação do crescimento micelial vertical de *G. lucidum* no processo de fermentação semi-sólida, três discos de micélio ( $\phi = 7$  mm) foram retirados das culturas obtidas no item 3.1 e inoculados nos substratos esterilizados e resfriados (item 3.2.1). Em cada tubo de ensaio medindo 200 mm x 25 mm foram coladas três fitas milimetradas medindo 130 mm x 5 mm. A fermentação foi conduzida a 25 °C, na ausência 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 Marino *et al.* (2008). Todos os experimentos foram realizados em triplicata (Tabela 1).

Substratos	Suplemento [Farelo de arroz (%)]
Serragem	0
	10
	20
Casca cupuaçu	0
	10
	20

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

### 3.2.3 Produção das enzimas pectinolíticas

As enzimas pectinolíticas foram produzidas pela tecnologia da fermentação semi-sólida. Os substratos tratados (Item 3.2.1) foram acondicionados em tubo de ensaio medindo 200 mm x 25 mm, conforme um planejamento fatorial 2<sup>2</sup>, com 4 pontos centrais (Neto *et al.*, 2007), cujas variáveis estudadas foram: tempo de cultivo e concentração de FA (Tabela 2), para cada substrato base (CC e SE). Os tubos de ensaio contendo mistura de substrato formando uma coluna de 130 mm foram esterilizados a 121°C por 45 minutos em dois dias consecutivos.

Para as análises estatísticas foram consideradas 3 variáveis respostas: produção de pectinaesterase, endopoligalacturonase e exopoligalacturonase. O ponto central foi realizado em triplicata para possibilitar o cálculo do erro experimental.

Experimento	Tempo de cultivo (dias)	Farelo de arroz (%)
01	5	0
02	15	0
03	5	20
04	15	20
05	10	10
06	10	10
07	10	10
08	10	10

Tabela 2 - Delineamento fatorial 2<sup>2</sup> completo com quatro repetições no ponto central

### 3.3 Obtenção do extrato enzimático

No fim do período de crescimento, para a obtenção do extrato enzimático, o fermentado foi adicionado em 50 mL água destilada esterilizada (121 °C por 45 minutos durante dois dias consecutivos) e submetido a agitação 150 rpm, a 25°C por 30 minutos. Em seguida a suspensão foi filtrada em tecido de algodão e o sobrenadante concentrado a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C.

### 3.4 Determinação da atividade pectinolítica

#### 3.4.1 Avaliação qualitativa

A atividade pectinolítica foi determinada conforme Teixeira *et al.* (2000) em ágar pectina 0,5% (p/v). Em placa de Petri, após solidificação do meio esterilizado a 121°C por 15 minutos foram feitos *cup-plates* de nove milímetros de diâmetro. Em cada *cup-plate* foram inoculados 100 µL do extrato enzimático em triplicada e o branco (Tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,0). As placas foram incubadas a 37 °C por 18 horas. A atividade pectinolítica foi determinada em milímetros seguida da revelação do halo com HCl 5N.

#### 3.4.2 Avaliação enzimática quantitativa

A determinação de atividade das enzimas pectinesterase, exopoligalacturonase e endopoligalacturonase foi feita segundo descrito em Teixeira; Lima Filho; Durán, 2000.

#### **3.4.2.1 Determinação da atividade de pectinesterase (PE)**

A atividade de pectinesterase foi avaliada pelo decréscimo do pH do meio e por titulação dos grupos carboxílicos utilizando uma metodologia modificada, em 2,0 ml de 1% (p / v), pectina cítrica solução tampão 0,025 M Tris-acetato pH 6,5 e 1,0 ml do extrato bruto. O branco foi preparado da mesma forma, exceto que o extrato foi substituído por solução tampão. A reação enzimática foi realizada a 50 °C por 2 horas e em seguida, resfriados em banho-maria por 3 minutos. Em seguida, as amostras foram resfriadas em um banho de gelo e titulado com solução de NaOH 0,01 M. Uma unidade de pectinesterase (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera um microequivalente do grupos carboxílicos em 1 h de reação sob as condições descritas, expressa em U/mL.

#### **3.4.2.2 Determinação da atividade de exopoligalacturonase (Exo-PG)**

A atividade de exo-PG foi determinada pela quantificação de grupos redutores liberados a partir da solução de pectina pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) . Para 250 µL de solução de pectina cítrica 0,5% (p/v) em Tampão acetato 0,025 M, pH 5.0, 1 mM EDTA, 50 µL extrato enzimático foram adicionadas. O branco foi preparado como descrito acima. A mistura foi incubada a 50 °C e a reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de DNS, em seguida, as amostras foram incubadas por 5 minutos em água fervente. Após o resfriamento, uma alíquota de 5 mL de água deionizada foi adicionada às amostras e a leitura feita em espectrofotômetro a 575 nm. Os valores de açúcar redutor foram determinados a partir de uma curva padrão de ácido monogalacturônico. Uma unidade enzimática (U) foi definida pela quantidade de enzima que liberta um µmol de ácido monogalacturônico por



minuto de reação sob as condições experimentais descritas. A atividade enzimática foi expressa UV/mL/min.

### 3.4.2.3 Determinação da atividade de endopoligalacturonase (Endo-PG)

A atividade de endopoligalacturonase (endo-PG) foi determinada pelo método de Tuttobello e Mill nas seguintes condições: 250 µl do extrato bruto foram adicionados a 5,5 ml de solução de pectina cítrica 0,2% (p/v) em tampão acetato de sódio 0,025 M, pH 5,0 e 1,0 mM EDTA. Para o branco, 250 ml de solução tampão foram adicionados ao invés do extrato enzimático. A reação foi incubada a 50 ° C por 10 minutos e, então levada a banho de gelo. Em viscosímetro de “Ostwald” foi feita a leitura do tempo de corrida da solução após a ação da enzima. Uma unidade viscosimétrica foi considerada como a quantidade de enzima necessária para diminuir em 50% a viscosidade inicial da solução do substrato em um minuto de reação, nas condições definidas (UV/mL).

## 3.5 Determinação da característica físico-química dos substratos

Os resíduos agroflorestais (base seca) foram triturados e embalados em potes de vidro, hermeticamente fechado para determinação da sua composição físico-química, conforme descrito a seguir. Os parâmetros analisados foram:

- Umidade: determinada por dessecação em estufa com circulação de ar a 60 °C (método gravimétrico) até obtenção de peso constante A.O.A.C. (1997).
- Proteína total: determinada pela concentração de nitrogênio (%) segundo o método micro *Kjeldahl* e aplicando o fator de conversão 6,25.
- Cinzas (resíduo mineral fixo): determinado por incineração do material em mufla a 550-660 °C até obtenção de peso constante A.O.A.C. (1997).
- Lipídios: obtido com misturas de solventes a frio segundo o método *Bligh and Dyer*.

- Carboidratos totais: estimados por diferença entre o somatório das porcentagens de umidade, umidade, proteína, lipídios, cinzas. (Latinfoods 2002, NEPA 2006).
- Energia: a energia total metabolizável, expressa em kilocalorias (kcal), foi calculada pelo fator de conversão de Atwater: (4 g proteína) + (4 g carboidratos totais) + (9 g de lipídeos), preconizados pelo Latinfoods 2002, NEPA 2006).

#### **4 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados referentes ao crescimento micelial vertical atividades enzimáticas pectinolíticas foram submetidos a análise estatística paramétrica ANOVA fatorial com os tratamentos realizados, utilizando-se o software STATISTICA 7.0.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Crescimento micelial vertical

Os dados referentes ao crescimento micelial vertical de *Ganoderma lucidum* estão apresentados no gráfico 1 e figura 1. 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. Dessa forma, as características do micélio foram classificadas de acordo com as seguintes notas: 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 compostos de CC suplementado com 10% e 20% de FA, enquanto em CC e SE sem suplementação de farelo foi fracamente adensado e em SE contendo 10% e 20% de FA, mediamente adensado. Marino et al. (2008) relata que adição de farelos à serragem de coco tem ação estimulante no crescimento de cogumelos devido ao conteúdo de carboidratos, proteínas e minerais assimiláveis por fungos.

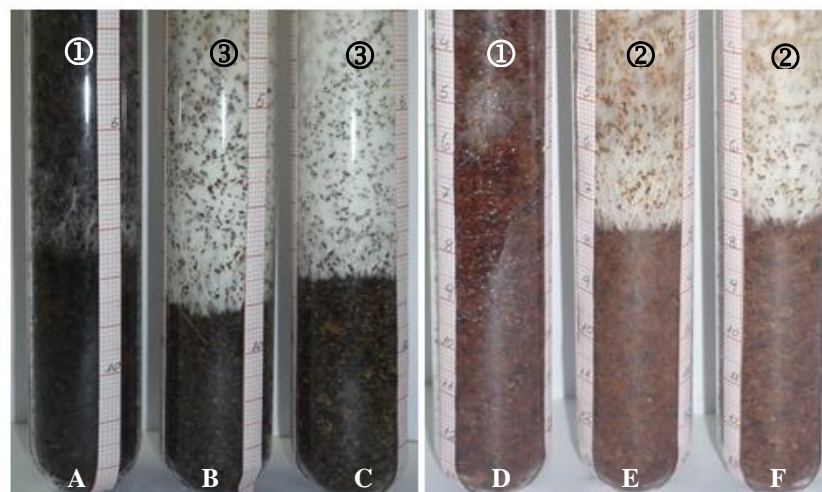


Figura 1 - Cultivo de *G. lucidum* a 25 °C/15 dias: características do desenvolvimento micelial em A(CC); B (CC+ FA 10%); C (CC+FA 20%); D (SE); E (SE+FA 10%); e F (SE+FA 20%)

No gráfico 1 está demonstrado a curva de crescimento micelial vertical de *G. lucidum*, nos resíduos com e sem suplementação de farelo de arroz. Nas condições de cultivo *in vitro*, registrou-se em casca de cupuaçu (a), no período inicial de crescimento (3 dias) a fase de adaptação, nos demais somente a fase exponencial. Na serragem foi observado o crescimento do tipo diáuxico até o décimo dia, ou seja, fases exponenciais sequenciadas das fases de adaptação, demonstração da presença de outras fontes de carbono devido a metabolização do substrato pelo cogumelo. A partir do 12º até o 15º dia *G. lucidum* só expressou crescimento do tipo exponencial.

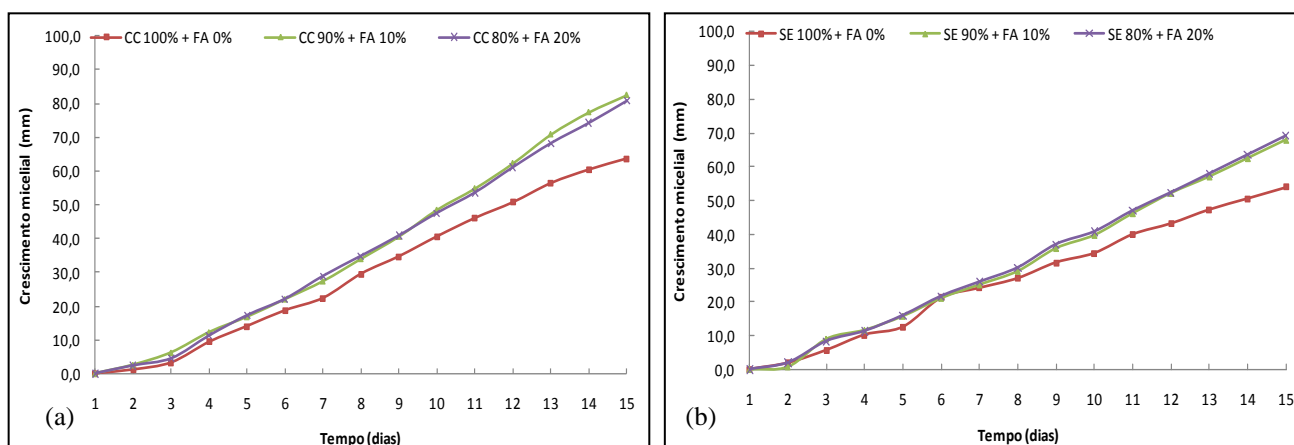


Figura 2. Crescimento micelial vertical de *G. lucidum* em casca de cupuaçu (a) e serragem (b), com e sem suplementação de farelo de arroz.

Quando se considerou a influência dos substratos no crescimento de *G. lucidum*, estatisticamente ( $\alpha=5\%$ ) houve diferença significativa entre as médias que representam o crescimento micelial vertical em casca de cupuaçu ( $76,65 \pm 1,01$  mm) e serragem ( $63,67 \pm 1,01$  mm).

Nos diferentes tratamentos, com e sem suplementação de farelo 10% e 20%, a diferença significativa só foi observada entre os cultivos de *G. lucidum* obtidos nos substratos com suplementação de farelo [10% (média = 75,22); 20% (média=74,94 $\pm$ 1,24)] em relação aos sem suplementação (média=60,31 $\pm$ 1,24).

#### 4.2 Característica físico-química dos substratos

A composição centesimal de CC, FA e SE 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 SE, registrando redução em CC (72,20) e FA (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; MATA, 2004). 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; MILES, 2004).

Amostra	Casca cupuaçu (CC)	Farelo arroz (FA)	Serragem (SE)
Umidade (%)	9,61	9,24	7,81
Cinzas (%)	4,53	9,14	0,47
Lipídios (%)	1,98	19,41	2,43
Proteína (N x 6,25) (%)	12,42	17,37	7,82
Nitrogênio (%)	1,98	3,13	1,25
Carboidrato Total (%)	72,2	44,84	81,94
Fibra (%)	2,02	2,07	1,99
Energia (kcal)	353,34	423,35	379,04

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

#### 4.3 Determinação da atividade de enzimas pectinolíticas em meio sólido

Na Tabela 5 observa-se que em todos os experimentos os extratos enzimáticos de *G. lucidum* hidrolisaram a pectina em meio sólido, com destaque para o ensaio 3 ( $\emptyset = 2,6$  cm), utilizando SE suplementado com 20% de farelo de arroz no 5º dia de cultivo.

Experimentos	Halo (cm)	
	CC	SE
1	2,5	2,5
2	2,4	2,55
3	2,35	2,6
4	2,3	2,3
5	2,45	2,3
6	2,5	2,3
7	2,55	2,4
8	2,55	2,3

Tabela 4 – Halos de degradação em ágar pectina

#### 4.4 Atividade de enzimas pectinolíticas (PE, EndoPG e exoPG)

As figuras 3 a 5 estão demonstrando o resultado da análise estatística referente aos valores das atividades das enzimas pectinolíticas (pectinesterase, endopoligalacturonases e exopoligalacturonases) de *G. lucidum* nos cultivos em casca de cupuaçu e serragem.

Os resultados da análise estatística está demonstrando os valores dos efeitos estimados em relação à produção das enzimas pectinolíticas. O gráfico de Pareto apresenta os efeitos estimados das variáveis (tempo de cultivo e concentração de farelo de arroz) na atividade de cada enzima. A linha vertical mostra os efeitos que foram estatisticamente significantes. As barras que se estendem através desta linha correspondem aos efeitos estatisticamente significantes ( $p = 0,05$ ).

A figura 3 está mostrando a eficiência de CC e SE no cultivo de *G. lucidum* na produção de pectinesterase. A análise estatística dos dados mostrou que a concentração de FA foi estatisticamente significativa na atividade de pectinesterase [efeito negativo(-3,73) e (-6,92)], ou seja, mostrou que quanto menor a concentração do farelo maior a atividade de PE quando se utiliza casca de cupuaçu e serragem na fermentação semi-sólida. O tempo de cultivo não foi significativo, assim como, a interação entre as duas variáveis para a produção

da enzima. A atividade de PE foi máxima (1,55 U/mL) em CC sem suplementação com 15 dias de cultivo, em SE a produção máxima (1,16 U/mL) foi observada nas mesmas condições.

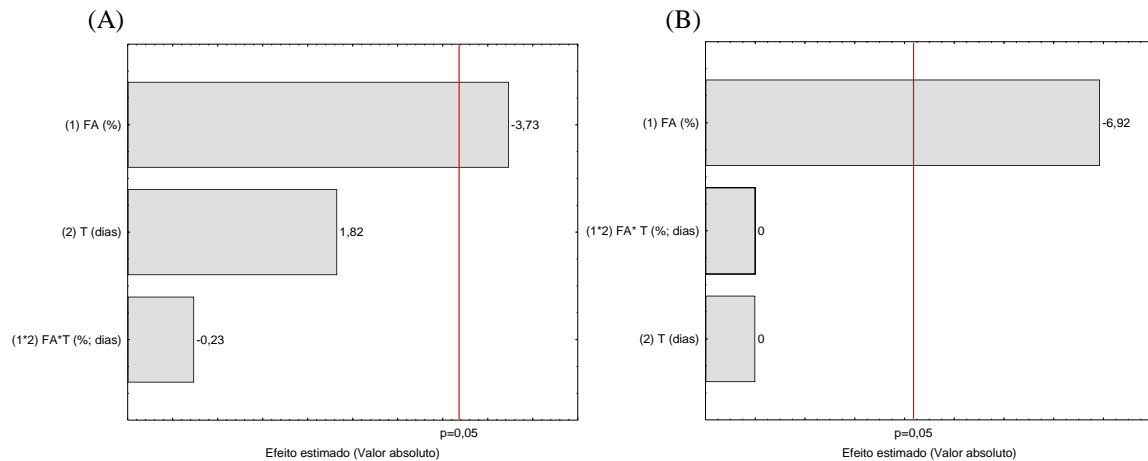


Figura 3 - Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável resposta a produção de pectinesterase em casca de cupuaçu (A) e em serragem (B). (1) FA- Concentração do farelo de arroz (%); (2) T- Tempo de cultivo (dias); (1\*2)- interação entre a concentração do farelo de arroz (%) e o tempo de cultivo (dias).

A atividade de exopoligalacturonase foi influenciada significativamente ( $p=0,05$ ) pela concentração de FA em ambos substratos base, como observado na figura 4. As maiores atividades (1,22 UV/mL/min em CC e 1,37 UV/mL/min em SE) foram obtidas quando os substratos foram suplementados com 20% de FA. Em CC o tempo de cultivo e a interação entre as variáveis influenciaram negativamente na produção dessa enzima.

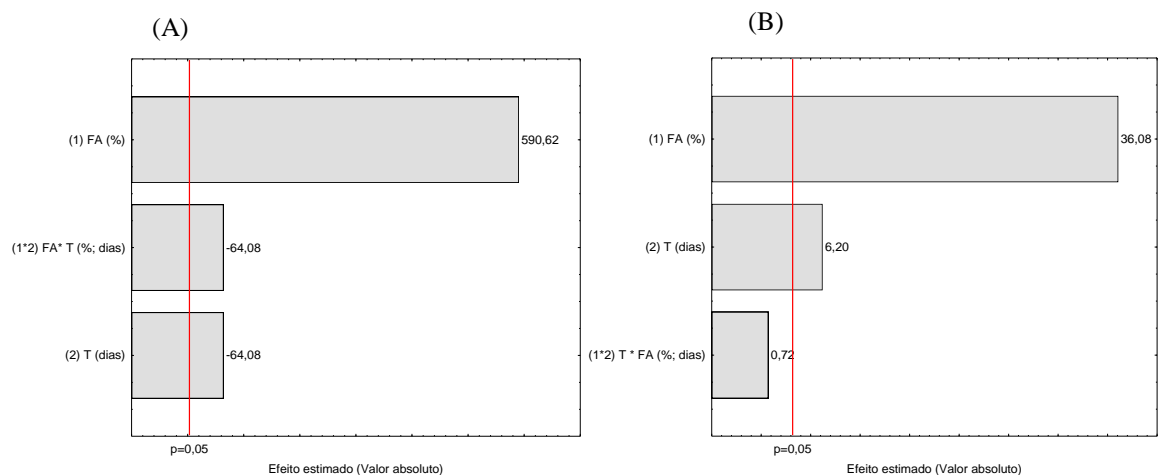


Figura 4 - Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável resposta a produção de exopoligalacturonase em casca de cupuaçu (A) e em serragem (B). (1) FA- Concentração do farelo de arroz (%); (2) T- Tempo de cultivo (dias); (1\*2)- interação entre a concentração do farelo de arroz (%) e o tempo de cultivo (dias).

Com relação à atividade de endopoligalacturonase (Figura 5) em substrato a base de CC, a combinação das variáveis influenciou positivamente, assim como, o tempo de cultivo, determinando-se a maior atividade (5,87 UV/mL) nesse substrato suplementado com 20% de FA, aos 15 dias de cultivo. Em substrato a base de SE a produção da enzima sofreu influência positiva do tempo de cultivo.

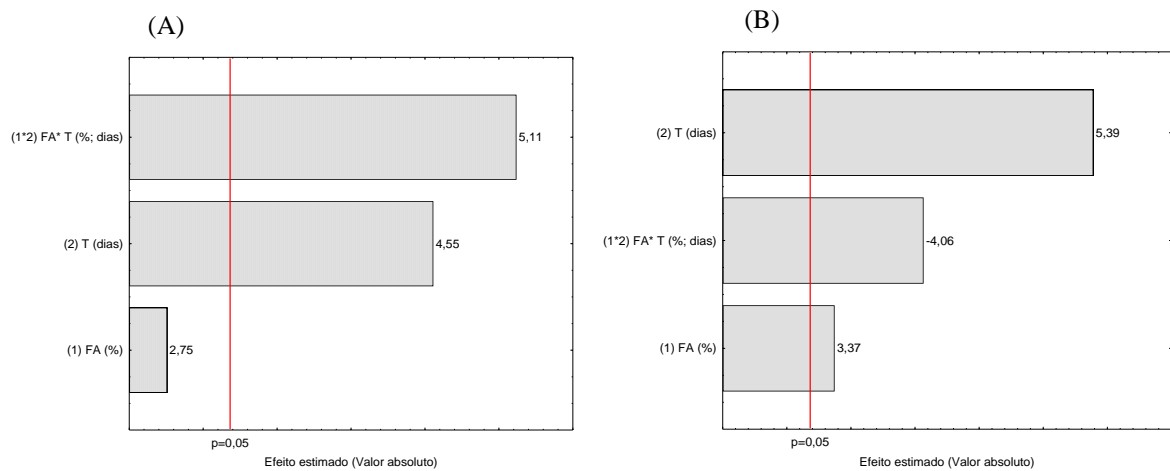


Figura 5 - Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável resposta a produção de endopoligalacturonase em casca de cupuaçu (A) e em serragem (B). (1) FA- Concentração do farelo de arroz (%); (2) T- Tempo de cultivo (dias); (1\*2)- interação entre a concentração do farelo de arroz (%) e o tempo de cultivo (dias).



## 5. Conclusões

A partir dos resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que:

- Casca de cupuaçu e serragem são substratos favoráveis para o crescimento micelial vertical e produção de enzimas pectinolíticas de *G. lucidum*;
- Casca de cupuaçu suplementada com farelo de arroz são os melhores substratos para o desenvolvimento micelial do tipo fortemente adensado.
- A adição do farelo de arroz como suplemento na composição nutricional de *G. lucidum* proporciona o maior crescimento micelial vertical e na atividade pectinolítica;
- *Ganoderma lucidum* produz as maiores atividades de PE em CC sem suplementação, já a atividade exo-PG foi maior quando os substratos foram suplementados com 20% de FA. Foram detectadas maiores atividades de endo-PG em CC suplementada com 20% de FA.
- As enzimas pectinolíticas produzidas por *G. lucidum* possuem potencialidade e podem ser futuramente empregadas nos setores biotecnológicos.

## 6. REFERÊNCIAS

- CHANG, S. T.; MILES, P. G. Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact. 2. ed London: CRC, 2004. 451p.
- CHIU, S.W.; WANG, Z.M.; LEUNG, T.M.; MOORE, D. Nutritional value of Ganoderma extract and assessment of its genotoxicity and antigenotoxicity using comet assays of mouse lymphocytes. Food Chem. Toxicol., v. 38, p.173-178, 2000.
- DONINI, L. P.; BERNARDI, E.; E NASCIMENTO, J. S. Desenvolvimento in vitro de *Agaricus brasiliensis* em meios suplementados com diferentes farelos. Pesq. agropec. bras. v.41, n.6, p.995-999, jun. 2006.
- KIM, J. H.; LEE, D. H.; LEE, S. H.; CHOI, S.; LEE, J. S. Effect of *Ganoderma lucidum* on the quality and functionality of korean traditional rice wine, yakju. Journal Of Bioscience And Bioengineering.v. 97, n. 1, p. 24–28, oct. 2004.
- LATINFOODS (2002): Tabla de Composicion de Alimentos de América Latina. Disponível em: <[www.fao.org/LAmerica/grupo](http://www.fao.org/LAmerica/grupo)>. Acesso em: 28/06/2010.
- MARASCHIN, M.; VERPOORTE, R. V. Engenharia do metabolismo secundário - otimização da produção de metabólitos secundários em culturas de células vegetais. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. v. 10, p. 24-28, 1999.
- 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. Arq. Inst. Biol. v.75, n.1, p.29-36, jan./mar. 2008.
- MATA, G.; GAITÁN-HERNÁNDEZ, R. Cultivation of the Edible Mushroom *Lentinula edodes* (Shiitake) in Pasteurized Wheat Straw - Alternative Use of Geothermal Energy in Mexico Engineering in Life Sciences. v. 4, n.4, p.363-367, aug. 2004
- NEPA (2006) Tabela de Composição de Alimentos. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação. UNICAMP. Campinas, Brasil. 105 pp.
- PINTO, S.A.G. Fermentação em estado sólido: Uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. Disponível em: <[http://www.cnpat.embrapa.br?home/down/index.php?pub/cot\\_102.pdf](http://www.cnpat.embrapa.br?home/down/index.php?pub/cot_102.pdf)>, acesso em 07/06/2010.
- RAI, M.; TIDKE, G.; WASSER, S. P. Therapeutic Potential of Mushrooms. Natural Products Radiance. v.4, n.4, Aug., 2005.
- REGINA, M. Cinética do crescimento miceliano de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler em bagaço de cana-de-açúcar e serragem de eucalipto. 2001. 87p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- ROLLAN, G. M. Cultivo de setas y Trufas. 4º. Edicion. Espanha: Artes Gráficas Cuesta, 239 pp. 2003

ROSSI, I. H.; MONTEIRO, A. C.; MACHADO, J. O. Desenvolvimento micelial de *Lentinula edodes* como efeito da profundidade e suplementação do substrato. *Pesq. agropec. bras.* v. 36, n. 6, p. 887-891, jun. 2001

RUBEL, R. Produção de compostos bioativos de *Ganoderma lucidum* por fermentação em estado sólido: avaliação da ação antitumoral, imunomoduladora e hipolipidêmica. 2006. Tese (Curso de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 172p.

SERNA, C. P.; CADAVID, A. S.; VEGA, A. A. S.; ROJANO, B. A. Establecimiento de um médio de cultivo sumergido para uns cepa nativa de um hongo Poliporal. *Ver. Colomb. Biotecnol.* v.8, n.1, jul., 2006.

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*, ano3, n.4, 2<sup>o</sup> semestre de 2006.

SCRASE, R. Cultivating Mushrooms – The Potential. *Mycologist.* v.9, n.1, p.18-19, feb. 1995.

SHIAO, M. Natural products of the medicinal fungus *Ganoderma lucidum*: occurrence, biological activities, and pharmacological functions. *The Chemical Record*, v. 3, p.172–180, fev, 2003.

SOCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal.* v.13, n.2-3, p. 205-218. March, 2003.

TEIXEIRA, M. F. S.; LIMA FILHO, J. L.; DURÁN, N. Carbon sources effect on pectinase production from *aspergillus japonicus* 586. *Brazilian Journal of Microbiology.* n. 31, p.286-290, 2000.

UENOJO, M; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. *Quim. Nova*, v. 30, n. 2, p. 388-394, 2007.

URBEN, A. F. ; EMBRAPA (2004). Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada. Brasília, DF: Embrapa. 187 p. ISBN 85-87697-27-7.

WAGNER, R.; MITCHELL, D. A.; SASSAKI, G. L.; AMAZONAS, M. A. L. A.; BEROVIC, M. Current techniques for the cultivation of *Ganoderma lucidum* for the production of biomass, ganoderic acid and polysaccharides. *Food Technol. Biotechnol.* v.41, p.371-382, 2003.

ROSSI, I. H., MONTEIRO, A. C.; MACHADO, J. O. Desenvolvimento micelial de *Lentinula edodes* como efeito da profundidade e suplementação do substrato. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v. 36, n. 6, p. 887-891, 2000.