



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

THAÍS ALMEIDA DE MENEZES

**PRODUÇÃO DE BASIDIOMAS E ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS
DE *GANODERMA LUCIDUM* EM RESÍDUOS DE LICURI**

Feira de Santana, BA
2014

THAÍS ALMEIDA DE MENEZES

**PRODUÇÃO DE BASIDIOMAS E ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS
DE *GANODERMA LUCIDUM* EM RESÍDUOS DE LICURI**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Aristóteles Góes Neto
Co-orientador: Prof. Dr. Hélio Mitoshi Kamida

Feira de Santana, BA
2014

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Joelita Pereira e Adelmo Menezes, por todo amor, cuidado e pela educação concedida

Ao meu esposo, Paulo Matheus, pelo apoio, compreensão, cuidado e carinho

Aos meus irmãos, Bruno Menezes e Dayana Menezes, pela torcida

Ao meu professor orientador, Aristóteles Góes Neto, por todo apoio, aprendizado e, sobretudo, pela oportunidade de ingresso ao Mestrado

Ao prof. Hélio Kamida pela co-orientação

A minha prof.^a de Inglês e amiga Ana Paula quem sempre esteve ao meu lado desde a seleção do Mestrado...

A prof.^a Elinalva Maciel por ter cedido o LAMASP para a realização da parte enzimática

Ao prof. Ricardo Santos por ter permitido que eu fizesse o processamento dos resíduos em seu laboratório

Ao prof. Ernesto Martínez por ter liberado o acesso ao LAFIQUI para realização de algumas determinações físico-química dos resíduos

Aos técnicos do Laboratório de Saneamento Ambiental, Luís e Adriano, pelo auxílio na determinação de nitrogênio

A Edna pela utilização do LAPRON para a determinação de umidade

A Edison de Souza da Brasmicel pela doação da linhagem de *G. lucidum*

As prof.^{as} Gabriela Koblitz e Marília Lordêlo pelas orientações na parte enzimática

A prof.^a Luciana Porto pelas contribuições na parte de produção de cogumelos

Aos colegas do LAPEM, em especial, Aline Simões pela orientação na parte de planejamento experimental, Marcelo Tomé pela realização da parte molecular e Gorette Carmo por todo suporte

A minha estagiária Raihanne Lima por ter ajudado nos experimentos

As amigas, Priscilla Souza e Vanessa Falconeri pelas horas e horas de desabafos...

Aos amigos conquistados na UEFS, Daniela Magalhães, Edilaine Silva, Hélio Costa e Leila Thaíse pelo carinho, pela companhia e pelo cuidado

A Helton Ricardo do PPGBiotec pela organização, dedicação e compromisso que tem com cada um de nós...

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado

RESUMO

Ganoderma lucidum (Curtis) P. Karst é um fungo medicinal, do Filo *Basidiomycota*, Família *Polyporaceae*, popularmente conhecido como “Lingzhi” na China, “Reishi” no Japão e “Cogumelo Rei” no Brasil, que tem sido cultivado em diversos materiais lignocelulósicos. No presente estudo, foram avaliadas a formação de micélio, bem como a produção de basidiomas e enzimas ligninolíticas da espécie em resíduos de casca de fruto, folha e bráctea da palmeira endêmica da região semi-árida brasileira, *Syagrus coronata* (Martius) Beccari (licuri), por meio de fermentação em estado sólido. As condições ótimas de cultivo foram as mesmas para os três tipos de substratos testados (pH 6,5, relação C/N de 40 e temperatura de 30°C), sendo estabelecidas a partir do ensaio em placas de Petri e análise dos gráficos de contorno e superfície de resposta. A atividade enzimática de lacase e de manganês peroxidase foram determinadas empregando métodos espectrofotométricos, em intervalos de 7 dias, através do cultivo da linhagem nos três substratos selecionados durante 28 dias de incubação. A atividade de lacase foi determinada a 420 nm, empregando ABTS: 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) como substrato enzimático e a de manganês peroxidase, a 610 nm, pela oxidação do vermelho de fenol. O maior pico de atividade para a lacase (13,80 U/L) foi verificado no substrato bráctea, aos 14 dias de incubação, e não diferiu significativamente dos demais a 95% de confiança. Esse substrato também proporcionou o maior pico de atividade para a manganês peroxidase (14,92 U/L), que somente ocorreu aos 28 dias de incubação, diferindo estatisticamente dos demais a 5% de probabilidade. O ensaio para a produção de basidiomas foi realizado em sacos de polipropileno. O único substrato que não promoveu a formação de basidiomas foi a casca de fruto de licuri. O rendimento biológico não diferiu significativamente a 95% de confiança nos substratos bráctea (33,53 g/kg) e folha (37,48 g/kg). A eficiência biológica também não foi estatisticamente diferente nos substratos bráctea (3,35%) e folha (3,75%). Assim, acredita-se que os resíduos de licuri sejam potenciais substratos e possam ser empregados no processo de bioconversão para a formação de micélio e basidiomas, e também para a produção de enzimas ligninolíticas de *G. lucidum*.

Palavras-chave: *Ganoderma lucidum*. *Syagrus coronata*. Enzimas ligninolíticas. Basidiomas.

ABSTRACT

Ganoderma lucidum (Curtis) P. Karst is a medicinal fungus (Basidiomycota, Polyporaceae) popularly known as "Lingzhi" in China, "Reishi" in Japan and "Mushroom King" in Brazil, which has been cultivated in several lignocellulosic materials. In the present study, the formation of mycelium as well as the production of ligninolytic enzymes and basidiomata of this species were evaluated in waste fruit shell, leaf and bract endemic palm of the Brazilian semi-arid region, *Syagrus coronata* (Martius) Beccari (licuri) by solid state fermentation. The optimal cultivation conditions were the same for all three types of substrates tested (pH 6.5, C/N ratio of 40 and 30°C of temperature) and were established from assays in Petri dishes and contour graphic analysis and response surface methodology. The enzymatic activity of laccase and manganese peroxidase were determined using spectrophotometric methods at intervals of 7 days by cultivating the strain in the three substrates selected for 28 days of incubation. The activity of the laccase was determined at 420 nm, using ABTS: 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) as the enzymatic substrate, and the activity of the manganese peroxidase at 610 nm by oxidation of phenol red. The highest peak activity for laccase (13,80 U/L) was found in bract substrate in 14 days of incubation and did not differ significantly from the others at 95% of statistical confidence. That substrate also resulted in the highest peak of activity for manganese peroxidase (14,92 U/L), which only occurred after 28 days of incubation, differing from the previous one at 5% probability. The assay for the production of basidiomata was performed in polypropylene bags. The only substrate that did not promote the formation of the basidiomata was the fruit shell. The biological yield did not differ significantly at 95% confidence in the bract (33,53 g/kg) and leaf (37,48 g/kg) substrates. The biological efficiency also was not statistically different in the bract (3,35%) and leaf (3,75%) substrates. Thus, it is believed that the licuri wastes are potential substrates and can be used in the bioconversion processes for the formation of the mycelium and basidiomata as well for ligninolytic enzymes production in *G. lucidum*.

Keywords: *Ganoderma lucidum*. *Syagrus coronata*. Ligninolytic enzymes. Basidiomata.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fotos da palmeira <i>Syagrus coronata</i> , evidenciando a inflorescência com a bráctea e a infrutescência com os frutos.....	18
Figura 2 Representação simplificada das etapas metodológicas da pesquisa.....	31
Figura 3 Fluxograma do cultivo de <i>Ganoderma lucidum</i> , utilizando resíduos do licuri (<i>Syagrus coronata</i>) como substrato.....	31
Figura 4 Foto do resultado da amplificação por PCR da região ITS do fungo com 25 (A1-A3) e 28 (A4-A6) ciclos.....	32
Figura 5 Coeficiente de variação dos componentes dos substratos de <i>S. coronata</i> (licuri).....	35
Figura 6 Crescimento micelial de <i>G. lucidum</i> em resíduos de licuri no 5º dia de incubação.....	35
Figura 7 Diagrama de Pareto para otimização das condições de cultivo no substrato casca de fruto.....	37
Figura 8 Valores de crescimento micelial observados <i>versus</i> valores preditos pelo modelo da equação 1.....	37
Figura 9 Efeito bidimensional (a) e tridimensional (b) das variáveis temperatura e pH no crescimento micelial de <i>G. lucidum</i> no substrato casca de fruto.....	38
Figura 10 Diagrama de Pareto para otimização das condições de cultivo no substrato folha.....	39
Figura 11 Valores de crescimento micelial observados <i>versus</i> valores preditos pelo modelo da equação 2.....	40
Figura 12 Efeito bidimensional (a) e tridimensional (b) das variáveis temperatura e C/N no crescimento micelial de <i>G. lucidum</i> no substrato folha.....	40
Figura 13 Diagrama de Pareto para otimização das condições de cultivo no substrato bráctea.....	41
Figura 14 Valores de crescimento micelial observados <i>versus</i> valores preditos pelo modelo da equação 3.....	42
Figura 15 Efeito bidimensional (a) e tridimensional (b) das variáveis temperatura e pH no crescimento micelial de <i>G. lucidum</i> no substrato bráctea.....	43
Figura 16 Crescimento micelial de <i>G. lucidum</i> em resíduos de licuri no 4º dia de incubação. a. Casca de fruto. b. Folha. c. Bráctea.....	44
Figura 17 Atividade enzimática de MnP por <i>G. lucidum</i> cultivado em resíduos de licuri no 7º dia de incubação.....	47
Figura 18 Atividade enzimática de MnP por <i>G. lucidum</i> cultivado em resíduos de licuri no 14º dia de incubação.....	47
Figura 19 Atividade enzimática de MnP por <i>G. lucidum</i> cultivado em resíduos de licuri no 21º dia de incubação.....	47

Figura 20 Atividade enzimática de MnP por <i>G. lucidum</i> cultivado em resíduos de licuri no 28° dia de incubação.....	47
Figura 21 Análise de correlação Atividade x Tempo para MnP.....	47
Figura 22 Análise de correlação Atividade x Substrato para MnP.....	47
Figura 23 Atividade enzimática de LAC por <i>G. lucidum</i> cultivado em resíduos de licuri no 7° dia de incubação.....	49
Figura 24 Atividade enzimática de LAC por <i>G. lucidum</i> cultivado em resíduos de licuri no 14° dia de incubação.....	49
Figura 25 Atividade enzimática de LAC por <i>G. lucidum</i> cultivado em resíduos de licuri no 21° dia de incubação.....	49
Figura 26 Atividade enzimática de LAC por <i>G. lucidum</i> cultivado em resíduos de licuri no 28° dia de incubação.....	49
Figura 27 Análise de correlação Atividade x Tempo para LAC.....	49
Figura 28 Análise de correlação Atividade x Substrato para LAC.....	49
Figura 29 Produção de basidiomas em <i>G. lucidum</i> , utilizando resíduos de <i>S. coronata</i> como substrato. A. Bráctea. B. Folha.....	50
Figura 30 Formação de micélio em <i>G. lucidum</i> , utilizando casca de fruto de licuri como substrato.....	50
Figura 31 Degradação de <i>G. lucidum</i> , em casca de fruto de licuri.....	52
Figura 32 Atividade enzimática de MnP por <i>G. lucidum</i> cultivado no substrato casca de fruto de licuri.....	66
Figura 33 Atividade enzimática de MnP por <i>G. lucidum</i> cultivado no substrato folha de licuri.....	66
Figura 34 Atividade enzimática de MnP por <i>G. lucidum</i> cultivado no substrato bráctea de licuri.....	66
Figura 35 Atividade enzimática de LAC por <i>G. lucidum</i> cultivado no substrato casca de fruto de licuri.....	67
Figura 36 Atividade enzimática de LAC por <i>G. lucidum</i> cultivado no substrato folha de licuri.....	67
Figura 37 Atividade enzimática de LAC por <i>G. lucidum</i> cultivado no substrato bráctea de licuri.....	67
Figura 38 Fotos dos resíduos de <i>S. coronata</i> após trituração.....	68
Figura 39 Cultivo de <i>G. lucidum</i> , em resíduos de licuri com 7, 14, 21 e 28 dias de incubação (A, B, C e D), respectivamente.....	69
Figura 40 Cultivo de <i>G. lucidum</i> em grão de trigo para produção da semente (<i>spawn</i>) no 14° dia de incubação.....	70
Figura 41 Início da formação de basidiomas de <i>G. lucidum</i> no substrato bráctea de licuri.....	70
Figura 42 Início da formação de basidiomas de <i>G. lucidum</i> no substrato folha de licuri.....	70

Figura 43 Desenvolvimento de basidiomas de <i>G. lucidum</i> no substrato bráctea de licuri.....	71
Figura 44 Basidiomas de <i>G. lucidum</i> coletados do substrato bráctea de licuri.....	71
Figura 45 Basidiomas de <i>G. lucidum</i> coletados do substrato folha de licuri.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Valor nutricional de diferentes cogumelos cultivados (% peso fresco).....	16
Tabela 2 Componentes medicinais ativos e respectivas ações farmacológicas de duas espécies de cogumelos do gênero <i>Ganoderma</i>	17
Tabela 3 Depósito de pedido nacional de patente associado a produtos derivados da palmeira <i>Syagrus coronata</i> (Martius) Beccari.....	21
Tabela 4 Produção de espécies de cogumelos em larga escala no mundo ou em alguns países...22	
Tabela 5 Variáveis independentes e seus níveis.....	28
Tabela 6 Ensaio para avaliação de crescimento micelial.....	28
Tabela 7 Composição físico-química dos resíduos de <i>S. coronata</i>	33
Tabela 8 Análise de variância para caracterização físico-química dos resíduos de licuri.....	33
Tabela 9 Valores médios de crescimento micelial (raio) de <i>G. lucidum</i> em resíduos de licuri, após 5 dias de cultivo.....	36
Tabela 10 Análise de variância para o substrato casca de fruto de licuri.....	36
Tabela 11 Análise de variância para o substrato folha de licuri.....	39
Tabela 12 Análise de variância para o substrato bráctea de licuri.....	41
Tabela 13 Valores médios de crescimento micelial (raio) de <i>G. lucidum</i> em resíduos de licuri, após 4 dias de cultivo.....	44
Tabela 14 Produção de enzimas ligninolíticas pelo fungo <i>G. lucidum</i> em resíduos de <i>S. coronata</i> (licuri).....	45
Tabela 15 Índices de avaliação da produção de basidiomas de <i>G. lucidum</i> em resíduos de <i>S. coronata</i>	52
Tabela 16 Fórmulas utilizadas nos cálculos de determinações químicas e dos índices de avaliação da produção de basidiomas.....	72
Tabela 17 Formulação dos substratos de cultivo para a produção de enzimas e basidiomas.....	73
Tabela 18 Formulação do substrato de cultivo (casca de fruto) para realização do ensaio em placas de Petri.....	73
Tabela 19 Formulação do substrato de cultivo (bráctea) para realização do ensaio em placas de Petri.....	74
Tabela 20 Formulação do substrato de cultivo (folha) para realização do ensaio em placas de Petri.....	74
Tabela 21 Valores médios de crescimento micelial (raio) de <i>G. lucidum</i> no substrato casca de fruto em 5 dias de cultivo.....	75
Tabela 22 Valores médios de crescimento micelial (raio) de <i>G. lucidum</i> no substrato bráctea em	

5 dias de cultivo.....76

Tabela 23 Valores médios de crescimento micelial (raio) de *G. lucidum* no substrato folha em 5 dias de cultivo.....76

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 IMPORTÂNCIA DOS COGUMELOS.....	15
2.1.1 <i>Ganoderma lucidum</i> (Curt.: Fr.) Karst.....	17
2.2 <i>SYAGRUS CORONATA</i> (MARTIUS) BECCARI.....	18
2.3 PRODUÇÃO DE COGUMELOS.....	22
2.4 ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 AQUISIÇÃO, PRESERVAÇÃO E MANUTENÇÃO DA LINHAGEM FÚNGICA.....	25
3.2 CERTIFICAÇÃO MOLECULAR DA LINHAGEM.....	25
3.3 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SUBSTRATOS.....	26
3.3.1 Umidade.....	26
3.3.2 pH.....	26
3.3.3 Cinzas.....	26
3.3.4 Nitrogênio total e proteínas.....	26
3.3.5 Carbono.....	27
3.3.6 Lignina, celulose e hemicelulose.....	27
3.3.7 Lipídeos.....	27
3.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO E AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO MICELIAL.....	27
3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	28
3.5.1 Lacase.....	29
3.5.2 Manganês peroxidase.....	30
3.6 PRODUÇÃO DE BASIDIOMAS.....	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1 CERTIFICAÇÃO MOLECULAR DA LINHAGEM.....	32
4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SUBSTRATOS.....	32
4.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO E AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO MICELIAL.....	35
4.3.1 Análise de variância para otimização das condições de cultivo no substrato casca de fruto de licuri.....	36
4.3.2 Análise de variância para otimização das condições de cultivo no substrato folha de licuri.....	39

4.3.3 Análise de variância para otimização das condições de cultivo no substrato bráctea de licuri.....	41
4.3.4 Confirmação experimental das condições otimizadas.....	44
4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	45
4.4.1 Manganês peroxidase.....	45
4.4.2 Lacase.....	48
4.5 PRODUÇÃO DE BASIDIOMAS.....	50
5 CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS.....	56
APÊNDICES.....	63
APÊNDICE A – Sequências originadas da linhagem de <i>Ganoderma lucidum</i>.....	64
APÊNDICE B – Gráficos de atividade enzimática (MnP).....	66
APÊNDICE C – Gráficos de atividade enzimática (LAC).....	67
APÊNDICE D – Fotos dos resíduos de licuri triturados.....	68
APÊNDICE E – Fotos dos ensaios para determinação de atividade enzimática.....	69
APÊNDICE F – Fotos do experimento produção de basidiomas.....	70
APÊNDICE G – Fórmulas utilizadas na realização de cálculos.....	72
APÊNDICE H – Formulação dos substratos de cultivo.....	73
APÊNDICE I – Avaliação diária de crescimento micelial (raio) de <i>G. lucidum</i> nos substratos de cultivo.....	75
APÊNDICE J – Dados referentes aos cálculos de atividade enzimática (MnP) nos substratos de cultivo.....	77
APÊNDICE K – Dados referentes aos cálculos de atividade enzimática (LAC) nos substratos de cultivo.....	78

1 INTRODUÇÃO

O cultivo de cogumelos assim como a produção de enzimas fúngicas são extremamente importantes para indústria biotecnológica devido suas aplicações. O processo de produção de cogumelos gera insumos como alimentos, fármacos, fertilizantes, nutracêuticos, ração animal, enquanto que, as enzimas, sobretudo as ligninolíticas dos basidiomicetos, são empregadas em processos de biorremediação, na degradação de corantes têxteis e no branqueamento do papel (SILVA; MELO; OLIVEIRA, 2005).

O cultivo de fungos para a produção de basidiomas e enzimas é feito, principalmente, por meio de fermentação em estado sólido, em que diversos substratos lignocelulósicos de baixo custo, são comumente utilizados como fontes de carbono e energia. Entre esses materiais pode-se destacar bagaço-de-cana, palhas de trigo e arroz, farelos de trigo e arroz, polpa de café e resíduos de frutas (NILADEVI, 2009).

A habilidade dos fungos em degradar esses substratos está relacionada com a produção de enzimas extracelulares oxidativas, incluindo as ligninas peroxidases, lacases e manganês peroxidases. Essas enzimas são capazes de modificar a lignina tornando os demais componentes da parede celular dos vegetais, celulose e hemicelulose, disponíveis.

Syagrus coronata (Martius) Beccari, conhecida popularmente como licuri, é uma espécie de planta endêmica da região semi-árida brasileira que tem sido pouco estudada cientificamente, porém tem uma grande relevância sócio-econômica, sendo amplamente explorada, por pessoas pobres, de comunidade rurais, localizadas no interior dos estados da Bahia e Pernambuco. Ressalta-se que todas as partes dessa planta são utilizadas no artesanato, na produção de alimentos e de ração animal. Contudo, não existe nenhum relato de utilização dessa palmeira e nem depósitos de patentes no site do INPI associados ao cultivo de fungos. É nesse contexto que se insere essa pesquisa, envolvendo a utilização de resíduos de *S. coronata* para a produção de basidiomas e enzimas ligninolíticas de *G. lucidum*.

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo geral testar a eficiência de resíduos de licuri como substratos na produção de basidioma medicinal. Além disso, teve como objetivos específicos (i) caracterizar físico-quimicamente os resíduos lignocelulósicos para a produção axênica do fungo *G. lucidum*; (ii) fazer a otimização das condições de cultivo através da fermentação em estado sólido; (iii) analisar o crescimento somático deste fungo nos resíduos selecionados; (iv) verificar a produção e atividade de enzimas ligninolíticas (lacase e manganês peroxidase); (v) avaliar a produção de basidiomas nos substratos testados.

A importância deste trabalho está realacionada com a utilização de resíduos dessa palmeira do semi-árido brasileiro para a geração de produtos biotecnológicos, como basidiomas medicinais e

enzimas ligninolíticas, agregando valor econômico a estes materiais lignocelulósicos que seriam descartados, e com a produção de conhecimento científico associado a esta palmeira, que tem sido pouco estudada.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 IMPORTÂNCIA DOS COGUMELOS

Os cogumelos são fungos macroscópicos que possuem estrutura reprodutiva sexual distinta e podem ser epígeos ou hipógeos, ocorrendo acima ou abaixo do solo, respectivamente (CHANG; MILES, 1992). De acordo com Fan e Ding (1990), cogumelos são estruturas reprodutivas formadas por micélio. Segundo Cho (2004), muitos desses organismos estão incluídos nos filos *Basidiomycota* e *Ascomycota*, apresentando ciclo de vida dividido em duas fases, uma somática, em que ocorre a formação de micélio, e outra sexual com produção de esporos.

Para Cho (2004), os cogumelos, de acordo com o tipo de substrato colonizado, estão classificados em três categorias; sapróbios – crescem em matéria orgânica morta ou em decomposição, parasitas – associam-se com outros organismos, causando-lhes prejuízos e micorrizas – formam associações com raízes de determinadas plantas. Enquanto que Chang e Miles (2004) mencionam que esses fungos podem ser agrupados em quatro categorias; comestíveis, medicinais, venenosos e outros cogumelos.

Estima-se, conservativamente, que no Reino Fungi estão incluídas cerca de 1,5 milhões de espécies, das quais 74.000 estão descritas. Além disso, calcula-se também que 140.000 desse total estimado, são consideradas macrofungos, das quais apenas 10% são conhecidas (HAWKSWORTH, 2001a, 2001b). Estimativas mais recentes sugerem que existem mais de 5 milhões de espécies dentro deste grupo e que essas diferenças existem porque a maior parte das regiões tropicais não foi amplamente inventoriada e que inúmeras espécies que ocorrem nessas áreas ainda são desconhecidas (BLACKWELL, 2011).

Desde os primórdios da humanidade alguns cogumelos tem sido tratados como alimento especial, sendo consumidos não somente pelo seu sabor, textura e composição nutricional, mas também devido ao seu valor terapêutico (JONG; BIRMINGHAM, 1992). De acordo com Urban (2004), mais de 2.000 espécies de cogumelos são consideradas comestíveis, entretanto apenas 20 destas são comercialmente cultivadas com fins alimentícios em diversos países do mundo.

Os cogumelos possuem em sua composição carboidratos, vitaminas, baixos teores de lipídeos, minerais diversos e altos teores de proteínas, superando aqueles encontrados em muitas frutas e legumes. Além disso, podem ser fonte de aminoácidos. Todavia, é importante ressaltar que o teor desses componentes varia de acordo com a espécie e substrato utilizado em seu cultivo (BONONI et al., 1999; EIRA, 2004).

O valor nutritivo de alguns cogumelos e alimentos convencionais podem ser verificados e comparados com base nas informações da tabela abaixo:

Tabela 1: Valor nutricional de diferentes cogumelos cultivados (% peso fresco)

Cogumelo/ alimento	Proteína	Carboidrato	Lipídeos	Cálcio (Ca)	Tiamina (Vit. B ₁)	Riboflavina (Vit. B ₂)	Ferro (Fe)	Niacina (Vit. B ₃)
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	2.9 (26-35)*	5.66	1.79	3.14	0.20	0.22	3.40	7.72
<i>Volvariella volvacea</i>	3.8 (25-29)*	6.00	0.60	3.00	0.10	0.17	1.70	8.30
<i>Agaricus brunnescens</i>	3.5 (24-34)*	11.4	0.40	2.40	0.10	-	Traço	5.85
<i>Lentinula edodes</i>	7.5 (13-17)*	6.50	0.93	3.00	-	-	1.90	7.60
<i>Auricularia polytricha</i>	4.8 (4-8)	7.16	0.50	3.15	0,08	0.19	3.60	4.00
Batata	2.00	9.10	0	11	0.10	0.04	0.70	0.04
Leite	3.50	4.90	3.90	118	0,04	0.17	0.10	0.17
Peixe	14-20	2-3	1-2	15	60	1.20	1.50	1.20
Ovo	13	2.0	13.3	68	18	0.27	1-15	0.27
Carne	21	-	3.6	8.3	0.10	0.29	2.52	29.00
Cenoura	1.2	9.3	0.3	39	0.06	0.06	0.8	0.06

Fonte: QUIMIO, 2004.

*Números em parênteses são dados de peso seco

Bononi et al. (1999) destacam que os cogumelos eram utilizados, também, com fins medicinais para combater hemorragias, cólicas, feridas, asma, icterícia, etc. desde épocas remotas. Segundo Quimio (2004), nos últimos 20 anos o interesse pelos cogumelos e seus aspectos medicinais tem sido bastante estimulado, tendo em vista o grande número de estudos científicos realizados com estes organismos. Nesse sentido, componentes específicos de cogumelos tem sido identificados e isolados para tentar combater doenças cardiovasculares, câncer e AIDS (QUIMIO, 2004).

De uma modo geral, os organismos incluídos no Reino Fungi possuem uma grande importância ecológica, pois são essencialmente decompositores, sendo fundamentais na ciclagem da matéria orgânica, decompondo os detritos em moléculas menores que são reutilizadas pelas plantas (NEVES et al., 2013). Portanto, desempenham um importante papel na manutenção do equilíbrio ambiental (SILVA; ESPOSITO, 2010).

2.1.1 *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) Karst.

Ganoderma lucidum é uma espécie de cogumelo que pertence à Classe *Basidiomycetes*, Família *Ganodermataceae*, sendo popularmente conhecida como Lingzhi na China; Reishi, Mannentake ou Sachitake no Japão e Youngzi na Coreia (CHANG; MILES, 2004). Denominado também de Cogumelo Rei no Brasil, tem sido objeto de estudo em diversas partes do mundo devido às suas propriedades medicinais (URBEN, 2004; CLEMENTINO; ROSADO, 2011).

As pesquisas científicas associadas a *G. lucidum* revelam que este fungo possui ação antitumoral, anti-inflamatória, anti-AIDS, antihepatotóxica, hipotensiva, hipoglicêmica, imunomodulatória. Além disso, age na regulação dos sistemas nervoso e respiratório, e aumenta a síntese de proteínas e ácidos nucleicos (JONG; BIRMINGHAM, 1992; CHEN, 2004). Acredita-se que essa diversidade de ação biológica seja atribuída à presença de compostos químicos como alcalóides, aminoácidos e peptídeos, elementos inorgânicos, esteróides, lipídeos, ácidos orgânicos e, principalmente, triterpenos e polissacarídeos (CHANG; MILES, 2004). A tabela abaixo apresenta os compostos ativos e ações farmacológicas de cogumelos do gênero *Ganoderma*:

Tabela 2: Componentes medicinais ativos e respectivas ações farmacológicas de duas espécies de cogumelos do gênero *Ganoderma*.

Espécies	Componentes	Ações farmacológicas
<i>Ganoderma lucidum</i>	b-glicanas	Antitumoral, antiviral e hipoglicêmica
	Triterpenos	Antiinflamatório, antiviral, hipocolesterolêmica
	Proteína Lin Zhi-8	Antialérgica
	Ganoderan	Antialérgica
	Glicogênio peptídico	Hipoglicêmico
<i>Ganoderma applanatum</i>	b-glicanas	Antitumoral e antiviral

Fonte: URBEN, 2004.

G. lucidum é uma espécie que tem ampla distribuição mundial, está incluída no grupo dos fungos causadores da podridão branca, e, na natureza, ocorre crescendo como parasita ou sapróbio em uma variedade de árvores (SIMONIC' et al., 2010; HARIHARAN; NAMBISAN, 2013; POSTEMSKY; DELMASTRO; CURVETTO, 2014). Além disso, é capaz de sintetizar três importantes enzimas extracelulares, lacase (EC 1.10.3.2), lignina peroxidase (EC 1.11.1.14) e manganês peroxidase (EC 1.11.1.13) para degradação da lignina (D'SOUZA; BOOMINATHAN; REDDY, 1996; STAJIC' et al., 2010).

G. lucidum não é uma espécie comestível porque apresenta estrutura coriácea, mas, devido aos benefícios proporcionados à saúde humana, é muito empregada como nutracêutico e na

produção de fármacos (URBEN, 2004). Há séculos, tem sido utilizado para combater doenças cardiovasculares, artrites, diabetes, fadigas, câncer, impotência sexual (STAMETS, 1993).

Berovic et al. (2003), destacaram que este cogumelo é dificilmente encontrado na natureza, o que dificulta sua exploração comercial. Dessa forma, para aumentar sua oferta de mercado internacional torna-se necessário o seu cultivo.

Lee et al. (2003), mencionaram que a produção de *G. lucidum*, é feita tradicionalmente em culturas sólidas, utilizando-se comumente grãos, serragem ou madeira como substratos. Entretanto, existe uma variedade de substratos alternativos que pode ser empregada no cultivo da espécie, como por exemplo, bagaço de cana, soro de queijo, resíduos da folha de abacaxi, de soja, de chá e do processamento de frutos do mar (PERUMAL; KALAICHELVAN, 1996; LEE et al., 2003; HSIEH; YANG, 2004; PEKSEN; YAKUPOGLU, 2009; MANAVALAN et al., 2012; HARIHARAN; NAMBISAN, 2013; LAKSHMI, 2013b; SHI et al., 2013). É nesse contexto que se insere essa pesquisa envolvendo o aproveitamento de resíduos de licuri (*Syagrus coronata*) para produção de *G. lucidum*.

2.2 SYAGRUS CORONATA (MARTIUS) BECCARI

S. coronata é uma espécie de planta que tem sido pouco estudada do ponto de vista científico, assim essa seção foi construída, principalmente, com base em, Noblick (1991) que apesar de relativamente antiga, ainda é considerada uma grande referência neste assunto.

S. coronata é uma palmeira solitária, da Família Arecaceae que possui tronco ereto, com cerca de 1,5 a 12 m de altura e 15 a 25 cm de diâmetro, sendo popularmente conhecida como: licuri, licurizeiro, ouricuri, nicuri, alicuri, baba-de-boi e coqueiro cabeçudo (Figura 1).



Figura 1: Fotos da palmeira *Syagrus coronata*, evidenciando a inflorescência com a bráctea e a infrutescência com os frutos.

Fonte: Drumond, 2007.

Esta espécie, endêmica da região semi-árida brasileira, é capaz de tolerar diferentes habitats e, por isso, apresenta ampla distribuição geográfica que abrange o norte de Minas Gerais até o sul de Pernambuco, incluindo os estados de Sergipe, Alagoas, bem como a porção central e leste da Bahia

Ainda que esta palmeira floresça e frutifique durante todos os meses do ano, seu pico de floração e frutificação ocorre no período do verão, portanto, de dezembro a março. É considerada um importante recurso vegetal, que tem sido bastante utilizada, movimentando a economia rural dos estados da Bahia e Pernambuco (RUFINO et al., 2008).

As folhas desta espécie podem ser moídas e misturadas com outras plantas, servindo de alimento para o gado em períodos de seca. Além disso, também são utilizadas para fazer portas, coberturas e muros de casas ou abrigos rurais. No artesanato, são empregadas na fabricação de chapéus, cestas, leques, esteiras, espanadores, vassouras. As folhas dessa palmeira ainda podem ser utilizadas para fazer tochas para iluminação noturna devido ao grande acúmulo de cera.

A semente do licuri é comestível e pode ser cozida, sendo utilizada para fazer cocadas, sorvetes, licores, entre outros produtos alimentícios (BAUER et al., 2013). Essa semente quando quebrada e triturada pode servir de ração para alimentar aves; ressalta-se que no interior da Bahia, é mais utilizada do que o milho. Da semente dessa espécie também é extraído óleo que pode ser utilizado na indústria de perfume ou ser misturado com outros, extraídos da espécie africana *Elaeis guineensis* (dendezeiro) para fazer sabão. A parte central do tronco (palmito), é comestível e pode ser utilizada para fazer farinha.

Lorenzi (1992), destacou que essa palmeira é extremamente ornamental, devido a forma helicoidal característica da inserção das folhas e que pode ser empregada no paisagismo, algo que já vem sendo realizado, porém em escala limitada, em cidades da região sudeste do país. Além disso, o potencial do licuri para a produção de biodiesel tem sido avaliado (SALLES et al. 2010).

Rufino et al. (2008) ao realizar um estudo de cunho etnobotânico em uma comunidade rural pobre do estado de Pernambuco, município de Buíque, relataram que a “água do coco” (endosperma) é utilizada para tratar inflamações oculares, micoses e na cicatrização de feridas e o chá das raízes do licuri é empregado para o tratamento de dores na coluna vertebral.

Segundo Belviso et al. (2013) *S. coronata* também é bastante importante do ponto de vista social. Nesse sentido, os autores mencionaram que a comunidade rural, típica de regiões do semi-árido brasileiro, com baixo poder aquisitivo (homens, mulheres e crianças) se organiza para a comercialização, processamento e colheita manual do fruto de licuri.

Após realização de busca de patentes depositadas na base de dados do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) (<https://gru.inpi.gov.br/pPI/jsp/patentes/PatenteSearchBasico.jsp>),

observou-se que apenas 7 pedidos foram feitos associando produtos derivados do licuri, o que está apresentado na Tabela 3:

Tabela 3: Depósito de pedido nacional de patente associado a produtos derivados da palmeira *Syagrus coronata* (Martius) Beccari.

Nº do pedido	Data do depósito	Classificação	Título	Nome do depositante	Nome do inventor
PI 0704841-6 A2	19/04/2007	A23G 3/48; A23L 1/09; A23L 1/164	Alimento a base de licuri com cereais	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia - IFBA (BR/BA)	Djane Santiago de Jesus; Francisco José Brito Duarte
PI 0704745-2 A2	19/04/2007	A23G 9/42; A23G 9/00	Sorvete e picolé de licuri	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia - IFBA (BR/BA)	Djane Santiago de Jesus; Francisco José Brito Duarte
PI 0605123-5 A2	21/11/2006	A23L 1/36; A23G 3/00; A23G 3/48	Amêndoas de licuri revestidas	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia - IFBA (BR/BA)	Djane Santiago de Jesus
PI 0605477-3 A2	22/09/2006	A23L 1/218	Conserva de amêndoas de licuri	Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia - IFBA (BR/BA)	Djane Santiago de Jesus
PI 0402893-7 A2	13/07/2004	A61K 35/06; A61P 1/04	Utilização do óleo de ouricuri (<i>Syagrus coronata</i>) em pacientes submetidos a tratamento com drogas quimioterápicas	Universidade Federal de Minas Gerais (BR/MG)	Sérgio Duarte Segall; Jacqueline Aparecida Takahashi; Delio Soares Raslan; Jacqueline Isaura Álvares Leite
PI 0405902-6 A2	16/12/2004	C08J 3/26; C08K 7/02; C08L 7/02	Composto polimérico aquoso de látex vegetal associado a fibras vegetais e processo de obtenção	Francisco Samonek (BR/AC)	Francisco Samonek
PI 0203480-8 A2	21/08/2002	A23N 3/00	Descapador de sistema cilíndrico para frutas de endocarpo duro e similares	José Xavier Minikowski (BR/PR); Marlene A. Minikowski (PR)	José Xavier Minikowski; Marlene A. Minikowski

2.3 PRODUÇÃO DE COGUMELOS

O cultivo de cogumelos tem grande importância econômica para a indústria biotecnológica e tem sido desenvolvido em diversas partes do mundo (FAN; SOCCOL; PANDEY, 2008). Nesse sentido, Royse (2005) destacou que mais de 10 milhões de toneladas métricas de cogumelos comestíveis e medicinais foram produzidos em diversos países em 2004. A tabela abaixo apresenta as principais espécies de cogumelos que são produzidas em larga escala em diferentes regiões.

Tabela 4: Produção de espécies de cogumelos em larga escala no mundo ou em alguns países.

Nome comum	Nome científico	Área de produção
Cogumelo branco ou marrom	<i>Agaricus spp</i>	Mundial
Shiitake	<i>Lentinula edodes</i>	Mundial
Ostra	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Mundial
Cogumelo palha	<i>Volvaria volvacea</i>	Ásia
Enokitake	<i>Flammulina velutipes</i>	Japão, Taiwan, China, América do Norte
Maitake	<i>Grifola frondosa</i>	Japão, China, América do Norte
Nameko	<i>Pholiota nameko</i>	Japão, China
Stropharia vermelho-vinho	<i>Stropharia rugoso-annulata</i>	Europa
Shiimeji	<i>Lyophyllum descastes</i>	Japão, China, América do Norte
Kuritake	<i>Naemataloma sublaterium</i>	Japão
Kukirage	<i>Auricula auricularia</i>	Ásia
Fungo geléia branca	<i>Tremella fugiformis</i>	China
Reishi ou Ling Zhi	<i>Ganoderma lucidum</i>	China, Japão, Coreia
Fungo lagarto	<i>Cordyceps sinense</i>	China

Fonte: STAMETS, 2000.

Segundo Fan, Soccol e Pandey (2008), a produção de cogumelos pode converter vários materiais lignocelulósicos como toras de madeira, serragem, resíduos e palha de algodão entre outros substratos, em diversos produtos (alimentos, ração e fertilizantes). Chang (1993, 1999) também destacou os principais tipos de substratos que são utilizados na produção de cogumelos: palhas de arroz, trigo e feijão, farelos de arroz e trigo, sabugo e caules de milho, casca, palha e resíduos da indústria têxtil de algodão, polpa de café, casca de cacau, folhas de banana, bagaços de cana e mandioca, esterco de cavalo e galinha.

O cultivo de cogumelos é realizado basicamente em três etapas: (1) produção do inóculo (*spawn*), (2) preparo do substrato – envolve adição de água e pré-tratamento microbiológico ou físico e (3) crescimento do cogumelo – envolve a colonização do substrato pelo micélio do fungo e

formação de basidiomas ou ascomas (WANG, 1999; MARTÍNEZ-CARRERA; AGUILAR; MARTÍNEZ, 2000). A produção do inóculo é realizada através da inoculação de culturas estoques de micélio em grãos de cereais previamente esterilizados; os mais comumente utilizados são grãos de trigo, milho e arroz (STAMETS, 2000; MATA; SAVOIE, 2005).

Nos resíduos vegetais, celulose e hemicelulose são as principais fontes de carboidratos e estão associadas a lignina, que confere barreira física a estes componentes (PHILIPPOUSSIS, 2009). Assim, para degradar os substratos lignocelulósicos, os fungos durante a sua fase somática, produzem diversas enzimas; peroxidases e lacases, requeridas para a modificação da lignina, bem como glucanases, celulasas e xilanases para a degradação da celulose e hemicelulose (GHOSH; MUKHERJEE; NANDI, 1998; FAN; SOCCOL; PANDEY, 2008).

2.4 ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS

Os fungos são organismos que se nutrem por absorção, por isso precisam produzir enzimas extracelulares para utilizar os mais diversos substratos como fontes de carbono e energia (SILVA; ESPOSITO, 2010).

Segundo Ferraz (2010), os materiais lignocelulósicos são formados por celulose, poliose, lignina, extrativos e minerais que estão ligados quimicamente, construindo o complexo celular dos vegetais. A celulose constitui cerca de 50% desses materiais, sendo um polímero linear formado por moléculas anidro-glicose unidas por ligações β -(1-4)-glicosídicas. As polioses ou hemiceluloses correspondem a 20% dos materiais lignocelulósicos e são contituídas pelos anidro-açúcares da glicose, manose e galactose (hexoses) e xiloses e arabinose (pentoses). A lignina é uma macromolécula formada por unidades de fenilpropano que representa de 20 a 30% dos materiais lignocelulósicos.

Durán (2010), destacou que a maioria dos fungos capazes de mineralizar a lignina a CO_2 e água, pertencem ao grupo dos basidiomicetos causadores da podridão branca. De um modo geral, essa degradação envolve a participação de enzimas oxidativas. A lignina peroxidase (LiP), conhecida comumente como ligninase, é uma glicoproteína, com massa molar de 38-43 KDa que requer peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para sua atividade catalítica, capaz de degradar compostos fenólicos e não-fenólicos, sendo formada por um grupo prostético, ferroprotoporfirina IX (heme). A manganês peroxidase (MnP) é bastante semelhante a LiP, é extracelular, glicolisada, possui massa molar de 45-47 KDa e um grupo prostético heme, sendo dependente do peróxido de hidrogênio e do íon Mn^{+2} , normalmente não oxida compostos não-fenólicos. As lacases (LAC) são fenoloxidases que podem ser produzidas por fungos e plantas, que possuem átomos de cobre em sua estrutura,

massas molares de 60-100 KDa e oxidam uma variedade de substratos, preferencialmente compostos fenólicos (NILADEVI, 2009).

Conforme apontado em Niladevi (2009) o interesse por essas enzimas tem crescido recentemente, devido ao seu significado biotecnológico. Muito tem sido elucidado sobre a diversidade de lacases e sua utilidade em aplicações industriais como deslignificação, produção de etanol, modificação de fibras da madeira, clareamento de corantes, síntese de produtos químicos/medicinais e remediação de solos e águas contaminadas (SCHNEIDER et al., 1999; MAYER; STAPLES, 2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AQUISIÇÃO, PRESERVAÇÃO E MANUTENÇÃO DA LINHAGEM FÚNGICA

A linhagem comercial do fungo basidiomiceto *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. utilizada no presente trabalho foi obtida por doação da empresa Brasmicel (Suzano, São Paulo, Brasil). A preservação dessa linhagem foi feita, adicionando-se 5 *plugs* de micélio (0,5 cm Ø) da matriz primária em frascos de vidro autoclavados contendo água destilada estéril, conforme descrito em Castellani (1967). Essa linhagem, durante os experimentos, foi mantida em placas de Petri em meio de cultura à base de Batata-Dextrose-Ágar (BDA), incubada em estufa do tipo B.O.D. à 25°C, na ausência de luz, sendo repicada mensalmente.

3.2 CERTIFICAÇÃO MOLECULAR DA LINHAGEM

A extração do DNA genômico do micélio de *Ganoderma lucidum* foi realizada de acordo com Doyle & Doyle (1987) modificado por Góes-Neto, Loguercio-Leite e Guerrero (2005). Para a amplificação da região ITS (Internal Transcribed Spacer) do rDNA, foi utilizado o par de primers ITS8-F/ITS6-R (DENTINGER; MARGARITESCU; MONCALVO, 2010). O sequenciamento foi realizado no Sequenciador ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) do Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz - Belo Horizonte/MG, no âmbito do Projeto Identificação Molecular de Fungos do Brasil. As sequências foram editadas manualmente com o *software* Geneious (Biomatters, <http://www.geneious.com/>) e o alinhamento foi realizado de acordo com os parâmetros *default* do algoritmo do *software* Muscle (Kato; Asimeno; Toh, 2009) e inspecionados manualmente no próprio *software* Geneious (Biomatters). As sequências obtidas foram comparadas com as depositadas na base de dados do GenBank pelo programa BLASTn, disponível no site do NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A pesquisa no BLASTn fornece uma lista de organismos cujas sequências mais se assemelham àquela sequência confrontada, fornecendo, entre diversas informações, a identidade, a cobertura e um valor estatístico que indicam a porcentagem de bases semelhantes entre os dois organismos e o quão confiável é a correlação entre o isolado confrontado e aquele semelhante depositado no banco de dados (ALTSCHUL et al., 1997).

3.3 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SUBSTRATOS

Para a realização desta etapa foram utilizados três tipos de substrato: folha, bráctea e casca do fruto da palmeira, endêmica da região semi-árida brasileira, *Syagrus coronata* (Martius) Beccari (licuri). Os resíduos foram obtidos através de coletas manuais realizadas no Campus da UEFS, Universidade Estadual de Feira de Santana (Feira de Santana, Bahia, Brasil), localizado entre as coordenadas geográficas 12°16'00"S e 38°58'00"W. Esses resíduos foram triturados separadamente em triturador de forragem e moinho de facas e acondicionados em sacos plásticos para análises posteriores. Os seguintes parâmetros foram avaliados: umidade, pH, cinzas, nitrogênio total, proteínas, carbono, lipídeos, extrativos, lignina, hemicelulose e celulose. Os dados de caracterização foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e depois, comparados pelo teste de Tukey a 95% de confiança ($\alpha=0,05$), através do *software* PAleontological STatistics 3.0.

3.3.1 Umidade

O teor de umidade das amostras foi verificado com o auxílio de uma balança determinadora de umidade por infravermelho. Inicialmente pesou-se 3 g de cada amostra. A secagem foi realizada a temperatura de 105°C, durante 20 min.

3.3.2 pH

A determinação do potencial hidrogênio iônico (pH) foi efetuada utilizando um potenciômetro previamente calibrado, 10 g de cada amostra foi diluída em 100 mL de água destilada e em seguida foi feita a leitura (ZENEBO; PASCUET; TIGLEA, 2008).

3.3.3 Cinzas

O teor de cinzas foi determinado por incineração em mufla a 550°C, inicialmente pesou-se 5 g de cada amostra e os resultados foram expressos em % (ZENEBO; PASCUET; TIGLEA, 2008).

3.3.4 Nitrogênio total e proteínas

Para a análise de nitrogênio total foi aplicado o método Kjeldahl modificado, o qual envolve três etapas: digestão, destilação e titulação e os resultados foram expressos em %, sendo

multiplicado por um fator de conversão (6,25) para a determinação de proteínas (ZENEBO; PASCUET; TIGLEA, 2008).

3.3.5 Carbono

O conteúdo de carbono foi determinado de acordo com cálculo descrito em Mantovani, Linde e Colauto (2007), considerando que este elemento representa 50% da matéria orgânica, (Apêndice G).

3.3.6 Lignina, celulose e hemicelulose

Os teores de lignina, celulose e hemicelulose foram quantificados pelo método de determinação de fibras, através de um sistema detergente, com o auxílio do analisador de fibras. A celulose e lignina foram isoladas pelo método fibra em detergente ácido (FDA), enquanto que a hemicelulose pela diferença entre fibra em detergente neutro (FDN) e (FDA) (BORTOLASSI et al., 2000; ZERVAKIS; KOUTROTSIOS; KATSARIS, 2013). A fração de lignina insolúvel da amostra foi determinada através do método de Klason, por meio da digestão em ácido sulfúrico, e a solúvel pelo método de Goldschmid com o auxílio de espectrofotômetro (MORAIS; ROSA; MARCONCINI, 2010).

3.3.7 Lipídeos

A determinação de lipídeos foi feita pelo método de extração direta em Soxhlet, empregando o éter de petróleo como solvente (ZENEBO; PASCUET; TIGLEA, 2008).

3.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO E AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO MICELIAL

Para a determinação das condições de cultivo que favorecem o crescimento micelial do fungo estudado, em cada substrato testado, foi utilizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) para três fatores (2^3), incluindo 8 pontos fatoriais, 4 repetições no ponto central e 6 pontos axiais, totalizando 18 ensaios. A Tabela 5 apresenta as variáveis independentes e seus níveis e a Tabela 6, os valores reais da matriz experimental gerada pelo *software* Statística (7.0).

Tabela 5: Variáveis independentes e seus níveis

Variáveis	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Temperatura °C	20	22	25	28	30
pH	4,5	5,3	6,5	7,7	8,5
C/N	20	28	40	52	60

Tabela 6: Ensaios para avaliação de crescimento micelial

Ensaios	(T°C)	(pH)	(C/N)
1	22	5,3	28
2	28	5,3	28
3	22	7,7	28
4	28	7,7	28
5	22	5,3	52
6	28	5,3	52
7	22	7,7	52
8	28	7,7	52
9	20	6,5	40
10	30	6,5	40
11	25	4,5	40
12	25	8,5	40
13	25	6,5	20
14	25	6,5	60
15	25	6,5	40
16	25	6,5	40
17	25	6,5	40
18	25	6,5	40

Os ensaios foram realizados em placas de Petri (9 cm Ø) contendo meios de cultura formulados à base de resíduos de *S. coronata*, ágar e farelo de trigo, sendo umidificados a 60% com água destilada (Apêndice H). O pH dos meios foram ajustados com o auxílio das soluções de HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M. A relação C/N dos meios foram ajustadas com quantidade apropriada de farelo de trigo, calculada com base na caracterização físico-química dos resíduos e do farelo em uma planilha do Excel. Os meios, após esterilização em autoclave (15 min., 121°C), foram inoculados com a linhagem de *G. lucidum* (1 *plug*) e incubados em estufas do tipo B.O.D. à temperatura indicada no planejamento, na ausência de luz. O crescimento micelial foi avaliado através da medição do raio da colônia, em duas direções ortogonais, a cada 24 h, por um período de cinco dias (COSTA; COIMBRA; SILVA, 2008).

3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para determinação da atividade enzimática foram utilizadas as condições de cultivo, obtidas através de planejamento experimental, da melhor resposta (30°C, pH 6,5, C/N 40/1). O experimento

foi realizado em frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 20 g de resíduos de licuri e farelo de trigo, sendo umidificado a 60% com solução de sais – 1 g KH_2PO_4 , 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Apêndice H) (HAN; AN; YUAN, 2005). Os frascos foram autoclavados a 121°C, 1 atm, durante 1 h. Em cada frasco, adicionou-se 4 *plugs* (0,5 cm Ø) de micélio de *G. lucidum*. O controle consistiu de material sem o inóculo. Os frascos foram incubados em estufas B.O.D., na ausência de luz por 28 dias. A cada 7 dias de incubação, foram adicionados 50 mL de água destilada ao meio de cultivo para homogeneização do material, e em seguida este foi filtrado. O filtrado foi centrifugado a 19.975 g/4°C por 2 min. para a obtenção do sobrenadante e determinação de atividade. Os cálculos de atividade enzimática foram realizados de acordo com a equação derivada da Lei de Beer-Lambert, conforme descrito em Menezes, Silva e Durrant (2009):

$$\Delta \text{ Abs} \times 10^6 / \epsilon \times R \times T$$

Onde:

$\Delta \text{ Abs}$ = diferença entre a absorbância dos extratos fervidos e não fervidos

ϵ = absorbtividade molar ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$): MnP= 4460, lacase= 36000

R = alíquota do sobrenadante (mL)

T = tempo da reação (min.)

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e em seguida, comparados pelo teste de Tukey a 95% de confiança ($\alpha = 0,05$), utilizando o *software* GraphPad Prism 5.0.

3.5.1 Lacase

A atividade da lacase foi determinada em espectrofotômetro, no comprimento de onda 420 nm, empregando-se ABTS: *2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)* como substrato enzimático. A mistura reacional foi composta de 700 μL de água destilada, 450 μL de tampão acetato de sódio (0,1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ /pH 5), 200 μL do sobrenadante e 150 μL de ABTS (1 mM), sendo mantida a 30°C por 10 min. A reação foi paralisada pela adição de 100 μL de ácido tricloroacético 5% e o volume ajustado para 5 mL com água destilada. As análises foram realizadas em triplicata, sendo considerado o controle 1, a mistura exceto o ABTS e o controle 2, a mistura exceto o sobrenadante (D'AGOSTINI et al., 2011).

3.5.2 Manganês peroxidase

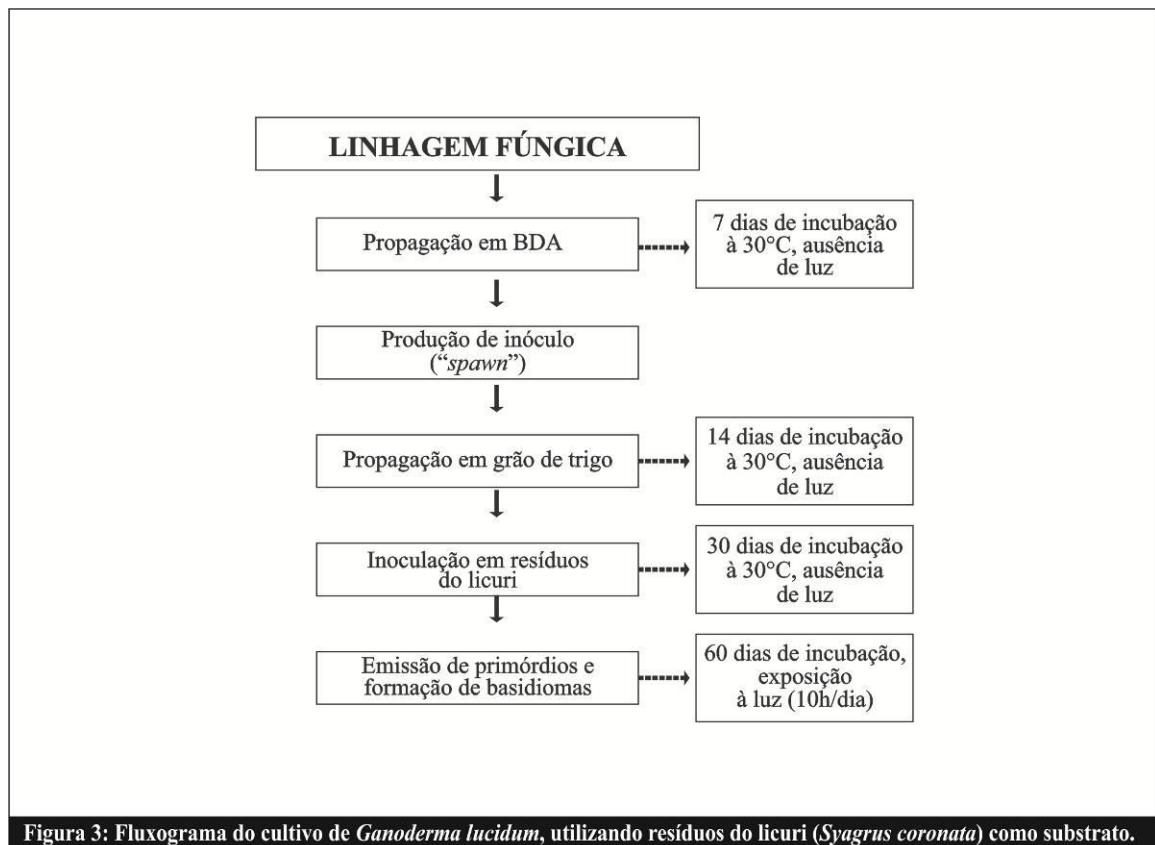
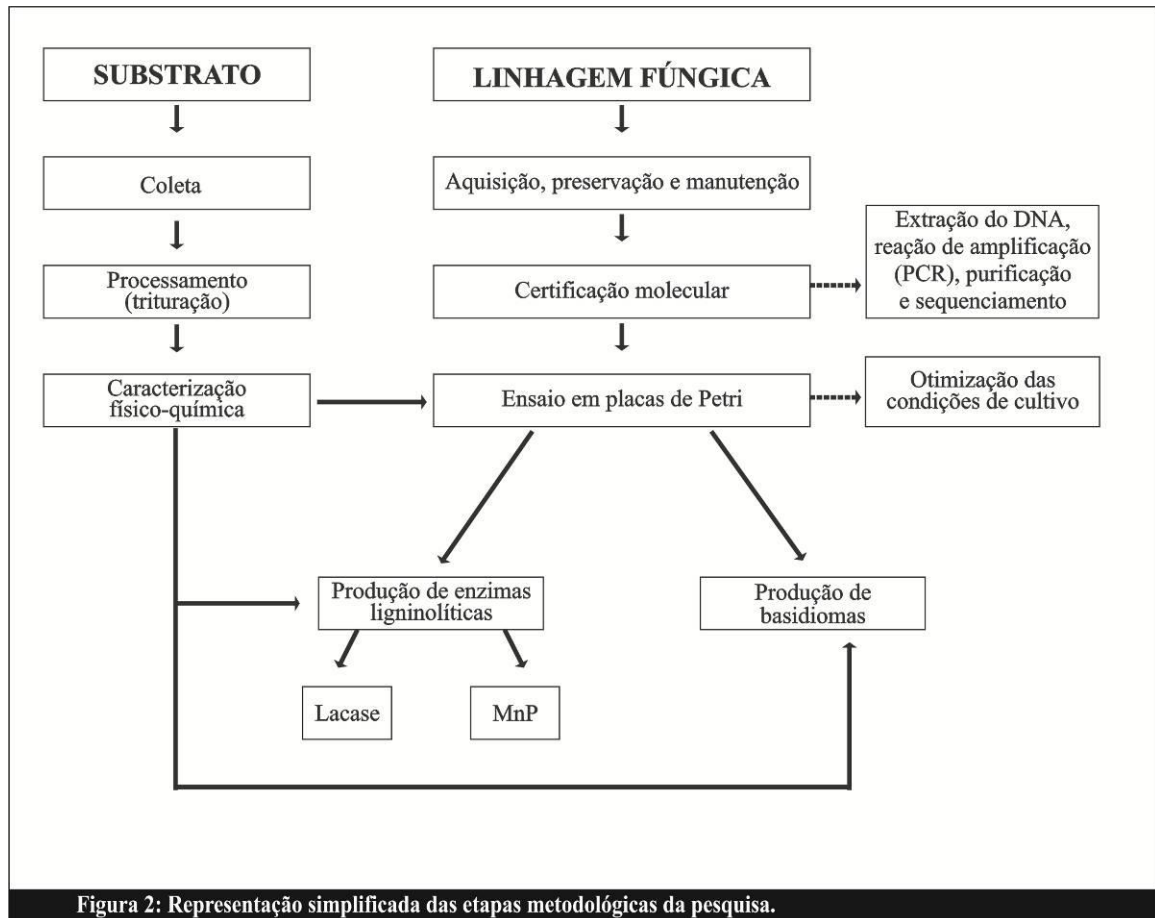
A atividade da manganês peroxidase foi determinada em espectrofotômetro, no comprimento de onda 610 nm, pela oxidação do vermelho de fenol na presença de peróxido de hidrogênio, segundo metodologia modificada de Kuwahara et al. (1984). A mistura reacional foi composta de 50 µL de sulfato de manganês (2,0 mM), 200 µL de albumina bovina 0,5%, 50 µL de peróxido de hidrogênio (2,0 mM) em tampão succinato de sódio (0,2 M/pH 4,5), 100 µL de lactato de sódio (0,25 M), 500 µL do sobrenadante e 100 µL de vermelho de fenol (0,01%), sendo mantida a 30°C por 5 min. A reação foi paralisada pela adição de 40 µL de hidróxido de sódio (2,0 M). As análises foram realizadas em triplicata, sendo considerado o controle a mistura contendo o sobrenadante fervido por 10 min.

3.6 PRODUÇÃO DE BASIDIOMAS

O experimento para a produção de basidiomas foi conduzido em sacos de polipropileno (17 x 35 cm) preenchidos com 200 g dos resíduos de *S. coronata* e farelo de trigo, e o conteúdo de umidade foi ajustado para 60% com adição adequada de solução de sais (Apêndice H). Os sacos foram fechados e esterilizados em autoclave duas vezes por 30 min., à 121°C, obedecendo a um intervalo de 24 h. Após resfriamento, foi adicionado em cada saco 10% da massa inicial do substrato de inóculo produzido em grão de trigo (URBEN, 2004). O controle negativo do experimento foi preparado do mesmo modo sem adição do inóculo. Os sacos foram transferidos para uma sala de produção e mantidos à temperatura de 30°C, por 30 dias, na ausência de luz. Após completa colonização do substrato pelo micélio, os sacos foram abertos (5 furos ao redor do saco), mantidos à temperatura de 20°C e expostos à luz (lâmpadas fluorescentes por 10h/dia) para a emissão dos primórdios. Após completo desenvolvimento dos primórdios os sacos foram mantidos a temperatura de 25°C e expostos à luz (lâmpadas fluorescentes por 10h/dia) para a formação do basidioma (MANAVALAN et al., 2012). A produção total em cada tipo de resíduo (tratamento) foi avaliada em dois fluxos de colheita, em um período de 90 dias. Após colheita dos basidiomas, variáveis como rendimento, eficiência biológica, perda de matéria orgânica, número de basidiomas e emissão de primórdios (nº de dias) foram analisadas (Apêndice G) (ISIKHUEMHEN; MIKIASHVILLI; KELKAR, 2009).

O desenho experimental utilizado foi em blocos completamente aleatorizados, com 8 repetições por tratamento. Os dados de produção foram submetidos ao teste t a 95% de confiança ($\alpha=0,05$), com auxílio do *software* PAleontological STatistics 3.0.

As etapas metodológicas da pesquisa e o fluxograma de cultivo de basidiomas de *G. lucidum* estão representados esquematicamente nas figuras abaixo:



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CERTIFICAÇÃO MOLECULAR DA LINHAGEM

A linhagem comercial, originária da China, cedida pela empresa Brasmicel foi identificada como *Ganoderma lucidum* pela amplificação e sequenciamento da região ITS (Internal Transcribed Spacer) do rDNA, utilizando o par de primers ITS8-F/ITS6-R. A amplificação por PCR gerou um produto de aproximadamente 432 pb (Figura 4). A linhagem apresentou 100% de identidade e cobertura com a sequência (KF648564) depositada na base de dados do NCBI GenBank ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/563426278?report=genbank&log\\$=nuclalign&blast_rank=1&RID=0CY0TP1201R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/563426278?report=genbank&log$=nuclalign&blast_rank=1&RID=0CY0TP1201R)). Essa sequência foi obtida de um fungo coletado na região noroeste do Himalaia que compreende partes da China, Índia e Paquistão.

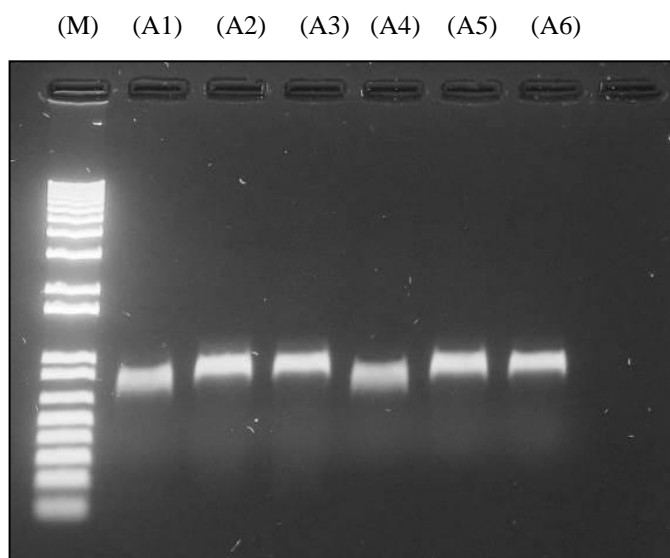


Figura 4: Foto do resultado da amplificação por PCR da região ITS do fungo com 25 (A1-A3) e 28 (A4-A6) ciclos. (M= marcador de peso molecular; amostras 1-6 correspondem a amplificações da mesma alíquota de gDNA da linhagem de *G. lucidum* utilizada neste estudo.

4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SUBSTRATOS

A Tabela 7 apresenta a caracterização físico-química dos resíduos de licuri utilizados como substratos no cultivo de *G. lucidum* por fermentação em estado sólido.

Tabela 7: Composição físico-química dos resíduos de *S. coronata*

Constituinte	Tipo de substrato		
	Casca de fruto	Folha	Bráctea
pH	5,69±0,03	6,16±0,03	5,64±0,01
C (%) ^a	45,78	43,15	44,38
N (%) ^b	0,48±0,08	0,67±0,08	0,72±1,36
C/N	88,79	59,47	57,16
U (%) ^c	6,90±0,15	7,60±0,27	7,27±0,06
Cinzas (%)	0,23±0,21	8,17±1,12	4,20±0,46
Lipídios (%)	0,47	2,27	0,75
Proteínas (%)	3,00±0,52	4,20±0,52	4,50±0,00
Celulose (%)	21,89±1,31	28,58±5,72	32,82±4,46
Hemicelulose (%)	32,76±0,04	21,15±0,13	26,15±0,57
Lignina (%)	38,20±1,21	17,31±5,05	21,81±4,34
Extrativos (%)	7,24±0,27	29,06±0,95	17,07±0,96

^a C: carbono; ^b N: nitrogênio; ^c U: umidade; Valores = média±desvio padrão

Após determinações físico-químicas e análise de comparação das médias obtidas foi possível observar que não existe diferença significativa entre os substratos no que se refere aos constituintes avaliados, $p > 0,05$ (Tabela 8).

Tabela 8: Análise de variância para caracterização físico-química dos resíduos de licuri

Variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F	p-valor
Entre os grupos	39,5379	2	19,769	0,04265	0,9583
Dentro dos grupos	15296,4	33	463,528		
Total	15336	35			

No presente estudo, o valor do pH inicial dos substratos variou de 5,64 a 6,16 (Tabela 7). Em Peksen e Yakupoglu (2009) é apontado que o pH do meio de cultivo pode afetar a solubilidade dos compostos nos substratos, o que interfere na disponibilidade desses componentes para o fungo. Além disso, Babitskaya e colaboradores (2005), afirmaram que fatores como pH do meio, temperatura e aeração são importantes na regulação do crescimento e metabolismo dos basidiomicetos.

Ainda em observação a Tabela 7, pode-se perceber que os teores de N e proteínas foram baixos nos três tipos de substratos avaliados, indicando necessidade de suplementação. Bernardi, Minotto e Nascimento (2008) mencionaram que, aos substratos pobres do ponto de vista nutritivo,

devem ser acrescentados suplementos à base de farelos de soja, trigo, milho ou arroz. Em Reis et al. (2010), é destacado que a suplementação é uma prática comum, pois garante o fornecimento de nutrientes; as proteínas, minerais e vitaminas interferem no crescimento micelial, enquanto que os carboidratos aumentam a velocidade de crescimento e degradação no substrato.

Segundo Galvagno e Forchiassin (2010), mesmo que o N seja requerido para a síntese de proteínas e componentes celulares como ácidos nucleicos e quitina, o C é imprescindível como fonte de energia. Para estes autores relação C/N maior ou igual a 10 fornecerá um alto conteúdo proteico, no entanto, em excesso favorecerá a acumulação de álcool, metabólitos secundários, lipídios ou polissacarídeos extracelulares.

De acordo com a Tabela 7, notou-se que o conteúdo de cinzas foi bem menor no substrato casca de fruto (0,23%), em comparação com os demais. Em Campos et al. (2010) é relatado que o teor de cinzas de uma determinada amostra corresponde ao resíduo mineral obtido após incineração dos componentes orgânicos. Contudo, ressalta-se que nem sempre as cinzas representam toda substância inorgânica presente na amostra, pois pode ocorrer volatilização ou redução de seus constituintes durante a queima (ZENEBO; PASCUET; TIGLEA, 2008).

O teor de extrativos também foi menor na casca de fruto em relação aos outros substratos estudados (Tabela 7). Os extrativos são compostos extraídos de materiais lignocelulósicos, por solventes polares ou apolares, que não fazem parte da parede celular, dentre os quais se podem citar: sais, açúcares, polissacarídeos, ácidos ou ésteres graxos, álcoois de cadeia longa, ceras, resinas, esteroides e compostos fenólicos e glicosídeos. As principais funções fisiológicas desses compostos incluem o acúmulo de nutrientes e preservação da madeira (SILVÉRIO et al., 2006; PINO et al. 2007; ZHANG et al., 2007)

Apesar dos resíduos de licuri não terem sido considerados diferentes estatisticamente, houve variação, principalmente em alguns parâmetros mensurados, o que pode ser verificado na Figura 5. Os maiores coeficientes de variação foram observados nos parâmetros cinzas (89,21%), lignina (29,20%) e celulose (20,01%).

Para Garcia (1989), o coeficiente de variação é uma medida de dispersão ou de variabilidade que permite comparações entre variáveis de natureza distinta, sendo calculado através da fórmula abaixo:

$$CV= 100.s/m$$

Portanto, significando que, o CV é o desvio padrão (s) expresso em porcentagem da média (m). Ainda segundo esse autor, quanto menor for o CV mais homogêneo serão os dados.

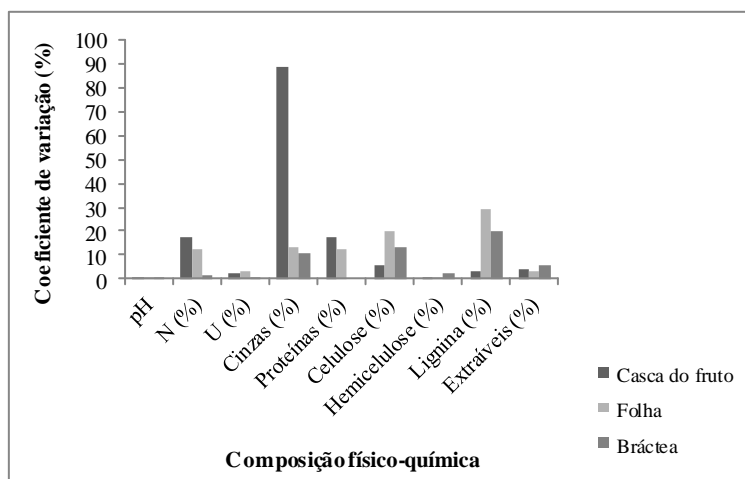


Figura 5: Coeficiente de variação dos componentes dos substratos de *S. coronata* (licuri).

A variação existente entre os tipos de substratos pode servir para explicar a formação de basidiomas em *G. lucidum*. Nesse sentido, hipóteses foram levantadas na seção 4.5 na tentativa de justificar tais resultados.

4.3 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO E AVALIAÇÃO DE CRESCIMENTO MICELIAL

Os três substratos formulados a base de resíduos de licuri proporcionaram crescimento do micélio de *G. lucidum*, conforme ilustrado na Figura 6.



Figura 6: Crescimento micelial de *G. lucidum* em resíduos de licuri no 5º dia de incubação.

Após realização do teste em placas de Petri e avaliação das médias de crescimento micelial, foi possível definir as melhores condições de cultivo, observadas no ensaio 10, para os três substratos testados (pH= 6,5; temperatura= 30°C; C/N= 40), (Tabela 9).

Tabela 9: Valores médios de crescimento micelial (raio) de *G. lucidum* em resíduos de licuri, após 5 dias de cultivo

Ensaio	T (°C)	pH	C/N	Média de crescimento (cm)		
				Casca de fruto + Farelo de trigo	Folha + Farelo de trigo	Bráctea + Farelo de trigo
1	22	5,3	28	1,38	1,64	1,40
2	28	5,3	28	2,18	2,50	2,14
3	22	7,7	28	1,25	1,55	1,42
4	28	7,7	28	2,03	2,41	2,14
5	22	5,3	52	1,35	1,63	1,33
6	28	5,3	52	2,01	2,22	2,10
7	22	7,7	52	1,58	1,68	1,34
8	28	7,7	52	1,99	2,27	2,07
9	20	6,5	40	0,92	1,11	1,09
10	30	6,5	40	2,47	2,53	2,49
11	25	4,5	40	1,68	2,32	1,90
12	25	8,5	40	1,66	2,24	1,93
13	25	6,5	20	2,09	2,35	2,07
14	25	6,5	60	1,84	2,27	1,94
15	25	6,5	40	1,87	2,29	1,92
16	25	6,5	40	1,91	2,25	1,90
17	25	6,5	40	1,95	2,25	1,89
18	25	6,5	40	1,98	2,28	1,89

4.3.1 Análise de variância para otimização das condições de cultivo no substrato casca de fruto de licuri

A Tabela abaixo apresenta a análise de variância para a otimização das condições de cultivo no substrato casca de fruto de licuri suplementado com farelo de trigo.

Tabela 10: Análise de variância para o substrato casca de fruto de licuri

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F. calculado	F. tabelado
Regressão	2,195	3	0,732	52,28	3,41
Resíduo	0,179	13	0,014		
Total	2,374	16			

De acordo com os dados de análise de variância e Figura 7 foi possível notar que as variáveis temperatura (linear e quadrática) e pH (quadrático) exerceram efeitos significativos no crescimento micelial de *G. lucidum* no experimento em placas. O valor de F calculado para a regressão (52,28) foi significativo a 5% de probabilidade. O coeficiente R^2 de 92% indicou que

existe uma boa correlação entre os valores observados no experimento e os preditos pelo modelo (Equação 1: $\hat{y} = 1,921 + 0,384x - 0,088x^2 - 0,097x^2$), o que pode ser visualizado na Figura 8.

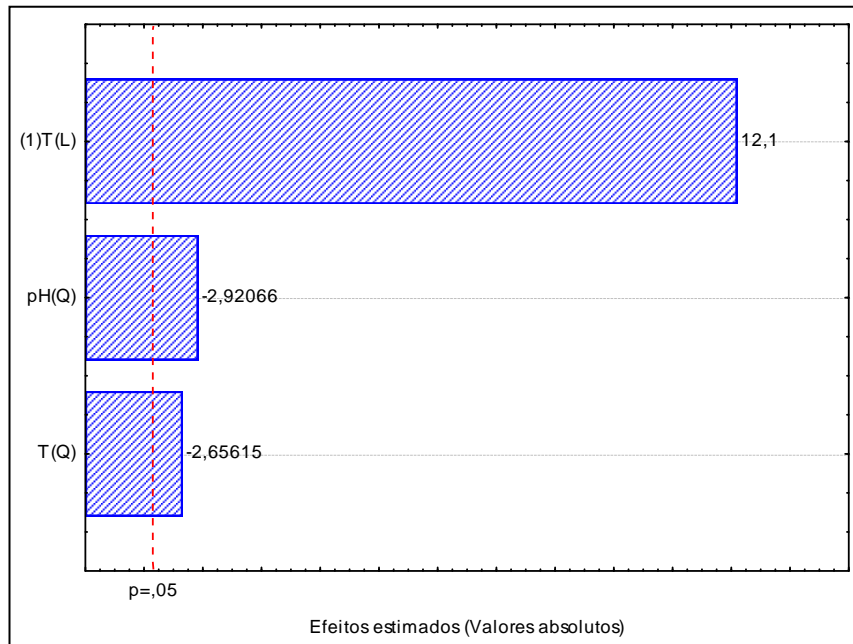


Figura 7: Diagrama de Pareto para otimização das condições de cultivo no substrato casca de fruto.

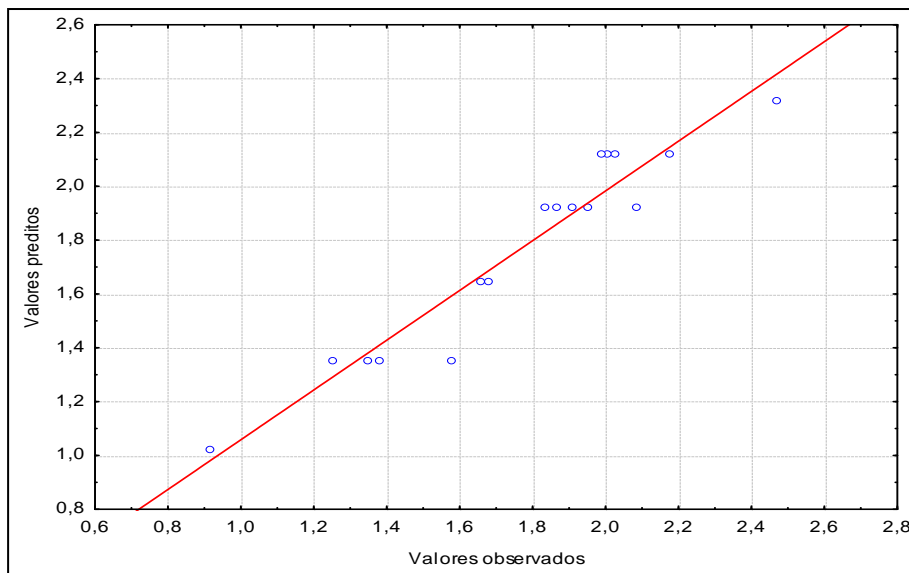


Figura 8: Valores de crescimento micelial observados *versus* valores preditos pelo modelo da equação 1.

O gráfico de contorno da Figura 9a sugere que o aumento da temperatura causou um efeito positivo no crescimento micelial, tendo em vista que o crescimento máximo foi alcançado a 30°C.

Assim, ressalta-se que valores de temperaturas ainda maiores do que os utilizados neste planejamento experimental poderiam ser testados para a obtenção de melhores resultados.

Com relação à variável pH, destaca-se que apesar de considerada significativa, exerceu um efeito menor na resposta estudada. Conforme verificado na Tabela 9, ensaios 11 e 12, nas mesmas condições de temperatura e relação C/N, aumentando o pH em 4 unidades (de 4,5 a 8,5, de moderadamente ácido a moderadamente básico), a resposta foi praticamente a mesma. Em Fan, Soccol e Pandey (2008), também é apontado que o crescimento micelial é pouco afetado pelo pH.

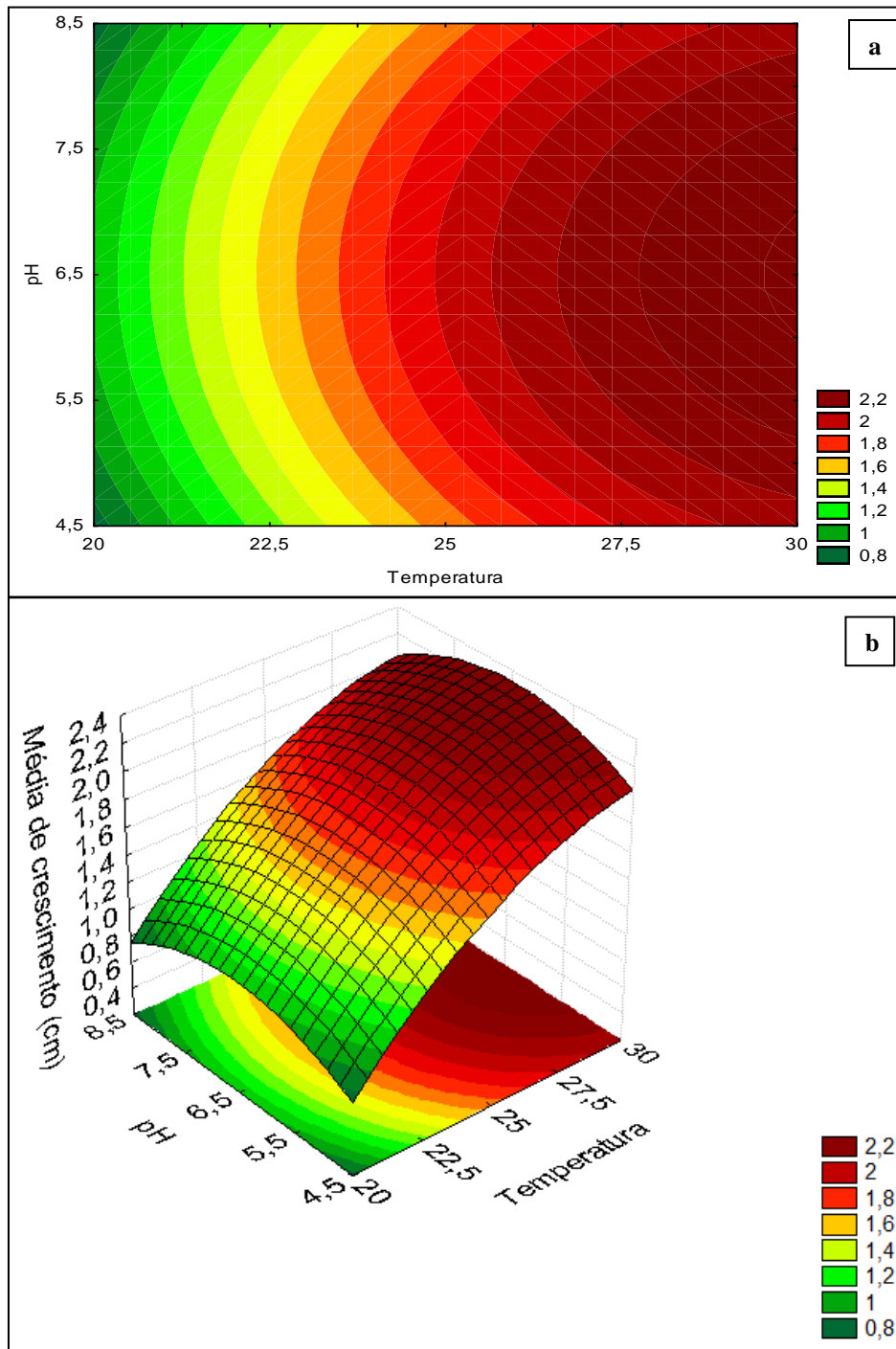


Figura 9: Efeito bidimensional (a) e tridimensional (b) das variáveis temperatura e pH no crescimento micelial de *G. lucidum* no substrato casca de fruto.

4.3.2 Análise de variância para otimização das condições de cultivo no substrato folha de licuri

Em observação a Tabela 11 e Figura 10 notou-se que apenas a variável temperatura (linear e quadrática) foi significativa para o crescimento micelial de *G. lucidum* utilizando folha de licuri como substrato.

Tabela 11: Análise de variância para o substrato folha de licuri

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F. calculado	F. tabelado
Regressão	2,476	2	1,238	112,55	3,74
Resíduo	0,149	14	0,011		
Total	2,625	16			

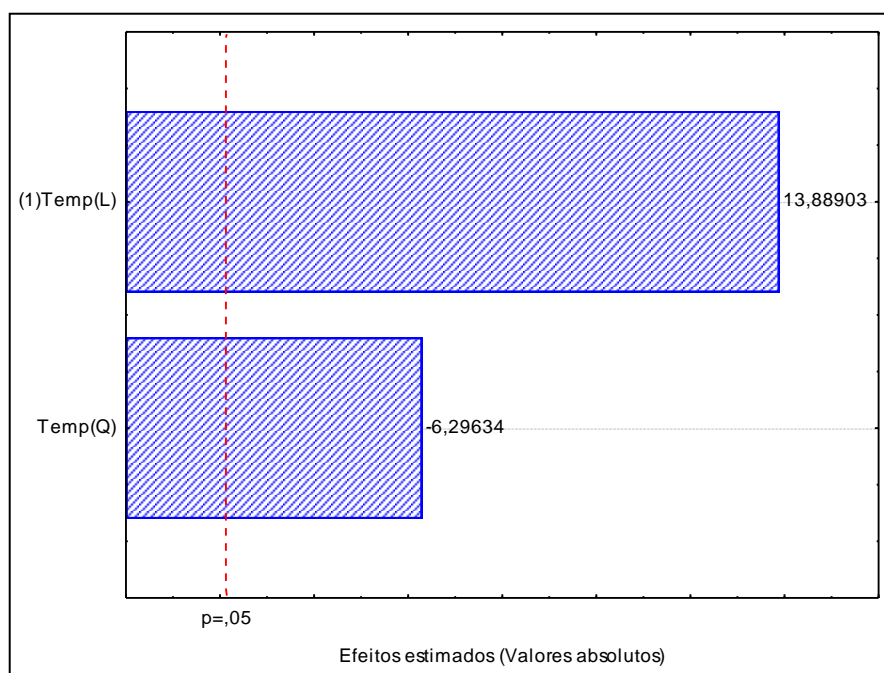


Figura 10: Diagrama de Pareto para otimização das condições de cultivo no substrato folha.

O valor de F calculado para a regressão (112,55), foi cerca de 30 vezes maior do que o de F tabelado, indicando que o experimento foi altamente significativo a 5% de probabilidade. O valor de $R^2=94\%$, demonstra que houve boa correlação entre as respostas observadas experimentalmente e as previstas pelo modelo (Equação 2: $\hat{y} = 2,232 + 0,387x - 0,179x^2$), (Figura 11).

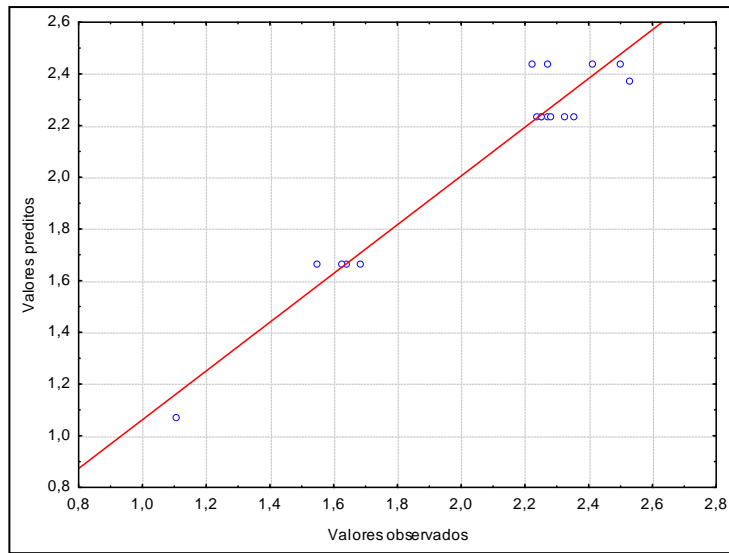


Figura 11: Valores de crescimento micelial observados *versus* valores preditos pelo modelo da equação 2.

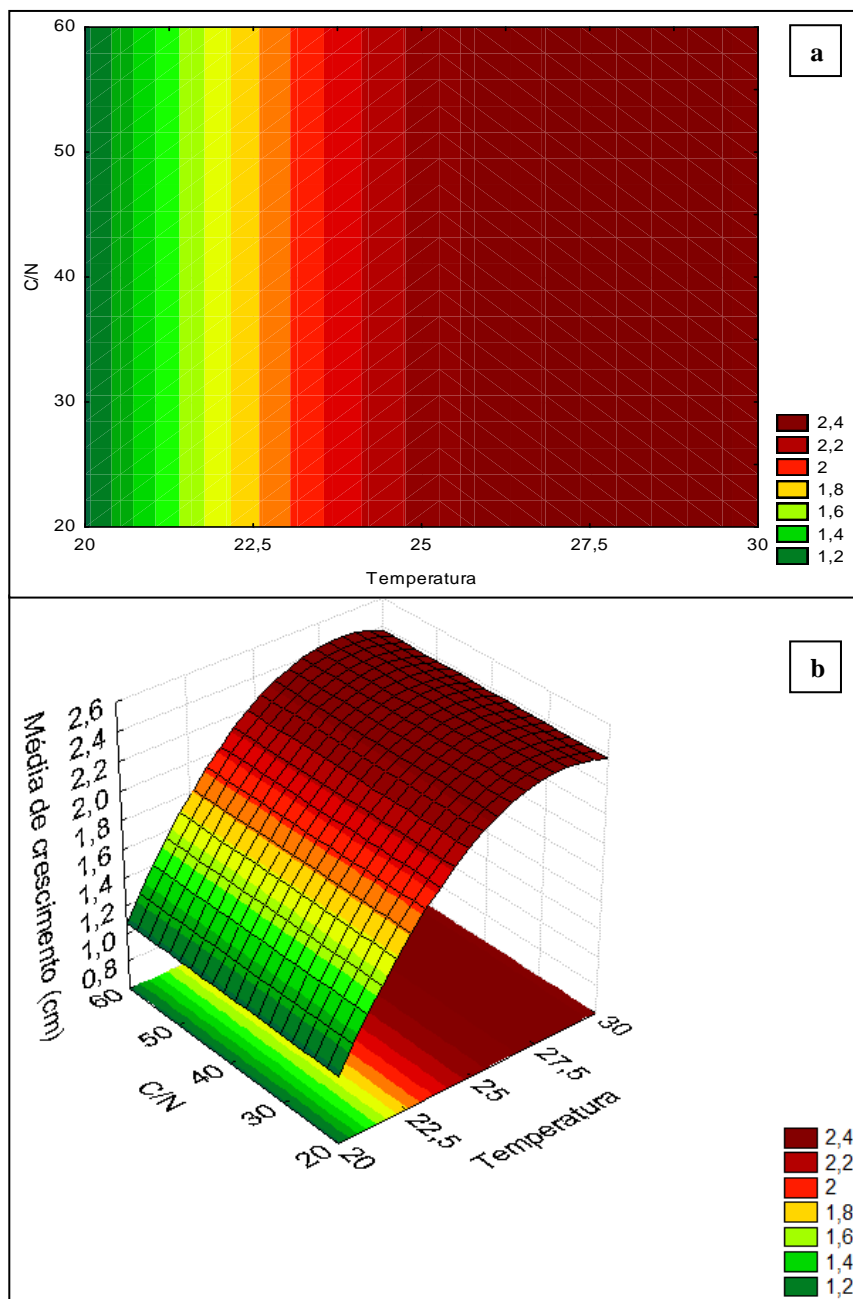


Figura 12: Efeito bidimensional (a) e tridimensional (b) das variáveis temperatura e C/N no crescimento micelial de *G. lucidum* no substrato folha.

Analisando o gráfico da Figura 12a é possível inferir que o aumento da temperatura também influenciou positivamente o crescimento micelial de *G. lucidum*, quando cultivado em folha de licuri. Assim, sugere-se que, para maximizar a resposta estudada, faz-se necessário utilizar um novo planejamento estatístico, ampliando a faixa de temperatura.

4.3.3 Análise de variância para otimização das condições de cultivo no substrato bráctea de licuri

A Tabela 12 apresenta os resultados de análise de variância para a otimização das condições de cultivo no substrato bráctea de licuri.

Tabela 12: Análise de variância para o substrato bráctea de licuri

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F. calculado	F. tabelado
Regressão	2,068	1	2,068	175,25	4,54
Resíduo	0,177	15	0,012		
Total	2,245	16			

De acordo com a Tabela acima e Figura 13 também foi possível observar que somente a variável temperatura (linear) influenciou significativamente o crescimento micelial de *G. lucidum*.

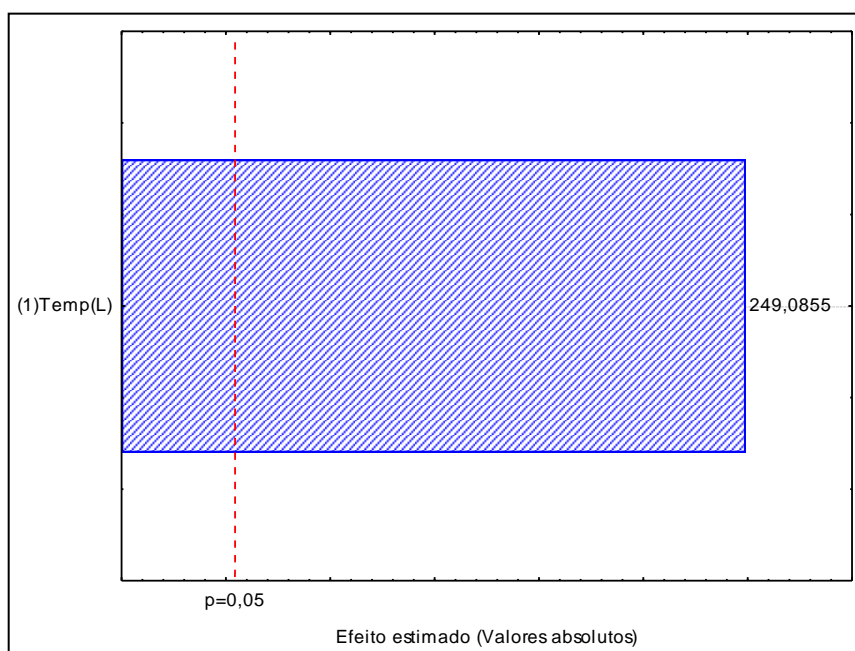


Figura 13: Diagrama de Pareto para otimização das condições de cultivo no substrato bráctea.

O valor de F calculado para a regressão (175,25) a 5% de probabilidade foi alto, quando comparado com F tabelado, e indicou que o experimento foi bastante significativo. O coeficiente R^2 foi de 92%, sugerindo que houve uma boa correlação entre os resultados obtidos e os preditos pelo modelo (Equação 3: $\hat{y} = 1,83 + 0,39x$), como representado na Figura 14.

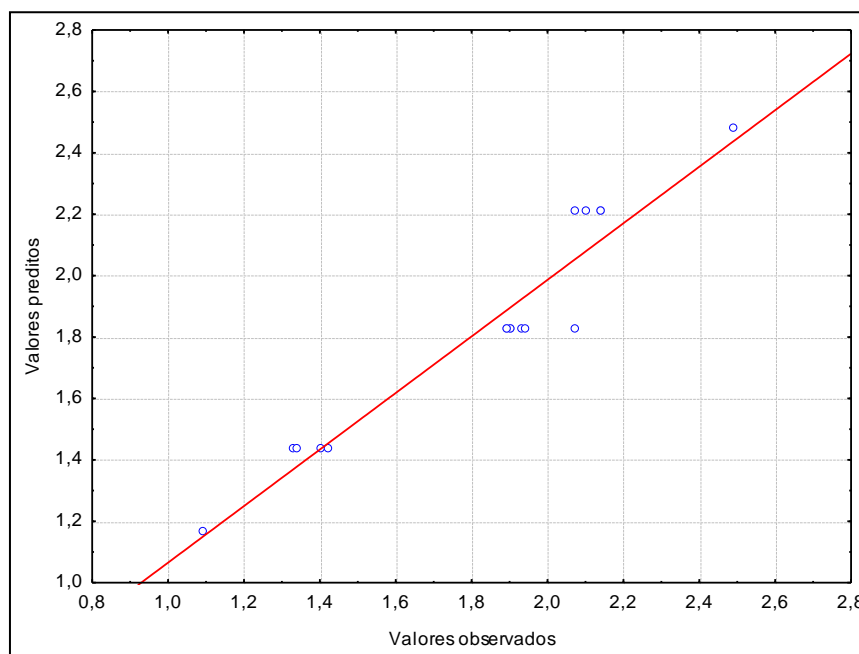


Figura 14: Valores de crescimento micelial observados *versus* valores preditos pelo modelo da equação 3.

Observando a Figura 15a foi possível notar que o aumento da temperatura também favoreceu o crescimento micelial de *G. lucidum*, quando cultivado em bráctea de licuri. Dessa forma, recomenda-se que um novo planejamento estatístico seja aplicado com aumento da variável temperatura com objetivo de ampliar a resposta.

Análises de superfícies de resposta também foram utilizadas por Lee et al. (2003) para determinar condições ótimas de temperatura e pH para a produção de micélio de *G. lucidum* em resíduos de queijo. A maior produção micelial (17,0 g/L) foi verificada a 30°C, que também foi a mesma temperatura encontrada no presente estudo, embora o valor ótimo de pH tenha sido um pouco diferente. Em contrapartida, Postemsky, Delmastro e Curvetto, (2014) afirmaram que altos valores de biomassa micelial desta espécie foram observados na faixa de 5,0-6,2 de pH e temperatura de 25°C.

Segundo Junior, Linde e Colauto (2010) relações C/N de 70-80:1 são consideradas ótimas para o cultivo axênico de *G. lucidum*. Hsieh e Yang (2004) ao testar resíduo de soja na fermentação em estado sólido desta espécie, também observaram altas taxas de crescimento micelial (6 mm/dia

em tubo; 7,5 mm/dia em frascos de 500 mL) na mesma faixa de relação C/N. Contudo, no presente trabalho, o ótimo foi alcançado na relação C/N de 40/1.

Lakshmi (2013a), estudando o crescimento de *G. lucidum* em resíduos de chá, a 28°C de temperatura, verificou a maior taxa de crescimento micelial (7,4 cm) no 8º dia de cultivo. Ressalta-se que, utilizando resíduos de licuri como substrato, 5 dias de cultivo foi o tempo de incubação requerido para obtenção de maior crescimento do micélio por esta espécie (8,5 cm). Resultado ainda maior de crescimento (8,8 cm) em 8 dias de cultivo foi detectado por Postemsky, Delmastro e Curvetto (2014) ao estudar o efeito de óleos comestíveis na biodegradação de produtos derivados do arroz pela linhagem de *G. lucidum* E47 no sistema de tubos de vidro.

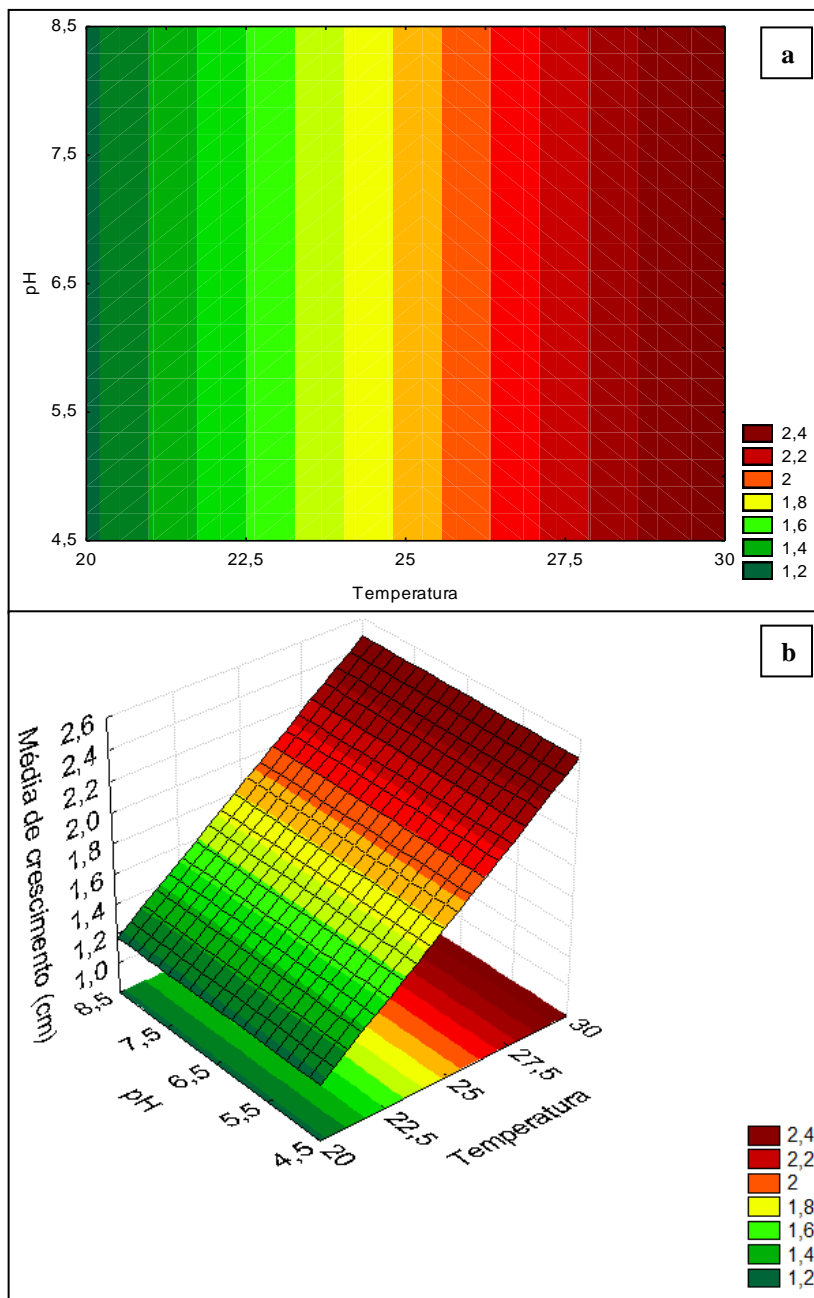


Figura 15: Efeito bidimensional (a) e tridimensional (b) das variáveis temperatura e pH no crescimento micelial de *G. lucidum* no substrato bráctea.

Ao investigar o cultivo de *G. lucidum* em serragem suplementada com farelo de trigo, Rai, Kamal e Singh (2004) obtiveram o máximo de taxa de crescimento micelial com 20% de suplementação (7,4 mm/dia). Resultados semelhantes foram encontrados neste trabalho em que a suplementação com 17, 18 e 28% de farelo de trigo promoveu o maior crescimento micelial da mesma espécie, nos resíduos bráctea, folha e casca de fruto, respectivamente.

O conteúdo de 60% de água proporcionou maiores taxas de crescimento de *G. lucidum* em resíduos de grão de vinhaça (4,5-5,7 mm/dia) quando comparado com o cultivo em umidade de 70% nesse mesmo substrato (YANG; HSIEH; CHEN, 2003). Destaca-se que, no presente trabalho, o valor de umidade de 60% também foi adotado para a fermentação em estado sólido.

4.3.4 Confirmação experimental das condições otimizadas

Para verificar a dinâmica de crescimento micelial de *G. lucidum*, foram realizados, simultaneamente, ensaios em triplicata com os três tipos de substratos nas condições otimizadas (pH 6,5, relação C/N de 40/1 e temperatura de 30°C) através do planejamento experimental. A Tabela abaixo apresenta os resultados das médias das triplicatas:

Tabela 13: Valores médios de crescimento micelial (raio) de *G. lucidum* em resíduos de licuri, após 4 dias de cultivo

Tipo de substrato	Média de crescimento (cm)
Casca de fruto + farelo de trigo	2,36
Bráctea + farelo de trigo	2,16
Folha + farelo de trigo	2,13

Avaliando as médias de crescimento nos substratos casca de fruto, bráctea e folha de licuri, observou-se que as respostas foram praticamente as mesmas, quando comparadas com as determinadas no ensaio 10 do planejamento completo (tabela 9), porém o período de incubação foi reduzido para 4 dias.

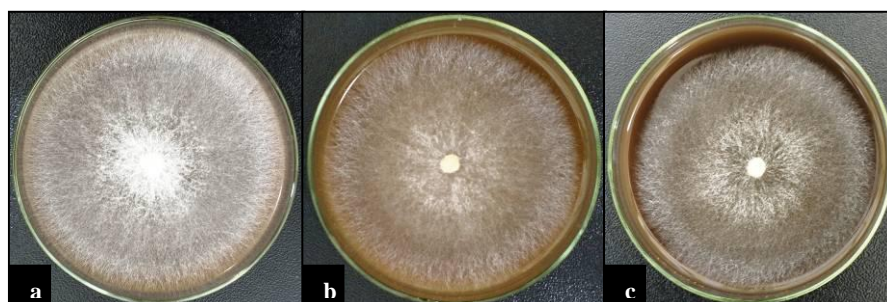


Figura 16: Crescimento micelial de *G. lucidum* em resíduos de licuri no 4º dia de incubação. **a.** Casca de fruto. **b.** Folha. **c.** Bráctea.

4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A linhagem de *G. lucidum* utilizada neste estudo produziu as enzimas ligninolíticas LAC e MnP nos três tipos de substratos testados, durante os 28 dias de cultivo em meio sólido (Tabela 14). Esses resultados demonstram tanto o potencial da linhagem estudada, devido a sua habilidade de degradação de materiais lignocelulósicos, quanto dos resíduos de *S. coronata*, como substrato, no processo biotecnológico de produção enzimática. Nesse sentido, D'Souza, Merritt e Reddy (1999) afirmaram que *G. lucidum* é um fungo importante no processo decomposição da madeira e que tem sido estudado para a produção de enzimas modificadoras da lignina, como lacase, MnP e LiP.

Tabela 14: Produção de enzimas ligninolíticas pelo fungo *G. lucidum* em resíduos de *S. coronata* (licuri)

Dias	Atividade enzimática (U/L) ^a	
	MnP	Lacase
Casca do fruto + farelo de trigo		
7	0,81	11,71
14	1,49	12,57
21	8,46	13,48
28	2,75	9,09
Folha + farelo de trigo		
7	0,00	11,06
14	0,93	13,04
21	1,97	11,31
28	3,92	8,22
Bráctea + farelo de trigo		
7	0,35	12,81
14	10,46	13,80
21	7,23	13,29
28	14,92	9,87

^aTodos os valores são médias de três repetições

4.4.1 Manganês peroxidase

Analisando a Figura 17, é possível inferir que o substrato casca do fruto de *S. coronata* foi o mais eficiente na produção de MnP no 7º dia de cultivo (0,81 U/L), quando comparado com o substrato folha, que teve atividade nula. Em conformidade com este resultado, a atividade enzimática de MnP no mesmo período de incubação também não foi detectada por Silva, Melo e Oliveira (2005) para as linhagens de *Ganoderma* (CB364, GASI2), crescendo em meio de cultura líquido. Assim, os autores sugeriram que ou os fungos não produziram a enzima em níveis suficientes para serem detectados ou que requerem diferentes condições de cultivo. Em

contrapartida, Stajić et al. (2010) encontraram nível máximo de atividade para MnP ($112,8 \pm 1,0$ U/L), em *G. lucidum*, quando cultivado em palha de trigo suplementada com glicose e NH_4NO_3 20 mM.

Observando-se a Figura 18, pode-se notar que houve um aumento da atividade de MnP no 14º dia de incubação em todos os substratos de licuri utilizados quando comparada com a atividade no 7º dia de cultivo. O substrato bráctea foi o que proporcionou maior atividade enzimática (10,46 U/L) e diferiu significativamente a 95% de significância dos demais, que não foram diferentes entre si. Por outro lado, Asgher, Sharif e Bhatti, (2010) estudando os resíduos lignocelulósicos palha de arroz, trigo e milho, engaço de bananeira, bagaço de cana e sabugo de milho encontraram valores muito maiores de atividade enzimática ao longo de 14 dias de cultivo. De acordo com esses autores, após otimização do processo de fermentação em estado semissólido, a linhagem de *G. lucidum* IBL-06, apresentou o máximo de atividade de MnP (1972000 U/L) no substrato palha de arroz nas seguintes condições: pH 4,5; temperatura 35°C; umidade 75%; utilizando frutose como fonte de carbono, uréia como fonte de nitrogênio e *Tween*-80 como surfactante. Ressalta-se que o meio de cultura utilizado neste trabalho é muito mais caro do que um meio contendo apenas resíduos de licuri e farelo de trigo.

De acordo com a Figura 19, observa-se que a atividade enzimática variou de (1,97 a 8,46 U/L) dependendo do tipo de substrato empregado na fermentação em estado sólido. Em Hariharan e Nambisan (2013) é destacado que aparentemente a produção de enzimas vai depender da linhagem de fungo e do tipo de substrato utilizados na fermentação em estado semissólido. Fatores como tipo de cultivo, fontes e concentrações de carbono e nitrogênio, presença ou ausência de indutores, pH do meio, agitação, tempo de cultivo também vão interferir na produção enzimática (D'SOUZA; MERRITT; REDDY, 1999; STAJIĆ et al., 2006; STAJIĆ et al., 2010).

Na Figura 20, pode-se verificar que o maior pico de atividade enzimática para MnP (14,92 U/L), ocorreu no substrato bráctea, o qual diferiu significativamente dos outros substratos avaliados. Nesse contexto, Asgher, Sharif e Bhatti (2010), afirmaram que o tipo, bem como a composição de substrato lignocelulósico tem um grande impacto na secreção enzimática pelos fungos causadores da podridão branca.

Observa-se também que, com exceção do substrato casca do fruto, todas as atividades aumentaram quando comparadas com os tempos de incubação 7, 14, e 21 dias. Segundo Galvagno e Forchiassin (2010), a degradação é um processo relacionado ao crescimento secundário, assim ao decompor os nutrientes do meio, principalmente o nitrogênio, e cessar o crescimento, aumenta-se a atividade ligninolítica.

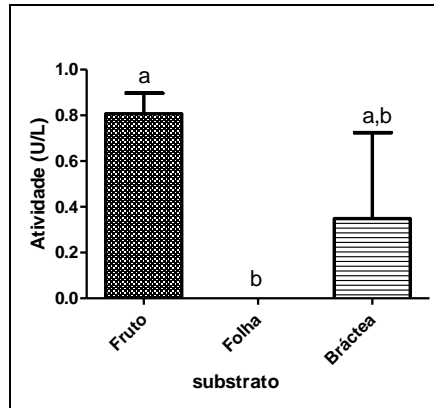


Figura 17: Atividade enzimática de MnP por *G. lucidum* cultivado em resíduos de licuri no 7º dia de incubação. Letras distintas significa que as médias diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

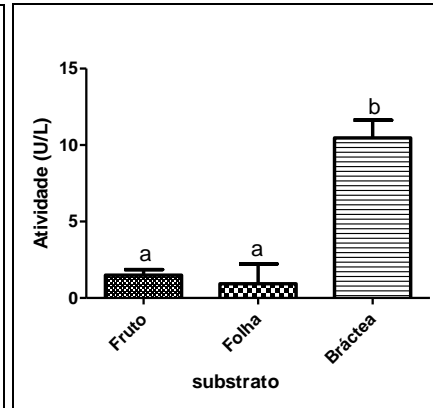


Figura 18: Atividade enzimática de MnP por *G. lucidum* cultivado em resíduos de licuri no 14º dia de incubação. Letras distintas significa que as médias diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

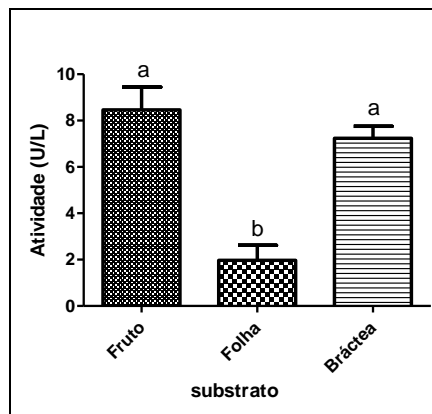


Figura 19: Atividade enzimática de MnP por *G. lucidum* cultivado em resíduos de licuri no 21º dia de incubação. Letras distintas significa que as médias diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

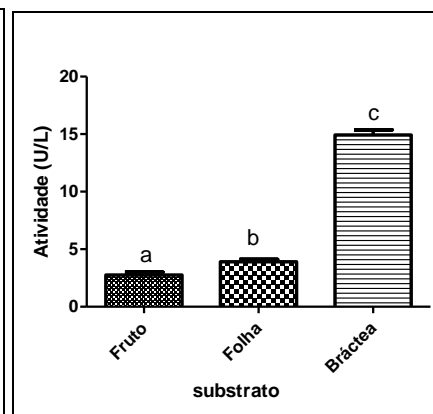


Figura 20: Atividade enzimática de MnP por *G. lucidum* cultivado em resíduos de licuri no 28º dia de incubação. Letras distintas significa que as médias diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

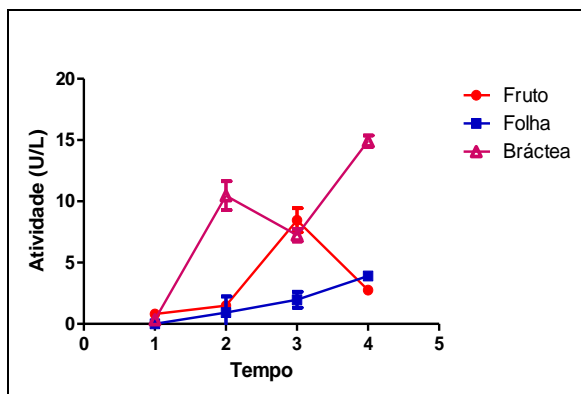


Figura 21: Análise de correlação Atividade x Tempo para MnP. Tempo 1-4=(7,14,21,28 dias), respectivamente.

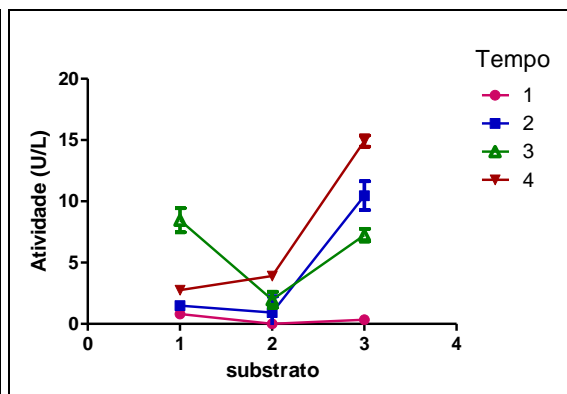


Figura 22: Análise de correlação Atividade x Substrato para MnP. Substrato 1- fruto, substrato 2- folha, substrato 3- bráctea.

Ainda levando em consideração a atividade de MnP nos substratos avaliados, Figuras 21 e 22, percebe-se que não houve correlação significativa (positiva), entre atividade e o tempo de fermentação, exceto para o substrato folha; e nem entre atividade e substrato ao longo do tempo.

4.4.2 Lacase

Com relação à atividade de LAC, comportamentos semelhantes nos substratos e tempos de avaliação foram verificados. Winqvist et al. (2008) também notaram que, dentre as enzimas estudadas, a lacase foi a mais estável, mantendo seu nível de atividade próximo a um pico anteriormente alcançado.

A partir da análise da Figura 23, foi possível perceber que o substrato bráctea proporcionou valor de atividade mais alto (12,81 U/L), após 7 dias de incubação. Resultado bem próximo (10,40 U/L) foi obtido por meio da fermentação sólida de *G. lucidum* HAI 158, em palha de trigo (SIMONIC' et al., 2010). Por outro lado, Silva Melo e Oliveira (2004) encontraram valores baixos de atividade para LAC, estudando a produção de enzimas ligninolíticas por fungos isolados de solos sob o cultivo de arroz irrigado em meio líquido; o maior pico de atividade detectado foi de (6,057 U.L⁻¹) para a linhagem de *Ganoderma* (GASI3.4) no mesmo tempo de incubação.

O maior pico de atividade para LAC ocorreu após 14 dias de fermentação no substrato bráctea (13,80 U/L), (Figura 24). Manavalan et al. (2012), destacaram que 3 picos de atividade foram observados para LAC (55, 83 e 93 U/g), aos 15, 30 e 40 dias, respectivamente, de cultivo de *G. lucidum* em bagaço de cana.

Na Figura 25 é indicado que no 21º dia de cultivo, a atividade de LAC variou de (11,31 a 13,48 U/L). Investigando o efeito da suplementação no substrato e produção de enzimas extracelulares por *G. lucidum*, Rai, Kamal e Singh (2004) observaram que a atividade variou de 22 a 772 U.L⁻¹; faixa de atividade maior do que as observadas no presente trabalho. Dessa forma, verificou-se que a atividade das enzimas extracelulares, incluindo a lacase, aumentou significativamente tendo em vista a adição de farelo de trigo ao meio de cultivo.

O decréscimo de atividade de LAC em todos os resíduos de licuri pode ser visualizado na Figura 26. Tan e Wahab (1997) ao estudar o crescimento de *Pleurotus ostreatus* em resíduo de algodão, constataram que a atividade da lacase está associada com a morfogênese e aumenta com crescimento micelial, atingindo um pico de crescimento rápido e, posteriormente, diminuindo rapidamente. Papinutti, Diorio e Forchiassin (2003) também afirmaram que a atividade das enzimas LAC e MnP depende do crescimento. Contudo, Winqvist et al. (2008) evidenciaram que em fermentação em estado sólido, um metabolismo terciário deve ocorrer, sendo caracterizado pela estreita associação das hifas com eventos do metabolismo secundário.

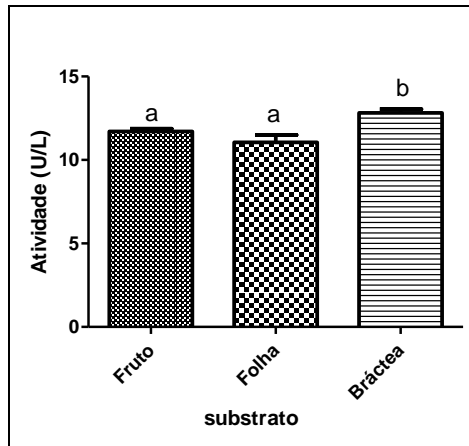


Figura 23: Atividade enzimática de LAC por *G. lucidum* cultivado em resíduos de licuri no 7º dia de incubação. Letras distintas significam que as médias diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

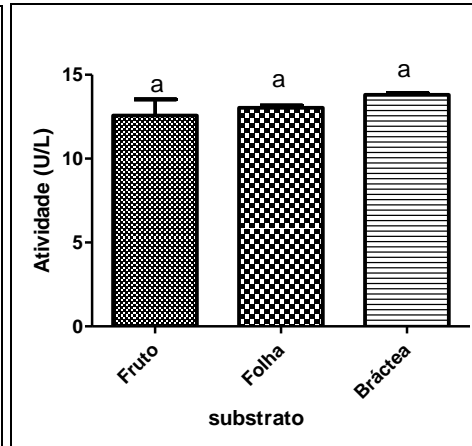


Figura 24: Atividade enzimática de LAC por *G. lucidum* cultivado em resíduos de licuri no 14º dia de incubação. Letras distintas significam que as médias diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

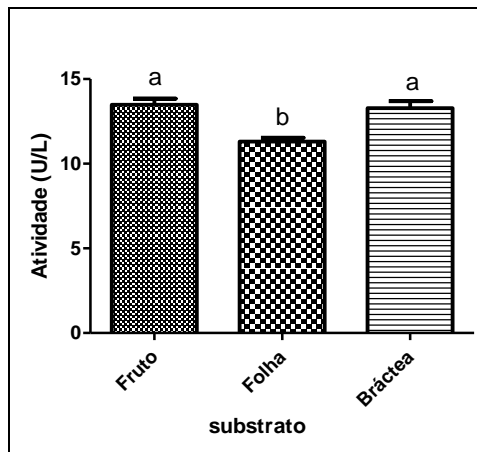


Figura 25: Atividade enzimática de LAC por *G. lucidum* cultivado em resíduos de licuri no 21º dia de incubação. Letras distintas significam que as médias diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

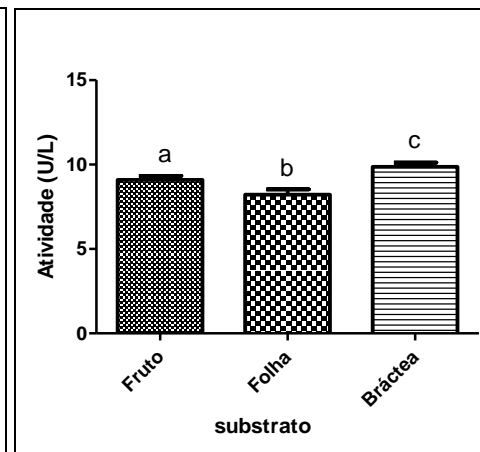


Figura 26: Atividade enzimática de LAC por *G. lucidum* cultivado em resíduos de licuri no 28º dia de incubação. Letras distintas significam que as médias diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

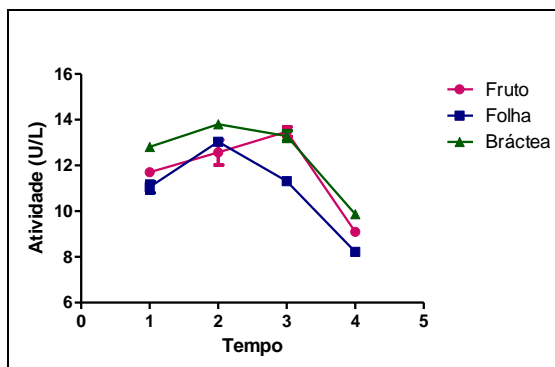


Figura 27: Análise de correlação Atividade x Tempo para LAC. Tempos 1-4= (7,14,21,28 dias), respectivamente.

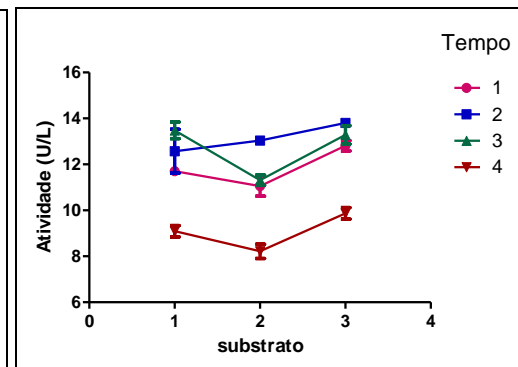


Figura 28: Análise de correlação Atividade x Substrato para LAC. Substrato 1- fruto, substrato 2- folha, substrato 3- bráctea.

Nas Figuras 27 e 28, as análises de correlação para LAC estão representadas. Assim, é possível inferir que não houve correlação significativa (positiva) entre atividade e tempo; nem entre atividade e substrato ao longo do tempo de cultivo.

Comparando os resultados de atividade das duas enzimas estudadas, notou-se que, de um modo geral, as atividades para LAC foram maiores do que aquelas detectadas para MnP. Nessa perspectiva, Zilly et al. (2012), pesquisando a produção de enzimas hidrolíticas e oxidativas em resíduos do maracujá, através da fermentação em estado sólido apontaram que a principal enzima oxidativa encontrada foi a lacase em todos os substratos e fungos utilizados em seus experimentos. Para estes autores, já é fato que as lacases estão bem mais distribuídas em fungos causadores da podridão branca do que as peroxidases. Perumal e Kalaichelvan (1996) sugeriram que as lacases parecem estar mais envolvidas com o processo de degradação da lignina.

4.5 PRODUÇÃO DE BASIDIOMAS

A linhagem de *G. lucidum* utilizada neste estudo também foi capaz de produzir basidiomas em dois dos três tipos de substratos testados, indicando que as enzimas ligninolíticas secretadas pelo basidiomiceto participaram do processo de biodegradação dos resíduos do licuri (Figura 29). Além disso, foi possível perceber que embora o substrato casca de fruto do licuri não tenha proporcionado formação de basidiomas, houve colonização desse substrato pelo fungo em sua fase assimilativa (Figura 30).

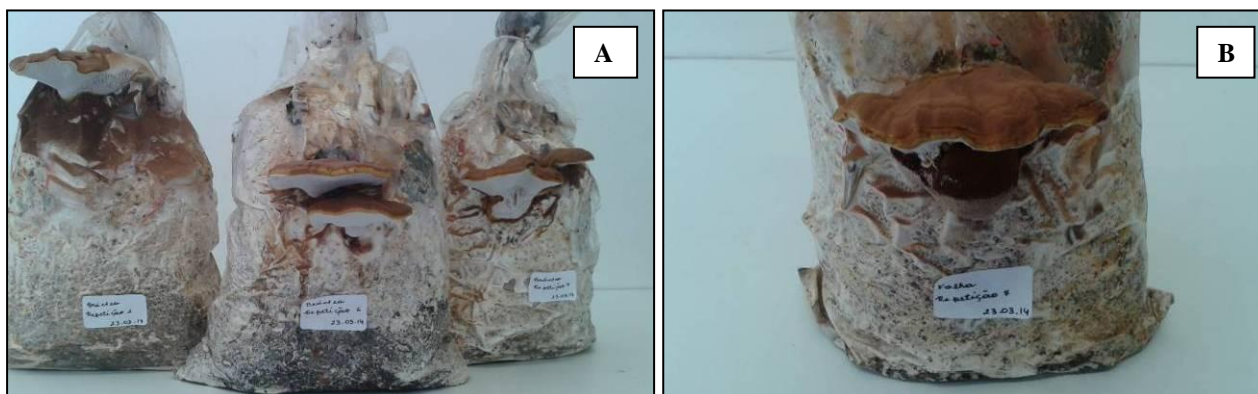


Figura 29: Produção de basidiomas em *G. lucidum*, utilizando resíduos de *S. coronata* como substrato. **A.** Bráctea. **B.** Folha.



Figura 30: Formação de micélio em *G. lucidum*, utilizando casca de fruto de licuri como substrato.

A própria constituição química do substrato, já apresentada em seção anterior, pode servir para explicar a não-formação de basidiomas de *G. lucidum* em casca de fruto do licuri. Esse substrato é o que contém maior teor de lignina (38,20%) dentre os analisados, o que pode ter dificultado o acesso do fungo aos nutrientes. Para Galvagno e Forchiassin (2010), a lignina, apesar de ser fonte de carbono, não é um substrato energético que promove o crescimento, necessitando, portanto de um co substrato. A lignina constitui cerca de 20 a 30% da parede celular dos vegetais e está ligada a celulose e hemicelulose formando uma barreira física impermeável, garantindo-lhe suporte estrutural e resistência contra ataque microbiano e estresse oxidativo (SÁNCHEZ, 2009; MEHBOOB et al., 2011).

Outra característica do substrato casca de fruto que provavelmente não favoreceu a formação de basidiomas foi seu baixo conteúdo de celulose (21,89%) quando comparado com os demais substratos testados. Segundo Paterson (2007), uma vez que a lignina é degradada, os fungos causadores da podridão branca obtém energia, predominantemente, a partir desse polímero. Conforme apontado em Sánchez (2009), muitos microorganismos são capazes de degradar e utilizar a celulose e hemicelulose como fontes de carbono e energia.

Para Ueitele, Kadhila-Muandingi e Matundu (2014), substratos com alto teor de celulose e baixo de lignina formam primórdios mais rapidamente do que aqueles que contém baixo teor de celulose e alto de lignina. Isso porque, substratos com alto conteúdo de celulose tem maior quantidade de carbono disponível e são mais rapidamente degradados durante o crescimento micelial. Assim, sugere-se que, talvez, a casca de fruto de licuri necessite de um tempo maior do que 30 dias para ser degradada e proporcionar melhor desenvolvimento do micélio de *G. lucidum*.

A casca do fruto foi considerada um substrato pouco nutritivo e pobre em minerais, tendo em vista seu baixo teor de extrativos (7,24%) e cinzas (0,23%), respectivamente; fatores estes que também devem ter contribuído para a não-produção de basidiomas. De acordo com Hafiz et al. (2007) os fungos incluídos na família *Polyporaceae* são muito importantes em ecossistemas naturais, decompondo os nutrientes e minerais da madeira. Os microelementos, principalmente, elementos minerais são requeridos, por atuarem como cofatores enzimáticos, reguladores osmóticos e na transferência de elétrons em reações de óxido-redução (GALVAGNO; FORCHIASSIN, 2010).

Campos e Andrade (2011), mencionaram que a decomposição do substrato pelo fungo pode ser estimada pelo índice perda de matéria orgânica (PMO). Entre os substratos em estudo, o substrato casca de fruto foi o que apresentou menor PMO (13,88%), indicando um baixo potencial de decomposição e possível utilização deste substrato para formação de basidiomas em *G. lucidum*. Dessa forma, faz-se necessário destacar que, ainda que tenha ocorrido algum tipo de decomposição neste substrato, está não foi completa, o que pode ser visualizado na Figura 31. Para Fan, Soccol e

Pandey (2008) o início da frutificação está associado com o esgotamento nutricional do substrato de cultivo.



Figura 31: Degradação de *G. lucidum*, em casca de fruto de licuri.

Ressalta-se que resultados semelhantes ao encontrado neste trabalho para o substrato casca de fruto, foram obtidos por Hsieh e Yang (2004) ao testar a utilização de resíduos de soja para a produção de *G. lucidum*. De acordo com esses autores, relações de C/N abaixo de 50/1 não estimularam a produção de basidiomas por esta espécie, apesar da relação 30/1 ter formado agregado micelial. Serragem de *Dalbergis sisoo* também não promoveu a formação de basidiomas em *G. lucidum*, devido ao seu pobre crescimento micelial e problemas de aeração causados pelo substrato (GURUNG; BUDATHOKI; PARAJULI, 2012).

Comparando as médias dos índices de avaliação da produção de *G. lucidum* nos resíduos bráctea e folha pelo teste t (Tabela 15), verificou-se que não houve diferença significativa entre estes substratos (p-valor = 0,75064).

Tabela 15: Índices de avaliação da produção de basidiomas de *G. lucidum* em resíduos de *S. coronata*

Índices	Tipo de substrato	
	Bráctea + farelo de trigo	Folha + farelo de trigo
PMO (%) ^a	28,11±1,62	32,21±9,76
EB (%) ^b	3,35±1,46	3,75±0,01
R (g/kg) ^c	33,53±14,57	37,48±0,99
Nº de basidiomas	1,63±0,74	1,50±0,58
Peso de basidiomas (g)	7,52±3,27	9,25±0,24
Emissão de primórdios (nº dias)	33,66±3,57	41,20±6,38
Início da formação de basidiomas (nº dias)	46,38±4,96	52,00±4,00

^a PMO: perda da matéria orgânica; ^b EB: eficiência biológica; ^c R: rendimento; Valores= média±desvio padrão

A eficiência biológica é a relação entre o peso fresco do basidioma colhido e o peso seco do substrato inicial, sendo expressa em porcentagem. Este índice indica a habilidade de formação de basidiomas do fungo em um determinado substrato (FAN et al., 2006). No presente trabalho a eficiência biológica foi baixa e variou de 3,35 a 3,75%, dependendo do tipo de substrato utilizado.

O baixo resultado de eficiência pode estar associado à ventilação inadequada da sala de produção e também a falta de monitoramento e controle dos teores de CO₂. Neste sentido, Zied e Minihoni (2009) destacaram que fatores como temperatura do ambiente e do composto, bem como umidade relativa e níveis de CO₂ são fatores importantes para o controle e homogeneização da produção. No manual de cultivo de cogumelos das Nações Unidas também é ressaltado que fatores ambientais, incluindo iluminação, renovação do ar, e redução da temperatura podem promover a formação de basidiomas (http://www.unapcaem.org/publication/pub_trmucu.htm). Além disso, Fan, Soccol e Pandey (2008), sugeriram que a formação de basidiomas é bastante influenciada pelas condições fisiológicas e estado nutricional do micélio.

Lakshmi (2013b) ao investigar o cultivo de *G. lucidum* em resíduos do processamento da pesca misturado com resíduos agroindustriais detectou resultados semelhantes de eficiência biológica, variando de 0,92 a 4,63%. Ueitele, Kadhila-Muandingi e Matundu (2014), ao avaliar a produção desta mesma espécie em sabugo de milho, também verificaram baixa eficiência biológica, de 5,32%.

Altos valores de eficiência biológica foram registrados por Peksen e Yakupoglu, (2009), ao testar resíduos de chá como suplemento no cultivo de *G. lucidum*, 17,32 a 34,90%, utilizando 1 kg de substrato, 1% de CaCO₃ e 1% de sacarose. Manavalan et al. (2012), ao estudar bagaço de cana como substrato lignocelulósico para o crescimento da espécie, obtiveram valor ainda maior de eficiência biológica, 80±15%; evidencia-se que o cultivo foi realizado em 500 g desse substrato acrescido de 1% de CaCO₃, sendo umidificado a 80% e os níveis de CO₂ foram controlados em cada etapa do cultivo. Assim, observa-se que a quantidade de substrato empregado no cultivo, e conseqüentemente, de inóculo, bem como a adição de outros componentes e o conteúdo de água podem interferir no resultado de eficiência biológica. Além disso, é importante destacar que a composição química do bagaço de cana (50% celulose, 25% hemicelulose, 25% lignina) também pode ter contribuído para o alto valor de eficiência biológica obtido.

Suplementos como CaCO₃ devem ser acrescentados ao meio de cultivo por permitir a manutenção de pH favorável ao crescimento do fungo, principalmente, nos estágios finais de decomposição, quando ocorre aumento de acidez devido as reações do metabolismo (CAMPOS et al., 2010).

Segundo Peksen e Yakupoglu, (2009), a umidade do substrato sólido é um fator extremamente importante na fermentação em estado sólido, e 70% pode ser considerado um valor

crítico; umidade acima deste valor promove o crescimento do micélio de *G. lucidum*, abaixo, forma micélio mais lentamente. Em contrapartida, Yang, Hsieh e Chen (2003) mencionaram que o ótimo para a formação de basidiomas desta espécie foi determinado com 60% de conteúdo de água.

O rendimento biológico é a relação entre massa fresca do basidioma e massa seca do substrato inicial, sendo expresso em (g/kg) (ERKEL, 2009a). No presente estudo, o rendimento variou de 33,53 a 37,48 (g/kg). Este resultado foi bem próximo ao verificado por Azizi et al. (2012) ao investigar diferentes resíduos como substrato no cultivo de *G. lucidum*; 36,95 g/kg em serragem de *Fagus orientalis*. Estes mesmos autores destacaram a importância das proporções e combinações de serragem, farelo de trigo e extrato de malte empregados na formulação do substrato para produção comercial deste fungo. Erkel (2009b) observou valor de rendimento de 47,72 g/kg utilizando serragem de *Populus* como substrato.

Veena e Pandey (2011) observaram rendimento de 89,97 a 104,71 g/kg, quando *G. lucidum* foi cultivado em palha de arroz. Altos valores de rendimento também foram encontrados por Erkel (2009b), estudando o cultivo desta espécie em diferentes fontes de carbono e proteína. De acordo com este autor, 1% de melão foi o melhor suplemento e fonte de carbono, proporcionando rendimento de 73,20 g/kg. Nesse sentido, Hsieh, Hsu e Yang (2005), afirmaram que a adição de melão na fermentação proporcionou alto crescimento micelial e concentração celular, tendo em vista que os carboidratos são as principais fontes de carbono e energia para muitos fungos. Dessa forma, pode-se inferir que a formação de basidiomas depende, dentre outros fatores, de um bom desempenho micelial.

O peso de basidiomas colhidos por saco neste trabalho variou de 7,25 a 9,25 g. Em Yang, Hsieh e Chen (2003), o peso dos basidiomas produzidos em resíduos de grãos da vinhaça suplementados com farelo de trigo por *G. lucidum* foi de 10,25 a 26,80 g. Esses autores notaram que a adição de CaCO_3 e $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ocasionaram crescimento micelial rápido e significativo.

Mishra e Singh (2008) detectaram valores mais altos para este índice, 14,25 a 84,40 g, sendo que o maior peso foi verificado no substrato palha de trigo com adição de 5% de farelo de arroz e a ventilação para a formação de basidiomas foi considerada adequada. Esses autores apontaram que as diferenças de peso e, conseqüentemente, rendimento se devem as diferenças nutricionais dos substratos utilizados em experimento.

No presente trabalho, o início da formação de basidiomas foi registrado aos 46 e 52 dias de cultivo, e no 60º dia os basidiomas estavam completamente formados e prontos para serem colhidos e pesados. Entretanto, um período de tempo maior, 102 dias, foi requerido para formação de basidiomas de *G. lucidum* (LAKSHMI, 2013b). Conforme apontado em Hsieh e Yang (2004), o cultivo desta espécie em substratos convencionais, incluindo serragem, grãos e madeira necessita de 120 a 200 dias para o completo desenvolvimento de basidiomas pela fermentação em estado sólido.

5 CONCLUSÃO

- ✓ A linhagem de *G. lucidum* estudada é potencial produtora de enzimas modificadoras da lignina, como lacase e manganês peroxidase.
- ✓ Os resíduos lignocelulósicos de *S. coronata* (casca de fruto, bráctea e folha) também são potenciais substratos e podem ser utilizados para a produção de micélio e das enzimas ligninolíticas lacase e manganês peroxidase.
- ✓ O ótimo para a produção de micélio de *G. lucidum* foi verificado nas seguintes condições de cultivo: pH de 6,5, temperatura de 30°C e relação C/N de 40/1.
- ✓ Os resíduos lignocelulósicos de *S. coronata* (folha e bráctea), podem ser empregados no processo de bioconversão para a produção de basidiomas de *G. lucidum*.
- ✓ Fatores ambientais como níveis de CO₂, iluminação, temperatura e umidade são extremamente importantes e devem ser controlados, principalmente, nas etapas de emissão de primórdios e formação de basidiomas.
- ✓ O substrato casca de fruto de licuri apresentou em sua composição química baixos teores de extrativos, minerais e celulose, bem como maior percentual de lignina, quando comparado com os demais substratos avaliados, sugerindo que essa constituição deve ter contribuído para a não-formação de basidiomas de *G. lucidum* nesse substrato.
- ✓ Novos estudos envolvendo a produção de basidiomas de *G. lucidum* no substrato casca de fruto de licuri devem ser realizados, testando outras formas (pulverizada e em fragmentos menores) desse mesmo resíduo, com o objetivo de melhorar o acesso (penetração) das hifas do fungo no substrato e conseqüentemente, aumentar o potencial de degradação.
- ✓ Para aumentar a atividade enzimática de *G. lucidum* nos substratos utilizados sugere-se que outros parâmetros, incluindo agitação, suplementação com fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio e com diferentes fontes de carbono, além da adição de surfactantes sejam testados na fermentação em estado sólido.
- ✓ Visando maximizar rendimento e eficiência biológica, fatores como aumento do tamanho do saco de polipropileno, da quantidade de substrato e inóculo, bem como suplementação com outras fontes de carbono e nitrogênio e CaCO₃, além do controle efetivo dos níveis de umidade e CO₂ devem ser testados na produção de basidiomas.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**. v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ASGHER, M.; SHARIF, Y.; BHATTI, H. N. Enhanced production of ligninolytic enzymes by *Ganoderma lucidum* IBL-06 using lignocellulosic agricultural wastes. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**. v. 8, n. 59, p. 1-17, 2010.
- AZIZI, M. et al. Yield performance of Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr) P. Karst. (higher Basidiomycetes), using different waste materials as substrates. **International Journal of Medicinal Mushrooms**. v. 14, n. 5, p. 521-527, 2012.
- BABITSKAYA, V. G. et al. Polysaccharides of *Ganoderma lucidum*: factors affecting their production. **Applied Biochemistry and Microbiology**. v. 41, n. 2, p. 169-173, 2005.
- BAUER, L. C. et al. Chemical characterization of pressed and refined licuri (*Syagrus coronata*) oils. **Acta Scientiarum Technology**. v. 35, n. 4, p. 771-776, 2013.
- BELVISO, S. et al. Phenolic composition, antioxidant capacity and volatile compounds of licuri (*Syagrus coronata* (Martius) Beccari) fruits as affected by the traditional roasting process. **Food Research International**. v.51, p. 39-45, 2013.
- BERNARDI, E.; MINOTTO, E.; NASCIMENTO, J. S. Aproveitamento de resíduo de curtume como suplemento no cultivo de *Pleurotus ostreatus*. **Arq. Inst. Biol**. v. 75, n. 2, p. 243-246, 2008.
- BEROVIC, M. et al. Submerged cultivation of *Ganoderma lucidum* biomass and immunostimulatory effects of fungal polysaccharides. **Journal of Biotechnology**. v.103, p. 77-86, 2003.
- BLACKWEL, M. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1million species? **American Journal of Botany**. v. 98, n. 3, p. 426-438, 2011.
- BONONI, V. L. et al. **Cultivo de cogumelos comestíveis**. 2ª ed. São Paulo: Ícone, 1999. 206 p.
- BORTOLASSI, J. R. et al. Comparação dos métodos convencional e Filter Bag Technique da Ankom® (FBT) para determinação de fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido. **Acta Scientiarum**. v. 22, n. 3, p. 807-811, 2000.
- CAMPOS, C. S; ANDRADE, M. C. N. Aproveitamento de resíduos madeireiros para o cultivo do cogumelo comestível *Lentinus strigosus* de ocorrência na Amazônia. **Acta Amazonica**. v. 41, n. 1, p. 1-8, 2011.
- CAMPOS, C. S. et al. Análise físico-química e composição nutricional da matéria prima e de substratos pré e pós cultivo de *Pleurotus ostreatus*. **Interciência**. v. 35, n.1, p. 70-76, 2010.
- CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 70, p. 181-184, 1967.
- CHANG, S. T. Global impact of edible and medicinal mushrooms on human welfare in the 21st century: nongreen revolution. **International Journal of Medicinal Mushrooms**. v. 1, 1-7, 1999.

CHANG, S. T. Mushroom biology: the impact on mushroom production and mushroom products. In: CHANG, S. T.; BUSWELL, J. A.; CHIU, S. W. **Mushroom biology and mushroom products**. Hongkong: The Chinese University Press, 1993. p. 3-20.

CHANG, S. T.; MILES, P. G. Mushroom Biology - a new discipline. **Mycologist**. v. 6, p. 64-65, 1992.

CHANG, S. T.; MILES, P. G. **Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact**. 2^a ed. Boca Raton, London, New York, Washington, D. C.: CRC Press, 2004. 451 p.

CHEN, A. W. Growing *Ganoderma* Mushrooms. In: **Mushroom Growers' Handbook 1 - Oyster Mushroom Cultivation**. Haeng-oon Bldg: MushWorld, 2004. p. 224-234.

CHO, S. B. What is mushroom. In: **Mushroom Growers' Handbook 1 - Oyster Mushroom Cultivation**. Haeng-oon Bldg: MushWorld, 2004. p. 1-3.

CLEMENTINO, L. S.; ROSADO, F. R. Cultivo submerso de *Ganoderma lucidum* (Curt. ex. Fr.) Karst em diferentes meios de cultura. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**. v. 4, n. 1, p. 131-144, 2011.

COSTA, S. M.; COIMBRA, L. B.; SILVA, E. S. Crescimento micelial de dois isolados de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, em resíduos ligninocelulósicos. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**. v. 30, n. 2, p. 192-196, 2008.

D'AGOSTINI, E. C. et al. Low carbon/nitrogen ratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation. **Scientia Agricola**. v. 68, n.3, p. 295-300, 2011.

D'SOUZA, T. M.; BOOMINATHAN, K.; REDDY, C. A. Isolation of laccase gene-specific sequences from white rot and brown rot fungi by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 62, n. 10, p. 3739-3744, 1996.

D'SOUZA, T. M.; MERRITT, C. S.; REDDY, C. A. Lignin-modifying enzymes of the white rot Basidiomycete *Ganoderma lucidum*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 65, n. 12, p. 5307-5313, 1999.

DENTINGER, B. T. M.; MARGARITESCU, S.; MONCALVO, J. M. Rapid and reliable high-throughput methods of DNA extraction for use in barcoding and molecular systematic of mushrooms. **Molecular Ecology Resources**. v. 10, p. 628-633, 2010.

DRUMOND, M. A. **Licuri *Syagrus coronata* (Mart.) Becc.** 1^a ed. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2007. 16 p.

DURÁN, N. Enzimas ligninolíticas. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2^a ed. Caxias do Sul: EDUCS, 2010. 638 p.

EIRA, A. F. Fungos comestíveis. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 2004. p. 379-450.

ERKEL, E. I. The effect of different substrate mediums on yield of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. **Journal of Food, Agriculture & Environment**. v. 7, p. 841-844, 2009a.

- ERKEL, E. I. Yield performance of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst cultivation on substrates containing different protein and carbohydrate sources. **African Journal of Agricultural Research**. v. 4, n. 11, p. 1331-1333, 2009b.
- FAN, L. Effect of caffeine and tannins on cultivation and fructification of *Pleurotus* on coffee husks. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 37, p. 420-424, 2006.
- FAN, L.; DING, C. K. **Handbook of mushrooms cultivation**. Jiangxi: Jiangxi Science and Technology Publishing House. 1990.
- FAN, L.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Mushroom production. In: PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Current Developments in Solid-state Fermentation**. New York: Springer, 2008. p. 253-274.
- FERRAZ, A. L. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2ª ed. Caxias do Sul: EDUCS, 2010. 638 p.
- GALVAGNO, M. A.; FORCHIASSIN, F. Fisiologia dos fungos: nutrição e metabolismo. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2ª ed. Caxias do Sul: EDUCS, 2010. 638 p.
- GARCIA, C. H. **Tabelas para classificação do coeficiente de variação**. Piracicaba: IPEF, 1989. 10 p.
- GHOSH, M.; MUKHERJEE, R.; NANDI, B. Production of extracellular enzymes by two *Pleurotus* species using banana pseudostem biomass. **Acta Biotechnologica**. v. 18, p. 243-254, 1998.
- GÓES-NETO, A.; LOGUERCIO-LEITE, C.; GUERRERO, R. T. DNA extraction from frozen field-collected and dehydrated herbarium fungal basidiomata with high content of secondary metabolites and/or polysaccharides: performance of SDS and CTAB-based methods. **Biotemas**. v. 18, n. 2, p. 19-32, 2005.
- GURUNG, O. K.; BUDATHOKI, U.; PARAJULI, G. Effect of different substrates on the production of *Ganoderma lucidum* (Curt.:Fr.) Karst. **Our Nature**. v. 10, p. 191-198, 2012.
- HAFIZ, F. Cultivation of Polypore Mushroom (*Ganoderma resinaceum*). **Bangladesh J. Sci. Ind. Res.** v. 42, n. 2, p. 115-120, 2007.
- HAN, J. R.; AN, C. H.; YUAN, J. M. Solid-state fermentation of cornmeal with the basidiomycete *Ganoderma lucidum* for degrading starch and upgrading nutritional value. **Journal of Applied Microbiology**. v. 99, p. 910-915, 2005.
- HARIHARAN, S.; NAMBISAN, P. Optimization of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and lac production from *Ganoderma lucidum* under solid state fermentation of pineapple leaf. **BioResources**. v. 8, n. 1, p. 250-271, 2013.
- HAWKSWORTH, D. L. Mushrooms: the extent of the unexplored potential. **International Journal of Medicinal Mushrooms**. v. 3, p. 333-337, 2001a.
- HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1±5 million species estimate revisited. **Mycol. Res.** v. 105, n. 12, p. 1422-1432, 2001b.

HSIEH, C.; HSU, T. H.; YANG, F. C. Production of polysaccharides of *Ganoderma lucidum* (CCRC36021) by reusing thin stillage. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 909-916, 2005.

HSIEH, C.; YANG, F. C. Reusing soy residue for the solid-state fermentation of *Ganoderma lucidum*. **Bioresource Technology**. v. 91, p. 105-109, 2004.

ISIKHUEMHEN, O. S.; MIKIASHVILI, N. A.; KELKAR, V. Application of solid waste from anaerobic digestion of poultry litter in *Agrocybe aegerita* cultivation: mushroom production, lignocellulolytic enzymes activity and substrate utilization. **Biodegradation**. v. 20, p. 351-361, 2009.

JONG, S. C.; BIRMINGHAM, J. M. Medicinal benefits of the mushroom *Ganoderma*. **Advances in Applied Microbiology**. v. 37, p. 101-134, 1992.

JUNIOR, L. L. Z.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B. Carbon-to-nitrogen ratios for *Agaricus brasiliensis* on the axenic method. **Acta Scientiarum Agronomy**. v. 32, n. 1, p. 55-60, 2010.

KATOH, K.; ASIMENOS, G.; TOH, H. Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. **Methods in Molecular Biology**. v. 537, p. 39-64, 2009.

KUWAHARA, M. et al. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**. v. 169, n. 2, p. 247-250, 1984.

LAKSHMI, S. S. Comparative study on mycelia growth rate of *Ganoderma lucidum* and *Pleurotus flabellatus* on agro-wastes. **International Journal of Advanced Research**. v. 1, p. 199-203, 2013a.

LAKSHMI, S. S. *In vivo* utilization of seafood processing wastes for cultivation of the medicinal mushroom (*Ganoderma lucidum*) using agro-industrial waste. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**. v. 6, p. 51-54, 2013b.

LEE, H. et al. Production of *Ganoderma lucidum* mycelium using cheese whey as an alternative substrate: response surface analysis and biokinetics. **Biochemical Engineering Journal**. v. 15, p. 93-99, 2003.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. 352 p.

MANAVALAN, T. et al. Secretome analysis of *Ganoderma lucidum* cultivated in sugarcane bagasse. **Journal of Proteomics**. v. 77, p. 298-309, 2012.

MANTOVANI, T. R. D.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B. Effect of the addition of nitrogen sources to cassava fiber and carbon-to-nitrogen ratios on *Agaricus brasiliensis* growth. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 53, p. 139-143, 2007.

MARTÍNEZ-CARRERA, D.; AGUILAR, A.; MARTÍNEZ, W. Commercial production and marketing of edible mushrooms cultivated on coffee pulp in Mexico. In: SERA, T. et al. **Coffee Biotechnology and Quality**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000.

MATA, G.; SAVOIE, J. M. Improvement of spawn for cultivation in alternative substrates. In: GUSH, R. **Mushroom's Grower's Handbook 2**. Seoul: MushWorld, 2005.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**. v. 60, n. 6, p. 551-565, 2002.

MEHBOOB, N. et al. Production of lignin peroxidase by *Ganoderma leucidum* using solid state fermentation. **African Journal of Biotechnology**. v. 10, n. 48, p. 9880-9887, 2011.

MENEZES, C. R.; SILVA, I. S.; DURRANT, L. R. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninocelulolíticas. **Estudos Tecnológicos**. v. 5, n. 1, p. 68-78, 2009.

MISHRA, K. K.; SINGH, R. P. Evaluation of substrate for production of Ling Zhi or Reishi medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr.) P. Karst. (Aphyllophoromycetidae). **International Journal of Medicinal Mushrooms**. v. 10, n. 4., p. 379-381, 2008.

MORAIS, J. P. S.; ROSA, M. F.; MARCONCINI, J. M. **Procedimentos para análise lignocelulósica**. 1ª ed. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2010. 54 p.

NEVES, M. A. et al. **Guide to the common Fungi of the semiarid region of Brazil**. Florianópolis: TECC, 2013. 131 p.

NILADEVI, K. N. Ligninolytic Enzymes. In: SINGH NEE' NIGAM, P.; PANDEY, A. **Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation**. New York: Springer, 2009. 466 p.

NOBLICK, L. R, 1991. The indigenous palms of the state of Bahia. PhD Thesis (University of Illinois at Chicago).

PAPINUTTI, V. L.; DIORIO, L. A.; FORCHIASSIN, F. Production of laccase and manganese peroxidase by *Fomes sclerodermeus* grown on wheat bran. **J. Ind Microbiol Biotechnol**. v. 30, p. 157-160, 2003.

PATERSON, R. R. M. *Ganoderma* disease of oil palm: a white rot perspective necessary for integrated control. **Crop Protection**. v. 26, p. 1369-1376, 2007.

PEKSEN, A.; YAKUPOGLU, G. Tea waste as a supplement for the cultivation of *Ganoderma lucidum*. **World J Microbiol Biotechnol**. v. 25, p. 611-619, 2009.

PERUMAL, K.; KALAICHELVAN, P. T. Production of extracellular lignin peroxidase and laccase by *Ganoderma lucidum* PTK₃ on sugarcane bagasse lignin. **Indian Journal of Experimental Biology**. v. 34, p. 1121-1125, 1996.

PHILIPPOUSSIS, A. N. Production of mushrooms using agro-industrial residues as substrates. In: SINGH NEE' NIGAM, P.; PANDEY, A. **Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation**. New York: Springer, 2009. 466 p.

PINO, V. et al. Determination of the alkyl- and methoxy-phenolic content in wood extractives by micellar solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Talanta**. v. 73, p. 505-513, 2007.

POSTEMSKY, P. D.; DELMASTRO, S. E.; CURVETTO, N. R. Effect of edible oils and Cu (II) on the biodegradation of rice by-products by *Ganoderma lucidum* mushroom. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 93, p. 25-32, 2014.

- QUIMIO, T. H. Why grow mushrooms. In: **Mushroom Growers' Handbook 1 - Oyster Mushroom Cultivation**. Haeng-oon Bldg: MushWorld, 2004. p. 4-12.
- RAI, R. D.; KAMAL, S.; SINGH, S. K. Effect of wheat bran supplementation to the sawdust substrate on mycelia growth rate and production of extracellular degradative enzymes by the medicinal Reishi mushroom *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr.) Lloyd (Aphyllophoromycetidae). **International Journal of Medicinal Mushrooms**. v. 6, p. 375-382, 2004.
- REIS, M. F. et al. Análise de substratos alternativos para o cultivo de *Pleurotus ostreatoroseus* e *Pleurotus florida*. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**. v. 3, n. 2, p. 79-91, 2010.
- ROYSE, D. J. Foreword to the fifth international conference on mushrooms biology and mushroom products. **Acta Edulis Fungi**. v. 12, p. 1-2, 2005.
- RUFINO, M. U. L. et al. Conhecimento e uso do ouricuri (*Syagrus coronata*) e do babaçu (*Orbignya phalerata*) em Buíque, PE, Brasil. **Acta bot. bras.** v. 22, n. 4, p. 1141-1149, 2008.
- SALLES, K. T. S. et al. Characterization of *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. oil and properties of methyl esters for use as biodiesel. **Industrial Crops and Products**. v. 32, p. 518-521, 2010.
- SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**. v. 27, p. 185-194, 2009.
- SCHNEIDER, P. et al. Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase. **Enzyme Microbial Technology**. v. 25, p. 502-528, 1999.
- SHI, M. et al. Evaluation of solid-state fermentation by *Ganoderma lucidum* using soybean curd residue. **Food Bioprocess Technol.** v. 6, p. 1856-1867, 2013.
- SILVA, C. M. M. S.; MELO, I. S.; OLIVEIRA, P. R. Ligninolytic enzyme production by *Ganoderma* spp. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 37, p. 324-329, 2005.
- SILVA, M.; ESPOSITO, E. O papel dos fungos na recuperação ambiental. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2ª ed. Caxias do Sul: EDUCS, 2010. 638 p.
- SILVÉRIO, F. O. et al. Metodologia de extração e determinação do teor de extrativos em madeiras de eucalipto. **R. Árvore**. v. 30, n. 6, p. 1009-1016, 2006.
- SIMONIC, J. et al. Intraspecific diversity within *Ganoderma lucidum* in the production of laccase and Mn-oxidizing peroxidases during plant residues fermentation. **Appl Biochem Biotechnol.** v. 162, p. 408-415, 2010.
- SILVA, C. M. M. S.; MELO, I. S.; OLIVEIRA, P. R. **Produção de enzimas ligninolíticas por fungos isolados de solos sob cultivo de arroz irrigado**. 1ª ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 18 p.
- STAJIĆ, M. et al. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. **Enzyme and Microbial Technology**. n. 38, p. 65-73, 2006.

- STAJIĆ, M. et al. Wheat straw conversion by enzymatic system of *Ganoderma lucidum*. **BioResources**. v. 5, n. 4, p. 2362-2373, 2010.
- TAN, Y. H.; WAHAB, M. N. Extracellular enzyme production during anamorphic growth in the edible mushroom, *Pleurotus sajor caju*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v. 13, p. 613-617, 1997.
- STAMETS, P. **Growing gourmet and medicinal mushrooms**. Berkeley: Ten Speed Press, 1993. 554 p.
- STAMETS, P. **Growing gourmet and medicinal mushrooms**. 3rd ed. California: Ten Speed Press, 2000.
- UEITELE, I. S. E.; KADHILA-MUANDINGI, N. P.; MATUNDU, N. Evaluating the production of *Ganoderma* mushroom on corn cobs. **African Journal of Biotechnology**. v. 13, n. 22, p. 2215-2219, 2014.
- URBEN, A. F. **Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada**. 2ª ed. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 186 p.
- VEENA, S. S.; PANDEY, M. Paddy straw as a substrate for the cultivation of Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr) P. Karst in India. **International Journal of Medicinal Mushrooms**. v. 13, n. 4, p. 397-400, 2011.
- WANG, H. H. Development and/or reclamation of bioresources with solid state fermentation. **Proc Nat Sci Counc**. v. 23, n. 2, p. 45-61, 1999.
- WINQUIST, E. et al. Production of lignin modifying enzymes on industrial waste material by solid-state cultivation of fungi. **Biochemical Engineering Journal**. v. 42, p. 128-132, 2008.
- YANG, F. C.; HSIEH, C.; CHEN, H. M. Use of stillage grain from a rice-spirit distillery in the solid state fermentation of *Ganoderma lucidum*. **Process Biochemistry**. v. 39, p. 21-26, 2003.
- ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 1ª ed. digital. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.
- ZERVAKIS, G. I.; KOUTROTSIOS, G.; KATSARIS, P. Composted versus raw olive mill waste as substrates for the production of medicinal mushrooms: an assessment of selected cultivation and quality parameters. **BioMed Research International**. p. 1-13, 2013.
- ZHANG, X. et al. Degradation of wood extractives in thermo-mechanical pulp by soybean lipoxygenase. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 40, p. 866-873, 2007.
- ZIED, D. C.; MINHONI, M. T. A. Influência do ambiente de cultivo na produção do cogumelo *Agaricus blazei* SS. Heinemann (*A. brasiliensis*). **Revista Energia na Agricultura**. v. 24, n.1, p. 17-34, 2009.
- ZILY, A. et al. Solid-state bioconversion of passion fruit waste by white-rot fungi for production of oxidative and hydrolytic enzymes. **Food Bioprocess Technol**. v. 5, p. 1573-1580, 2012.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Sequências originadas da linhagem de *Ganoderma lucidum*

Repetição 1

CATAAAGCTGTCTCACAAACGAGACGGTTAGAAGCTCGCCAAAACGCTTCACGGTCACGGCGT
 AGACATTATCACACCGAGAGCCGATCCGCAAGGAATCAAGCTAATACATTTAAGAGGAGCCGA
 CCGAAACACGGCCGACAAGCCTCCAAGTCCAAGCCTACAAACCCGCAAAGGTTTGTAAGTTGA
 AGATTTTCATGACACTCAAACAGGCATGCTCCTCGGAATACCAAGGAGCGCAAGGTGCGTTCAA
 AGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATC
 GATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGCTGAAAGTTGTACATAGATGCGTTACATCGCAATACAC
 ATTCTAATACTTTATAGAGTTTG

Repetição 2

AGGTCATAAAGCTGTCTCACAAACGAGACGGTTAGAAGCTCGCCAAAACGCTTCACGGTCACG
 GCGTAGACATTATCACACCGAGAGCCGATCCGCAAGGAATCAAGCTAATACATTTAAGAGGAG
 CCGACCGAAACACGGCCGACAAGCCTCCAAGTCCAAGCCTACAAACCCGCAAAGGTTTGTAAG
 TTGAAGATTTTCATGACACTCAAACAGGCATGCTCCTCGGAATACCAAGGAGCGCAAGGTGCGT
 TCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTT
 CATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGCTGAAAGTTGTACATAGATGCGTTACATCGCAAT
 ACACATTCTAATACTTTATA

Repetição 1

AGGTCATAAAGCTGTCTCACAAACGAGACGGTTAGAAGCTCGCCAAAACGCTTCACGGTCACG
 GCGTAGACATTATCACACCGAGAGCCGATCCGCAAGGAATCAAGCTAATACATTTAAGAGGAG
 CCGACCGAAACACGGCCGACAAGCCTCCAAGTCCAAGCCTACAAACCCGCAAAGGTTTGTAAG
 TTGAAGATTTTCATGACACTCAAACAGGCATGCTCCTCGGAATACCAAGGAGCGCAAGGTGCGT
 TCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCT

Repetição 2

AGGTCATAAAGCTGTCTCACAAACGAGACGGTTAGAAGCTCGCCAAAACGCTTCACGGTCACG
 GCGTAGACATTATCACACCGAGAGCCGATCCGCAAGGAATCAAGCTAATACATTTAAGAGGAG
 CCGACCGAAACACGGCCGACAAGCCTCCAAGTCCAAGCCTACAAACCCGCAAAGGTTTGTAAG
 TTGAAGATTTTCATGACACTCAAACAGGCATGCTCCTCGGAATACCAAGGAGCGCAAGGTGCGT
 TCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTT
 CATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGCTGAAAGTTGTACATAGATGCGTTACATCGCAAT
 ACACATTCTAATACTTTATAGAGTTTGTGGTAAACGCAGGCACAGACACGCT

Repetição 3

GGTCATAAAGCTGTCTCACAAACGAGACGGTTAGAAGCTCGCCAAAACGCTTCACGGTCACGG
 CGTAGACATTATCACACCGAGAGCCGATCCGCAAGGAATCAAGCTAATACATTTAAGAGGAGC
 CGACCGAAACACGGCCGACAAGCCTCCAAGTCCAAGCCTACAAACCCGCAAAGGTTTGTAAGT
 TGAAGATTTTCATGACACTCAAACAGGCATGCTCCTCGGAATACCAAGGAGCGCAAGGTGCGTT
 CAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTT
 ATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGCTGAAAGTTGTACATAGATGCGTTACATCGCAATA
 CACATTCTAATACTTTATAGAGT

Sequência consenso

AGGTCATAAAGCTGTCTCACAAACGAGACGGTTAGAAGCTCGCCAAAACGCTTCACGGTCACG
GCGTAGACATTATCACACCGAGAGCCGATCCGCAAGGAATCAAGCTAATACATTTAAGAGGAG
CCGACCGAAACACGGCCGACAAGCCTCCAAGTCCAAGCCTACAAACCCGCAAAGGTTTGTAAG
TTGAAGATTTTCATGACTCAAACAGGCATGCTCCTCGGAATACCAAGGAGCGCAAGGTGCGT
TCAAAGATTTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCTT
CATCGATGCGAGAGCCAAGAGATCCGTTGCTGAAAGTTGTACATAGATGCGTTACATCGCAAT
ACACATTCTAATACTTTATAGAGTTTGTGGTAAACGCAGGCACAGACACGCT

APÊNDICE B – Gráficos de atividade enzimática (MnP)

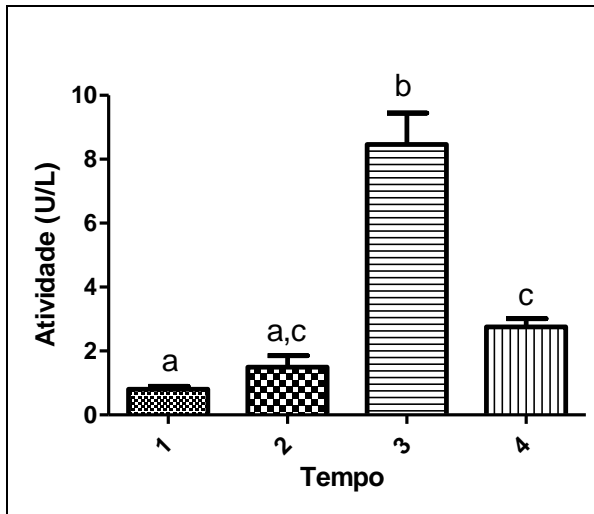


Figura 32: Atividade enzimática de MnP por *G. lucidum* cultivado no substrato casca de fruto de licuri. Tempo 1-4= período de incubação (7,14,21,28 dias), respectivamente. Letras distintas significa que as médias diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

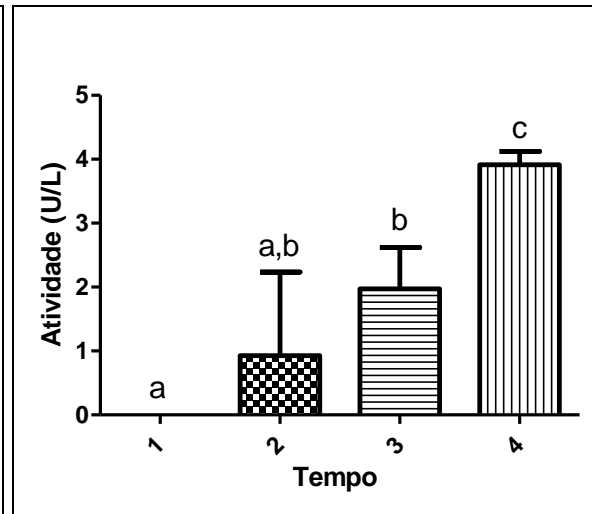


Figura 33: Atividade enzimática de MnP por *G. lucidum* cultivado no substrato folha de licuri. Tempo 1-4= período de incubação (7,14,21,28 dias), respectivamente. Letras distintas significa que as médias diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

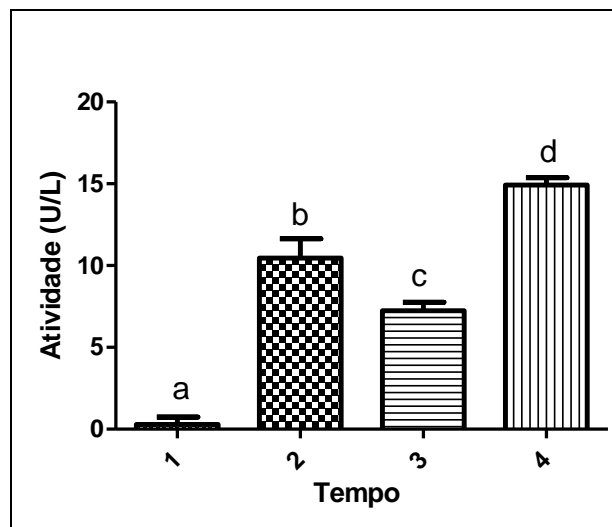


Figura 34: Atividade enzimática de MnP por *G. lucidum* cultivado no substrato bráctea de licuri. Tempo 1-4= período de incubação (7,14,21,28 dias), respectivamente. Letras distintas significa que as médias diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

APÊNDICE C – Gráficos de atividade enzimática (LAC)

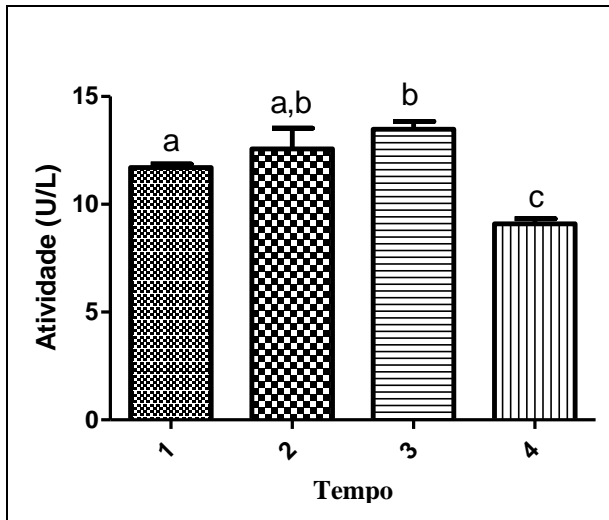


Figura 35: Atividade enzimática de LAC por *G. lucidum* cultivado no substrato casca de fruto de licuri. Tempo 1-4= período de incubação (7,14,21,28 dias), respectivamente. Letras distintas significa que as médias diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

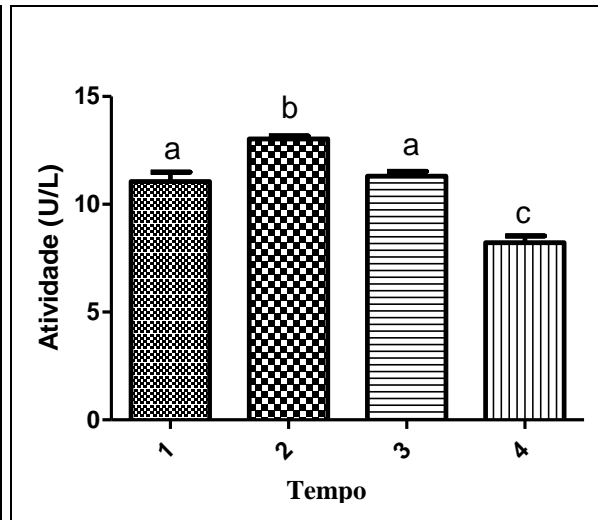


Figura 36: Atividade enzimática de LAC por *G. lucidum* cultivado no substrato folha de licuri. Tempo 1-4= período de incubação (7,14,21,28 dias), respectivamente. Letras distintas significa que as médias diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

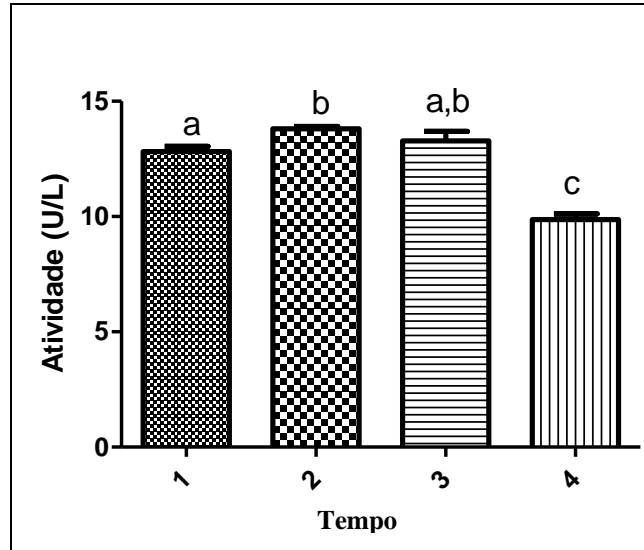


Figura 37: Atividade enzimática de LAC por *G. lucidum* cultivado no substrato bráctea de licuri. Tempo 1-4= período de incubação (7,14,21,28 dias), respectivamente. Letras distintas significa que as médias diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

APÊNDICE D – Fotos dos resíduos de licuri triturados



Figura 38: Fotos dos resíduos de *S. coronata* após trituração. **a.** Bráctea. **b.** Folha. **c.** Casca de fruto. **d.** Bráctea pulverizada. **e.** Folha pulverizada. **f.** Casca de fruto pulverizada.

APÊNDICE E – Fotos dos ensaios para determinação de atividade enzimática

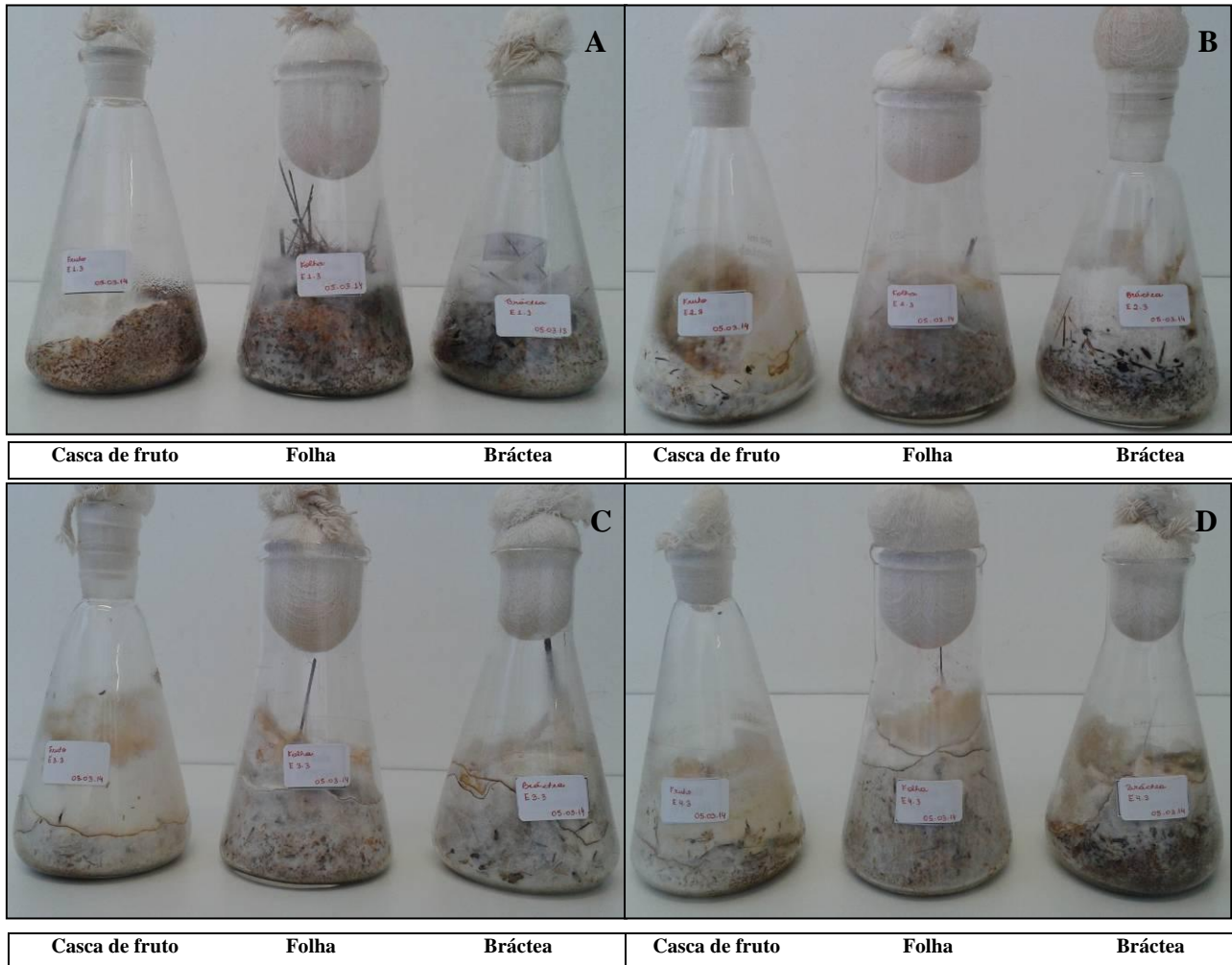


Figura 39: Cultivo de *G. lucidum*, em resíduos de licuri com 7, 14, 21 e 28 dias de incubação (A, B, C e D), respectivamente.

APÊNDICE F – Fotos do experimento produção de basidiomas



Figura 40: Cultivo de *G. lucidum* em grão de trigo para produção da semente (*spawn*) no 14º dia de incubação.

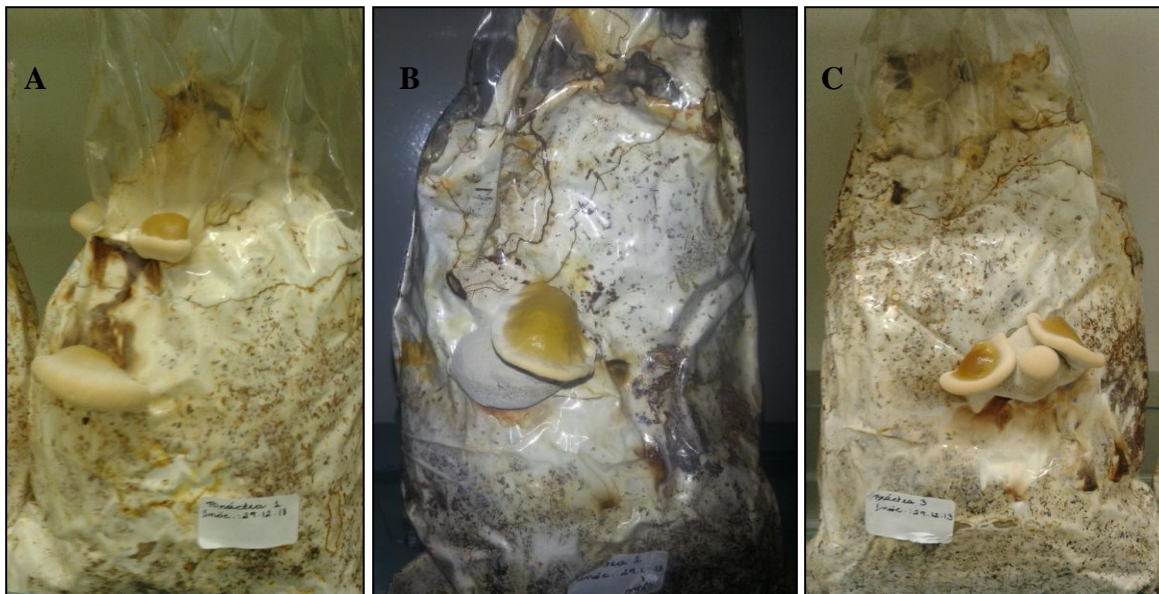


Figura 41: Início da formação de basidiomas de *G. lucidum* no substrato bráctea de licuri. (A,B,C)= são repetições do mesmo ensaio.



Figura 42: Início da formação de basidiomas de *G. lucidum* no substrato folha de licuri.

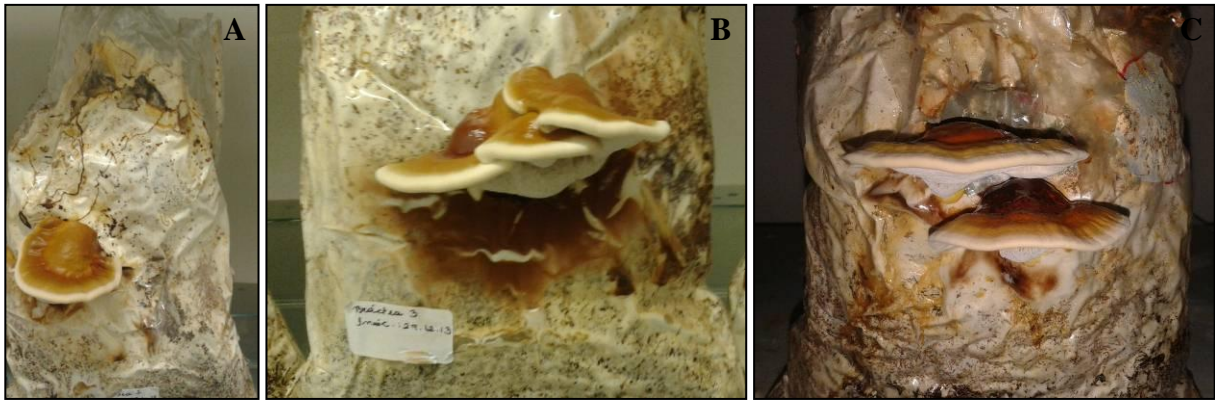


Figura 43: Desenvolvimento de basidiomas de *G. lucidum* no substrato bráctea de licuri. (A, B, C)= são repetições do mesmo ensaio.



Figura 44: Basidiomas de *G. lucidum* coletados do substrato bráctea de licuri.



Figura 45: Basidiomas de *G. lucidum* coletados do substrato folha de licuri.

APÊNDICE G – Fórmulas utilizadas na realização de cálculos

Tabela 16: Fórmulas utilizadas nos cálculos de determinações químicas e dos índices de avaliação da produção de basidiomas

Determinação	Variáveis
Cinzas totais (%) = $\frac{\text{massa de cinza (g)} \times 100}{\text{massa (g) da amostra}}$	
Nitrogênio (%) = $\frac{V \times N \times f \times 0,014 \times 100}{P}$	V= volume HCl (mL) N= normalidade do HCl f = fator de correção do HCl P= peso da amostra em (g)
Proteína total (%) = N (%) x 6,25	%N= porcentagem de Nitrogênio
Carbono (%) = (massa seca - conteúdo de cinzas) x 0,5	
PMO (%) ^a = $\frac{\text{peso seco subs. inic.} - \text{peso seco subs. resi.}}{\text{peso seco substrato inicial}} \times 100$	peso subs. inic.= substrato inicial (g) peso subs. resi.= substrato residual (g)
EB (%) ^b = $\frac{\text{peso fresco cogumelos}}{\text{peso seco subs. inic.}} \times 100$	peso fresco cogumelo= (g) peso subs. inic.= substrato inicial (g)
R (g/kg) ^c = $\frac{\text{peso fresco cogumelo}}{\text{peso seco subs. inic.}}$	peso fresco cogumelo= (g) peso substrato inicial= (kg)
PMO ^a = perda da matéria orgânica; EB ^b = eficiência biológica; R ^c = rendimento	

APÊNDICE H – Formulação dos substratos de cultivo

Tabela 17: Formulação dos substratos de cultivo para a produção de enzimas e basidiomas

Tipo de substrato	Farelo de trigo (g)	Volume de solução de sais (mL) 60% umidade
Experimento produção enzimática		
Casca de fruto (20 g)	7,90	36,61
Bráctea (20 g)	4,16	31,67
Folha (20 g)	4,40	31,80
Experimento produção de basidiomas		
Casca de fruto (200 g)	78,96	366,08
Bráctea (200 g)	41,65	316,71
Folha (200 g)	44,00	318,05

Tabela 18: Formulação do substrato de cultivo (casca de fruto) para realização do ensaio em placas de Petri

Ensaio	Farelo de trigo (g)	Casca de fruto (g)	Ágar (g)	Volume de solução de sais (mL) 60% umidade
1	0,97	1,0	0,9	60
2	0,97	1,0	0,9	60
3	0,97	1,0	0,9	60
4	0,97	1,0	0,9	60
5	0,199	1,0	0,9	60
6	0,199	1,0	0,9	60
7	0,199	1,0	0,9	60
8	0,199	1,0	0,9	60
9	0,39	1,0	0,9	60
10	0,39	1,0	0,9	60
11	0,39	1,0	0,9	60
12	0,39	1,0	0,9	60
13	3,20	1,0	0,9	60
14	0,13	1,0	0,9	60
15-18	1,57	4,0	3,6	240

Tabela 19: Formulação do substrato de cultivo (bráctea) para realização do ensaio em placas de Petri

Ensaio	Farelo de trigo (g)	Bráctea (g)	Ágar (g)	Volume de solução de sais (mL) 60% umidade
1	0,70	1,0	0,9	60
2	0,70	1,0	0,9	60
3	0,70	1,0	0,9	60
4	0,70	1,0	0,9	60
5	0,042	1,0	0,9	60
6	0,042	1,0	0,9	60
7	0,042	1,0	0,9	60
8	0,042	1,0	0,9	60
9	0,21	1,0	0,9	60
10	0,21	1,0	0,9	60
11	0,21	1,0	0,9	60
12	0,21	1,0	0,9	60
13	2,60	1,0	0,9	60
14	0,003	1,0	0,9	60
15-18	0,826	4,0	3,6	240

Tabela 20: Formulação do substrato de cultivo (folha) para realização do ensaio em placas de Petri

Ensaio	Farelo de trigo (g)	Folha (g)	Ágar (g)	Volume de solução de sais (mL) 60% umidade
1	0,703	1,0	0,9	60
2	0,703	1,0	0,9	60
3	0,703	1,0	0,9	60
4	0,703	1,0	0,9	60
5	0,056	1,0	0,9	60
6	0,056	1,0	0,9	60
7	0,056	1,0	0,9	60
8	0,056	1,0	0,9	60
9	0,22	1,0	0,9	60
10	0,22	1,0	0,9	60
11	0,22	1,0	0,9	60
12	0,22	1,0	0,9	60
13	2,57	1,0	0,9	60
14	0,003	1,0	0,9	60
15-18	0,88	4,0	3,6	240

APÊNDICE I – Avaliação diária de crescimento micelial (raio) de *G. lucidum* nos substratos de cultivo

Tabela 21: Valores médios de crescimento micelial (raio) de *G. lucidum* no substrato casca de fruto em 5 dias de cultivo

Ensaio	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia
E1	0,00	0,70	1,30	2,10	2,80
E2	0,40	1,30	2,00	3,15	4,03
E3	0,00	0,70	1,20	1,85	2,50
E4	0,30	1,05	1,88	2,90	4,00
E5	0,30	0,70	1,20	1,95	2,60
E6	0,40	1,10	1,93	2,90	3,70
E7	0,30	0,85	1,53	2,25	2,95
E8	0,30	1,18	1,95	2,80	3,70
E9	0,00	0,40	0,88	1,35	1,95
E10	0,50	1,40	2,50	3,70	4,25
E11	0,00	0,85	1,70	2,60	3,25
E12	0,00	1,00	1,60	2,38	3,30
E13	0,38	1,10	2,00	3,00	3,95
E14	0,30	1,00	1,80	2,68	3,40
E15	0,30	0,95	1,75	2,70	3,63
E16	0,40	1,00	1,85	2,70	3,58
E17	0,30	1,10	1,90	2,80	3,65
E18	0,30	1,10	1,88	2,85	3,75

Tabela 22: Valores médios de crescimento micelial (raio) de *G. lucidum* no substrato bráctea em 5 dias de cultivo

Ensaio	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia
E1	0,00	0,80	1,30	2,00	2,88
E2	0,40	1,25	2,05	3,00	3,98
E3	0,00	0,90	1,40	2,00	2,80
E4	0,55	1,33	2,00	2,98	3,85
E5	0,00	0,83	1,30	2,00	2,50
E6	0,50	1,30	2,00	2,95	3,75
E7	0,00	0,90	1,30	2,00	2,50
E8	0,45	1,30	1,93	2,90	3,75
E9	0,00	0,60	1,10	1,53	2,20
E10	0,70	1,60	2,40	3,50	4,25
E11	0,40	1,10	1,88	2,63	3,48
E12	0,50	1,15	1,80	2,68	3,50
E13	0,50	1,20	1,90	2,90	3,83
E14	0,60	1,20	1,80	2,65	3,45
E15	0,40	1,20	1,80	2,70	3,50
E16	0,40	1,13	1,80	2,65	3,50
E17	0,40	1,10	1,80	2,63	3,50
E18	0,40	1,10	1,80	2,65	3,48

Tabela 23: Valores médios de crescimento micelial (raio) de *G. lucidum* no substrato folha em 5 dias de cultivo

Ensaio	1º dia	2º dia	3º dia	4º dia	5º dia
E1	0,40	1,00	1,50	2,30	3,00
E2	0,60	1,50	2,50	3,65	4,25
E3	0,40	0,90	1,50	2,13	2,80
E4	0,50	1,45	2,38	3,48	4,25
E5	0,38	1,00	1,65	2,15	2,95
E6	0,60	1,45	2,10	3,10	3,85
E7	0,50	1,18	1,70	2,13	2,90
E8	0,60	1,40	2,30	3,00	4,05
E9	0,00	0,60	1,08	1,60	2,25
E10	0,60	1,50	2,58	3,70	4,25
E11	0,50	1,43	2,28	3,30	4,10
E12	0,50	1,30	2,23	3,13	4,03
E13	0,55	1,33	2,30	3,33	4,25
E14	0,60	1,40	2,28	3,10	3,98
E15	0,60	1,40	2,30	3,13	4,00
E16	0,60	1,40	2,25	3,00	4,00
E17	0,60	1,35	2,23	3,08	4,00
E18	0,60	1,40	2,30	3,10	3,98

APÊNDICE J – Dados referentes aos cálculos de atividade enzimática (MnP) nos substratos de cultivo

MnP leitura 1

Fruto	F controle	Diferença
0,896861	0	0,896861
0,717489		0,717489
0,807175		0,807175
0,896861	0,7174888	0,807175

MnP leitura 1

Folha	F controle	Diferença
0	0,029895	0
0		0
0		0
0	0	0

MnP leitura 1

Bráctea	F controle	Diferença
1,704036	0,956652	0,747384
1,255605		0,298954
0,807175		-0,14948
0,747384	0,298954	-0,14948

MnP Leitura 2

Fruto	F controle	Diferença
1,973094	0,5381166	1,434978
1,704036		1,165919
2,421525		1,883408
1,434978	1,1659193	1,883408

MnP Leitura 2

Folha	F controle	Diferença
2,421525	0	2,421525
0		0
0,358744		0,358744
2,421525	0	0,358744

MnP Leitura 2

Bráctea	F controle	Diferença
9,237668	0	9,237668
10,58296		10,58296
11,56951		11,56951
9,237668	10,58296	11,56951

MnP Leitura 3

Fruto	F controle	Diferença
7,443946	0	7,443946
9,41704		9,41704
8,520179		8,520179
7,443946	9,4170404	8,520179

MnP Leitura 3

Folha	F controle	Diferença
2,690583	0	2,690583
1,793722		1,793722
1,434978		1,434978
2,690583	1,793722	1,434978

MnP Leitura 3

Bráctea	F controle	Diferença
7,174888	0,239163	6,935725
7,174888		6,935725
8,071749		7,832586
6,935725	6,935725	7,832586

MnP leitura 4

Fruto	F controle	Diferença
3,139013	0,5381166	2,600897
3,139013		2,600897
3,587444		3,049327
2,600897	2,6008969	3,049327

MnP leitura 4

Folha	F controle	Diferença
3,67713	0	3,67713
4,035874		4,035874
4,035874		4,035874
3,67713	4,035874	4,035874

MnP leitura 4

Bráctea	F controle	Diferença
14,52915	0	14,52915
14,79821		14,79821
15,42601		15,42601
14,52915	14,79821	15,42601

APÊNDICE K – Dados referentes aos cálculos de atividade enzimática (LAC) nos substratos de cultivo

LAC leitura 1

Fruto	F controle	Diferença
12,27778	0,435185	11,84259
12,18056		11,74537
11,97222		11,53704
11,84259	11,74537	11,53704

LAC leitura 1

Folha	F controle	Diferença
11,66667	0,148148	11,51852
11,13889		10,99074
10,80556		10,65741
11,51852	10,99074	10,65741

LAC leitura 1

Bráctea	F controle	Diferença
12,79167	0,236111	12,55556
13,20833		12,97222
13,15278		12,91667
12,55556	12,97222	12,91667

LAC Leitura 2

Fruto	F controle	Diferença
13,125	0,5	12,625
14		13,5
12,09722		11,59722
12,625	13,5	11,59722

LAC Leitura 2

Folha	F controle	Diferença
13,63889	0,467593	13,1713
13,38889		12,9213
13,48611		13,01852
13,1713	12,9213	13,01852

LAC Leitura 2

Bráctea	F controle	Diferença
14,18056	0,467593	13,71296
14,23611		13,76852
14,38889		13,9213
13,71296	13,76852	13,9213

LAC Leitura 3

Fruto	F controle	Diferença
13,86111	0,666667	13,19444
14,02778		13,36111
14,55556		13,88889
13,19444	13,36111	13,88889

LAC Leitura 3

Folha	F controle	Diferença
12,19444	0,814815	11,37963
11,875		11,06019
12,30556		11,49074
11,37963	11,06019	11,49074

LAC Leitura 3

Bráctea	F controle	Diferença
13,98611	0,768519	13,21759
14,48611		13,71759
13,69444		12,92593
13,21759	13,71759	12,92593

LAC Leitura 4

Fruto	F controle	Diferença
9,305556	0,009259	9,296296
9,166667		9,157407
8,833333		8,824074
9,296296	9,157407	8,824074

LAC leitura 4

Folha	F controle	Diferença
8,569444	0,087963	8,481481
8,388889		8,300926
7,958333		7,87037
8,481481	8,300926	7,87037

LAC leitura 4

Bráctea	F controle	Diferença
10,11111	0,032407	10,0787
9,972222		9,939815
9,625		9,592593
10,0787	9,939815	9,592593