

## UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS DE BANANEIRA PARA PRODUÇÃO DO COGUMELO COMESTÍVEL *Lentinula edodes*

Gabriellen Yasmine de Oliveira PEDRENO<sup>1</sup>

Adriana da Silva NUNES<sup>2</sup>

Ceci SALES-CAMPOS<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista Iniciação Científica INPA-PIBIC/CNPq;

<sup>2</sup>Colaboradora Doutoranda em Biotecnologia/UFAM;

<sup>3</sup>Orientadora COTI/INPA.

### INTRODUÇÃO

Para escolher o modo de produção de um cogumelo comestível deve-se levar em consideração a espécie que se pretende cultivar, disponibilidade dos substratos e custos de aquisição, os quais refletirão no valor final do produto que será oferecido ao consumidor. O cultivo do cogumelo comestível *Lentinula edodes* sob condições axênicas é considerado vantajoso em relação à técnica natural que utiliza toras, pois visa diminuir o início da produção e aumentar a produtividade em base úmida de massa fúngica, além de utilizar produtos como serragem ou resíduos agrícolas como substrato (Eira 2004).

O Brasil é um dos grandes produtores mundiais de banana, sendo a terceira fruta mais exportada no país (FAO 2014), consistindo a região Norte na terceira maior produtora. Após a produção do caho de banana o que ocorre uma vez a cada 18 meses de cultivo, grande parte da bananeira é descartada, deixando-se apenas 50 cm do pseudocaule que servirá de fonte nutricional aos brotos. Neste sentido, os resíduos da bananeira (pseudocaule e engaço) podem ser uma alternativa econômica na composição de substratos para o cultivo de cogumelos. De acordo com Oliveira *et al.* (2007), o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos oriundos da produção agrícola para produção de proteína alimentar na forma de biomassa fúngica é uma alternativa para agregar valor aos resíduos, considerando que a produção de cogumelos comestíveis é uma atividade comercial já bem estabelecida e rentável.

Quando se avalia a viabilidade da utilização de substratos alternativos para cultivo de cogumelos comestíveis é importante conhecer sua composição nutricional, pois esta varia de acordo com o substrato de cultivo (Sales-Campos, 2008). Portanto, neste trabalho pretende-se avaliar a eficácia da utilização de resíduos de bananeira (psudocaul e engaço) na produção do cogumelo comestível *Lentinula edodes*.

### MATERIAL E MÉTODOS

A linhagem do fungo *L. edodes* 36/13 foi acessada da micoteca do laboratório de Fungos Comestíveis do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA – procedente da UNESP de Botucatu. Para a reativação da colônia, fragmentos fúngicos de foram depositados assepticamente em placas de Petri contendo meio de cultura BDA, as quais foram incubadas até preenchimento total, e armazenadas para testes subsequentes.

As duas variedades de bananeiras (Prata anã e Thap-Maeo) e seus respectivos resíduos (pseudocaul e engaço) foram adquiridos junto à produtores rurais do Município de Parintins. Para elaboração do substrato os triturados do pseudocaul e engaço foram autoclavados a uma temperatura de 121 °C durante 60 minutos para assepsia. Após o resfriamento, foram destinados à formulação do meio de cultura alternativo e do substrato de cultivo.

### **Obtenção da matriz secundária e produção da matriz terciária (“semente” ou “spawn”)**

Fragmentos de massa fúngica de *L. edodes* previamente miceliados em BDA foram transferidos para placas de Petri contendo meios de cultura alternativos preparados de acordo com a metodologia proposta por Sales-Campos (2008) a partir da infusão dos resíduos de bananeira selecionados para elaboração da matriz secundária que servira como fonte de inóculo para a matriz secundária.

A matriz terciária (Semente ou spawn) foi elaborada a partir da metodologia adaptada por Sales-Campos (2008), adequando-se à necessidade de umidade requerida por cada substrato. Para cada 50g de resíduos secos e triturados, foram adicionados entre 200 e 250mL de água destilada até que a mistura atingisse 75% de umidade segundo a necessidade de cada substrato com o objetivo de obter em torno de 225g umidas, as quais foram depositadas em frascos de vidro de 450mL cujas tampas possuíam um respirômetro elaborados com esponja sintética para auxiliar as trocas gasosas. Os potes de vidro com os resíduos foram autoclavados a 121°C durante 60 minutos. Após o resfriamento, em condições estéreis, foram inoculados nos frascos, fragmentos de micélio da matriz secundária de acordo com os substratos preparados com três repetições para cada tratamento. Após esta etapa, os frascos foram mantidos em estufa BOD à  $25 \pm 2$  °C até a completa colonização do substrato pelo fungo.

### **Elaboração do substrato de cultivo**

Os substratos para o crescimento fúngico foram elaborados utilizando os resíduos secos e triturados (pseudocaule e engaço) nas proporções de 3,33 kg para aproximadamente 50L de água destilada. Não foi adicionado  $\text{CaCO}_3$ , uma vez que o pH da mistura não precisou de correção para atingir 6,5. Os substratos foram inseridos em sacos do tipo PEAD (polietileno de alta densidade) com o auxílio de um respiro de esponja sintética, em seguida vedados e autoclavados durante 60 minutos. Após o resfriamento os substratos foram inoculados em câmara de fluxo laminar. Os sacos foram vedados e inseridos aleatoriamente em uma sala de incubação com temperatura (20 °C) e umidade (90%). Durante esta fase os sacos foram incubados na ausência de luz. Foram preparados 80 sacos, 20 repetições para cada tratamento.

Após a total colonização do substrato pelo fungo, foi feita a indução dos primórdios, a temperatura da estufa BOD foi diminuída para 16 °C e mantida por 24 horas. Posteriormente a esse período, a temperatura foi ajustada para a mesma utilizada na incubação, a umidade ajustada para 95% e a luminosidade mantida em fotoperíodo de 12 horas.

### **Avaliação da Eficiência Biológica**

A produtividade é expressa através da eficiência biológica (EB) que representa o percentual de conversão de substrato em biomassa fúngica (cogumelos), através da fórmula (Eira 2004):

$$EB = (\text{massa de cogumelo fresco} / \text{massa de substrato seco}) \times 100.$$

### **Análise Nutricional do substrato pré-cultivo**

*Nitrogênio Total e Proteína Bruta:* Foi determinado pelo método de Kjeldahl. Descrito por Silva & Queiroz (2009) envolvendo três etapas: Digestão da amostra por ácido sulfúrico até a conversão em sulfato de amônia:  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ . Destilação do sulfato de amônia em destilador de nitrogênio arcone-MA036 em meio básico (NaOH 60%), liberando gás amônia ( $\text{NH}_3$ ), o qual foi recolhido em ácido bórico formando borato de amônia ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3$ ). Titulação do borato de amônia com ácido clorídrico (HCl) 0,001N. Os resultados

foram expressos em % de nitrogênio e, conseqüentemente, a quantidade de proteína que a mesma contém, utilizando-se a fórmula: **Nitrogênio %** =  $(V \times N \times 0,014) / M \times 100$ ; V = Volume de HCl gasto na titulação (mL); N = Normalidade: 0,001; M = Massa de amostra (g). Para a conversão de nitrogênio em proteína utilizou-se a fórmula seguinte, considerando-se que 100g de proteína contém, em média, 16% de nitrogênio: **P%** =  $N \times 6,25$ .

**Cinzas:** Para determinação de cinzas foi utilizado o método de incineração em mufla até a obtenção de um resíduo isento de carvão, com coloração branca acinzentada (Instituto Adolfo Lutz, 1985). As amostras foram aquecidas a uma temperatura de 600 °C durante quatro horas até a combustão total da matéria orgânica (resíduo isento de carvão com a coloração branca acinzentada). O teor de cinza foi expresso em % pelas fórmulas: **Cinza (g)** =  $M2 - M1$ ; **Cinza (%)** =  $(\text{Cinza (g)} \times 100) / M2$ ; Onde: M1 = Massa inicial da amostra; M2 = Massa final da amostra.

**Extrato Etéreo:** Consiste em submeter a amostra seca à extração contínua com éter de petróleo (Instituto Adolfo Lutz, 1985), pela adição de 2 a 5g de amostra em cartuchos tipo Soxhlet o qual passará por um processo de extração contínua em conjunto Soxhlet por um período de 4 a 5 horas em temperatura de 30 a 60°C, tendo o éter de petróleo como reagente extrator. A porcentagem de lipídios foi calculada utilizando a fórmula: **Lipídios (%)** =  $(M2 - M1 \times 100) \times P$ ; Onde: M1 = massa inicial do balão; M2 = massa final do balão; P = nº de gramas da amostra.

### Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com fatorial 2X3 (duas variedades de bananeira e 2 tipos de resíduos). Para análise estatística dos dados utilizou-se o software BioEstat 7.0 para obtenção dos parâmetros discutidos (média, desvio padrão e variância), e análise inferencial dos tratamentos utilizando o teste ANOVA e de TUKEY para contrastes das médias quando necessário.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Análise nutricional do Resíduo Pré-cultivo

A Tabela 1 apresenta os valores de Nitrogênio total, Proteína Bruta, Cinzas e Extrato Etéreo presente nos resíduos de bananeira utilizados como substrato para cultivo de *L. edodes*.

Tabela 1. Valores das médias aritméticas das análises nutricionais dos resíduos de bananeiras pré-cultivo.

Cultivar	Resíduo	PB %	N %	Cinza %	EE %
Prata-anã	Pseudocaule	4,69	0,79	7,53	0,37
	Engaço	6,60	1,09	11,07	0,88
Thap-maeo	Pseudocaule	4,90	0,78	6,45	0,38
	Engaço	6,13	1,02	8,41	0,30

N%: percentual de nitrogênio; PB%: percentual de proteína bruta; Cinzas%: percentual de cinzas; EE%: extrato etéreo (lipídeos).

O percentual de Nitrogênio contido nos pseudocaules de Prata-anã e Thap-maeo (Tabela 1) foi de N% de 0,79 e 0,78 para os respectivos resíduos. Os valores para os engaços de Prata-anã foram de N% 1,09 e 1,02 para o de Thap-maeo. De acordo com estudos de Cunha *et al.* (2011), o valor encontrado para nitrogênio

presente no engaço da banana – cultivar pacová foi 0,78%, sendo considerado baixo. Miles e Chang (1997) frisam que a quantidade de nitrogênio em resíduos agroindustriais é normalmente baixa e a de carbono elevada.

Os valores de proteína bruta (%) (Tabela 1) detectados no pseudocaule da cultivar Thap-maeo foi 4,90% e no engaço 6,13%. Já no resíduo de Prata-anã foi determinado o valor de 4,69% de proteína bruta para o pseudocaule desta variedade e 6,60% de proteína para o engaço. Os respectivos valores corroboram com o trabalho de Cunha *et al.* (2011), que analisando o teor de proteína bruta em substratos a partir de resíduo agroindustriais como a bananeira, observou 4,46% de proteína bruta, valor este considerado baixo, onde o aumento só ocorre com a suplementação para tornar o substrato mais proteico.

Os maiores teores de cinzas foram detectados nos resíduos da variedade Prata-anã, sendo que o engaço apresentou 11,07% e no respectivo pseudocaule 7,53%. Nos resíduos de Thap-maeo, os maiores valores foram observados no engaço 8,41%, sendo que em pseudocaule o teor de cinza foi 6,45%. Na pesquisa de Cunha *et al.* (2011), o conteúdo de cinzas também foi alto na matéria-prima engaço de banana pacová (BAN-MP), apresentando 16,99% e menor na semente em semente de açaí (AÇA-PM), com 2,24%. Positivamente o valor de cinzas no engaço da banana poderá contribuir em futuras análises no teor de macro e micronutrientes, assim como nos substratos com formulação envolvendo este tipo de resíduo.

Os resultados das análises de extrato etéreo variaram de 0,37 a 0,88% entre os resíduos evidenciando a presença de um pequeno percentual de gordura bruta nas amostras analisadas. Estes resultados corroboram com a pesquisa de Carvalho *et al.* (2011), onde os percentuais de lipídeo em amostras de engaço de bananeira foi de 0%.

### **Eficiência Biológica**

A utilização dos resíduos de bananeira demonstrou-se inviável para o cultivo do cogumelo comestível *L. edodes* visto que não houve desenvolvimento fúngico da espécie nos substratos preparados. Durante o desenvolvimento do projeto, foram elaboradas 3 tentativas de produção de semente em potes de vidro e um cultivo em sacos polietileno de alta densidade (PEAD) utilizando-se como fonte de inoculação a matriz secundária. Percebeu-se que a ausência de colonização do substrato pelo fungo nos frascos de vidro, seguida de um alto índice de contaminantes que se proliferavam nos substratos. No entanto, o cultivo em sacos PEAD também não obteve êxito, embora que ao final de três meses de cultivo detectou-se o princípio de colonização do substrato em 10 sacos preparados. Notou-se um micélio esbranquiçado o qual apareceu após colonizar totalmente os substratos. Entretanto não formou a capa marrom, característica da colonização final deste fungo (Eira 2004; Sales-Campos 2008). Foram submetidos à indução dos primórdios, porém, sem lograr êxito, salvo em alguns sacos que apresentaram início de frutificação, os quais não se desenvolveram além deste estágio por semanas. Um dos fatores que podem ter contribuído para o insucesso do cultivo do fungo neste substrato, pode ter sido a falta de um maior controle das condições ambientais para esta espécie.

O tempo de permanência no ambiente de frutificação, quando estendido após os três meses de incubação, propicia o desenvolvimento de agentes contaminantes (Andrade 1999). No entanto, na literatura são relatadas avaliações de crescimento micelial, que obtiveram êxito utilizando substratos à base de resíduos de bananeira, tais como: Sales-campos *et al.* (2011), Almeida *et al.* (2013) que mensuraram o crescimento micelial de *L. edodes*, *Pleurotus ostreatus* e *Coprinus comatus* em meios de cultura suplementados com resíduos da agroindústria, entre eles o de bananeira. *L. edodes* não apresentou crescimento micelial significativo quando

comparado à sua testemunha. *P. ostreatus* bem como *C. comatus*, apresentaram médias de avanço da fronteira micelial superiores quando inseridos nos meios de cultivo à base de resíduos de Thap-maeo e Prata-anã, independentemente da suplementação utilizada.

Embora *L. edodes* tenha conseguido se desenvolver no meio de cultura contendo estes resíduos, no presente experimento não houve correlação entre o cultivo *in vitro* e a produtividade do cultivo axênico, assim como observou Montini (2001), durante a análise da influência dos substratos e das linhagens para o cultivo de *L. edodes*. Vale ressaltar que em meios de cultura, principalmente nos preparados à partir da infusão do resíduo, as condições nutricionais diferem do cultivo direto no substrato, principalmente quando se adiciona a este meio dextrose, tornando o meio mais prontamente disponível para o fungo do que o substrato de cultivo (Sales-Campos 2008)

Montini (2001) também observou que o algodão utilizado no selamento do saco, não foi suficiente para as trocas gasosas necessárias para um crescimento efetivo do fungo. Desta forma, podemos deduzir que um dos fatores que influenciaram na inibição do crescimento fúngico, foi por falta de aeração adequada, mesmo com os níveis de temperatura e umidades adequados para o crescimento fúngico de *L. edodes* tanto em frascos de vidro, como nos sacos. A aeração inadequada pode ter promovido a proliferação de contaminantes nos substratos, e inibido o desenvolvimento micelial de *L. edodes*. Segundo Laixuthai *et al.* (1987) *apud* Maciel (2012), a menos que o contaminante se instale no substrato cujo esteja bastante colonizado pelo micélio de shiitake, o substrato terá de ser descartado, pois os principais contaminantes de *L. edodes* apresentam uma elevada agressividade durante o amensalismo por espaço no ambiente. Outro fator que pode ter contribuído foi a falta de análise de carne em tempo hábil, que impossibilitou o cálculo de uma relação C:N adequada para implementar o substrato adequado para o cultivo deste fungo.

## CONCLUSÃO

Nas condições testadas, os resíduos de bananeira não são eficazes como substratos para produção do cogumelo comestível *Lentinula edodes*, uma vez que o desenvolvimento fúngico não ocorreu fazendo-se necessários novos estudos para que o seu aproveitamento seja satisfatório.

## REFERÊNCIAS

- Association of Official Analytical Chemists – AOAC. 2012. *Official methods of analysis of AOAC international*. 19 ed. Maryland: AOAC.
- Almeida, L.B.; Sales-Campo, C.; Carvalho, C.S.M.; Minhoni, M.T.A.; Andrade, M.C.N. 2013. Resíduos de bananeira como substrato base para o cultivo *in vitro* de *Coprinus comatus*. *Ambiência. Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais*, 9(3): 643-650.
- Andrade, F.A. 1999. *Efeitos de fungos contaminantes na produção de shiitake (Lentinula edodes (Berk) Pegler) em toras de Eucalyptus saligna Sm.* Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Proteção de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo. 62p.
- Bononi, V.L.; Capelari, M.; Maziero, R.; Trufem, S.F.B.S. 1999. *Cultivo de cogumelos comestíveis*. S. Paulo: Ícone 2a Ed. 206p.
- Carvalho, C.S.M.; Andrade, M.C.N.; Sales-Campos, C. 2011. Avaliação da produção e das características bromatológicas de *Pleurotus ostreatus* cultivado em resíduos de bananeira, p. 39-46. *In: Sales-Campos, C.;*

- Varejão, M.J.C. (Ed). *Bioconversão de resíduos ligninocelulolíticos da Amazônia para cultivo de cogumelos comestíveis*. Manaus: INPA.
- Cunha, A.L.B.; Sales-Campos, C.; Varejão, M.J.C.; Araújo, L.M. 2011. Avaliação das características físico-químicas de resíduos madeireiros e agroindustriais para a formulação de substratos para cultivo de cogumelos, 166p. In: *Bioconversão de resíduos ligninocelulolíticos da Amazônia para cultivo de cogumelos comestíveis*. Manaus: INPA.
- Eira, A.F. 2004. Fungos comestíveis, p. 397-450. In: Esposito, E.; Azevedo, J.L. (Orgs). *Fungos uma introdução à biotecnologia, bioquímica e biotecnologia*. Caxias do Sul: Educs.
- Eira, A.F.; Minhoni, M.T.A. 1997. *Manual do cultivo do “Hiratake” e “Shimeji” (Pleurotus spp.)*. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais-UNESP, 1997. 63p.
- FAO. 2014. *Banana statistics*. Disponível em: (<http://www.fao.org>). Acesso em: 02/10/2014.
- Galvagno, M.A.; Forchiassin, F. 2004. Fisiologia dos fungos: crescimento, morfologia e diferenciação. p. 91-124. In: Esposito, E.; Azevedo, J.L. (Orgs.). *Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Caxias do Sul: Educs.
- Instituto Adolfo Lutz – IAL. 1985. *Métodos químicos e físicos para a análise de alimentos*. 3 ed. São Paulo.
- Laixuthai, N.; Gaewgla, M.; Triratana, S. 1987. Study on contaminative fungi in shiitake substrate bags. In: *Annual Conference of kasetsart*. Bangkok, 520-527.
- Maciel, W.P. 2012. *Cultivo de Lentinula edodes em diferentes condições de substratos e temperatura*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais. 35p.
- Miles, P.G.; Chang, S.T. 1997. *Mushroom biology: concise basics and current developments*. Singapore: wordscientific, 194p.
- Montini, R.M.C. 2001. *Efeito de linhagens e substratos no crescimento miceliano e produtividade em cultivo axênico do cogumelo shiitake (Lentinula edodes (Berk.) Pegler)*. Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo. 106p.
- Oliveira, M.A.; Donega, M.A.; Peralta, R.M.; Souza, C.G.M. 2007. Produção de inóculo do cogumelo comestível *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quélet – CCB19 a partir de resíduos da agroindústria. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas, 27: 84-87.
- Sales-Campos, C. 2008. *Aproveitamento de resíduos madeireiros e da agroindústria regional para o cultivo de fungos comestíveis de ocorrência na região amazônica*. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 197p.
- Sales-Campo, C.; Carvalho, C.M.S.; Aguiar, L.V.B.; Andrade, M.N.C. 2011. Cinética micelial dos fungos comestíveis *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes* em resíduos ligninocelulósicos. *Arquivos do Instituto Biológico*, 78: 141-145.
- Silva, D.J.; Queiroz, A.C. 2009. *Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos)*. 3 ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa.