

## **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIODEGRADADORA DE *Pleurotus ostreatus* (JACQ. EX FR) KUMMER NO SUBSTRATO DE CULTIVO FORMULADO A PARTIR DE RESÍDUO MADEIREIRO**

Luciane Rodrigues de AZEVEDO<sup>1</sup>; Ceci SALES-CAMPOS<sup>2</sup> Maria de Jesus Coutinho VAREJÃO<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq/ INPA; <sup>2</sup>Orientadora CPPF/ INPA; <sup>3</sup>Co-orientadora CPPF/ INPA

### **1. Introdução**

No Brasil, o consumo de cogumelos é baixo, mas vem crescendo significativamente devido à busca por alimentos "naturais", isentos de agrotóxicos e conservantes, com elevados teores protéicos, vitamínicos e propriedades terapêuticas (Bobek *et al.*, 1993). Os cogumelos do gênero *Pleurotus* são de cultivo fácil, pois apresentam um crescimento micelial rápido e abundante frutificação, exigindo pouco controle de ambiente para seu cultivo, são facilmente cultivados em resíduos agrícolas e pasteurizados (Reffatti *et al.*, 2006). O cultivo de *Pleurotus* tem sido realizado em substratos ou compostos à base de resíduos celulósicos ou lignocelulósicos. Devido ao seu complexo enzimático, estes fungos conseguem se nutrir e produzir cogumelos a partir destes resíduos nutricionalmente pobres (Bernardi *et al.*, 2008). O substrato para o cultivo de cogumelos é um composto orgânico sólido e seu preparo caracteriza-se por ser um processo biotecnológico que utiliza materiais residuais tais como: resíduos de animais (esterco bovino, equino, de aves, porcos e outros animais domésticos) e materiais vegetais (palhas e outros resíduos de trigo, arroz, milho, algodão e bagaço de cana, entre outros) (Eira *et al.*, 1997). Esse fato é possível devido à produção de uma série de enzimas lignocelulases, que os permite degradar facilmente a lignina e celulose da madeira, assim como outros substratos vegetais utilizados para o seu cultivo (Capelari, 1996; Alexandrino *et al.*, 2007). Dentre as espécies desse gênero destaca-se o *Pleurotus ostreatus*, responsável pela produção de enzimas hidrolíticas e oxidativas envolvidas na degradação de materiais lignocelulósicos para decomposição primária de madeira e resíduos vegetais, tais como: lacase ou fenol oxidase, manganês peroxidase, xilanase e glucanase (Alexandrino *et al.*, 2007).

O *Pleurotus ostreatus* é apto a utilizar a lignina, celulose e hemicelulose como fonte de carbono e nutrientes (Reffatti *et al.*, 2006). Desta forma os resíduos lignocelulósico podem ser uma alternativa para utilização de cultivo axênico de cogumelo. O nitrogênio no entanto, é indispensável para assegurar a síntese de aminoácidos e de proteínas (Reffatti *et al.*, 2006).

Neste contexto, realizou-se um estudo com resíduos madeireiros da Amazônia como fonte alternativa para cultivo de cogumelos comestíveis, oriundo do projeto "Estudo da bioconversão de resíduos lignocelulolíticos da Amazônia para cultivo de fungos comestíveis". Sob este aspecto, analisou-se o processo de degradação do substrato de cultivo ocasionada por *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr) Kummer.

### **2. Material e métodos**

O cultivo foi conduzido no Laboratório de Cultivo de Fungos Comestíveis da CPPF, em condição axênica. O processamento (elaboração das amostras) e análises do teor celulose (holocelulose) e lignina foram realizadas nos Laboratórios de Celulose e Papel e de Química da Madeira respectivamente. As amostras (substrato inicial e residual) foram procedentes do experimento de cultivo do cogumelo *Pleurotus ostreatus*, oriundas do projeto "Estudo da Bioconversão de Resíduos Lignocelulolíticos da Amazônia para Cultivo de Fungos Comestíveis". Todas as análises químicas foram feitas em triplicata, com base na matéria seca.

*Atividade biodegradadora em função da Perda da Matéria orgânica – PMO-* Esta avaliação foi realizada segundo Rajarathman & Bano (1989) e Sturion, (1994). A perda matéria orgânica (PMO) é o índice que avalia a decomposição do substrato pelo fungo, sofrido durante o cultivo. Tal índice é baseado na perda da matéria orgânica decomposta pelo fungo que é determinada através da diferença entre a massa seca do substrato inicial, e a massa seca do substrato residual (pós-colheita). A PMO foi avaliada conforme expressa pela seguinte fórmula:

$$PMO (\%) = \frac{\text{Massa seca do substrato residual (g)}}{\text{Massa seca do substrato inicial (g)}} \times 100$$

Os resultados da PMO são provenientes do cultivo do cogumelo em condições ambientais controladas, os quais fazem parte do estudo de tese de Sales-Campos, (2008).

*Atividade biodegradadora em função da degradação da celulose e da lignina*- As amostras analisadas foram divididas em substrato inicial (antes de ser submetido ao cultivo pelo fungo *Pleurotus ostreatus*) e substrato residual (pós-colheita do fungo).

Foram utilizados dois substratos de cultivo (substrato inicial), elaborados a partir de serragem de *Simarouba amara* Aubl. (marupá), denominado SIAMP e da serragem de *Ochroma pyramidale* Cav. Ex Lam. Urban (pau de balsa), denominado SIAPB, os quais foram suplementados com uma mistura de farelo de cereais (arroz e milho). Os substratos residuais (pós-Colheita) foram codificados como SRMP e SRPB para marupá e pau de balsa respectivamente.

Os teores de celulose e lignina foram determinados nas amostras livres de extrativos totais e basearam-se na metodologia especificada no quadro 1.

Para determinação do teor de extrativos totais utilizou-se o método ABTCP M 3/69 de extração em aparelho de Soxlet em que as amostras foram submetidas sob refluxo por no mínimo oito horas, partindo da mistura de solventes etanol-tolueno 1:2 (de média à baixa polaridade) seguido de outra extração somente com etanol P. A. (de alta polaridade) e finalmente foi feita uma lavagem em água.

Para a determinação da lignina foi utilizado o método lignina Klason TAPPI 222 OM - 83, em que as amostras livres de extrativos foram submetida a uma digestão a frio em ácido sulfúrico 72%, por duas horas, seguidas de diluição em 560 mL de água destilada durante quatro horas em banho-maria com filtração final em funil de Büchner. A lignina foi obtida em função do resíduo obtido após a filtração, sendo o seu teor calculado pela fórmula:

$$\% \text{ lignina} = (P_2 / P_1) \times 100.$$

P<sub>1</sub>: Peso seco inicial da amostra

P<sub>2</sub>: Peso seco de holocelulose obtida

Para a determinação da celulose usou-se o método Halward e Sanchez (1975) em que as amostras livres de extrativos, foram submetidas a uma digestão em solução nitro-alcóolica 1:4 sob refluxo por uma hora, repetindo-se o processo até obtenção da cor branca, característica do material celulósico, passando por filtração em cadinho com filtro sinterizado. O resíduo obtido após a filtração se trata da celulose obtida, calculada através da fórmula: % celulose = (P<sub>2</sub> / P<sub>1</sub>) x 100, onde:

P<sub>1</sub>: Peso seco inicial da amostra

P<sub>2</sub>: Peso seco de holocelulose obtido

A celulose (holocelulose) foi também analisada pelo método da diferença, conforme quadro abaixo. Sendo este o mais simples e apresentando o mesmo resultado.

Os Coeficientes de degradação da celulose e da lignina foram mensurados conforme Capelari (1996), após as análises de celulose e lignina dos substratos iniciais e residuais (pós-colheita).

Quadro 1 - Análises químicas realizadas

TESTE	PROCEDIMENTO (NORMA)
Extrativos totais	ABTCP M 3/69
Lignina Klason	TAPPI 222 OM - 83
Holocelulose	100- % Extrativos totais - % Lignina

### 3. Resultados e discussão

*Atividade biodegradadora em função da Perda da Matéria orgânica - PMO* - No presente estudo, onde se cultivou *P. ostreatus*, a PMO do substrato elaborado a partir de marupá foi de 65,37 % ± 4,48, enquanto que a PMO para pau de balsa foi de 67,68 ± 4,66. Observa-se que pau de balsa sofreu maior perda de matéria orgânica. Segundo Zadrazil (1978); Rajarathnam e Bano (1989), a PMO ocorre devido à perda de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O durante o metabolismo dos microorganismos e não

somente em função da remoção de materiais para a construção dos basidiomas. A PMO Também esteve relacionada no presente estudo com o maior período de incubação do substrato (36 dias para SIAPB), enquanto que para marupá, o tempo médio de incubação foi menor (24,14 dias).

Zadrazil e Brunnert (1981), apud Sturion (1994) relataram também um aumento da degradação do substrato (PMO) quando o período de incubação do substrato foi aumentado quando os autores cultivaram *Pleurotus sajor-caju* em palha de trigo. Os resultados atuais são concernentes com os dos autores. Da mesma forma, quando comparado com o estudo de Sales-Campos (2008), quando cultivou *P. ostreatus* em diferentes resíduos madeireiros e agroindustriais.

**Atividade biodegradadora em função da degradação da celulose e da lignina-** O Coeficiente de degradação da celulose e da lignina é mensurado em função do processo degradativo do substrato sofrido durante o cultivo do cogumelo devido ao seu metabolismo enzimático. Observa-se na Tabela 1 que os teores de extrativos são superiores (9,25- 8,59%) nos substratos iniciais SIAMP e SIAPB, comparados aos substratos residuais SRMP e SRPB (9,25 - 8,59). Da mesma forma, os teores de celulose e de lignina. Tal fato comprova a degradação destes compostos pelo fungo. A degradação da lignina (35,40 a 39,50%) foi superior a da celulose (14,61 a 3.51), o que mostra a preferência desta espécie de cogumelo pela lignina, como pode ser comprovado pelos seus respectivos coeficientes de degradação. Os resultados estão de acordo com (Rajarathnam, et al., 1992; LI et al. 2001; Zhang et al., 2002; Salmones et al., 2005). As evidências para estes resultados são de uma linhagem não só com o potencial comestível, mas que possivelmente poderá ser utilizada na biodegradação de compostos fenólicos, em função de seu metabolismo enzimático, uma vez que muitos destes basidiomicetos secretam enzimas oxidativas "fenol-oxidases" envolvidas na degradação de xenobióticos (Rajarathnam, et al., 1992; Mateus; Okino, 1999). Necessitando, no entanto, de estudos posteriores).

Tabela 1 Composição química dos substratos iniciais e finais (após cultivo de *P ostreatus*)

AMOSTRA	ET %		Celulose %		DH %	CDH %	Lignina %		DL %	CDL %	PMO %
	SIA	SR	SIA	SR			SIA	SR			
SIAMP	9,25	8,47	23,58	20,14	14,61	0,22	12,26	7,92	35,40	0,54	65,37
SIAPB	8,59	7,85	25,51	24,61	3,51	0,05	8,76	5,30	39,50	0,58	67,7

SIA: substratos iniciais autoclavados SR: Substratos residuais (pós-colheita do fungo). SIAMP e SIAPB: Substratos iniciais autoclavados, formulados a partir das serragens de marupá e de pau de balsa respectivamente; SRMP e SRPB: Substrato pós-colheita do fungo, nas respectivas serragens. ET: Teor de extrativos totais. DH: Celulose degradada. CDH: Coeficiente de degradação da celulose por *P ostreatus*. DL: Lignina degradada. CDL: Coeficiente de degradação da lignina por *P ostreatus*.

#### 4. Conclusões

- A redução dos teores de extrativos, bem como de celulose e de lignina nos substratos residuais, indicam a capacidade biodegradativa de compostos fenólicos pela linhagem nos substratos.
- A maior degradação da lignina promovida pelo cogumelo *P. ostreatus*, nos substratos testados sugere uma espécie preferencialmente lignícola, com potencial de aproveitamento na fungicultura, assim como na decomposição de xenobióticos.

#### 5. Referências

Alexandrino, A. M; Faria, H. G; Souza, C. G. M de; PERALTA, R. M. 2007. Aproveitamento do Resíduo de Laranja para a Produção de Enzimas Lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). *Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27,(2): 364-368.

Bernardi, E., Minotto, E., Nascimento, J.S. do.2008. Aproveitamento de resíduos de curtume como suplemento no cultivo de *Pleurotus ostreatus*. *Arq. Inst. Biol*, 75 (2): 243-246.

Bobek, P.; Kuniak, L.; Ozdin, L. (1993) *The mushroom Pleurotus ostreatus reduces secretion and accelerates the fractional turnover rate of very-low-density lipoproteins in the rat* *Annals Nutrition and Metabolism*, Basel, 37:142-145.

Capelari, M. 1996. *Atividade biodregadora e cultivo de três espécies comestíveis de basidiomicetos: Pleurotus sp. e Agrocybe perfecta (Rick) Sing.* Tese de Doutorado em Botânica. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 154p.

Eira, A. F.; Minhoni, M. T. A.; Braga, G. C.; Montini, R. M. C.; Ichida, M. S.; Marino, R. H.; Colauto, N. B.; Silva, J.; Neto, F. J. 1997. *Manual teórico/prático do cultivo de cogumelos comestíveis.* UNESP/FEPAF. Botucatu, 115p.

Li, X.; Pang, Y.; Zhang, R. Compositional changes of cottonseed hull substrate during *P. ostreatus* growth and the effects on the feeding value of the spent substrate. *Bioresouce Technology*, Essex, v. 80, n. 2, p. 157-161, 2001.

Halward, A.; Sanchez, C. 1975. *Métodos de ensaios nas indústrias de celulose e papel.*, São Paulo/SP: Editora Brusco, 458p.

Matheus, D. R., Okino, L. K. 1999. Utilização de basidiomicetos em processos biotecnológicos. In: Bononi, V. L. *Zigomiceto, Basidiomicetos e Deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas.* São Paulo: Instituto de Botânica/Secretaria do Meio Ambiente, p. 107-139.

Rajaratnam, S.; Bano, Z. Pleurotus Mushrooms; part 3: Biotransformation of natural lignocellulosic waste: commercial applications and implications. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Boca Raton, v. 28 n. 1, p. 31-113, 1989

Rajaratnam, S.; Shashireka, M. N.; Bano, Z. 1992. Biopotencialities of the Basidiomycetes. *Advances in Applied Microbiology*, New York, Academic Press, v. 37, p. 233-361.

Reffatti, P. F.; Lorenzetti, E.; Rodrigues, M. B. 2006. Caracterização de resíduos de erva-mate – para produção axênica de cogumelos. *Synergismus scyentifica*, 1 (1,2,3,4): 92-98.

Sales-Campos, C. 2008. *Aproveitamento de resíduos madeiros e da agroindústria regional para o cultivo de fungos comestíveis de ocorrência na região amazônica.* 2008. 182f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

Sturion, G. L. 1994. *Utilização da folha da Bananeira como substrato para o cultivo de cogumelo (Pleurotus spp).* Dissertação (Mestrado em Ciências/ Ciência e tecnologia de alimentos) ESALQ/USP, Piracicaba, 147p.

Zhang, R.; LI, X.; Fadel, J. G. Oyster mushroom cultivation with rice and wheat straw. *Bioresource Technology*, Essex, v. 82, n. 3, p. 277-284, 2002.