



**MAIARA ANDRADE CARVALHO**

**ATIVIDADE DE LIGNINASES E CELULASES  
DE LINHAGENS DE *Lentinula edodes* (Berk.)  
Pegler EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO**

**LAVRAS – MG**

**2011**

**MAIARA ANDRADE CARVALHO**

**ATIVIDADE DE LIGNINASES E CELULASES DE LINHAGENS DE  
*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Eustáquio Souza Dias

Coorientador

Dr. Disney Ribeiro Dias

**LAVRAS – MG**

**2011**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Carvalho, Maiara Andrade.

Atividade de ligninases e celulases de linhagens de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler em diferentes meios de cultivo / Maiara Andrade Carvalho. – Lavras: UFLA, 2011.

73 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Eustáquio Souza Dias.

Bibliografia.

1. *Lentinula edodes*. 2. Requerimentos nutricionais. 3. Ligninases. 4. Celulases. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 635.8

**MAIARA ANDRADE CARVALHO**

**ATIVIDADE DE LIGNINASES E CELULASES DE LINHAGENS DE  
*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler EM DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração em Microbiologia Agrícola, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 29 de julho de 2011.

Dr. Eustáquio Souza Dias                      UFLA

Dr. Disney Ribeiro Dias                      UFLA

Dr. Custódio Donizete dos Santos                      UFLA

Dr. Eustáquio Souza Dias  
Orientador

Dr. Disney Ribeiro Dias  
Coorientador

**LAVRAS – MG**

**2011**

*A Deus, pela constante presença em  
minha vida. Aos meus amados pais, Sueli  
e Hermes, pelo apoio, incentivo, carinho  
e dedicação. Ao meu namorado, Hudson,  
pelo carinho, companheirismo e apoio.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as graças concedidas durante a minha vida.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Eustáquio, pela oportunidade de realizar este trabalho, pela orientação e ensinamentos.

Aos meus pais, Sueli e Hermes, por sempre terem acreditado em mim e me apoiado, pelas suas orações e por todo o esforço que sempre fizeram para que eu pudesse estudar. A minha irmã, Samara.

Ao meu namorado, Hudson, por todo o apoio e compreensão, sempre junto de mim, mesmo estando longe. Aos meus sogros, Izabel e Ademir, pelo exemplo de vida e fé e aos meus cunhados, Anderson e Bryan.

Às meninas da república, Ju, Andressa, Mari e Samara, pela convivência e conselhos.

Aos professores do Programa de Microbiologia Agrícola Rosane, Cristina, Romildo, Disney e Patrícia, por todo o suporte nessa caminhada do mestrado.

A Ivani, Cidinha e Paulinho, sempre prontos a ajudar.

A Débora, pela dedicação e competência.

Aos colegas do Laboratório de Cogumelos Comestíveis, Claudinelli, Emerson, Vinícius, Thiago, Manu, Mari Lino, Simone, William, Andreísa, Fernanda e Lucas, pela boa convivência.

Aos amigos que fiz no mestrado, Andréia, Marco, Martin, Monique e Angélica, sempre dispostos a ajudar.

A Amanda (solos), Cíntia, Gilberto e Carla, pela enorme ajuda.

À Rose, pela educação, sempre disposta a ajudar.

A todos que, de alguma forma e em algum momento, me ajudaram na realização deste sonho.

## RESUMO

O consumo do cogumelo shiitake (*Lentinula edodes*) tem crescido no Brasil, tornando sua oferta menor do que a demanda. É necessário promover o desenvolvimento de novas tecnologias de cultivo desse cogumelo e a seleção de linhagens tanto para o cultivo comercial quanto para o melhoramento genético é uma etapa importante nesse processo. O conhecimento dos requerimentos nutricionais das linhagens de *Lentinula edodes*, bem como a caracterização enzimática, é uma etapa importante na seleção das linhagens. Este trabalho foi realizado com os objetivos de avaliar o crescimento de seis linhagens de *Lentinula edodes* (LE, LE2, LE3, LE4, LE5 e LE6) em cinco meios de cultivo e caracterizar as linhagens quanto à produção de ligninases e celulases no meio de cultivo selecionado como melhor para o crescimento das linhagens. O meio de cultivo que proporcionou maior crescimento micelial das linhagens foi utilizado para a realização de testes semiquantitativos de ligninases e celulases a fim de proceder a seleção de três linhagens para a realização de uma curva enzimática de 28 dias. Amostras para os ensaios enzimáticos e dosagem de proteínas totais foram coletadas com 7, 14, 21 e 28 dias de incubação. As outras três linhagens que não participaram da curva foram inoculadas nos mesmos meios de cultivo e as amostras foram coletadas com 7 e 28 dias, para os ensaios das celulases e 28 dias para ligninases. A atividade de exoglucanase diminuiu com o desenvolvimento da curva para as linhagens LE3 e LE6. A linhagem LE6 se destacou na produção de endoglucanase,  $107,2 \text{ U mg de proteína}^{-1}$ , com 14 dias de incubação,  $\beta$ -glicosidase, manganês peroxidase e lacase, sendo as atividades dessas enzimas de  $126,8 \text{ U mg de proteína}^{-1}$ ;  $26,2 \text{ U mg de proteína}^{-1}$  e  $333,7$ , respectivamente, com 28 dias de incubação. A produção de exoglucanase, endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase foi maior com 7 dias de incubação para as linhagens LE, LE2 e LE5. A produção de endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase aumentou com 28 dias, enquanto a produção de exoglucanase diminuiu. A atividade de ligninases foi inferior para essas linhagens quando comparadas às linhagens LE3, LE4 e LE6. Não foi detectada atividade de lignina peroxidase para nenhuma das linhagens. A linhagem LE5 apresentou o melhor crescimento no meio acrescido de extrato de levedura. A linhagem LE6 se destacou na produção de lacase, manganês peroxidase, endo- $\beta$ -1,4-glucanase e  $\beta$ -glicosidase e a linhagem LE5 se destacou na produção de exo- $\beta$ -1,4-glucanase. Todas as linhagens apresentaram maior massa seca nos meios contendo avicel e carboximetilcelulose, após 28 dias de incubação.

Palavras-chave: *Lentinula edodes*. Requerimentos nutricionais. Ligninases. Celulases.

## ABSTRACT

The consumption of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*) has been increasing in Brazil, making its supply less than the demand. It is necessary to develop new technologies that mushroom cultivation and selection of strains for both the commercial cultivation and genetic improvement is an important step in this process. Knowledge of nutritional requirements of strains of *Lentinula edodes* and the enzymatic characterization are important steps in the selection of strains. The objectives of this study were to evaluate the growth of six strains of *Lentinula edodes* (LE, LE2, LE3, LE4, LE5 and LE6) in five culture media, to characterize the strains and the production of ligninases and cellulases in the culture medium selected as best for the growth of the strains. The culture medium that provided the greatest mycelial growth of the strains was used for semi-quantitative testing of ligninases and cellulases for the selection of three strains to carry out a 28-day enzymatic curve. Samples for enzyme assays and determination of total proteins were collected at 7, 14, 21 and 28 days of incubation. The other three strains that did not participate in the curve were inoculated in the same culture media and samples were collected 7 and 28 days for testing of cellulases and 28 days for ligninases. The exoglucanase activity decreased with the development curve and for strains LE3 to LE6. Strain LE6 excelled in the production of endoglucanase, 107.2 U mg protein<sup>-1</sup>, with 14 days of incubation,  $\beta$ -glucosidase, manganese peroxidase and laccase, and the activities of these enzymes to 126.8 U mg protein<sup>-1</sup>, 26.2 U mg protein<sup>-1</sup> and 333.7 respectively, with 28 days of incubation. The production of exoglucanase, endoglucanase and  $\beta$ -glucosidase was highest with 7 days of incubation for strains LE, LE2, and LE5. The production of endoglucanase and  $\beta$ -glucosidase increased with 28 days while the production of exoglucanase decreased. As regards ligninases, the activity was lower for these strains as compared to strains LE3, LE4 and LE6. Lignin peroxidase activity was not detected for any of the strains was detected. Strain LE5 showed the best growth in the medium plus yeast extract. Strain LE6 excelled in the production of laccase, manganese peroxidase,  $\beta$ -endo-1,4-glucanase and  $\beta$ -glucosidase and strain LE5 excelled in the production of exo- $\beta$ -1,4-glucanase. All strains presented higher dry matter content in media containing carboxymethylcellulose and Avicel after 28 days of incubation.

Keywords: *Lentinula edodes*. Nutrient Requirements. Ligninases. Cellulases.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Avaliação semiquantitativa de lacase para a linhagem LE 3 .....	44
Figura 2	Avaliação semiquantitativa de lignina peroxidase e manganês peroxidase para a linhagem LE5 .....	45
Figura 3	Avaliação semiquantitativa de celulase para a linhagem LE3 .....	45

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Curva de produção de manganês peroxidase para as linhagens LE3, LE4 e LE6 de <i>Lentinula edodes</i> .....	48
Gráfico 2	Curva de produção de lacase para as linhagens LE3, LE4 e LE 6 de <i>Lentinula edodes</i> .....	48
Gráfico 3	Curva de indução de exo-1,4- $\beta$ -glucanase para as linhagens LE3, LE4 e LE6 de <i>Lentinula edodes</i> .....	51
Gráfico 4	Curva de indução de endo-1,4- $\beta$ -glucanase para as linhagens LE3, LE4 e LE6 de <i>Lentinula edodes</i> .....	52
Gráfico 5	Curva de indução de $\beta$ -glicosidase para as linhagens LE3, LE4 e LE6 de <i>Lentinula edodes</i> .....	53

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Crescimento micelial ( $\text{mm dia}^{-1}$ ) das linhagens de <i>Lentinula edodes</i> em diferentes meios de cultivo .....	41
Tabela 2	Massa seca ( $\text{mg dia}^{-1}$ ) das linhagens de <i>Lentinula edodes</i> em diferentes meios de cultivo .....	42
Tabela 3	Índice enzimático para lacase com cinco dias de incubação .....	44
Tabela 4	Atividade de manganês peroxidase e lacase ( $\text{U mg proteína}^{-1}$ ) para as linhagens LE, LE2 e LE5 com 28 dias de incubação .....	49
Tabela 5	Atividade de endo-1,4- $\beta$ -glucanase, exo-1,4- $\beta$ -glucanase e $\beta$ -glicosidase ( $\text{U mg proteína}^{-1}$ ), para as linhagens LE, LE2 e LE5, com 7 e 28 dias de incubação .....	54
Tabela 6	Massa seca micelial (mg) das linhagens de <i>Lentinula edodes</i> nos diferentes meios de cultivo, após 28 dias de incubação .....	57

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	15
2.1	Características gerais de <i>Lentinula edodes</i> .....	15
2.2	Requerimentos nutricionais para o crescimento .....	16
2.3	Potencialidades do cogumelo <i>Lentinula edodes</i> .....	18
2.4	Decomposição de lignina e celulose .....	20
2.5	Produção de enzimas por fungos basidiomicetos .....	22
2.5.1	Ligninases .....	23
2.5.1.1	Lacase (benzenodiol: oxigênio oxidoredutases (EC 1.10.3.2)) .....	24
2.5.1.2	Lignina peroxidase [1,2-bis(3,4- dimetoxifenil) propano-1,3 diol:hidrogenperóxido oxidoredutases, EC 1.11.1.14)] - LiP .....	25
2.5.1.3	Manganês peroxidase [Mn (II):hidrogeno-peróxido oxidoredutases, EC 1.11.1.13) – MnP .....	26
2.5.2	Celulases .....	27
2.5.2.1	Endo-1,4- $\beta$ -glucanase (EC 3.2.1.4, endocelulase) .....	27
2.5.2.2	Exo-1,4- $\beta$ -glucanase (EC 3.2.1.91; celobio-hidrolase) .....	28
2.5.2.3	$\beta$ -glucosidase (EC 3.2.1.21) .....	29
3	MATERIAL E MÉTODOS .....	31
3.1	Microrganismos .....	31
3.2	Avaliação do crescimento micelial em diferentes meios de cultivo .....	31
3.3	Avaliação semiquantitativa da produção de ligninases e celulases .....	32
3.3.1	Avaliação semiquantitativa da produção de lacase .....	33
3.3.2	Avaliação semiquantitativa da produção de lignina peroxidase e manganês peroxidase .....	33
3.3.3	Avaliação semiquantitativa da produção de celulase .....	33
3.4	Curva de indução de celulases .....	34
3.4.1	Determinação da atividade de endo-1,4- $\beta$ -glucanase (EC 3.2.1.4) .....	35
3.4.2	Determinação da atividade de exo-1,4- $\beta$ -glucanase (EC 3.2.1.91) .....	35
3.4.3	Determinação da atividade de $\beta$ -glicosidase (EC 3.2.1.21) .....	36
3.5	Curva de produção de ligninases .....	36
3.5.1	Determinação da atividade de lacase (EC 1.10.3.2) .....	37
3.5.2	Determinação da atividade de manganês peroxidase (EC 1.11.1.13) .....	38
3.5.3	Determinação da atividade de lignina peroxidase (EC 1.11.1.14) .....	38
3.6	Determinação de proteínas totais .....	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
4.1	Crescimento micelial e peso seco em diferentes meios de cultivo .....	40

4.2	<b>Avaliação semiquantitativa da produção de ligninases e celulases .....</b>	<b>43</b>
4.3	<b>Curva enzimática.....</b>	<b>47</b>
5	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>58</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>60</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O consumo do cogumelo shiitake (*Lentinula edodes*) tem crescido no Brasil, tornando sua oferta menor do que a demanda. Diante disso, é necessário o desenvolvimento de novas tecnologias de cultivo desse cogumelo e a seleção de linhagens tanto para o cultivo comercial quanto para o melhoramento genético é uma etapa importante nesse processo.

O conhecimento dos requerimentos nutricionais de cada linhagem é necessário para a definição de um melhor meio de cultivo que possibilite maior taxa de crescimento micelial. Uma vez estabelecido o melhor meio de cultivo para as linhagens, a produção de inóculo primário é feita em menor tempo. Além disso, é importante saber qual linhagem possui a maior taxa de crescimento, já que uma linhagem com crescimento micelial mais acelerado possibilita colonização rápida do substrato, diminuindo as chances de contaminação, além de acelerar o processo de produção.

A colonização de substratos lignocelulósicos por *Lentinula edodes* depende da produção de enzimas hidrolíticas e oxidativas, entre as quais se destacam as ligninases e as celulasas. Ligninase é um termo geral que se refere às enzimas lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase. Alguns fungos têm a capacidade de secretar todas essas enzimas enquanto outros produzem duas delas ou apenas uma. As ligninases não têm ação sinérgica, podendo atuar separadamente. Já as celulasas compreendem as enzimas endo-1,4- $\beta$ -glucanase, exo-1,4- $\beta$ -glucanase e  $\beta$ -glicosidase que, ao contrário das ligninases, têm ação sinérgica. Uma vez que um dos fatores que influenciam o sucesso da colonização do substrato é a secreção dessas enzimas, a caracterização enzimática dos isolados de *Lentinula edodes* é uma etapa importante na seleção de uma linhagem com elevado potencial de produção.

Este trabalho foi realizado com os objetivos de definir os requerimentos nutricionais de seis linhagens de *Lentinula edodes* e caracterizar as linhagens quanto à produção das enzimas lacase, manganês peroxidase, lignina peroxidase, endo-1,4- $\beta$ -glucanase, exo-1,4- $\beta$ -glucanase e  $\beta$ -glicosidase no meio de cultivo selecionado como melhor para o crescimento das linhagens.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Características gerais de *Lentinula edodes*

O número de espécies de cogumelos existentes na natureza é estimado em cerca de 10.000, dos quais aproximadamente 10% são comestíveis (CHYE; WONG; LEE, 2009). A divisão Basidiomycota abrange a maioria dos cogumelos comestíveis e os mais cultivados são o *Agaricus bisporus*, *Pleurotus* spp., *Lentinula edodes* e *Agaricus brasiliensis* (KERRIGAN, 2005; URBEN et al., 2001).

Segundo Urben et al. (2001), *Lentinula edodes* é um fungo aeróbio, lignolítico, pertencente à Classe Basidiomycetes, Subclasse Holobasidiomycetidae, Ordem Agaricales, Família Tricholomataceae.

O cogumelo *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, mais conhecido como shiitake, é uma iguaria culinária e tem sido tradicionalmente utilizado na medicina asiática há 2.000 anos. Esse cogumelo contém proteínas, lipídeos (principalmente ácido linoleico), carboidratos, fibras, minerais, vitaminas B1, B2 e C, além de ergosterol, a provitamina D. Um dos compostos de maior importância isolados desse cogumelo é a lentinana  $[(C_6H_{10}O_5)_n]$ , um polissacarídeo com massa molecular de 500 KDa, o qual age como ativador dos linfócitos T e outros efetores celulares que modulam a liberação de citocinas que, por sua vez, podem ser responsáveis, indiretamente, por sua atividade antitumoral e antimicrobiana (ZUCCATO et al., 2000).

O valor nutricional dos cogumelos varia em função da espécie, da linhagem cultivada, do processamento após colheita, do estágio de desenvolvimento do basidioma, da parte do basidioma e do tipo de substrato de cultivo utilizado (MANZI; AGUZZI; PIZZOFERRATO, 2001).

*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler é considerado o segundo mais popular cogumelo comestível no mundo devido a seu aroma, sabor, valor nutricional e propriedades medicinais (ISRAILIDES et al., 2008; NIKITINA et al., 2007; SILVA; CAVALLAZZI; MULLER, 2007; SMITH; ROWAN; SULLIVAN, 2002; WASSER, 2002). Possui um ciclo de vida de duas fases, crescimento micelial e formação de corpos de frutificação, sendo ambos afetados pelas proporções de celulose, lignina e hemicelulose e nitrogênio do substrato de cultivo (PHILIPPOUSSIS; DIAMANTOPOULOU; ZERVAKIS, 2003). A capacidade desse fungo de colonizar substratos ricos nessas substâncias torna este organismo biodegradador eficiente de madeira.

Suplementos contendo carboidratos facilmente disponíveis e nitrogênio (por exemplo, farelos de cereais) são normalmente adicionados aos resíduos para acelerar o crescimento e aumentar o rendimento de produção (OHGA; ROYSE, 2001; SILVA; CAVALLAZZI; MULLER, 2007). O grau de colonização do substrato, determinada por taxas de extensão do micélio, produção de biomassa e atividade enzimática, é de grande importância para o sucesso do cultivo (DI LENA; VIVANTI; QUAGLIA, 1997; LEATHAM, 1985; PHILIPPOUSSIS; DIAMANTOPOULOU; ZERVAKIS, 2003; SILVA; MACHUCA; MILAGRES, 2005a).

## **2.2 Requerimentos nutricionais para o crescimento**

Durante a colonização, as hifas são responsáveis pela absorção de água e nutrientes simples a partir do substrato onde crescem. A parede celular das hifas é responsável por essa absorção e, na presença de substâncias mais complexas, ocorre a liberação de enzimas que atuam na decomposição dessas substâncias em subunidades assimiláveis (KRUGNER; BACHI, 1995).

O equilíbrio entre as fontes de C, N, P, vitaminas e micronutrientes na composição do meio de cultura é um fator decisivo para o crescimento e a esporulação dos microrganismos, notadamente o tipo e a concentração de fontes de C e N. Microrganismos pouco exigentes, como as bactérias do gênero *Pseudomonas*, podem crescer em meios de cultura com composição sintética simples, porém, numerosos microrganismos, como os fungos, necessitam de um ou mais micronutrientes, vitaminas ou outros compostos. É desejável encontrar para cada microrganismo as necessidades mínimas de nutrição e, com isso, desenvolver um meio mínimo que contenha somente os compostos realmente necessários ao crescimento e à esporulação (SILVA; MELO, 1999).

Os fungos são bastante versáteis na utilização de compostos de carbono, os quais são necessários tanto para a síntese de macromoléculas como para a produção de energia. Os fungos podem utilizar como fonte de carbono uma diversidade de compostos, tais como monossacarídeos, ácidos orgânicos, aminoácidos, álcoois, além de certos compostos policíclicos e polissacarídeos, como lignina e celulose. A fonte de carbono mais comumente utilizada para o crescimento de fungos em laboratório é a glicose, a qual é muito bem utilizada pela maioria dos fungos, embora algumas espécies cresçam melhor em outras fontes de carbono e algumas em uma mistura de fontes (CHANG; MILES, 2004).

O nitrogênio é essencial para a síntese de proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos como a quitina, que é um importante componente da parede celular dos fungos. Dada a sua importância, a necessidade de nitrogênio para qualquer espécie de fungo precisa ser suprida na forma de fontes inorgânicas ou de extratos naturais ou industriais como peptona, extrato de levedura, extrato de malte, etc. Quando utilizados na composição dos meios de cultivo, esses extratos constituem fonte complexa de diferentes nutrientes, como carbono, nitrogênio, vitaminas e sais minerais. Além dos macronutrientes (enxofre, fósforo, potássio

e magnésio), os fungos podem apresentar diferentes exigências quanto à adição de elementos traço, como ferro, zinco, manganês, cobre e molibdênio. Da mesma forma, as exigências de vitaminas podem variar bastante de uma espécie para outra, sendo biotina e tiamina as mais comumente requeridas entre as diferentes espécies de fungos (CHANG; MILES, 2004).

As vitaminas são moléculas orgânicas requeridas em pequenas quantidades e não são usadas como fonte de energia ou material estrutural. Essas moléculas participam da ação catalítica, atuando como coenzimas. A maioria dos fungos tem requerimentos nutricionais relativamente simples, mas alguns requerem uma ou mais vitaminas. O requerimento indica a falta de habilidade do fungo em sintetizar a vitamina. A mais comumente requerida pelos fungos é a tiamina (Vitamina B1), a qual é requerida em concentrações de cerca de 100 µg/L. Diversos basidiomicetos possuem deficiência de tiamina. A segunda vitamina mais comumente requerida pelos fungos é a biotina, conhecida também como vitamina B7 e como vitamina H. Os requerimentos de biotina são satisfeitos com quantidades de aproximadamente 5 µg/L. Outras vitaminas requeridas por certos fungos são ácido nicotínico (B3), ácido pantotênico (B5) e ácido p-aminobenzoico (CHANG; MILES, 2004).

### **2.3 Potencialidades do cogumelo *Lentinula edodes***

Substâncias bioativas com ação antitumoral, hipocolesterolêmica, hipoglicemiante, imunomoduladora, antimutagênica, antimicrobiana e com atividade antioxidante têm sido encontradas em basidiomicetos (CUI et al., 2006; LEE, B. et al., 2004; METHACANON et al., 2005; SHON; NAM, 2001).

Algumas propriedades funcionais de *Lentinula edodes*, como hipocolesterolêmicos, antimicrobianos e antioxidantes, têm sido intensamente investigadas (HATVANI, 2001; MANZI; PIZZOFRATTO, 2000; MAU;

CHAO; WU, 2001; SHIMADA; MORITA; SUGIYAMA, 2003; YANG; LIN; MAU, 2002). Também foi confirmado que o shiitake pode aumentar a atividade imunológica de animais submetidos à terapia com o mesmo (CHANG, 1996).

Os benefícios medicinais de *Lentinula edodes* têm sido pesquisados, mais notadamente a propriedade antitumoral, por produzir um polissacarídeo chamado lentinana, uma  $\beta$ -D-glucana (1 $\rightarrow$ 3) ramificada em C-6 por unidades de glicopiranosose  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 6), sendo duas ligações glicopiranosídicas (1 $\rightarrow$ 6) para cada cinco ligações glucopiranosídicas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3), responsável por este efeito (KIM; KACEW; LEE, 1999; MAEDA et al., 1988).

O estipe de *L. edodes* é rico em quitina e quitosana, o que lhe confere forte ação antioxidante, principalmente na habilidade como quelante de íons ferro e contra radicais hidroxila, evidenciando a necessidade de que essa parte do cogumelo seja mais aproveitada tanto para alimentação como para a indústria farmacêutica (YEN et al., 2007).

A importância de *Lentinula edodes* deve-se ao seu valor nutricional e à possibilidade de sua aplicação medicinal. Além disso, *L. edodes* pertence ao grupo de fungos de podridão branca (WRF - *white rot fungi*), os quais possuem um sistema enzimático lignolítico extracelular que tem a capacidade de degradar vários xenobióticos perigosos (POINTING, 2001), como aditivos para combustíveis (YADAV; REDDY, 1993), pesticidas organoclorados (BUMPUS et al., 1985), bifenilos policlorados (NOVOTNY et al., 1997), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) (FIELD et al., 1992) e pentaclorofenol (LAMAR; DIETRICH, 1990), o que permite sua aplicação em biorremediação (POINTING, 2001).

As enzimas dos fungos de podridão branca têm se mostrado úteis na degradação de uma variedade de poluentes persistentes no ambiente. Algumas destas enzimas são extracelulares e, na natureza, elas estão provavelmente envolvidas com a degradação da madeira. A biorremediação de efluentes

industriais também tem sido investigada utilizando-se fungos de podridão branca. A capacidade de fungos para o branqueamento e desinfecção de efluentes foi analisada em um estudo. As enzimas encontradas neste caso foram lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase, mais uma vez corroborando o seu potencial (MAYER; STAPLES, 2002).

#### **2.4 Decomposição de lignina e celulose**

A lignocelulose é composta por três componentes principais: celulose, hemicelulose e lignina. Além disso, pequenas quantidades de outros materiais, tais como cinzas, proteínas e pectina, podem ser encontradas nos resíduos lignocelulósicos em diferentes proporções, dependendo da fonte (SANCHEZ, 2009). Celulose, o principal constituinte de todo o material vegetal, é um biopolímero linear consistindo de moléculas de glicose ligadas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4. O acoplamento de cadeias adjacentes de celulose por meio de pontes de hidrogênio e forças de van der Waals resulta no alinhamento paralelo de estruturas cristalinas conhecidas como microfibrilas (ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006).

Ao contrário da celulose, hemiceluloses são polímeros heterogêneos de pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (principalmente manose, sendo menos frequentes glicose e galactose). A composição altamente variável de hemiceluloses é dependente da sua fonte vegetal (SAHA, 2000, 2003).

Lignina, o segundo biopolímero mais abundante na Terra e um polímero heterogêneo em resíduos lignocelulósicos, é naturalmente sintetizado, tendo uma cadeia aromática como sustentação. Em geral, contém três precursores álcoois aromáticos, incluindo o álcool coniferil, sinapil e cumarílico (WEI et al., 2009). Esses precursores formam guaiacil, siringil e p-hidroxifenil, subunidades da molécula de lignina, respectivamente (MARTINEZ et al., 2005). A composição

da lignina varia entre grupos de plantas diferentes. O acoplamento oxidativo desses monômeros de lignina cria uma estrutura complexa em que a lignina é altamente recalcitrante à degradação (WONG, 2009).

Embora a lignina resista ao ataque da maioria dos microorganismos, os fungos de podridão branca são capazes de degradar a lignina de forma eficiente (ABBAS et al., 2005; WONG, 2009). Os basidiomicetos são os degradadores mais potentes desses polímeros porque muitas espécies crescem em madeira morta ou em ambiente rico em celulose (LYND et al., 2002). A degradação da lignocelulose exige um conjunto complexo de enzimas extracelulares. Hidrolases extracelulares e oxidorreduções estão envolvidas na quebra da lignocelulose e são produzidas por muitos fungos ligninolíticos. Embora um grande número de hidrolases fúngicas e oxidorreduções já tenha sido isolado e caracterizado, há, ainda, um grande interesse, especialmente para aplicações biotecnológicas (BALDRIAN; SNAJDR, 2006; HOFRICHTER, 2002; MARTINEZ et al., 2005).

Fungos lignocelulolíticos produtores de enzimas incluem desde espécies de ascomicetos (por exemplo, *Trichoderma reesei*) e basidiomicetos, como fungos de podridão-branca (por exemplo, *Lentinula edodes*) e fungos causadores da podridão-parda (por exemplo, *Fomitopsis palustris*). Além disso, poucas espécies anaeróbias (por exemplo *Orpinomyces* sp.) são capazes de degradar a celulose no trato gastrointestinal de ruminantes (LJUNGDAHL, 2008; YOON et al., 2007). A degradação de lignocelulose por estes fungos é realizada por uma complexa mistura de celulasas (BAYER et al., 1998), hemicelulasas (LJUNGDAHL, 2008) e ligninases (SANCHEZ, 2009; WENG et al., 2008), refletindo a complexidade desses materiais.

## 2.5 Produção de enzimas por fungos basidiomicetos

*Lentinula edodes* é um eficiente biodegradador de madeira e seu cultivo é, tradicionalmente, em alguns países, realizado em toras de carvalho. No Brasil, é cultivado em toras de *Eucalyptus* spp., por ser um recurso renovável e abundante. Embora *Eucalyptus* spp. apresente vantagens para o cultivo de *Lentinula edodes*, o uso de resíduos lignocelulósicos pode ser um processo mais economicamente viável para o cultivo em grande escala, devido à bioconversão rápida. A utilização de substratos lignocelulósicos para o cultivo de cogumelos depende da produção de um conjunto de enzimas hidrolíticas e oxidativas capazes de converter compostos lignocelulósicos, de alto peso molecular, em moléculas de baixo peso molecular que podem ser assimiladas pelo fungo e transformadas em energia (BUSWELL; CAI; CHANG, 1996).

Entre as enzimas hidrolíticas, endoglucanase e lacase são produzidas por cepas de *L. edodes*, sendo suas atividades relacionadas e dependentes da composição do substrato e fatores ambientais (BUSWELL et al., 1996; ELISASHVILI et al., 2008; SILVA; MACHUCA; MILAGRES, 2005b). Este fungo já foi descrito como um bom produtor de manganês peroxidase, enquanto lignina peroxidase, aparentemente, não desempenha papel importante em seu sistema enzimático ligninolítico (BUSWELL; CAI; CHANG, 1995; HATVANI; MÉCS, 2002; MAKKAR et al., 2001; MORAES et al., 2001). Além disso, ele tem a capacidade de descolorir corantes industriais e de degradar algumas substâncias perigosas (BUMPUS et al., 1985; FIELD et al., 1992; HATVANI; MÉCS, 2002).

O cultivo de *L. edodes* em meio sólido com base em lignocelulose é um meio atraente de produção de enzimas. No entanto, a utilidade dos materiais lignocelulósicos para a produção de enzimas é limitada pela falta de uma técnica simples e reproduzível para preparar extratos ativos, uma vez que as condições

de extração influenciam grandemente os valores obtidos. Temperatura e tipo de solvente são conhecidos como parâmetros importantes na extração de solutos de sólidos. Além disso, quando se lida com enzimas, é necessário levar em conta a estabilidade térmica da enzima. A estabilidade da atividade de manganês peroxidase é fortemente influenciada pelo pH, bem como a temperatura e o tempo de incubação (SUTHERLAND; AUST, 1996).

Já o cultivo de fungos basidiomicetos em meio líquido permite a formação de mais biomassa em menos tempo, favorece a dispersão do fungo e a adaptação e é mais fácil de manipular (GUILLÉN-NAVARRO et al., 1998; WU et al., 2004).

A produção de lacases e peroxidases depende da espécie de fungo, das condições de cultivo, das fontes de carbono e nitrogênio e suas concentrações (STAJIC et al., 2006). Estudos têm sido realizados para verificar o efeito das fontes de carbono na produção de enzimas ligninolíticas por distintas espécies de basidiomicetos (ELISASHVILI et al., 2006; MIKIASHVILI et al., 2006). Em alguns desses estudos foi mostrado que tanto a natureza quanto a concentração das fontes de nitrogênio são os fatores de regulação da produção de enzimas ligninolíticas por basidiomicetos de podridão branca (ELISASHVILI et al., 2006; GALHAUP et al., 2002; MIKIASHVILI et al., 2006; STAJIC et al., 2006).

### **2.5.1 Ligninases**

A degradação da lignina por fungos é feita pela secreção de enzimas coletivamente chamadas de “ligninases”. As ligninases podem ser classificadas em fenoloxidasas (lacase) e heme peroxidases (lignina peroxidase – LiP, manganês peroxidase – MnP) (MARTINEZ et al., 2005). Em geral, lacases usam a molécula de oxigênio como aceptor de elétrons enquanto as peroxidases

usam o peróxido de hidrogênio como cossustrato (MAI; KUES; MILITZ, 2004). Os fungos de degradação branca secretam uma ou mais das ligninases em adição a outros compostos necessários para efetivar a degradação da lignina (WESENBERG; KYRIAKIDES; AGATHOS, 2003).

#### **2.5.1.1 Lacase (benzenodiol: oxigênio oxidoredutases (EC 1.10.3.2))**

Lacases são multicobre oxidoredutases que usam a molécula de oxigênio para oxidar vários compostos aromáticos e não aromáticos (BALDRIAN, 2006; CLAUS, 2004). Lacases acoplam a redução do oxigênio em duas moléculas de água com a oxidação de uma variedade de substratos, como fenóis, arilaminas, anilinas, tióis e lignina (THURSTON, 1994). Quatro íons de cobre em seu centro catalítico mediam o processo redox (MESSERSCHMIDT; HUBER, 1990).

Essa enzima já foi encontrada em muitas plantas e insetos (CLAUS, 2004). No entanto, na maioria das vezes, lacases foram encontradas e estudadas em fungos de podridão-branca, como *Lentinus tigrinus* (FERRARONI et al., 2007), *Pleurotus ostreatus* D1 (POZDNIAKOVA et al., 2006), *Cerrena unicolor* estirpe 137 (MICHNIEWICZ et al., 2006), *T. versicolor* (NECOCHEA et al., 2005), *Trametes* sp. linhagem AH28-2 (XIAO et al., 2003), *Trametes pubescens* (SHLEEV et al., 2007) e *Cyathus bulleri* (SALONY; BISARIA, 2006). A produção de lacase usando meio de cultura líquido também tem sido relatada em fungos da podridão marrom, incluindo *Coniophora puteana* (LEE, K. et al., 2004).

Fungos de degradação branca produzem combinações diferentes de enzimas; há fungos que produzem LiP e MnP, MnP e lacase, fungos produtores de LiP e lacase e outros que não produzem nem LiP nem MnP (HATAKKA, 1994).

Como lacases trabalham eficientemente em uma ampla gama de substratos sem cofatores, podem ter valor significativo em muitas aplicações biotecnológicas, tais como no branqueamento de celulose, em biossensores (KULYS; VIDZIUNAITE, 2003), na indústria de alimentos (SELINHEIMO et al., 2007), na indústria têxtil (RODRÍGUEZ; HOFER, 2004), na biorremediação de solo (NYANHONGO; COUTO; GUEBITZ, 2006) e na produção de polímeros complexos em química sintética (MUSTAFA et al., 2005).

#### **2.5.1.2 Lignina peroxidase [1,2-bis(3,4- dimetoxifenil) propano-1,3 diol:hidrogenperóxido oxidorredutases, EC 1.11.1.14] - LiP**

Lignina peroxidases (LiP) são glicoproteínas heme que possuem um papel central na biodegradação dos constituintes da parede celular vegetal (PIONTEK; SMITH; BLODIG, 2001). LiP catalisa a despolimerização  $H_2O_2$ -dependente de uma variedade de compostos da lignina não-fenólicos, diarilpropano, e uma grande variedade de compostos fenólicos, como, por exemplo, guaiacol, álcool vanílico, catecol, ácido siríngico, com potenciais redox até 1,4 V (WONG, 2009).

Essa enzima oxida os substratos pela transferência de elétrons em várias etapas e a formação de radicais intermediários, tais como radicais fenoxi e cátions do álcool veratrílico. Estes radicais intermediários sofrem reações não enzimáticas, tais como acoplamento de radicais e polimerização, clivagem da cadeia lateral, desmetilação e adição intramolecular e rearranjo (WONG, 2009). Ao contrário de outras peroxidases, como MnP, LiP é capaz de oxidar substratos aromáticos não fenólicos e não exigir a participação de mediadores, devido ao seu potencial redox elevado (WANG et al., 2008; WONG, 2009).

Desde a descoberta da LiP em *Phanerochaete chrysosporium* (GLENN et al., 1983), mais LiP foram encontradas em diferentes cepas de

*P.chrysosporium* (RENGANATHAN; MIKI; GOLD, 1985; TIEN; KIRK, 1984) e outros fungos de podridão-branca, como *Trametes versicolor* (JOHANSSON; WELINDER; NYMAN, 1993). Além disso, genes de LiP foram detectados em diferentes espécies de fungos, incluindo *Panus* sp., *P. coccineus*, *P. sanguineus* e *Perenniporia medula* (POINTING et al., 2005). LiP foi também detectada em algumas bactérias, tais como *Acinetobacter calcoaceticus* NCIM 2890 (GHODAKE et al., 2009) e *Streptomyces viridosporus* T7A (GOTTSCHALK; BON; NOBREGA, 2008).

### **2.5.1.3 Manganês peroxidase [Mn (II):hidrogeno-peróxido oxidoredutases, EC 1.11.1.13] – MnP**

Manganês peroxidases (MnP) são glicoproteínas extracelulares e são secretadas em múltiplas isoformas, as quais contêm uma molécula heme como ferro protoporfirina IX (ASGHER et al., 2008). MnP é dependente de peróxido e catalisa a oxidação do Mn (II) (com a redução do substrato) para Mn (III), que depois é liberado da superfície da enzima em complexo com oxalato ou com outros quelantes. O complexo Mn (III) quelado age como um reativo de baixo peso molecular, mediador redox de substratos fenólicos, incluindo fenóis simples, aminas, corantes, estruturas fenólicas da lignina e dímeros. O potencial de oxidação de Mn (III) quelante se limita apenas às estruturas fenólicas da lignina. No entanto, para a oxidação de substratos não fenólicos por Mn (III), radicais devem ser formados na presença de um segundo mediador. Os ácidos orgânicos, tais como oxalato e malonato, são os principais compostos que atuam como mediadores na produção de radicais reativos (ASGHER et al., 2008; WESENBERG; KYRIAKIDES; AGATHOS, 2003; WONG; GARICA-CAMPAYO, 2009).

Desde a descoberta de MnP em *Phanerochaete chrysosporium* (GLENN; GOLD, 1985), mais MnP foram encontradas em basidiomicetos, tais como *Panus tigrinus* (LISOV; LEOTIEVSKY; GOLOVLEVA, 2003), *Lenzites betulinus* (HOSHINO et al., 2002), *Phanerochaete flavido-alba* (RUBIA et al., 2002), *Agaricus bisporus* (LANKINEN et al., 2001), *Bjerkandera* sp. (PALMA et al., 2000) e *Nematoloma frowardii* b19 (HILDEN et al., 2008).

Chagas e Durrant (2001) mostraram que a presença de MnP pode aumentar o grau de descoloração de corantes, tendo esta enzima sido a principal enzima envolvida na descoloração de corantes por *P. Chrysosporium*. Além disso, MnP de fungos de podridão branca é considerada a principal enzima responsável pela branqueamento de papel.

### **2.5.2 Celulases**

O mecanismo amplamente aceito para a hidrólise enzimática da celulose envolve ações sinérgicas de endoglucanase (EC 3.2.1.4), exoglucanase ou celobio-hidrolase (EC 3.2.1.91) e  $\beta$ -glicosidase (EC 3.2.1.21) (HENRISSAT, 1994; KNOWLES; LETHTOVAARA; REERI, 1987; LYND et al., 2002; TEERI, 1997; WOOD; GARICA-CAMPAYO, 1990; ZHANG; LYND, 2004), que agem para degradar a celulose em oligossacarídeos de baixo peso molecular, celobiose e, eventualmente, glicose (NAZAN; ZÜMRÜT, 2000).

#### **2.5.2.1 Endo-1,4- $\beta$ -glucanase (EC 3.2.1.4, endocelulase)**

Endoglucanases foram isoladas de vários basidiomicetos de madeira apodrecida, fungos de podridão-parda e de podridão-branca e outros fungos, como *Sclerotium rolfsii*, *Rhodotorula glutinis* e *Termitomyces* sp. Como a atividade de endoglucanase também foi documentada em culturas de

basidiomicetos em lixo em decomposição (STEFFEN et al., 2007; VALÁSKOVÁ et al., 2007), fungos ectomicorrízicos (CAO; CRAWFORD, 1993; MAIJALA; FAGERSTEDT; RAUDASKOSKI, 1991) e leveduras associadas à madeira (JIMENEZ et al., 1991), é evidente que esta enzima é comum entre os basidiomicetos.

Essa enzima hidrolisa ligações glicosídicas  $\beta$ -1, 4 intramoleculares das cadeias de celulose, aleatoriamente, para produzir novas terminações de cadeia susceptíveis à ação de exoglucanases. Endoglucanases de basidiomicetos possuem pH ótimo de atividade entre 4,0 e 5,0 (SUZUKI et al., 2006; VALÁSKOVÁ; BALDRIAN, 2006). Somente a enzima heteróloga de *Volvariella volvacea* expressa em *Pichia* sp. apresenta pH ideal neutro (DING; GE; BUSWELL, 2002). Ótimos de temperatura estão entre os 50° e 70°C (VALÁSKOVÁ; BALDRIAN, 2006), ou seja, bem acima dos valores que ocorrem em condições naturais.

Carboximetilcelulose e celulose amorfa são bons substratos para a maioria das endoglucanases, embora não sejam naturais, e indicam que a atividade dessa enzima é essencialmente direcionada para as regiões amorfas na molécula de celulose. Os valores de Km para carboximetilcelulose estão na faixa de 0,26, em *Polyporus arcularius* a 13 g L<sup>-1</sup>, em *Gloeophyllum trabeum* (ISHIHARA et al., 2005).

#### **2.5.2.2 Exo-1,4- $\beta$ -glucanase (EC 3.2.1.91; celobio-hidrolase)**

Uma vez que a endo-1,4- $\beta$ -glucanase cria novas extremidades, as exoglucanases agem em sequência, sendo capazes de se ligar aos domínios cristalinos e liberar celobiose ou glicose das extremidades (MUÑOZ et al., 2001).

O grupo das exoglucanases é constituído por celobio-hidrolase (CBH) e glucano-hidrolase (GH). A GH (EC 3.2.1.74), cujo nome sistemático é 1,4- $\beta$ -D-glucano-glucano-hidrolase, é pouco relatada, mas possui estratégia de hidrólise da cadeia celulósica de elevada importância, pois é capaz de liberar glicose diretamente do polímero (LYND et al., 2002).

A CBH (EC 3.2.1.91) possui o nome sistemático 1,4- $\beta$ -D-glucana celobio-hidrolase e pode ser dividida em dois tipos: enzima do tipo I (CBH I), que hidrolisa celulose a partir do terminal redutor liberando celobiose, enquanto a do tipo II (CBH II) hidrolisa o mesmo substrato a partir do terminal não redutor. Essas enzimas geralmente sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise (celobiose) (CASTRO; PEREIRA JÚNIOR, 2009).

As exoglucanases não atuam sobre carboximetilcelulose por haver um impedimento estereoquímico causado pelos grupos substituintes. As exoglucanases atuam sobre celulose cristalina (Avicel), produzindo uma redução lenta e gradual do seu grau de polimerização. Desse modo, ensaios de atividade sobre Avicel caracterizam as exoglucanases, enquanto, para a atividade de endoglucanases, usa-se carboximetilcelulose (SÁNCHEZ, 2009).

### **2.5.2.3 $\beta$ -glucosidase (EC 3.2.1.21)**

As  $\beta$ -glicosidases, também denominadas celobiasas, possuem a função de hidrolisar a celobiose gerada pelas celobiohidrolases e endoglucanases em glicose, completando a hidrólise da celulose. As  $\beta$ -glicosidases não são celulases legítimas, por agirem sobre substratos solúveis, mas sua contribuição é muito importante para a eficiência da hidrólise da celulose, pela remoção da celobiose do meio reacional, que é um potente inibidor competitivo das celobiohidrolases (MUÑOZ et al., 2001). Assim como a celobiohidrolase, a  $\beta$ -glicosidase também

é reportada com a característica de sofrer inibição por seu produto de hidrólise, neste caso a glicose (CASTRO; PEREIRA JÚNIOR, 2009).

Como celobiose é um substrato amplamente disponível,  $\beta$ -glicosidases são produzidas pela maioria dos microrganismos (LYND et al., 2002). Entre os basidiomicetos, essas enzimas foram isoladas tanto de fungos de podridão-branca quanto de podridão-marrom. Também foram isoladas dos fungos micorrízicos *Pisolithus tinctorius* e *Tricholoma matsutake*, do fitopatógeno *Sclerotium rolfsii* e de *Termitomyces* sp.  $\beta$ -glicosidases também foram isoladas e sua atividade detectada em leveduras basidiomicetos, embora algumas das leveduras associadas à madeira sejam incapazes de usar celobiose como substrato (MIDDELHOVEN, 2006; ONISHI; TANAKA, 1996; PECIAROVA; BIELY, 1982).

Quando atuam conjuntamente, as enzimas do complexo celulolítico apresentam um rendimento melhor do que a soma dos rendimentos individuais, ou seja, quando atuam isoladamente umas das outras. Tal efeito é conhecido como sinergia (BHAT; BHAT, 1997).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Microrganismos

Foram avaliadas, quanto ao crescimento micelial em cinco meios de cultivo e produção de ligninases e celulases, seis linhagens de *Lentinula edodes*: LE, LE2, LE3, LE4, LE5 e LE6, pertencentes à coleção do Laboratório de Cogumelos Comestíveis da Universidade Federal de Lavras.

As culturas estoque foram mantidas em meio ágar malte (15,0 g L<sup>-1</sup> de glicose; 15,0 g L<sup>-1</sup> de extrato de malte; 15,0 g L<sup>-1</sup> de ágar) e incubadas a 25°C.

#### 3.2 Avaliação do crescimento micelial em diferentes meios de cultivo

As linhagens LE, LE2, LE3, LE4, LE5 e LE6 foram inoculadas em cinco diferentes meios de cultivo: meio básico (10,0 g L<sup>-1</sup> de glicose; 1,0 g L<sup>-1</sup> de fosfato de potássio monobásico; 0,5 g L<sup>-1</sup> de sulfato de magnésio heptahidratado; 1,0 g L<sup>-1</sup> de sulfato de amônio, 0,5 g L<sup>-1</sup> de cloreto de cálcio; 15,0 g L<sup>-1</sup> de ágar); meio básico acrescido de 0,01% de extrato de levedura; meio básico e biotina na concentração final de 5 µg L<sup>-1</sup>; meio básico e tiamina na concentração final de 100 µg L<sup>-1</sup> e meio básico com biotina e tiamina nas concentrações de 5 µg L<sup>-1</sup> e 100 µg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

O meio básico e o meio básico com extrato de levedura foram autoclavados, a 121°C, por 15 minutos. As vitaminas foram preparadas em água estéril, filtradas em membrana de 0,20 µm e adicionadas ao meio básico já estéril, no momento em que foram vertidas nas placas de Petri.

Um disco de 10 mm de diâmetro contendo o micélio de cada cultura foi inoculado no centro da placa. As placas foram incubadas a 25°C e o diâmetro

das colônias foi medido diariamente até o momento em que a primeira colônia tivesse crescido em toda a placa, interrompendo a corrida micelial neste ponto.

A partir do momento em que a corrida micelial foi interrompida, foi determinado o peso seco da massa micelial para compará-lo com os diâmetros das colônias. Para isso, o ágar das placas foi fundido e a massa micelial foi transferida para cadinhos de alumínio, previamente identificados e pesados, para secagem em estufa, a 65°C, até peso constante.

O experimento foi feito com três repetições e foram estabelecidos o crescimento micelial (mm/dia) e o peso seco (mg dia<sup>-1</sup>) de cada linhagem em cada meio de cultivo avaliado. As médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott utilizando-se o software SISVAR (FERREIRA, 2008) para a determinação do meio de cultivo que proporcionou maior crescimento micelial.

### 3.3 Avaliação semiquantitativa da produção de ligninases e celulasas

Foi realizada uma avaliação semiquantitativa da produção de ligninases e celulasas para a seleção das linhagens com as quais seria realizada a curva de indução de celulasas e produção de ligninases.

Para seleção dos isolados foi utilizado o índice enzimático (IE) (HANKIN; ANAGNOSTAKIS, 1975):

$$IE = \frac{\text{diâmetro do halo}}{\text{diâmetro da colônia}}$$

Os isolados com maior índice enzimático foram selecionados para a realização da curva de indução enzimática.

### **3.3.1 Avaliação semiquantitativa da produção de lacase**

A avaliação semiquantitativa de lacase foi feita com modificações do método de Poiting (1999). Ao meio básico com 0,01% de extrato de levedura foi acrescido 0,1% de ABTS (2,2 'azino-bis (3-ácido etilbenzothiazoline-6-ácido sulfônico) e um disco de 10 mm contendo micélio foi inoculado no centro da placa. A incubação foi feita a 25°C, por 7 dias. A produção de lacase foi observada pela formação de uma cor verde no meio de crescimento.

Os diâmetros do halo verde e da colônia foram medidos diariamente para o cálculo do índice enzimático (IE).

### **3.3.2 Avaliação semiquantitativa da produção de lignina peroxidase e manganês peroxidase**

A avaliação semiquantitativa de lignina peroxidase e manganês peroxidase foi feita com modificações do método de Poiting (1999). Ao meio básico com extrato de levedura foi acrescido 0,01% de Azure-B. Um disco de 10 mm contendo micélio foi inoculado no centro da placa. A incubação foi feita a 25°C, por 7 dias.

A descoloração do corante Azure-B (Cl 52010) pelos fungos é positivamente correlacionada com a produção de lignina peroxidase e manganês peroxidase (ARCHIBALD, 1992).

### **3.3.3 Avaliação semiquantitativa da produção de celulase**

A avaliação da produção de celulase foi feita de acordo com Kasana et al. (2008), com modificações. O meio básico com 0,01% de extrato de levedura foi preparado substituindo-se a glicose por carboximetilcelulose. Um disco de 10

mm contendo micélio foi inoculado no centro da placa. A incubação foi feita a 25°C, por 3 dias.

Após esse período de incubação, uma solução de lugol (6,67 g L<sup>-1</sup> de iodeto de potássio; 3,33 g L<sup>-1</sup> de iodo) foi adicionada até cobrir toda a placa. A formação de uma zona amarela opaca indicou a produção de celulase.

### **3.4 Curva de indução de celulases**

O meio básico acrescido de 0,01% de extrato de levedura foi utilizado, substituindo-se a glicose do meio por carboximetilcelulose, avicel e celobiose para a indução de endo-1,4-β-glucanase, exo-1,4-β-glucanase e β-glicosidase, respectivamente. Para isso, foram utilizados frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL de meio líquido.

As linhagens selecionadas para a curva de indução foram LE3, LE4 e LE6. A inoculação foi feita adicionando-se 12 discos de 10 mm contendo o micélio de cada linhagem por frasco. A incubação foi feita a 25°C, a 110 rpm, por 28 dias. Foi feito um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com esquema fatorial de 3x4 e as parcelas foram subdivididas no tempo, retirando-se 8,3 mL de cada amostra com 7, 14, 21 e 28 dias, para os ensaios enzimáticos e dosagem de proteínas totais.

As linhagens LE, LE2 e LE5 foram inoculadas nos meios de indução para celulases e foram incubadas, a 25°C, a 110 rpm. As amostras para os ensaios de celulases foram coletadas com 7 e 28 dias de incubação.

As médias das atividades enzimáticas das linhagens LE, LE2 e LE5 com 7 e 28 dias de incubação foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, utilizando-se o software SISVAR (FERREIRA, 2008).

### 3.4.1 Determinação da atividade de endo-1,4- $\beta$ -glucanase (EC 3.2.1.4)

A atividade de endo-1,4- $\beta$ -glucanase foi determinada em mistura de reação contendo 0,05 mL da fonte enzimática e 0,45 mL de carboximetilcelulose 1% em tampão acetato de sódio 0,05 mol L<sup>-1</sup> (pH 5,0). A mistura de reação foi incubada por 30 minutos, a 50°C. A reação foi interrompida com a adição de 1,5mL de hidrazida do ácido p-hidroxibenzoico 1%. A mistura foi mantida a 100°C, por 5 minutos e, posteriormente, resfriada em gelo. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 410 nm, monitorando a liberação de moléculas de glicose (LEVER, 1972). O branco foi feito com todos os componentes da mistura de reação, substituindo-se a fonte enzimática pelo meio de cultivo sem inoculação.

As leituras de absorbância foram plotadas contra uma curva padrão de glicose e a atividade enzimática específica foi expressa em  $\mu\text{mol minuto}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$  (U mg de proteína<sup>-1</sup>).

### 3.4.2 Determinação da atividade de exo-1,4- $\beta$ -glucanase (EC 3.2.1.91)

A atividade de exo-1,4- $\beta$ -glucanase foi determinada em mistura de reação contendo 0,05 mL da fonte enzimática e 0,45 mL de celulose microcristalina 1% em tampão acetato de sódio 0,05 mol L<sup>-1</sup> (pH 5,0). A mistura de reação foi incubada, por 30 minutos, a 50°C. A reação foi interrompida com a adição de 1,5mL de hidrazida do ácido p-hidroxibenzoico 1%. A mistura foi mantida a 100°C, por 5 minutos e, posteriormente, resfriada em gelo. As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 410 nm, monitorando-se a liberação de moléculas de glicose (LEVER, 1972). O branco foi feito com todos os componentes da mistura de reação, substituindo-se a fonte enzimática pelo meio de cultivo sem inoculação.

As leituras de absorvância foram plotadas contra uma curva padrão de glicose e a atividade enzimática específica foi expressa em  $\mu\text{mol minuto}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$  (U mg de proteína<sup>-1</sup>).

#### **3.4.3 Determinação da atividade de $\beta$ -glicosidase (EC 3.2.1.21)**

A atividade de  $\beta$ -glicosidase foi determinada em mistura de reação contendo 0,3 mL de p-nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo  $0,02 \text{ molL}^{-1}$  em tampão acetato de sódio  $0,05 \text{ molL}^{-1}$  (pH 5,0) e 0,2 mL da fonte enzimática. A mistura de reação foi incubada, por 30 minutos, a  $50^{\circ}\text{C}$ . A reação foi interrompida com a adição de 0,5 mL de carbonato de sódio  $1 \text{ mol L}^{-1}$ . As leituras foram feitas em espectrofotômetro a 405 nm, monitorando-se a liberação de moléculas de p-nitrofenol (LEVER, 1972). O branco foi feito com todos os componentes da mistura de reação, substituindo-se a fonte enzimática pelo meio de cultivo sem inoculação.

As leituras de absorvância foram plotadas contra uma curva padrão de p-nitrofenol e a atividade enzimática específica foi expressa em  $\mu\text{mol minuto}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$  (U mg de proteína<sup>-1</sup>).

#### **3.5 Curva de produção de ligninases**

O meio básico foi utilizado acrescido de 0,01% de extrato de levedura para produção das ligninases (lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase). Para isso, foram utilizados frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL de meio líquido.

As linhagens selecionadas para a curva de produção de ligninases foram LE3, LE4 e LE6. A inoculação foi feita adicionando-se 12 discos de 10 mm contendo o micélio de cada linhagem por frasco. A incubação foi feita a  $25^{\circ}\text{C}$ , a

110 rpm, por 28 dias. Foi feito um delineamento inteiramente casualizado (DIC) com esquema fatorial de 3x4 e as parcelas foram subdivididas no tempo, retirando-se 8,3 mL de cada amostra com 7, 14, 21 e 28 dias, para os ensaios enzimáticos e dosagem de proteínas totais.

As linhagens LE, LE2 e LE5 foram inoculadas no meio para a produção de ligninases e foram incubadas, a 25°C, a 110 rpm. As amostras para o ensaio de ligninases foram coletadas com 28 dias de incubação.

As médias das atividades enzimáticas das linhagens LE, LE2 e LE5 com 7 dias de incubação foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, utilizando-se o software SISVAR (FERREIRA, 2008).

### **3.5.1 Determinação da atividade de lacase (EC 1.10.3.2)**

A atividade de lacase foi determinada por método espectrofotométrico indireto utilizando-se 2,2'-azino-bis etilbentiazoline (ABTS) em mistura de reação de 1 mL contendo 0,3 mL de tampão acetato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 5,0); 0,1 mL de ABTS 1 mmol L<sup>-1</sup> (em água) e 0,6 mL da fonte enzimática. A mistura de reação foi incubada, por 5 minutos, a 37°C e a oxidação do ABTS foi medida pelo aumento da absorbância a 420 nm (BUSWELL; CAI; CHANG, 1995). O branco foi feito com todos os componentes da mistura de reação substituindo-se a fonte enzimática pelo meio de cultivo sem inoculação.

Uma unidade de atividade enzimática específica foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μmol de ABST por minuto ( $\epsilon_{420} = 3,6 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ ) por mg de proteína.

### 3.5.2 Determinação da atividade de manganês peroxidase (EC 1.11.1.13)

A atividade de manganês peroxidase foi medida utilizando-se o vermelho de fenol ( $1\text{g. L}^{-1}$ ) como substrato ( $\epsilon = 4.460\text{ mol}^{-1}\text{. L.cm}^{-1}$ ) (KUWAHARA et al., 1984). A mistura de reação de 1 mL contendo 0,5 mL do extrato enzimático, 0,1 mL de solução de vermelho de fenol ( $1,0\text{ g.L}^{-1}$ ), 0,1 mL de lactato de sódio pH 4,5 ( $250\text{ mmol.L}^{-1}$ ), 0,2 mL de albumina bovina (0,5%), 0,05 mL de sulfato de manganês ( $2\text{ mmol. L}^{-1}$ ) e 0,05 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $2\text{ mmol.L}^{-1}$ ) em tampão succinato de sódio ( $20\text{ mmol.L}^{-1}$ ), pH 4,5. A solução resultante foi incubada, por 15 minutos, a  $37^\circ\text{C}$  e a reação foi interrompida pela adição de 0,04 mL de NaOH ( $2\text{ molL}^{-1}$ ). A absorvância foi medida a 610 nm contra um branco feito com todos os componentes da mistura de reação, substituindo-se a fonte enzimática pelo meio de cultivo sem inoculação.

Uma unidade de atividade enzimática específica foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar  $1\text{ }\mu\text{mol}$  de vermelho de fenol por minuto por mg de proteína.

### 3.5.3 Determinação da atividade de lignina peroxidase (EC 1.11.1.14)

A atividade de lignina peroxidase foi determinada pelo monitoramento da absorção em 310 nm da formação de veratraldeído ( $\epsilon = 9.300\text{ mol}^{-1}\text{ L cm}^{-1}$ ), por meio da oxidação de álcool veratrílico (TIEN; KIRK, 1984). A mistura de reação de 2 mL foi composta de 0,5 mL da fonte enzimática, 0,5 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$   $2\text{ mmol L}^{-1}$ , 0,5 mL de álcool veratrílico  $10\text{ mmol L}^{-1}$  e 1 mL de tartarato de sódio  $0,125\text{ mol L}^{-1}$  pH 3,0 incubada, por 5 minutos, a  $37^\circ\text{C}$ . O branco foi feito com todos os componentes da mistura de reação, substituindo-se a fonte enzimática pelo meio de cultivo sem inoculação.

Uma unidade de atividade enzimática específica foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de álcool veratrílico a veratraldeído por minuto por mg de proteína.

### **3.6 Determinação de proteínas totais**

A dosagem de proteínas foi realizada segundo o método de Bradford (1976) com algumas modificações, que consiste em reação com 0,2 mL de amostra e 0,8 mL de reagente de Bradford concentrado, acrescido sob agitação. Após 5 minutos, procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 595 nm. A concentração de proteínas foi obtida pela plotagem em curva padrão de albumina de soro bovino (BSA).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Crescimento micelial e peso seco em diferentes meios de cultivo

Não se observaram diferenças significativas para o crescimento micelial nos cinco meios de cultivo testados, para as linhagens LE, LE2, LE3, LE4 e LE6. Porém, a linhagem LE5 apresentou comportamento variado, tendo o meio básico sido o que menos favoreceu seu crescimento e o meio básico com 0,01% de extrato de levedura o melhor meio para o cultivo dessa linhagem, dentre os meios testados. A linhagem LE4 tem o menor crescimento micelial em todos os meios de cultivo. As linhagens LE, LE3, LE5 e LE6 foram as com maior crescimento no meio básico acrescido de biotina e tiamina; já no meio com 0,01% de extrato de levedura, as linhagens com maior crescimento micelial foram LE2, LE5 e LE6 (Tabela 1).

É importante fazer uma comparação entre o crescimento micelial ( $\text{mm dia}^{-1}$ ) e o peso seco ( $\text{mg dia}^{-1}$ ), uma vez que nem sempre um crescimento micelial rápido corresponde a um micélio denso. Assim como no crescimento micelial ( $\text{mm dia}^{-1}$ ), o peso seco das linhagens LE, LE2 e LE4 foi o mesmo para todos os meios de cultivo testados. A linhagem LE3 apresentou o maior peso seco nos meios básico e básico acrescido de 0,01% de extrato de levedura e as linhagens LE5 e LE6 apresentaram maior peso seco no meio básico acrescido de 0,01% de extrato de levedura. A linhagem LE5 não apresentou um comportamento tão variado no peso seco quanto no crescimento micelial, nos diferentes meios. O peso seco em meio básico foi menor para as linhagens LE2 e LE4, enquanto nos meios básico e biotina, básico e tiamina e a combinação das duas vitaminas, o peso seco foi o mesmo para todas as linhagens (Tabela 2).

Tabela 1 Crescimento micelial (mm dia<sup>-1</sup>) das linhagens de *Lentinula edodes* em diferentes meios de cultivo

Crescimento micelial (mm dia <sup>-1</sup> )												
Meio de cultivo	LE		LE2		LE3		LE4		LE5		LE6	
Meio básico	6,1	A b	6,0	A b	6,0	A b	4,8	A c	6,7	D a	6,9	A a
Meio básico e biotina 5 µgL <sup>-1</sup>	6,7	A a	6,4	A a	7,3	A a	4,8	A b	7,0	B a	6,9	A a
Meio básico e tiamina 100 µgL <sup>-1</sup>	6,4	A a	5,9	A a	6,9	A a	4,4	A b	7,0	B a	6,6	A a
Meio básico biotina e tiamina	6,7	A a	5,2	A b	7,0	A a	4,5	A c	6,9	C a	6,4	A a
Meio básico e extrato de levedura 0,01%	6,6	A b	7,4	A a	6,6	A b	4,4	A c	7,8	A a	7,5	A a

As médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

Tabela 2 Massa seca ( $\text{mg dia}^{-1}$ ) das linhagens de *Lentinula edodes* em diferentes meios de cultivo

Meio de cultivo	Massa seca ( $\text{mg dia}^{-1}$ )											
	LE		LE2		LE3		LE4		LE5		LE6	
<b>Meio básico</b>	1,07	A a	0,71	A b	1,14	A a	0,50	A b	1,14	B a	1,00	B a
<b>Meio básico e biotina <math>5 \mu\text{gL}^{-1}</math></b>	0,71	A a	0,93	A a	0,57	B a	0,50	A a	0,57	B a	0,64	B a
<b>Meio básico e tiamina <math>100 \mu\text{gL}^{-1}</math></b>	0,50	A a	0,93	A a	0,50	B a	0,36	A a	0,64	B a	0,79	B a
<b>Meio básico biotina e tiamina</b>	1,29	A a	1,07	A a	0,79	B a	0,41	A a	0,93	B a	0,64	B a
<b>Meio básico e extrato de levedura 0,01%</b>	1,07	A c	1,36	A c	1,21	A c	0,86	A c	3,86	A a	2,43	A b

As médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

Como alguns fungos basidiomicetos são deficientes em tiamina e biotina (CHANG; MILES, 2004), era esperado que o crescimento das linhagens de *Lentinula edodes* nos meios contendo biotina e tiamina, separadamente, fosse maior que no meio sem essas vitaminas e que a adição conjunta dessas vitaminas proporcionasse um crescimento ainda maior do que quando esses fatores de crescimento fossem adicionados separadamente ao meio de cultivo. No entanto, não foi isso o observado estatisticamente.

Pelo fato de duas linhagens (LE5 e LE6) terem apresentado um peso seco consideravelmente maior no meio com 0,01% de extrato de levedura e as linhagens LE3, LE5 e LE6 terem se desenvolvido melhor neste meio de cultivo de acordo com o peso seco, além do fato de o extrato de levedura ser uma fonte mais barata de vitaminas, o meio básico com 0,01% de extrato de levedura foi escolhido para a realização dos testes qualitativos de produção de ligninases e celulases e da curva enzimática.

#### **4.2 Avaliação semiquantitativa da produção de ligninases e celulases**

De acordo com Pointing (1999), a cor do meio de cultivo torna-se verde pela oxidação do ABTS (2,2 'azino-bis (3-ácido etilbenzothiazoline-6-ácido sulfônico) na presença de lacase (Figura 1). A reação com o ABTS foi imediata para as linhagens LE3, LE4 e LE6. As linhagens LE4 e LE6 apresentaram maior índice enzimático com cinco dias de incubação. As linhagens LE, LE2 e LE3 apresentaram o mesmo comportamento, enquanto a linhagem LE5 possuiu o menor índice enzimático (Tabela 3).

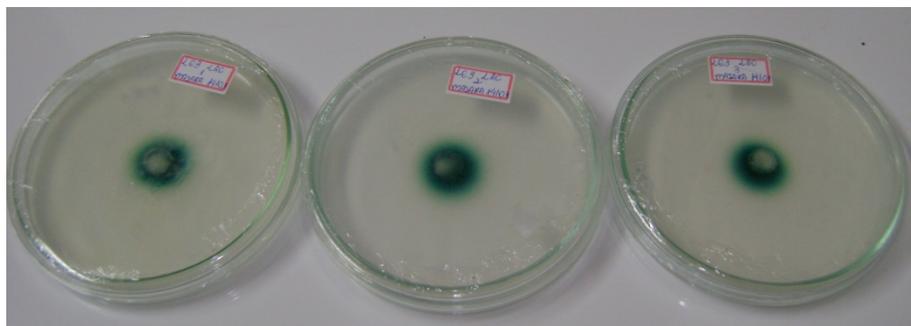


Figura 1 Avaliação semiquantitativa de lacase para a linhagem LE 3

Tabela 3 Índice enzimático para lacase com cinco dias de incubação

<b>Linhagem</b>	<b>Índice enzimático</b>
LE5	2,09 c
LE2	2,64 b
LE3	2,95 b
LE	3,25 b
LE6	5,00 a
LE4	5,33 a

As médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

As linhagens LE, LE3, LE4 e LE5 foram capazes de descolorir o corante Azure B, indicando a produção de lignina peroxidase e/ou manganês peroxidase (Figura 2). A descoloração do corante não ocorreu com o mesmo tempo de incubação para essas linhagens, sendo com sete dias de incubação para as linhagens LE3 e LE5, oito dias para LE e doze dias para a linhagem LE4. A descoloração ocorreu apenas sob as colônias, não sendo possível o cálculo do índice enzimático.



Figura 2 Avaliação semiquantitativa de lignina peroxidase e manganês peroxidase para a linhagem LE5

Não foi possível realizar o cálculo do índice enzimático na avaliação semiquantitativa de celulase para todas as linhagens testadas, uma vez que a coloração amarela opaca ocorreu somente sob as colônias (Figura 3).

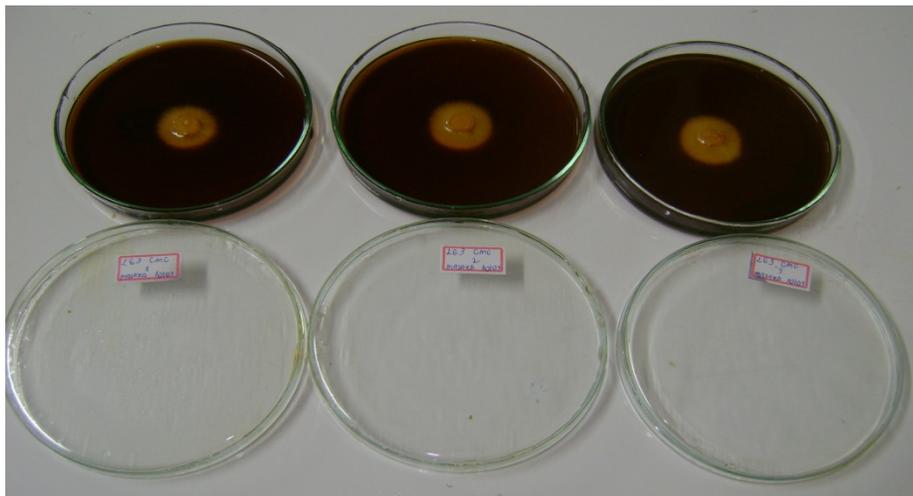


Figura 3 Avaliação semiquantitativa de celulase para a linhagem LE3

De acordo com Kasana et al. (2008), o método utilizando lugol, além de possibilitar uma observação rápida dos resultados, quando comparado com outros métodos, pode ser utilizado para bactérias, actinomicetos e fungos. Esse autor apenas relata a observação de resultados positivos ou negativos utilizando esse método e não menciona nenhuma relação que possa fornecer a intensidade da produção de celulase.

No trabalho de Hankin e Anagnostakis (1975), foi testada a produção de celulase em meio sólido contendo CMC de 4 espécies de fungos, *Trichoderma viride*, *Penicillium* sp., *Peziza ostracoderma* e *Fusarium* sp. e foi observado que, com *Trichoderma*, *Fusarium* e *Peziza*, as áreas claras estavam sob as colônias, e essas áreas claras não se estendiam muito além da borda da colônia. Já o fungo *Penicillium*, de crescimento mais lento, apresentou zonas de atividade celulolítica além da borda da colônia. Possivelmente, as áreas claras, indicativas da produção de celulase, das linhagens de *Lentinula edodes* não ultrapassaram a borda das colônias devido ao rápido crescimento dessas linhagens, não necessariamente indicando baixa produção de celulase.

As linhagens LE4 e LE6 foram selecionadas para a realização da curva de produção de ligninases pelo fato de essas linhagens terem apresentado maior índice enzimático para lacase. Além disso, a linhagem LE4 apresentou capacidade de descolorir o corante azure B, indicando produção de lignina peroxidase e/ou manganês peroxidase. A linhagem LE3 apresentou o mesmo comportamento das linhagens LE e LE2 na avaliação semiquantitativa de lacase. Dentre estas linhagens, LE e LE3 descoloriram o corante azure B, mas, pelo fato de a reação com o ABTS no teste para lacase ter sido imediata para a linhagem LE3, esta também foi selecionada para a realização da curva de produção de ligninases.

Como não foi possível a seleção das linhagens para a realização da curva de indução de celulases por meio da avaliação semiquantitativa, as mesmas

linhagens utilizadas na curva de produção de ligninases foram utilizadas na curva de indução de celulasas.

### **4.3 Curva enzimática**

As linhagens LE3, LE4 e LE6 tiveram uma tendência de aumento de atividade de manganês peroxidase ao longo dos dias de incubação, mas esse aumento foi maior para a linhagem LE6 que inicialmente possuía uma atividade de 0,642 U mg de proteína<sup>-1</sup> e, com 28 dias de incubação, essa atividade foi elevada para 26,2 U mg de proteína<sup>-1</sup> (Gráfico 1). A atividade de lacase para as linhagens LE3 e LE4 foi baixa em todo o experimento, apresentando valor médio de atividade de 0,137 U mg de proteína<sup>-1</sup> e 11,2 U mg de proteína<sup>-1</sup>, respectivamente (Gráfico 2). Já a linhagem LE6 apresentou atividade de lacase crescente com atividade máxima de 333,7 U mg de proteína<sup>-1</sup> aos 28 dias de incubação. Não foi detectada atividade de lignina peroxidase para nenhuma das linhagens avaliadas.

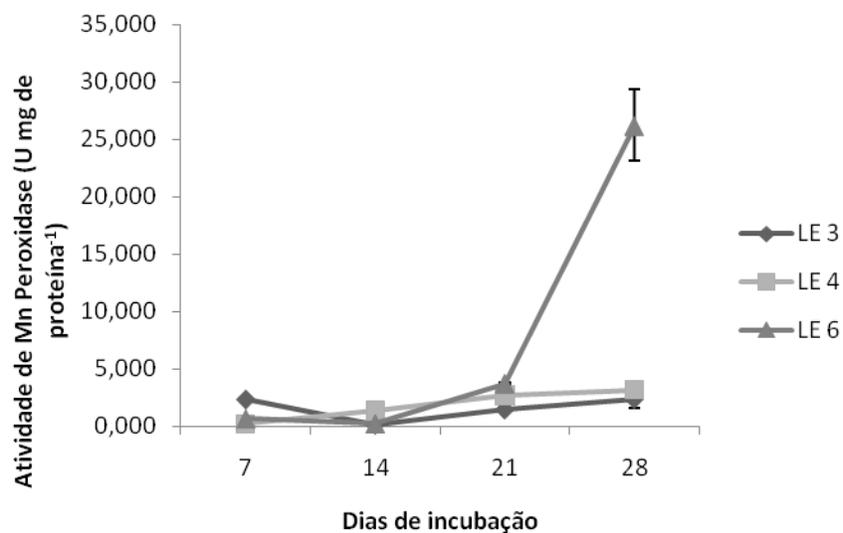


Gráfico 1 Curva de produção de manganês peroxidase para as linhagens LE3, LE4 e LE6 de Lentinula edodes

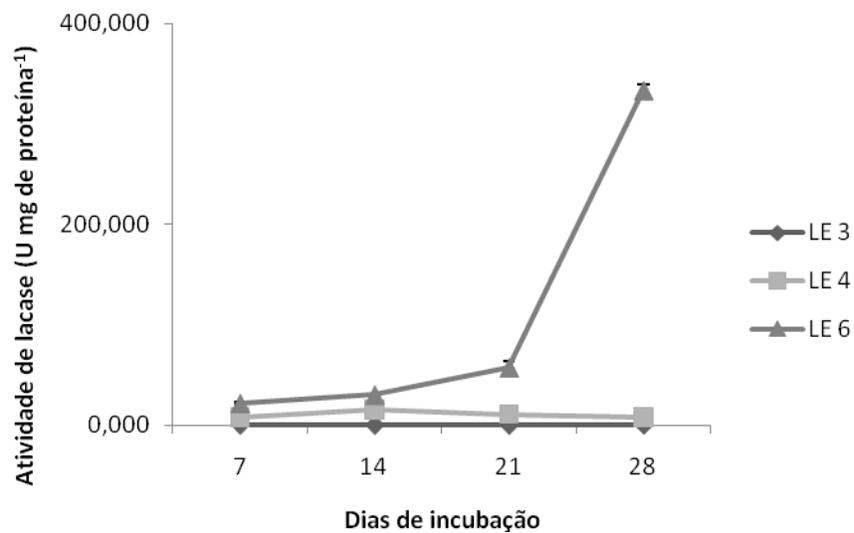


Gráfico 2 Curva de produção de lacase para as linhagens LE3, LE4 e LE 6 de Lentinula edodes

Apesar de a avaliação semiquantitativa de lignina peroxidase e manganês peroxidase ter sido negativa para a linhagem LE2, foi detectada uma pequena atividade de manganês peroxidase para essa linhagem com 28 dias de incubação. As atividades de lacase das linhagens LE e LE5 foram baixas, o que já era esperado para a linhagem LE5, uma vez que esta apresentou o menor índice enzimático. Já para a linhagem LE, de acordo com o índice enzimático, era esperada uma atividade próxima à das linhagens LE2 e LE3. No entanto, a atividade de lacase para essa linhagem foi inferior em relação à linhagem LE2, (Tabela 4). Também não foi detectada atividade de lignina peroxidase para as linhagens LE, LE2 e LE5.

Tabela 4 Atividade de manganês peroxidase e lacase (U mg proteína<sup>-1</sup>) para as linhagens LE, LE2 e LE5 com 28 dias de incubação

Linhagem	Atividade (U mg proteína <sup>-1</sup> )	
	Lacase	Mn peroxidase
LE	0,091 b	8,866 a
LE2	16,346 a	0,090 c
LE5	0,127 b	2,394 b

As médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

*Lentinula edodes* já foi descrito anteriormente como um bom produtor de manganês peroxidase e lacase, enquanto lignina peroxidase aparentemente não tem um papel significativo em seu sistema enzimático lignolítico (BUSWELL et al., 1995; HATVANI; MÉCS, 2002; LEATHAM, 1985; MAKKAR et al., 2001; MORAES et al., 2001). Tem sido debatido que a incubação de álcool veratrílico com o extrato enzimático de *L. edodes* produz vários produtos, muito diferentes daqueles identificados de outros fungos de degradação branca (CRESTINI; SERMANNI, 1995). Dessa maneira, os

resultados da ausência de LiP nos extratos de *L. edodes* levantam a seguinte questão: esse fungo realmente não produz LiP ou essa enzima não pode ser detectada pelos métodos analíticos convencionais (SILVA; MARTINS; MILAGRES, 2008).

Makkar et al. (2001), avaliando a produção de manganês peroxidase e lacase de *Lentinula edodes* em meio contendo farelo de arroz e serragem após quarenta dias de incubação, observaram atividades de 11,3 U mg de proteína<sup>-1</sup> para lacase e 10,2 U mg de proteína<sup>-1</sup> para manganês peroxidase. A linhagem LE4, com 21 dias de incubação, apresentou atividade de lacase de 11,7 U mg de proteína<sup>-1</sup>, aproximadamente igual à encontrada por Makkar et al. (2001). A linhagem LE6, entretanto, apresentou maior atividade de lacase que o encontrado por esses autores em todas as etapas de cultivo avaliadas. As linhagens LE3 e LE4 apresentaram atividade de manganês peroxidase menor que a relatada na literatura, em todas as etapas de cultivo avaliadas, enquanto a linhagem LE6 apresentou atividade dessa enzima superior à relatada por esses autores com 28 dias de incubação.

Orth, Royse e Tien (1993) obtiveram um extrato para avaliação da atividade de manganês peroxidase, lacase e lignina peroxidase de 12 espécies cultivadas em serragem de carvalho por 30 dias, a 23°C. Algumas das espécies avaliadas, *Lentinula edodes*, *Pleurotus eryngii* e *Pleurotus pulmonarius*, apresentaram atividade de manganês peroxidase de 11,8; 4,47 e 19,0 U mg de proteína<sup>-1</sup>, respectivamente. Esses autores relatam que, para todos os fungos utilizados no experimento, a atividade de lacase foi bem menor, em relação à de manganês peroxidase, o que não foi observado neste experimento para as linhagens LE2, LE4 e LE6, que apresentaram atividades de lacase superiores às atividades de manganês peroxidase. Não foi observada atividade de lignina peroxidase para os fungos avaliados por estes autores.

As linhagens LE4 e LE6 não apresentaram atividade de exo-1,4- $\beta$ -glucanase com sete dias de incubação, enquanto, para a linhagem LE3, o pico de atividade dessa enzima, 3,228 U mg proteína<sup>-1</sup>, foi com sete dias de incubação. Para a linhagem LE6, houve uma diminuição da atividade de exo-1,4- $\beta$ -glucanase depois de 14 dias de incubação. A linhagem LE4 foi a maior produtora de exo-1,4- $\beta$ -glucanase, com 11,4 U mg proteína<sup>-1</sup> de atividade com 28 dias de incubação (Gráfico 3).

A atividade de endo-1,4- $\beta$ -glucanase para as linhagens LE3 e LE6 foi máxima com 14 dias de incubação; os valores dessa atividade foram de 42,8 U mg proteína<sup>-1</sup> e 107,2 U mg proteína<sup>-1</sup>, respectivamente. A linhagem LE4 apresentou pico de atividade dessa enzima com 21 dias de incubação (Gráfico 4).

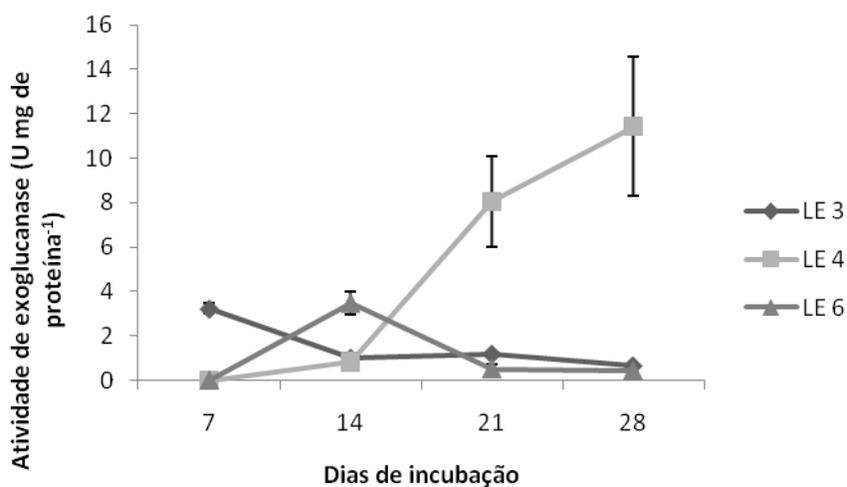


Gráfico 3 Curva de indução de exo-1,4- $\beta$ -glucanase para as linhagens LE3, LE4 e LE6 de *Lentinula edodes*

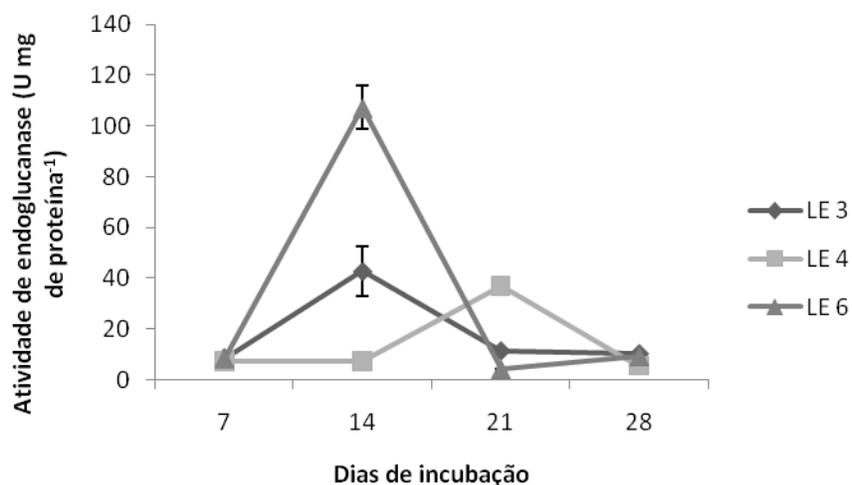


Gráfico 4 Curva de indução de endo-1,4-β-gluconase para as linhagens LE3, LE4 e LE6 de *Lentinula edodes*

Desse modo, para a indução de endo-1,4-β-gluconase para as linhagens LE3 e LE6, o tempo de incubação poderia ser reduzido para 14 dias e, para a linhagem LE4, para 21 dias de incubação.

A queda na atividade de endo-1,4-β-gluconase para essas linhagens pode ter acontecido devido à formação de produtos que possam inibir essa enzima. Além disso, o pH do meio pode ter sido alterado, afetando a atividade da enzima.

A linhagem LE6 precisou de um período maior de adaptação ao meio contendo celobiose, começando a produzir a enzima β-glicosidase com 21 dias de incubação. O pico de produção dessa enzima para todas as linhagens foi com 28 dias de incubação e a linhagem LE6 se destacou na produção dessa enzima neste período de incubação, com atividade de 126,7 U mg proteína<sup>-1</sup> (Gráfico 5).

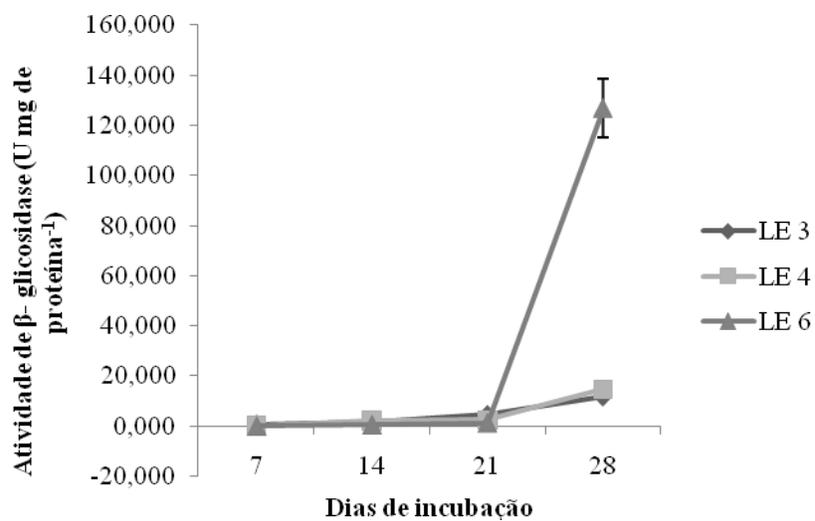


Gráfico 5 Curva de indução de  $\beta$ -glicosidase para as linhagens LE3, LE4 e LE6 de *Lentinula edodes*

Houve aumento na atividade de endo-1,4- $\beta$ -glucanase e  $\beta$ -glicosidase e diminuição da atividade de exo-1,4- $\beta$ -glucanase, de 7 para 28 dias de incubação, para as linhagens LE, LE2 e LE5 (Tabela 5). As atividades das três enzimas do complexo celulolítico para as linhagens LE, LE2 e LE5 foram superiores às atividades das linhagens LE3, LE4 e LE6, com sete dias de incubação.

Tabela 5 Atividade de endo-1,4- $\beta$ -glucanase, exo-1,4- $\beta$ -glucanase e  $\beta$ -glicosidase (U mg proteína<sup>-1</sup>), para as linhagens LE, LE2 e LE5, com 7 e 28 dias de incubação

Atividade (U mg proteína <sup>-1</sup> )												
Linhagem	7 dias de incubação						28 dias de incubação					
	Endo-1,4- $\beta$ -glucanase		Exo-1,4- $\beta$ -glucanase		$\beta$ -glicosidase		Endo-1,4- $\beta$ -glucanase		Exo-1,4- $\beta$ -glucanase		$\beta$ -glicosidase	
LE	11,632	c	19,211	b	0,267	b	40,380	a	3,528	b	0,360	b
LE2	13,265	b	18,469	b	0,203	b	27,643	b	3,890	b	1,145	a
LE5	16,033	a	24,674	a	0,841	a	20,764	c	6,009	a	1,089	a

As médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

Pereira Júnior, Correia e Oliveira (2003) avaliaram a produção de endoglucanase, exoglucanase e  $\beta$ -glicosidase de *Lentinula edodes*, por dez dias, em três meios de cultivo, meio SC contendo avicel (0,5%) ou carboximetilcelulose (0,5%), peptona, nitrato de cálcio, fosfato de potássio monobásico e sulfato de magnésio hepta-hidratado e meio JP contendo avicel (1,7%) e peptona. Foi observado que *Lentinula edodes* apresentou atividade de endoglucanase no sobrenadante dos três meios testados, porém a atividade de exoglucanase só foi detectada no meio SC. A enzima  $\beta$ -glicosidase não foi detectada em nenhum dos meios. A atividade de endoglucanase no meio JP foi de 820 U mg proteína<sup>-1</sup>. No meio SC contendo avicel, o pico de produção de endoglucanase foi de 620 U mg proteína<sup>-1</sup> com 48 horas de incubação e de exoglucanase foi de 74 U mg proteína<sup>-1</sup>. Já no meio SC contendo carboximetilcelulose, houve uma diminuição da atividade de endoglucanase para 200 U mg proteína<sup>-1</sup> e no de exoglucanase a atividade reduziu para menos de 50%.

Makkar et al. (2001), avaliando a produção de  $\beta$ -glicosidase de *Lentinula edodes* em meio contendo farelo de arroz e serragem, após 40 dias de incubação, obtiveram um extrato com atividade dessa enzima de 240 U mg proteína<sup>-1</sup>. Os valores encontrados por estes autores são muito superiores aos encontrados neste trabalho, o que pode ser explicado pelo fato de a composição do meio de cultivo ser diferente, já que ficou demonstrado que a atividade dessas enzimas varia em função disso.

O peso seco das linhagens LE3, LE4 e LE6, após 28 dias de incubação, foi menor no meio básico acrescido de extrato de levedura e a linhagem com maior peso seco neste meio foi LE. Não houve diferença estatística no peso seco das linhagens cultivadas no meio contendo carboximetilcelulose. No meio contendo avicel, a linhagem LE3 apresentou o menor peso, enquanto a linhagem LE6 apresentou o menor peso no meio contendo celobiose. Comparando-se o

comportamento das linhagens em cada meio, pode-se observar que o peso seco das linhagens foi maior nos meios contendo avicel e carboximetilcelulose (Tabela 6).

Buswell et al. (1996) relataram um pequeno crescimento de *L. edodes* em meio contendo celulose microcristalina e atribuíram esse baixo crescimento ao fato de esse fungo possuir baixa produção de enzimas hidrolíticas. No entanto, é possível observar, neste experimento, que não existiu relação direta entre peso seco e atividade enzimática, uma vez que a linhagem que apresentou maior peso em cada um dos meios não é a maior produtora da respectiva enzima.

Tabela 6 Massa seca micelial (mg) das linhagens de *Lentinula edodes* nos diferentes meios de cultivo, após 28 dias de incubação

Linhagem	Massa seca (mg)											
	Meio básico e extrato de levedura			Meio básico e CMC			Meio básico e avicel			Meio básico e celobiose		
LE	166,0	A	c	301,0	A	b	400,5	B	a	130,0	A	D
LE2	116,0	C	c	239,0	A	b	466,0	A	a	90,5	C	D
LE3	105,0	D	c	267,5	A	a	238,0	C	b	108,5	B	C
LE4	105,0	D	c	264,5	A	b	393,5	B	a	94,5	C	c
LE5	137,5	B	c	232,5	A	b	356,0	B	a	131,5	A	c
LE6	101,5	D	c	265,0	A	b	399,5	B	a	71,5	D	c

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas colunas não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

Médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas linhas não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade

## 5 CONCLUSÃO

As linhagens de *Lentinula edodes* apresentaram melhor crescimento no meio básico acrescido de 0,01% de extrato de levedura, tendo a linhagem LE5 sido a que apresentou o melhor crescimento neste meio. A adição de biotina e tiamina, em conjunto, ao meio de cultivo não aumentou o crescimento das linhagens com relação à adição dessas vitaminas separadamente no meio.

O comportamento das linhagens com relação à produção de ligninases e celulases foi diferente. A linhagem LE6 se destacou na produção de lacase, manganês peroxidase e  $\beta$ -glicosidase com 28 dias de incubação e endo- $\beta$ -1,4-glucanase com 14 dias de incubação, enquanto a linhagem LE5 se destacou na produção de exo- $\beta$ -1,4-glucanase com 7 dias de incubação.

Todas as linhagens apresentaram maior massa seca nos meios contendo avicel e carboximetilcelulose, após 28 dias de incubação.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

Estudos futuros serão realizados para a avaliação do polimorfismo das linhagens de *Lentinula edodes* por meio de sequenciamento e análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA) para discussão dos diferentes perfis enzimáticos das linhagens em função de possíveis diferenças genéticas.

Um estudo cinético das enzimas dessas linhagens também será realizado.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. et al. Fungal degradation of wood: initial proteomic analysis of extracellular proteins of *Phanerochaete chrysosporium* grown on oak substrate. **Current Genetics**, New York, v. 47, n. 1, p. 49-56, Jan. 2005.
- ARCHIBALD, F. S. A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye azure B. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 9, p. 110-116, Sept. 1992.
- ASGHER, M. et al. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 19, n. 6, p. 771-783, 2008.
- BALDRIAN, P. Fungal laccases: occurrence and properties. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v. 30, n. 2, p. 215-242, Mar. 2006.
- BALDRIAN, P.; SNAJDR, J. Production of ligninolytic enzymes by litterdecomposing fungi and their ability to decolorize synthetic dyes. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 59, n. 4, p. 1023-1029, Sept. 2006.
- BAYER, E. A. et al. Cellulose, cellulases and cellulosomes. **Current Opinion in Structural Biology**, London, v. 8, n. 5, p. 548-557, Oct. 1998.
- BHAT, M. K.; BHAT, S. Celulose degrading enzymes and their potential industrial application. **Biotechnology Advances**, New York, v. 15, n. 3, p. 583-620, 1997.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 7, p. 248-254, May 1976.
- BUMPUS, J. A. et al. Oxidation of persistent environmental pollutants by white rot fungus. **Science**, New York, v. 228, n. 4706, p. 1434-1436, June 1985.
- BUSWELL, J. A.; CAI, Y. J.; CHANG, S. T. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula* (*Lentinus*) *edodes*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 128, n. 15, p. 81-87, Apr. 1995.

BUSWELL, J. A. et al. Lignocellulolytic enzyme profiles of edible mushroom fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 12, n. 5, p. 537-542, 1996.

CAO, W. G.; CRAWFORD, D. L. Purification and some properties of beta-glucosidase from the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus tinctorius* Strain Smf. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 39, n. 1, p. 125-129, Jan. 1993.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JÚNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, São Paulo, v. 15, n. 1, p. 1-8, jan./fev. 2009.

CHAGAS, E. P.; DURRANT, L. R. Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajor-caju*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 29, n. 11, p. 473-477, Nov. 2001.

CHANG, R. Functional properties of edible mushrooms. **Nutrition Review**, New York, v. 54, n. 11, p. 91-93, Nov. 1996.

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

CHYE, F. Y.; WONG, J. Y.; LEE, J. S. Nutritional quality and antioxidant activity of selected edible wild mushrooms. **Food Science and Technology International**, London, v. 14, n. 4, p. 375-384, Aug. 2009.

CLAUS, H. Laccases: structure, reactions, distribution. **Micron**, New York, v. 35, n. 1, p. 93-96, Jan. 2004.

CRESTINI, C.; SERMANNI, G. G. Aromatic ring oxidation of vanillyl and veratryl alcohols by *Lentinus edodes*-possible artifacts in the lignin peroxidase and veratryl alcoholoxidase assays. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 39, n. 2, p. 175-179, 1995.

CUI, F. J. et al. Optimization of the medium composition for production of mycelial biomass and exopolymer by *Grifola frondosa* GF 9801 using response surface methodology. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, n. 10, p. 1209-1216, July 2006.

DI LENA, G.; VIVANTI, V.; QUAGLIA, G. B. Amino acid composition of wheat milling by-products after bioconversion by edible mycelia. **Nahrung**, Berlin, v. 41, n. 5, p. 285-288, 1997.

DING, S. J.; GE, W.; BUSWELL, J. A. Secretion, purification and characterisation of a recombinant *Volvariella volvacea* endoglucanase expressed in the yeast *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 31, n. 5, p. 621-626, Oct. 2002.

ELISASHVILI, V. et al. Lentinus edodes and Pleurotus species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 3, p. 457-462, Feb. 2008.

\_\_\_\_\_. Use of *Pleurotus dryinus* for lignocellulolytic enzymes production in submerged fermentation of mandarin peels and tree leaves. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 38, n. 7, p. 998-1004, May 2006.

FERRARONI, M. et al. Crystal structure of a blue laccase from *Lentinus tigrinus*: evidences for intermediates in the molecular oxygen reductive splitting by multicopper oxidases. **BMC Structure Biology**, Bethesda, v. 7, p. 60-61, Sept. 2007.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, Lavras, v. 6, n. 1, p. 36-41, 2008.

FIELD, J. A. et al. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 7, p. 2219-2226, July 1992.

GALHAUP, C. et al. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. **Enzyme and Microbial Technology**, London, v. 30, n. 4, p. 529-536, Apr. 2002.

GHODAKE, G. S. et al. Purification and partial characterization of lignin peroxidase from *Acinetobacter calcoaceticus* NCIM 2890 and its application in decolorization of textile dyes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 152, n. 1, p. 6-14, Jan. 2009.

GLENN, J. K. et al. An extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 114, n. 3, p. 1077-1083, Aug. 1983.

GLENN, J. K.; GOLD, M. H. Purification and characterization of an extracellular Mn(II)-dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 242, n. 2, p. 329-341, Nov. 1985.

GOTTSCHALK, L. M.; BON, E. P.; NOBREGA, R. Lignin peroxidase from *Streptomyces viridosporus* T7A: enzyme concentration using ultrafiltration. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 147, n. 1/3, p. 23-32, Mar. 2008.

GUILLÉN-NAVARRO, G. K. et al. Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo submergido. **Revista Iberoamericana de Micología**, Barcelona, v. 15, p. 302-306, oct. 1998.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, New York, v. 67, n. 3, p. 597-607, May 1975.

HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v. 13, n. 2/3, p. 125-135, Mar. 1994.

HATVANI, N. Antibacterial effect of the culture fluid of *Lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Bethesda, v. 17, n. 1, p. 71-74, Jan. 2001.

HATVANI, N.; MÉCS, I. Effect of the nutrient composition on dye decolorisation and extracellular enzyme production by *Lentinus edodes* on solid medium. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 30, n. 3, p. 381-386, Mar. 2002.

HENRISSAT, B. Cellulases and their interaction with cellulose. **Cellulose**, Bucharest, v. 1, n. 3, p. 169-196, June 1994.

HILDEN, K. S. et al. Molecular characterization of the basidiomycete isolate *Nematoloma frowardii* b19 and its manganese peroxidase places the fungus in the corticioid genus *Phlebia*. **Microbiology**, New York, v. 154, n. 8, p. 2371-2379, Aug. 2008.

HOFRICHTER, M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 30, n. 4, p. 454-466, Apr. 2002.

HOSHINO, F. et al. Thermally stable and hydrogen peroxide tolerant manganese peroxidase (MnP) from *Lenzites betulinus*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 530, n. 1, p. 249-252, Oct. 2002.

ISHIHARA, H. et al. Enhancement of the viscometric endocellulase activity of *Polyporus arcularius* CMC<sub>Case IIIa</sub> by cellobiose and cellooligosaccharides. **Mycoscience**, Tokyo, v. 46, n. 3, p. 148-153, Sept. 2005.

ISRILIDES, C. et al. Cytostatic and immunomodulatory properties of the medicinal mushroom *Lentinula edodes*. **Phytomedicine**, Jena, v. 15, n. 6/7, p. 512-519, June 2008.

JIMENEZ, M. et al. Screening of yeasts isolated from decayed wood for lignocellulose-degrading enzyme activities. **Mycological Research**, Cambridge, v. 95, n. 11, p. 1299-1302, Nov. 1991.

JOHANSSON, T.; WELINDER, K. G.; NYMAN, P. O. Isozymes of lignin peroxidase and manganese (II) peroxidase from the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor*: II., partial sequences, peptide maps, and amino acid and carbohydrate compositions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 300, n. 1, p. 57-62, Jan. 1993.

KASANA, R. C. et al. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. **Current Microbiology**, New York, v. 57, n. 5, p. 503-507, May 2008.

KERRIGAN, R. W. *Agaricus subrufescens*, a cultivated edible and medicinal mushroom, and its synonyms. **Mycologia**, New York, v. 97, n. 1, p. 12-24, Feb. 2005.

KIM, H.; KACEW, S.; LEE, B. In vitro chemopreventive effects of plant polysaccharides (*Aloe barbadensis miller*, *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum* and *Coriolus versicolor*). **Carcinogenesis**, Oxford, v. 20, n. 8, p. 1637-1640, 1999.

KNOWLES, J.; LETHTOVAARA, P.; REERI, T. T. Cellulase families and their genes. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 5, n. 9, p. 255-261, Sept. 1987.

KRUGNER, T. L.; BACHI, M. A. Fungos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. p. 80-83.

KULYS, J.; VIDZIUNAITE, R. Amperometric biosensors based on recombinant laccases for phenols determination. **Biosensors and Bioelectronics**, Essex, v. 18, n. 2/3, p. 319-325, Mar. 2003.

KUWAHARA, M. et al. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 169, n. 2, p. 247-250, Apr. 1984.

LAMAR, R. T.; DIETRICH, D. M. In situ depletion of pentachlorophenol from contaminated soil by *Phanerochaete* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 10, p. 3093-3100, Oct. 1990.

LANKINEN, V. P. et al. Characteristics and N-terminal amino acid sequence of manganese peroxidase from solid substrate cultures of *Agaricus bisporus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, n. 2, p. 170-176, Mar. 2001.

LEATHAM, G. F. Extracellular enzymes produced by the cultivated mushroom *Lentinus edodes* during degradation of a lignocellulosic medium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 50, n. 4, p. 859-867, Oct. 1985.

LEE, B. C. et al. Submerged culture conditions for production of micelial biomass and exopolysaccharides by the edible Basidiomycete *Grifola frondosa*. **Enzyme and Microbial**, New York, v. 35, n. 5, p. 369-376, Oct. 2004.

LEE, K. H. et al. Micromorphological characteristics of decayed wood and laccase produced by the brown-rot fungus *Coniophora puteana*. **Journal of Wood Science**, London, v. 50, n. 3, p. 281-284, 2004.

LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 47, n. 1, p. 273-279, May 1972.

LISOV, A. V.; LEONTIEVSKY, A. A.; GOLOVLEVA, L. A. Hybrid Mn-peroxidase from the ligninolytic fungus *Panus tigrinus* 8/18. Isolation, substrate specificity and catalytic cycle. **Biochemistry**, Moscow, v. 68, n. 9, p. 1027-1035, Sept. 2003.

LJUNGDAHL, L. G. The cellulase/hemicellulase system of the anaerobic fungus *Orpinomyces* PC-2 and aspects of its applied use. **Annals of the New York Academy Science**, New York, v. 1125, p. 308-321, Mar. 2008.

LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 66, n. 3, p. 506-577, Sept. 2002.

MAEDA, Y. Y. et al. Denaturation and renaturation of b-1,6; 1,3-Glucan, Lentinan, associated with expression of TCellmediated Responses. **Cancer Research**, Baltimore, v. 48, n. 3, p. 671-675, Feb. 1988.

MAI, C.; KUES, U.; MILITZ, H. Biotechnology in the wood industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 63, n. 5, p. 477-494, Sept. 2004.

MAIJALA, P.; FAGERSTEDT, K. V.; RAUDASKOSKI, M. Detection of extracellular cellulolytic and proteolytic activity in ectomycorrhizal fungi and *Heterobasidion annosum* (Fr) Bref. **New Phytologist**, Cambridge, v. 117, n. 4, p. 643-648, Apr. 1991.

MAKKAR, R. S. et al. *Lentinula edodes* produces a multicomponent protein complex containing manganese(II) dependent peroxidase, laccase and beta-glucosidase. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 200, n. 2, p. 175-179, June 2001.

MANZI, P.; AGUZZI, A.; PIZZOFERRATO, L. Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. **Food Chemistry**, London, v. 73, n. 3, p. 321-325, May 2001.

MANZI, P.; PIZZOFERRATO, L. Beta-glucans in edible mushrooms. **Food Chemistry**, London, v. 68, n. 3, p. 315-318, Feb. 2000.

MARTINEZ, A. T. et al. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International Microbiology**, Madrid, v. 8, n. 3, p. 195-204, Sept. 2005.

MAU, J. L.; CHAO, G. R.; WU, K. T. Antioxidant properties of methanolic extracts from several ear mushrooms. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 11, p. 5461-5467, Oct. 2001.

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

MESSERSCHMIDT, A.; HUBER, R. The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin: modelling and structural relationships. **European Journal Biochemistry**, Berlin, v. 187, n. 2, p. 341-352, Jan. 1990.

METHACANON, P. et al. Structural elucidation of bioactive fungi-derived polymers. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 60, n. 2, p. 199-203, May 2005.

MICHNIEWICZ, A. et al. The white-rot fungus *Cerrena unicolor* strain 137 produces two laccase isoforms with different physico-chemical and catalytic properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 69, n. 6, p. 682-688, Dec. 2006.

MIDDELHOVEN, W. J. Polysaccharides and phenolic compounds as substrate for yeasts isolated from rotten wood and description of *Cryptococcus fagi* sp. nov. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal Genetics and Molecular Microbiology**, Amsterdam, v. 90, n. 1, p. 57-67, Mar. 2006.

MIKIASHVILI, N. et al. Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 22, n. 9, p. 999-1002, Sept. 2006.

MORAES, H. et al. Effect of composition of a culture media on the laccase production of *Lentinus edodes* strains. **Acta Biotechnology**, Weinheim, v. 21, n. 4, p. 307-320, Nov. 2001.

MUÑOZ, I. G. et al. Family 7 cellobiohydrolases from *Phanerochaete chrysosporium*: crystal structure of the catalytic module of Cel7D (CHB 58) at 1.32 Å resolution and homology models of the lysozymes. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 314, n. 5, p. 1097-1111, Dec. 2001.

MUSTAFA, R. et al. Phenolic colorants obtained by enzymatic synthesis using a fungal laccase in a hydroorganic biphasic system. **Food Research International**, Barking, v. 38, n. 8/9, p. 995-1000, Oct. 2005.

NAZAN, A.; ZÜMRÜT, B. O. Avicel-adsorbable endoglucanase production by the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* type culture *Torula thermophila*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 27, n. 8, p. 560-569, Nov. 2000.

NECOCHEA, R. et al. Phylogenetic and biochemical characterization of a recombinant laccase from *Trametes versicolor*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 244, n. 2, p. 235-241, Mar. 2005.

NIKITINA, V. E. et al. *Lentinula edodes* biotechnology: from lentinan to lectins. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 45, n. 3, p. 230-237, 2007.

NOVOTNY, C. et al. Removal of various PCBs by various white rot fungi in liquid cultures. **Folia Microbiology**, Xalapa, v. 42, n. 2, p. 136-140, 1997.

NYANHONGO, G. S.; COUTO, S. R.; GUEBITZ, G. M. Coupling of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) metabolites onto humic monomers by a new laccase from *Trametes modesta*. **Chemosphere**, Oxford, v. 64, n. 3, p. 359-370, Feb. 2006.

OHGA, S.; ROYSE, D. J. Transcriptional regulation of laccase and cellulose genes during growth and fruiting of *Lentinula edodes* on supplemented sawdust. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 201, n. 1, p. 111-115, July 2001.

ONISHI, N.; TANAKA, T. Purification and properties of a galacto and gluco-oligosaccharide-producing betaglycosidase from *Rhodotorula minuta* IFO879. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 82, n. 5, p. 439-443, Nov. 1996.

ORTH, A. B.; ROYSE, D. J.; TIEN, M. Ubiquity of lignin-degrading peroxidases among various wood-degrading fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 12, p. 4017-4023, Dec. 1993.

PALMA, C. et al. Different fungal manganese-oxidizing peroxidases: a comparison between *Bjerkandera* sp. And *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 77, n. 2/3, p. 235-245, Feb. 2000.

PECIAROVA, A.; BIELY, P. Beta-xylosidases and a nonspecific wall-bound beta-glucosidase of the yeast *Cryptococcus albidus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 716, n. 3, p. 391-399, 1982.

PEREIRA JÚNIOR, J. A. S.; CORREIA, M. J.; OLIVEIRA, N. T. Cellulase Activity of a *Lentinula edodes* (Berk.) Pegl. Strain grown in media containing carboxymethylcellulose or microcrystalline cellulose. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 46, n. 3, p. 333-337, June 2003.

PHILIPPOUSSIS, A.; DIAMANTOPOULOU, P.; ZERVAKIS, G. Correlation of the properties of several lignocellulosic substrates to the crop performance of the shiitake mushroom *Lentinula edodes*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 19, n. 6, p. 551-557, Dec. 2003.

PIONTEK, K.; SMITH, A. T.; BLODIG, W. Lignin peroxidase structure and function. **Biochemical Society Transaction**, London, v. 29, n. 2, p. 111-116, May 2001.

POINTING, S. B. Exploiting the versatile ligninolytic system of white-rot fungi. In: POINTING, S. B.; HYDE, K. D. (Ed.). **Bio-exploitation of filamentous fungi**. Hong Kong: Fungal Diversity, 2001. p. 253-290. (Fungal Diversity Research Series, 6).

\_\_\_\_\_. Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. **Fungal Diversity**, Hong Kong, v. 2, n. 1, p. 17-33, Mar. 1999.

POINTING, S. B. et al. Screening of basidiomycetes and xylariaceous fungi for lignin peroxidase and laccase gene-specific sequences. **Mycological Research**, New York, v. 109, n. 1, p. 115-124, Feb. 2005.

POZDNIAKOVA, N. N. et al. Yellow laccase from the fungus *Pleurotus ostreatus* D1: purification and characterization. **Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiia**, Moscow, v. 42, n. 1, p. 56-61, 2006.

RENGANATHAN, V.; MIKI, K.; GOLD, M. H. Multiple molecular forms of diarylpropane oxygenase, an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring, lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 241, n. 1, p. 304-314, Aug. 1985.

RODRÍGUEZ, C. S. et al. Production of laccase by *Trametes hirsuta* grown in an immersion bioreactor: application to decolourisation of dyes from a leather factory. **Engineering in Life Sciences**, New York, v. 4, n. 3, p. 233-238, June 2004.

RUBIA, T. et al. Characterization of manganese-dependent peroxidase isoenzymes from the ligninolytic fungus *Phanerochaete flavido-alba*. **Research in Microbiology**, Paris, v. 153, n. 8, p. 547- 554, Oct. 2002.

SAHA, B. C. Alpha-L-arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology. **Biotechnology Advances**, New York, v. 18, n. 5, p. 403-423, Aug. 2000.

\_\_\_\_\_. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 30, n. 5, p. 279-291, Sept. 2003.

SALONY, M. S.; BISARIA, V. S. Production and characterization of laccase from *Cyathus bulleri* and its use in decolourization of recalcitrant textile dyes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 71, n. 5, p. 646-653, Sept. 2006.

SANCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, New York, v. 27, n. 2, p. 185-194, Mar. 2009.

SELINHEIMO, E. et al. Elucidating the mechanism of laccase and tyrosinase in wheat bread making. **Journal of the Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 15, p. 6357-6365, June 2007.

SHIMADA, Y.; MORITA, T.; SUGIYAMA, K. Dietary eritadenine and ethanolamine depress fatty acid desaturase activities by increasing liver microsomal phosphatidylethanolamine in rats. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 133, n. 3, p. 758-765, Mar. 2003.

SHLEEV, S. et al. Characterization of two new multiforms of *Trametes pubescens* laccase. **Bioorganic Chemistry**, New York, v. 35, n. 1, p. 35-49, Feb. 2007.

SHON, Y. H.; NAM, K. S. Antimutagenicity and induction of carcinogenic phase II enzymes by basidiomycetes. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 77, n. 1, p. 103-109, Sept. 2001.

SILVA, C. M. M. S.; MELO, I. S. Requisitos nutricionais para o fungo *Alternaria alternata*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 3, p. 499-503, mar. 1999.

SILVA, E. M.; MACHUCA, A.; MILAGRES, A. M. F. Effect of cereal brans on *Lentinula edodes* growth and enzyme activities during cultivation on forestry waste. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 40, n. 4, p. 283-288, 2005a.

\_\_\_\_\_. Evaluating the growth and enzyme production from *Lentinula edodes* strains. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 1, p. 161-164, Jan. 2005b.

SILVA, E. M.; MARTINS, S. F.; MILAGRES, A. M. F. Extraction of manganese peroxidase produced by *Lentinula edodes*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 7, p. 2471-2475, May 2008.

SILVA, É. S.; CAVALLAZZI, J. R. P.; MULLER, G. Biotechnological applications of *Lentinus edodes*. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, Helsinki, v. 5, n. 3/4, p. 403-407, Sept. 2007.

SMITH, J. E.; ROWAN, N. J.; SULLIVAN, R. Medicinal mushrooms: a rapidly developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 24, n. 22, p. 1839-1845, Nov. 2002.

STAJIC, M. et al. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 38, n. 1/2, p. 65-73, Jan. 2006.

STEFFEN, K. T. et al. Differential degradation of oak (*Quercus petraea*) leaf litter by litterdecomposing basidiomycetes. **Research in Microbiology**, Paris, v. 158, n. 5, p. 447-455, June 2007.

SUTHERLAND, G. R. J.; AUST, S. D. The effects of calcium on the thermal stability and activity of manganese peroxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, London, v. 332, n. 1, p. 128-134, Aug. 1996.

SUZUKI, M. R. et al. Fungal hydroquinones contribute to brown rot of wood. **Environmental Microbiology**, Netherlands, v. 8, n. 12, p. 2214-2223, Dec. 2006.

TEERI, T. T. Crystalline cellulose degradation: new insights into the function of cellobiohydrolases. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 15, n. 5, p. 160-167, May 1997.

THURSTON, C. F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**, London, v. 140, n. 1, p. 19-26, Jan. 1994.

TIEN, M.; KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring oxygenase. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v. 81, n. 8, p. 2280-2284, Apr. 1984.

URBEN, A. F. et al. **Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada**. Brasília: EMBRAPA, 2001. 151 p.

- VALÁSKOVÁ, V.; BALDRIAN, P. Degradation of cellulose and hemicelluloses by the brown rot fungus *Piptoporus betulinus*: production of extracellular enzymes and characterization of the major cellulases. **Microbiology-Sgm**, Reading, v. 152, n. 12, p. 3613-3622, Dec. 2006.
- VALÁSKOVÁ, V. et al. Production of lignocellulose-degrading enzymes and degradation of leaf litter by saprotrophic basidiomycetes isolated from a *Quercus petraea* forest. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 39, n. 10, p. 2651-2660, Oct. 2007.
- WANG, L. et al. Function of the iron-binding chelator produced by *Coriolus versicolor* in lignin biodegradation. **Science in China Series C: Life Sciences**, Beijing, v. 51, n. 3, p. 214-221, 2008.
- WASSER, S. Medicinal mushroom as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 60, n. 3, p. 258-274, Nov. 2002.
- WEI, H. et al. Natural paradigms of plant cell wall degradation. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 20, n. 3, p. 330-338, June 2009.
- WENG, J. K. et al. Emerging strategies of lignin engineering and degradation for cellulosic biofuel production. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 19, n. 2, p. 166-172, Apr. 2008.
- WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S. N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances**, New York, v. 22, n. 1/2, p. 161-187, Dec. 2003.
- WONG, D. W. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 157, n. 2, p. 174-209, 2009.
- WOOD, T. M.; GARICA-CAMPAYO, V. Enzymology of cellulose degradation. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 1, n. 2/3, p. 147-161, 1990.
- WU, J. Z. et al. Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer, part 2: effect of carbon-to-nitrogen ratio of the culture medium on the content and composition of the mycelia dietary fibre. **Food Chemistry**, London, v. 85, n. 1, p. 101-105, Mar. 2004.

XIAO, Y. Z. et al. Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a laccase from basidiomycete *Trametes* sp. strain AH28-2. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 60, n. 6, p. 700-707, Dec. 2003.

YADAV, J. S.; REDDY, C. A. Degradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX) by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 59, n. 3, p. 756-762, Mar. 1993.

YANG, J. H.; LIN, H. C.; MAU, J. L. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. **Food Chemistry**, London, v. 77, n. 2, p. 229-235, May 2002.

YEN, M. T. et al. Antioxidant properties of fungal chitosan from shiitake stipes. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 40, n. 2, p. 255-261, Mar. 2007.

YOON, J. J. et al. The brown-rot basidiomycete *Fomitopsis palustris* has the endo-glucanases capable of degrading microcrystalline cellulose. **Journal Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 17, n. 5, p. 800-805, May 2007.

ZHANG, Y. H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulose improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, New York, v. 24, n. 5, p. 452-481, Sept. 2006.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulose systems. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 88, n. 7, p. 797-824, Dec. 2004.

ZUCCATO, E. et al. Presence of therapeutic drugs in the environment. **Lancet**, London, v. 335, n. 1, p. 1789-1790, May 2000.