

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E
ENZIMÁTICA DE COGUMELOS
MEDICINAIS**

EVÂNIA GERALDA DA SILVA

2007

EVÂNIA GERALDA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ENZIMÁTICA DE COGUMELOS
MEDICINAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação “Strictu Sensu” em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de “Doutor”.

Orientador

Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2007**

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

Silva, Evânia Geralda da.

Caracterização química e enzimática de cogumelos medicinais / Evânia Geralda da Silva. -- Lavras : UFLA, 2007.

93 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Eustáquio Souza Dias.

Bibliografia.

1. Cogumelo comestível. 2. Potencial medicinal. 3. Resíduos agrícolas. 4. Cogumelo *Agaricus blazei*. 5. Resíduos agroindustriais. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-641.358

EVÂNIA GERALDA DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ENZIMÁTICA DE COGUMELOS
MEDICINAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação “Strictu Sensu” em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de “Doutor”.

APROVADA em 31 de agosto de 2007

Profa. Cristina Ferreira Silva e Batista	UFLA
Profa. Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada	UEM
Prof. Luís Roberto Batista	UFLA
Prof. Luiz Carlos de Oliveira Lima	UFLA
Profa. Rosane Freitas Schwan	UFLA

Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

*À minha mãe e aos meus irmãos,
Tânia, Anália, Nilson e Marco*
DEDICO

À minha filha Júlia
OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu orientador e protetor.

Ao Clérison, pelo carinho, compreensão e pela Júlia.

À Júlia, minha maior alegria.

À Conceição, Elizabeth, Rosimeire, Cida, Janeth e de modo geral a toda família Costa pela acolhida, carinho, amizade e grande ajuda com minha filha Júlia, nos momentos de ausência, obrigada.

À Carmen, pela amizade de sempre, pelas orações e pelo carinho.

À Cláudia Labory, pela presença diária, pelos conselhos e pela amizade.

Ao professor João Cândido de Souza, pela grande ajuda.

À minha irmã Tânia, pelo carinho, pelas orações e por acreditar que eu venceria mais esta etapa.

À professora Rosane Freitas Schwan, pelo apoio, conselhos, sugestões, críticas, profissionalismo e amizade.

Ao professor Eustáquio Souza Dias, pela confiança e orientação.

À professora Cristina Ferreira Silva e Batista, pela amizade e sugestões no meu árduo trabalho com as enzimas.

Ao Félix, pela grande ajuda com o cultivo dos cogumelos.

À Giuliana e à Talita, um agradecimento especial pela dedicação e ajuda com as lacases.

À Ivani, à Magda e a Cidinha, funcionárias da microbiologia, agradeço pela disponibilidade de sempre e pela amizade.

Ao professor Romildo e à professora Patrícia, pela disposição.

Às funcionárias: Tina, Sandra e Creusa, do Departamento de Ciência dos Alimentos, agradeço pela presteza e disponibilidade.

Aos amigos conquistados na microbiologia e que egressaram, Valdirene, Pascoal, Marisa, João, Débora, Aramália, Sílvia, Fernanda, Mirian, Ana Paula, Gisele, Nina, Márcio, Cláudia Labory, Sandra e Thaís.

Agradeço também, aos colegas do Laboratório de Microbiologia, Euziclei, Whasley, Ivani, Karina, Karina Herrera, Carla, Cássia, Cristina, Emerson, Caio, Mariana, Mayara, Paulinho, Lamartine Neto, Gabriela, Danielle, Rômulo, João Paulo e Matheus, pela amizade e risos na nossa luta diária.

Aos funcionários do Departamento de Biologia, em especial à Irondina, Rafaela, Zélia e Lamartine.

Agradeço ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade.

Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro concedido e que Deus ilumine a todos que de um modo ou de outro fizeram parte deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
CAPÍTULO 1	01
1- Introdução geral.....	02
2- Referencial teórico.....	04
2.1 Cogumelo <i>Pleurotus</i>	04
2.2 Cogumelo <i>Agaricus blazei</i> Murril	05
2.3 Importância nutricional e medicinal	07
2.4 Cultivo de <i>Agaricus blazei</i>	10
2.5 Resíduos Agrícolas	12
2.6 Lignina.....	13
2.7 Produção de ligninases por fungos.....	15
2.8 Ligninases	19
2.8.1 Lacase (EC 1.10.3.2)	19
2.8.2 Lignina peroxidase (EC 1.11.1.14)	23
2.8.3 Manganês peroxidase (EC 1.11.1.13)	25
3 Referências bibliográficas.....	27
CAPÍTULO 2 Composição química de corpos de frutificação de cogumelos medicinais, cultivados em diferentes teores de nitrogênio.....	36
Resumo.....	37
Abstract	38
1 Introdução	39
2 Material e métodos	40
2.1 Microrganismo: Fonte	40

2.2 Meio de cultivo.....	40
2.3 Produção de inoculante	40
2.4 Substrato para cultivo de <i>Pleurotus sajor-caju</i>	41
2.4.1 Análises químicas de <i>Pleurotus sajor-caju</i>	42
2.4.2 Estatística	43
2.5 Composto de cultivo de <i>Agaricus blazei</i>	43
2.5.1 Determinação do teor de nitrogênio total.....	44
2.5.2 Pasteurização a vapor.....	44
2.5.3 Inoculação e incubação.....	45
2.5.4 Indução e terra de cobertura.....	45
2.5.5 Cultivo e colheita.....	45
2.6 Determinação da composição centesimal.....	46
2.6.1 Umidade.....	46
2.6.2 Extrato etéreo.....	46
2.6.3 Proteína bruta	46
2.6.4 Fibra bruta.....	47
2.6.5 Açúcares totais glicose e sacarose.....	47
2.6.6 Aminoácidos.....	47
2.6.7 Estatística	48
3 Resultados e discussão.....	49
3.1 Colonização do substrato - <i>P. sajor-caju</i>	49
3.1.2 Produtividade e eficiência biológica	50
3.1.3 Qualidade nutricional dos basidiocarpos	51
3.2 Produtividade e eficiência biológica – <i>A.blazei</i>	53
3.2.1 Determinação do teor de nitrogênio total	54
3.2.2 Determinação da composição química	54
3.2.3 Determinação de aminoácidos	57
4 Conclusões.....	60

5 Referências bibliográficas.....	61
CAPÍTULO 3 Determinação de ligninases em isolados de <i>Agaricus blazei</i> Murril cultivados em diferentes concentrações de nitrogênio.....	64
Resumo	65
Abstract.....	66
1 Introdução.....	67
2 Material e métodos.....	68
2.1 Microrganismos.....	68
2.2 Meio de cultivo e manutenção.....	68
2.3 Curva de crescimento.....	68
2.4 Meios de cultivo para produção enzimática.....	69
2.4.1 Diferentes teores de extrato de levedura.....	69
2.4.2 Diferentes teores de uréia.....	69
2.4.3 Diferentes teores de sulfato de amônio.....	70
2.5 Avaliação do crescimento.....	70
2.6 Determinação da atividade enzimática.....	70
2.6.1 Atividade de lacase (EC1.10.3.2).....	70
2.6.2 Atividade de manganês peroxidase (EC 1.11.1.13).....	71
2.6.3 Atividade de lignina peroxidase (EC 1.11.1.14).....	71
3 Resultados e discussão.....	73
3.1 Avaliação do crescimento	73
3.2 Atividade enzimática	76
3.2.1 Lacase	76
3.2.2 Manganês-peroxidase	81
3.2.3 Lignina-peroxidase	86
3.3 Considerações finais	87
4 Conclusões.....	88

5 Referências bibliográficas.....	89
ANEXO	92

RESUMO

SILVA, Evânia Geralda da. **Caracterização química e enzimática de cogumelos medicinais**. 2007. 93 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Os cogumelos comestíveis são apreciados em muitas dietas pelo seu paladar, valor nutricional e potencial medicinal. O cultivo de cogumelos possibilita reciclar os resíduos agrícolas da produção e resíduos agroindustriais, evitando o descarte dos mesmos ao ambiente. A reciclagem dos resíduos agroindustriais oferece ao agricultor uma alternativa ao restante da sua produção agrícola e também como outra fonte de renda, visto o valor comercial dos cogumelos comestíveis. Os resíduos agrícolas são degradados pela secreção de enzimas ligninolíticas, lacase, manganês-peroxidase e lignina-peroxidase produzidas pelos cogumelos. O cogumelo *Agaricus blazei* é nativo do Brasil, possui propriedades medicinais as quais despertaram grandes interesses do mercado consumidor internacional. Sendo o clima brasileiro favorável à produção deste cogumelo, produtores rurais passaram a produzi-lo buscando outra fonte de renda. Este trabalho teve como objetivos avaliar a composição química de corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju* e *A. blazei* cultivado em diferentes teores de nitrogênio, com 0,65%; 0,85%; 1,30%; 1,75% e 2,20% para *P. sajor-caju* e 0,9%; 1,5% e 2% para *A. blazei*, avaliar a produção de enzimas ligninases, lacase, manganês-peroxidase e lignina-peroxidase, em quatro isolados de *A. blazei*, CS1, CS2, CS5 e CS7, cultivados em meio líquido com diferentes concentrações de nitrogênio. Foi observada diferença significativa nos teores de proteínas, açúcares (glicose e sacarose) nos basidiocarpos cultivados em altas concentrações de nitrogênio. A atividade de ligninases foi diferente entre os quatros isolados de *A. blazei*, sendo a melhor atividade de lacase observada com o isolado CS7, a melhor atividade para manganês-peroxidase, com o isolado CS2 e a melhor atividade de lignina-peroxidase, com o isolado CS5. Os resultados indicaram que a variação do teor de nitrogênio no composto de cultivo alterou o teor de proteína nos corpos de frutificação e a variação do teor de nitrogênio em meio de cultivo líquido para a produção enzimática pode variar conforme o isolado e a composição do meio de cultivo.

Comitê orientador: Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias – UFLA (Orientador), Dra. Rosane Freitas Schwan – UFLA.

ABSTRACT

SILVA, Evânia Geralda da. **Chemical and enzymatic characterization of medicinal mushrooms.** 2007. 93 p. Thesis (Doctorate in Food Science) - Federal University of Lavras, Lavras.

The edible mushrooms are a lot appreciated in several diets to the taste, nutritional value and medicinal potential. The mushroom cultivation allows the recycling of agricultural and agro industrial residues, avoiding their discard into the environment. The recycling of agro industrial products offers to the farmer an alternative for the rest of his agricultural production, besides making it possible to be another source of income, due to the business value of the edible mushroom. The agricultural residues are degraded by secretion of lignolytic enzymes, lacase, manganese peroxidase and lignin peroxidase produced by the mushrooms. *Agaricus blazei* mushroom is originally from Brazil, has medicinal properties, which called a lot of attention of the international cosumer market. Once the Brazilian climate is favorable to the production of this kind of mushroom, rural producers started to grow it in order to have one more source of income. The objectives of this work were to evaluate the chemical composition of *Pleurotus sajor-caju* and *A. blazei* fruiting bodies cultivated in different nitrogen contents with 0,65%; 0,85%; 1,30%; 1,75% and 2,20% for *P. sajor-caju* and 0,9%; 1,5% and 2,0% for *A. blazei*, to evaluate ligninase enzymes lacase, manganese peroxidase and lignin peroxidase in four isolates of *A. blazei*, CS1, CS2, CS5 and CS7, cultivated in a liquid medium with different concentration of nitrogen. A significant difference was observed in protein and sugar contents (glucose and sacarose) in basidiocarps cultivated in high nitrogen concentration. The ligninase activity was different among the four isolates of *A. blazei*, being the higher lacase activity observed with the CS7 isolates, the best one for manganese peroxidase activity with the CS2 isolates and for the lignin peroxidase activity the best one was with CS5. The results indicated that the variation in nitrogen content in the mushroom compost modified the protein content in the fruiting bodies and the variation of nitrogen in liquid culture medium for enzymatic production can vary according to the isolate and the composition of culture medium.

Advisory committee: Professor Dr. Eustáquio Souza Dias – UFLA (Advisor), Dra. Rosane Freitas Schwan – UFLA.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ENZIMÁTICA DE COGUMELoS MEDICINAIS

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os cogumelos comestíveis são apreciados em muitas dietas européias e orientais e vem crescendo em importância nos últimos anos. O consumo do mesmo se deve ao valor gastronômico com baixo valor calórico, alto teor em minerais, aminoácidos essenciais, fibras e vitaminas e ainda, alguns cogumelos, possuem substâncias com propriedades terapêuticas preventivas e ou curativas. Além da importância nutricional e medicinal do basidiocarpo, o cultivo dos mesmos possibilita reciclar economicamente resíduos agrícolas e agroindustriais, oferecendo ao pequeno agricultor uma alternativa viável ao restante da sua produção. Este aproveitamento de resíduos evita o descarte no ambiente e acrescenta uma fonte de renda alternativa para o produtor, devido ao alto valor comercial dos cogumelos.

Os fungos são importantes para o ecossistema por causa da sua habilidade em degradar os substratos da produção agrícola. São considerados os microrganismos mais importantes na decomposição da matéria orgânica devido a sua específica ação degradativa. Esta atividade ocorre devido à produção de enzimas extracelulares, que são importantes na degradação dos componentes dos substratos, principalmente lignocelulósicos (Valazquez-Cedeño et al., 2002).

A degradação dos resíduos lignocelulolíticos ocorre através da formação de um complexo enzimático que inclui as enzimas oxidativas como lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase e as hidrolíticas como xilanase, β -glicosidase entre outras. Esta ação enzimática, em cadeia, possibilita ao fungo a aquisição de nutrientes essenciais ao seu desenvolvimento.

O cogumelo *Agaricus blazei* é nativo do Brasil e apresenta propriedades funcionais que despertaram grandes interesses do mercado consumidor internacional, especialmente o japonês. Como o clima brasileiro é favorável ao

cultivo deste cogumelo, muitos produtores rurais passaram a produzi-lo e várias empresas passaram a comercializar o inóculo. O cultivo deste é praticado em comparação ao cultivo de *Agaricus bisporus*, pois estes cogumelos são semelhantes em alguns aspectos com relação ao cultivo, diferenciando na temperatura de indução da frutificação. Apesar de já se ter metodologia desenvolvida para o cultivo ainda é necessário o estabelecimento de técnicas mais efetivas, bem como o estabelecimento de linhagens mais produtivas ou eficientes.

Os resíduos agrícolas utilizados para cultivo de cogumelos, são de baixo custo e constituem diversos tipos de palhas ou capins ricos em carbono e pobres em nitrogênio. A suplementação, com nitrogênio, é necessária e está relacionada com a produtividade do cogumelo. A composição química dos cogumelos pode variar de acordo com a espécie utilizada, o método de cultivo empregado e a composição do substrato em que estes são desenvolvidos (Crisan & Sands, 1978).

A quantificação da produção enzimática de algumas linhagens de *Agaricus blazei* é um importante fator para determinar seu perfil enzimático e a relação enzima/produtividade.

Diante do exposto objetivou-se com este trabalho caracterizar a composição química de *Pleurotus sajor-caju* e *A. blazei* cultivados em diferentes concentrações de nitrogênio e quantificar ligninases de *A. blazei* cultivado em diferentes concentrações de nitrogênio.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cogumelo *Pleurotus*

Os cogumelos do gênero *Pleurotus* podem ser naturalmente encontrados em florestas tropicais e subtropicais. São fungos saprófitas, decompositores primários, decompondo madeira e outros resíduos vegetais (Bonatti et al., 2004). Como degradam madeira são conhecidos como “White-rot fungi” (WRF) (Souza et al., 2006; Ardon et al., 1996; Ragunathan & Swaminathan, 2003), causam podridão branca, nome que deriva da coloração que a madeira adquire em fases avançadas de degradação. Os corpos de frutificação do *Pleurotus* são grandes, com píleo de 6 a 10 cm, desenhando-se como conchas de ostras, por isto conhecido como fungo ostra (Bonatti et al., 2004).

Estes cogumelos possuem um grande destaque comercial, por sua gastronomia, propriedades nutricionais e medicinais, e também pelo fato de crescerem e frutificarem em uma grande variedade de substratos (Gern et al., 2008; Fu et al., 1997). Apreciados devido ao sabor, à alta quantidade de proteínas, carboidratos, minerais, tais como cálcio, fósforo e ferro, e vitaminas (tiamina, riboflavina e niacina) (Sturion & Oetterer, 1995b). La Guardia et al., 2005, analisaram quatro diferentes tipos de cogumelos *Pleurotus* em relação à composição de lipídeos, açúcares, nitrogênio, água, vitaminas, cinzas e valor energético. Os resultados mostraram que cogumelos *Pleurotus* são adequados em vários tipos de dietas por apresentarem baixo conteúdo calórico, alto valor gastronômico, vitaminas e sais minerais. A espécie *Pleurotus nebrodensis* é notável em relação ao alto teor de vitamina B₁₂ e riboflavina. O extrato aquoso contém vitaminas B₁, B₂ e C pode reduzir o nível de colesterol no sangue (Pramanik et al., 2005).

A atividade saprofítica de basidiomicetos tem importante papel na busca por nutrientes em madeira e resíduos vegetais, em regiões tropicais secas e subtropicais, prevenindo o acúmulo de resíduos vegetais no ambiente (Kashangura et al., 2006).

A habilidade para desenvolver-se em uma grande variedade de substratos de resíduos agro-industriais é devido à capacidade de síntese de relevantes enzimas como celulases, hemicelulases e enzimas ligninolíticas (Mikiashvili et al., 2006). Durante o crescimento micelial e desenvolvimento completo dos corpos de frutificação ocorrem mudanças bioquímicas devido à secreção de enzimas extracelulares, para degradar os materiais insolúveis em substratos e moléculas simples e solúveis, as quais são subseqüentemente utilizadas por enzimas intracelulares (Kuforiji & Fasidi, 2008).

Os substratos de cultivo para *Pleurotus* spp incluem diferentes tipos de resíduos como pó de serraria, blocos de madeira, bagaço e polpa de café, folha de bananeira, bagaço de cana-de-açúcar (Ragunatham & Swaminathan, 2003; Sturion & Oetterer, 1995a; Souza et al., 2006). Os resíduos agrícolas são pobres em nitrogênio e a composição química dos corpos de frutificação pode variar de acordo com o substrato de cultivo, bem como métodos de cultivo (Sturion & Oetterer, 1995a).

2.2 Cogumelo *Agaricus blazei* Murril

O cogumelo *A. blazei* é um fungo saprófita, que necessita do fornecimento de substâncias orgânicas em decomposição para seu desenvolvimento. O clima tropical úmido favorece seu desenvolvimento, com temperatura variando de 25°C a 30°C (Braga & Eira, 1997). Apresenta corpo de frutificação visível a olho nu, tendo como características básicas: estipe central separada do píleo, lamelas livres e acimentadas quando jovens tornando-se marrons escuras na maturidade (Urban, 2001).

Este cogumelo foi descoberto por um agricultor imigrante japonês, Sr. Takatoshi Furumoto, em sua propriedade na região de Piedade, interior do estado de São Paulo, na década de 1960. O Sr. Furumoto enviou amostras deste cogumelo ao Japão para investigação. Este cogumelo foi identificado como *Agaricus blazei* Murril, por Heinemann, um botânico belga, em 1967. Esta espécie já tinha sido descrita em 1945 por Murril, sendo uma espécie de ocorrência natural da América do Norte (Firenzuoli et al., 2007).

Dados publicados por Wasser et al. (2002), após estudarem características morfológicas das espécies de *Agaricus*, verificaram que *A. blazei* Murril (cultivado na América do Norte) e *A. blazei* Heinemann (espécie coletada no Brasil) são diferentes em vários caracteres, tratando-se de espécies distintas. Por isso, os autores propuseram uma nova classificação para *A. blazei* Heinemann em *Agaricus brasilienses*.

Colauto et al. (2002), em estudo para a caracterização de diferentes isolados de *A. blazei*, observaram pequena divergência genética entre os isolados de *A. blazei*, pelos resultados da análise de Randon Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Tomizawa et al. (2007) também estudaram a divergência genética de diferentes isolados de *A. blazei* por RAPD e verificaram que dos oito isolados avaliados, quatro foram caracterizados como geneticamente diferentes.

Segundo Kerrigan (2005), em estudos baseados no seqüenciamento da região ITS de rDNA e nas análises genéticas de progênies híbridas, *A. blazei*, *A. silvaticus* e *A. brasiliensis* são sinônimos da mesma espécie *Agaricus subrufescens*. No entanto, a classificação desse cogumelo ainda é considerada um problema até que um consenso internacional aconteça (Firenzuoli et al., 2007). Como a denominação *A. blazei* tem sido a mais usada na literatura, neste trabalho será utilizado a classificação *Agaricus blazei*.

2.3 Importância nutricional e medicinal

Os cogumelos são considerados alimentos saudáveis por serem pobres em calorias e gorduras e ricos em proteínas, minerais e fibras dietéticas (Manzi & Pizzoferrato, 2000). São muito apreciados por seu sabor, valor econômico e ecológico e propriedades medicinais, há muitos anos (Sanches, 2004).

Cogumelos selvagens comumente consumidos em Khasi hills-Meghalaya (tribo de uma região chuvosa do nordeste indiano) são ricos em proteínas e minerais, incluindo minerais traços, pobres em lipídeos, (Agrahar-Murugkar & Subbulakshmi, 2005). Cogumelos selvagens do norte da Espanha apresentam 16% da matéria seca em proteína, 45% de fibras e 5,7% de lipídeos (Díez & Álvares 2001). Em geral, os corpos de frutificação de cogumelos secos contêm 39,9% de carboidratos, 17,5% de proteína, 2,9% de gordura e o restante constituinte de minerais (Mendil et al., 2005). O corpo de frutificação, frescos de *A. blazei* possui cerca de 85 a 87% de água e, quando desidratado, contém 44-45% de proteínas e 3-4% de carboidratos, fibras dietéticas 6-8%, lipídeos 3-4% e vitaminas, em especial B1, B2 e niacina (Belini et al., 2003).

De acordo com Mizuno (1995), a composição química do *A. blazei* pode variar conforme a linhagem, método de cultivo e composição do substrato em que é desenvolvido (Tabela 1). De acordo com Firenzuoli et al. (2007), geralmente, a composição química de *A. blazei* apresenta 90% de água, 2 - 40% de proteína, 2 - 8% de gordura e 1- 55% carboidrato, 3 - 32% fibras e 8 - 10% de cinzas.

TABELA 1 Composição química do cogumelo *A. blazei* desidratado Mizuno (1995).

Componente	Valor
Proteína	40% - 45%
Carboidratos	38% - 45%
Fibra	6% - 8%
Cinza	5% - 7%
Lipídeo	3% - 4%
Vitamina B1	0,3 mg/100g
Vitamina B2	3,2 mg/100g
Niacina	49,2 mg/100g
Ergosterol	0,1% - 0,2%
Potássio	2,97%

A procura de substâncias ou métodos que aumentam ou potencializam o sistema imunológico do corpo humano, de forma a induzir uma resistência sem causar efeitos colaterais deletérios ao organismo, tem sido uma das mais importantes buscas da ciência na cura contra o câncer (Eira, 2003).

Polissacarídeos isolados e purificados de corpos de frutificação, micélio e culturas filtradas de *A. blazei*, exibiram alta atividade antitumoral (Mizuno et al., 1990; Nakajima et al., 2002), aumentando a resistência do organismo através da potencialização do sistema imunológico (Mizuno, 1995).

A. blazei tem sido alvo de grande interesse devido ao seu valor nutricional e farmacológico. É usado no combate físico e estress emocional por estimular o sistema imunológico, por melhorar a qualidade de vida do diabético, por combater doenças, tais como: a osteoporose, a úlcera gástrica e também como eficiente antioxidante (Guterrez et al., 2004).

A principal característica do *A. blazei* é o fato de apresentar conteúdo de D-glucano, formado exclusivamente por ligações β -1,6 as quais estão associadas à atividade antitumoral (Menoli et al., 2001). Os corpos de frutificação, em diferentes estágios de maturidade, contêm α - glucanas e β -glucanas. Glucanas são cadeias laterais de uma estrutura principal β -(1-6), sendo esta estrutura principal β -(1-6) com ramificação β -(1-3), a fração ativa dos corpos de frutificação do *A. blazei* (Figura 1) (Firenzuoli et al., 2007).

Diferentes estudos têm demonstrado diferentes substâncias, com diferentes propriedades medicinais. Kawagishi et al. (1990) verificaram que um complexo proteína-glucano apresentava maior atividade antitumoral. No entanto, as glucanas imunologicamente ativas são β - (1-3), ligados por polímeros de glicose, os quais ocorrem como um componente primário da parede celular de bactérias e dos fungos, são secretadas extracelularmente por vários fungos, e atualmente esta parece ser a mais importante substância ativa (Firenzuoli et al., 2007).

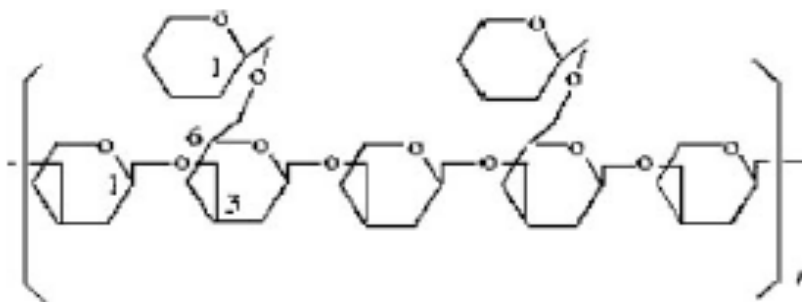


FIGURA 1 Ligação β -(1-6) e cadeia lateral β -(1-3) D-glucana (Firenzuoli et al. 2007).

Firenzuoli et al., (2007), destacam que estudos em *vivo* e em *vitro* mostram que, as propriedades imunomodulatórias e antimutagênicas através de rotas biológicas e substâncias químicas envolvidas na atividade farmacológica, não estão claros. É necessária atenção aos estudos clínicos, comparando a atividade dos componentes isolados, extrato total do cogumelo e dados epidemiológicos, para determinar o quanto o *A. blazei* realmente provê de benefícios clínicos. Estudos da dosagem de isolados, bem como, a identificação química e quantificação dos componentes específicos responsáveis pelo potencial benéfico na ingestão do *A. blazei*, devem ser totalmente desenvolvidos.

2.4 Cultivo de *Agaricus blazei*

As técnicas de cultivo de *A. blazei*, em escala comercial, ainda são praticadas de forma empírica. O seu cultivo baseia-se na adaptação às técnicas de produção de “champignon” (*A. bisporus*).

O cogumelo *A. blazei*, é um saprófita secundário. Isso significa que, ao contrário de outros cogumelos, como Shitake (*Lentinula edodes*), Maitake (*Grifola frondosa*) e o Reishi (*Ganoderma luciium*), que são saprófitas primários, ele pertence ao grupo dos decompositores secundários, aqueles que não podem degradar componentes lignocelulósicos complexos, e por isso, necessitam de uma fase de compostagem para se desenvolverem (Herrera, 2001).

O substrato de cultivo do *Agaricus* é resultado de uma compostagem orgânica sólida e em seu preparo utilizam-se de resíduos agropecuários ou agroindustriais como esterco de animais, restos vegetais (palhas de trigo, arroz, milho, feijão, algodão e bagaço de cana-de-açúcar).

A compostagem ocorre pela ação de microrganismos sobre os resíduos utilizados na presença de um teor de umidade adequado. A compostagem é dividida em fase I da compostagem e fase II, a qual é conhecida também como

pasteurização e condicionamento do composto. Durante estas fases ocorre uma intensa atividade de microrganismos, sendo estes responsáveis pela utilização de açúcares solúveis e quebra parcial das fibras que formam o material vegetal ou animal utilizado. A ação desses microrganismos faz com que o composto torne-se mais seletivo para o desenvolvimento do cogumelo, diminuindo as possibilidades de crescimento de microrganismos contaminantes (Dias, 2003). O pré-tratamento dos substratos para cultivo de cogumelos é necessário para tornar os constituintes químicos mais disponíveis e a sua estrutura física mais susceptível à colonização do micélio.

Durante a compostagem, são desenvolvidas características físicas e propriedades químicas importantes e interdependentes, as quais irão definir o sucesso da produção do cogumelo. Em termos de qualidades físicas, o composto deve ser permeável ao ar, apresentar boa retenção de água sem estar encharcado e um pH adequado. O composto deve apresentar, ao final do processo, um acúmulo de substâncias prontamente disponíveis para o fornecimento de nutrientes necessários ao cogumelo. Por outro lado, outras substâncias, tais como a amônia (NH_3), que são capazes de inibir o crescimento micelial do cogumelo, e devem ser eliminadas (Eira, 2003).

Depois de finalizada a fase I, o composto é transferido para o interior do túnel de pasteurização, para a fase II da compostagem, onde o composto é submetido à temperatura de 60°C por 6 horas no mínimo. A pasteurização tem como objetivo principal eliminar doenças e pragas do composto. Posteriormente, ainda durante a fase II, ocorre o condicionamento do composto, quando a temperatura é reduzida para $50^\circ\text{C} \pm 5$. Nele ocorre o desenvolvimento de microrganismos termofílicos e eliminação do excesso de amônia, a qual é volatilizada ou assimilada pelos microrganismos na forma de proteína (Dias, 2003). Todo processo de compostagem permite a obtenção um substrato mais

seletivo para o cogumelo e pouco favorável ao desenvolvimento de microrganismos competidores.

Após a pasteurização, ocorre a inoculação ou semeadura do *A. blazei*, normalmente em sacos plásticos. O inóculo é colocado juntamente com o composto pasteurizado na proporção de 1 a 2% do peso do composto. Após a inoculação, os sacos plásticos devem ser fechados para evitar perdas de umidade e acondicionados a 25°C por um período de 20 dias aproximadamente. Após a completa colonização, o composto é transferido para a casa onde o mesmo pode ser distribuído em prateleiras, em sistema de camas, ou mantidos nos próprios sacos. O composto é então coberto com uma camada de 5 cm de solo, de preferência livre de material orgânico e pasteurizado ou fumigado para a eliminação de pragas e doenças e pH ajustado para 7,0. Essa camada de cobertura sobre o composto deve ser mantida úmida durante todo o processo.

Após 20 ou 30 dias de aplicação da terra de cobertura, há o surgimento dos primeiros cogumelos. As colheitas podem estender por 60 dias ou mais, dependendo das condições de temperatura. A colheita deve ser realizada antes do início da abertura do píleo do cogumelo (Pascholati et al., 1998).

2.5 Resíduos agrícolas

Os maiores componentes de resíduos lignocelulósicos usados para o cultivo de cogumelos são: celulose, hemicelulose e lignina (Tan & Wahab, 1997). A degradação da lignina é muito importante para o ciclo global do carbono e requer a ação de enzimas específicas denominadas ligninolíticas (Jung et al., 2002). Os cogumelos são importantes para o ecossistema por causa da habilidade em degradar os substratos de resíduos da produção agrícola (Turkekul et al., 2004).

O cultivo de cogumelos comestíveis, em resíduos de práticas agrícolas, é o primeiro exemplo de conversão de resíduo de baixo valor, em uma mercadoria

de alto valor que serve para alimentação humana e como uma fonte comercialmente importante de metabólitos (Fu et al., 1997; Cai et al., 1998).

Durante a colonização do composto e, principalmente, durante a frutificação, o *A. blazei* provavelmente excreta enzimas para a degradação do material lignocelulósico e da massa microbiana, formada durante a compostagem, para a obtenção dos nutrientes necessários para a produção de massa micelial e, em especial, para a produção de cogumelos.

2.6 Lignina

A lignina é o polímero aromático mais abundante da terra. Este polímero natural é composto de unidades de fenil propano, que se repetem em ligações diferentes, sendo interligadas por ligações covalentes simples entre carbonos (C-C) e do tipo éter (C-O-C), tendo sua origem na polimerização desidrogenativa do álcool coniferílico (Boer et al., 2006).

A lignina é sintetizada inicialmente, em locais definidos da parede celular e da lamela média. A partir destes locais específicos a lignina se propaga em polímeros que se estendem através da parede celular. A estrutura da lignina confere rigidez às paredes celulares vegetais e devido à sua natureza recalcitrante é resistente ao ataque de microorganismos (Lechner & Papinutti, 2006; Hakala et al., 2005). Em função da estrutura complexa, este biopolímero é de difícil degradação e apresenta uma parte considerável do carbono fixado por fotossíntese. Os alcoóis p-cumaril, coniferil e sinapil, conhecidos como monolignóis, são as moléculas que vão gerar a lignina, chamados de precursores da lignina (Figura 2). O uso de polissacarídeos de resíduos ligninolíticos é limitado devido ao seu alto grau de polimerização.

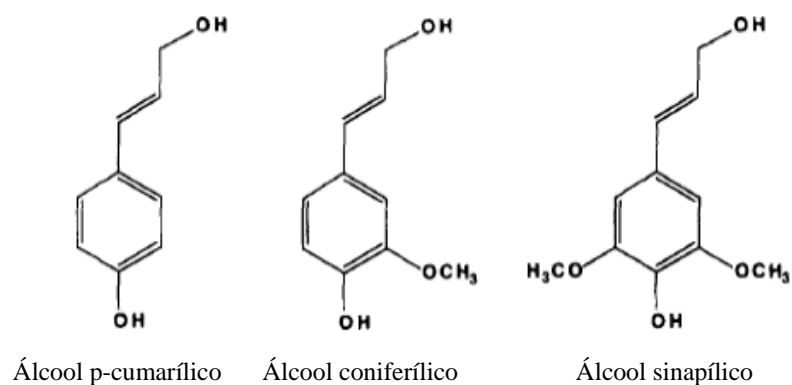


FIGURA 2 Precursores da lignina (Tuor et al., 1995).

A estrutura tridimensional, irregularidade na composição, heterogeneidade e recalcitrância em função de seu elevado peso molecular, confere a lignina alta estabilidade (Kerem & Hadar, 1995).

A lignina (Figura 3), sendo uma macromolécula, só pode entrar na célula microbiana após a quebra pela ação enzimática, em moléculas menores. A degradação da lignina é feita por um processo multienzimático resultante da ação de várias enzimas que inclui lacase (EC 1. 10. 3.2), manganês-peroxidase (EC. 1. 11. 1. 13), lignina-peroxidase (EC. 1. 11. 1. 14), dentre outras (Machado et al., 2005). A produção dessas enzimas é importante na colonização do substrato pelo fungo, bem como decisiva na produção de corpos de frutificação de cogumelos (Mata et al., 2005).

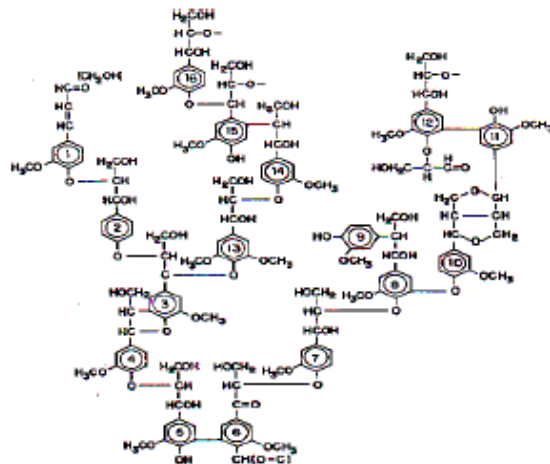


FIGURA 3 Esquema da estrutura tridimensional da lignina (Saliba et al., 2001)

2.7 Produção de ligninases por fungos

Os diversos tipos de fungos que degradam madeira são conhecidos como fungos da decomposição branca (“White-rot-fungi”) (Tabela 2), decomposição marron (“brown-rot”) e decomposição branda (“soft-rot”). Os fungos de decomposição marron degradam seletivamente carboidratos estruturais. Com a degradação limitada da lignina, o produto resultante apresenta elevada podridão parda ou marron. Os fungos de decomposição branca degradam os constituintes estruturais da parede celular, primeiro a lignina e hemicelulose, resultando na desfibrilação através da dissolução da lamela média. A degradação da lignina e carboidratos da parede celular é simultânea, resultando na degradação homogênea da parede celular (Pandey & Pitman, 2003). Os fungos que causam a degradação branca são mais eficientes na quebra de lignina (Jung et al., 2002). Os fungos produzem um complexo multienzimático de enzimas extracelulares,

que envolvem hidrolases e oxidoredutases, que degradam a lignina. As enzimas mais importantes são lacase, manganês-peroxidase (MnP) e lignina peroxidase (LiP) (Valášková et al., 2007). Alguns fungos de degradação-branca produzem todas as três enzimas do complexo ligninolítico e outros produzem somente uma ou duas delas (Tabela 2) (Wesenberg et al., 2003).

A degradação de lignina dá-se, principalmente, por grupos especializados de basidiomicetos pertencentes à ordem Agaricales (Hofrichter, 2002). Dentre os mais eficientes e conhecidos estão: *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* e o *Coriolus versicolor* (Tuor et al., 1995), sendo o primeiro e o último fungo os mais importantes produtores de enzimas que degradam a lignina (Call & Mücke, 1997).

A função mais importante das enzimas produzidas pelos cogumelos é a quebra de macromoléculas em moléculas menores que podem ser transportadas através da membrana celular. A aquisição de nutrientes são processos altamente regulados, que incluem a digestão, transporte e o subsequente metabolismo (Kersten et al., 1999). O crescimento e a frutificação do fungo são dependentes da habilidade do cogumelo em degradar os resíduos utilizando os produtos como fonte nutritiva (Tan & Wahab, 1997).

TABELA 2 Fungos de degradação-branca e suas enzimas ligninases (Tuor et al., 1995)

Microrganismos	Enzimas		
	LiP(EC 1.11.1.14)	MnP(EC 1.11.1.13)	Lac(EC 1.10.3.2)
<i>Coriolus versicolor</i>	+	+	+
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	+	+	Baixa
<i>Plebia brevispora</i>	+	+	+
<i>Plebia radiata</i>	+	+	+
<i>Pleurotus ostreatus</i>	+	+	+
<i>Pleurotus sajor caju</i>	+	+	+
<i>Pleurotus florida</i>	+	nd	+
<i>Lentinula edodes</i>	—	+	+
<i>Dichomitus squalens</i>	—	+	+
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	—	+	+
<i>Panus tigrinus</i>	nd	+	+
<i>Rigidoporus lignosus</i>	—	+	+
<i>Trametes cingulata</i>	—	—	nd
<i>Phelinus noxius</i>	nd	nd	+
<i>Xylaria polymorpha</i>	+	nd	+
<i>Ganoderma applanatum</i>	+	+	nd
<i>Fomes lignosus</i>	—	—	nd
<i>Poyiporus brumalis</i>	+	nd	+
<i>Poyiporus platensis</i>	+	nd	+
<i>Phlebia tremellosus</i>	+	nd	+
<i>Phlebia ochraceofulva</i>	+	nd	+
<i>Ustulina desuta</i>	+	nd	+

+ atividade enzimática; — não secreta enzima; nd atividade não detectada .

A produção de ligninases, especialmente a manganês-peroxidase por *Phanerochaete chrysosporium*, foi descoberto primeiramente por dois grupos de pesquisadores M. Gold e R. Crawford há 20 anos, (Hofrichter, 2002). A combinação de lacase e manganês-peroxidase são mais comuns em fungos de degradação-branca do que a combinação de lignina-peroxidase e manganês-peroxidase, observada em *P. chrysosporium* (Jung et al., 2002). O genoma de *P. chrysosporium* tem sido seqüenciado e aproximadamente 100 seqüências estão relacionadas às enzimas extracelulares, incluindo um número impressionante de enzimas oxidativas envolvidas na degradação de lignina (Kersten & Cullen, 2007).

As ligninases, secretadas por *Phanerochaete chrysosporium*, além de atuarem na degradação de resíduos lignocelulósicos, atuam também na remoção de corantes sintéticos, tais como: poluentes orgânicos clorofenóis, nitrotolueno e hidrocarbonetos poliêlicos aromáticos (Couto et al., 2000). Outros fungos como *Pleurotus ostreatus*, também foram usados na biodegradação de corante Remazol Brilliant Blue R (RBBR) (Machado & Matheus, 2006). Como já relatado por Wesenberg et al. (2003), os fungos de degradação-branca são hábeis em degradar compostos xenobióticos e corantes no tratamento de efluentes.

De acordo com Valásková et al. (2007), três fungos isolados de floresta de carvalho (República Checa), *Gymnopus* sp, *Hypholoma fasciculare* e *Rhodocollybia butyracea* foram capazes de produzir lacase e manganês peroxidase, entretanto, nenhum deles produziu lignina peroxidase.

A produção de lacase por um isolado brasileiro de *Pleurotus pulmonaris*, em fermentação em estado sólido, usando como substrato farelo de trigo, teve níveis máximos de 8.600 U/g de substrato com 75% de umidade em 5 dias de cultivo a 30°C (Souza et al., 2002). Tan & Wahab (1997) também encontraram alta produção de lacase em *Pleurotus sajor-caju*, cultivado em resíduos

lignocelulósicos de algodão, de 27,4 U (mg de proteína)⁻¹, após 35 dias de cultivo.

Vinte e um isolados selvagens de dois sítios distintos e seis isolados cultivados de *Agaricus bisporus*, foram cultivados em compostos convencionais para cogumelos e apresentaram diferenças na produção enzimática de lacase e manganês peroxidase (Savoie et al., 1996).

O cogumelo comestível *Lentinus tigrinus*, cultivado em substrato de palha de trigo durante 110 dias, degradou o resíduo lignocelulolítico, causando uma diminuição de 21,49% na lignina e apresentando altas atividades de ligninases durante a formação dos corpos de frutificação (Lechner & Papinutti, 2006).

2.8 Ligninases

A hidrólise enzimática da lignina é um processo multienzimático, resultante da ação coordenada de uma série de enzimas, principalmente lacase (Lac), manganês peroxidase (MnP) e lignina peroxidase (LiP).

2.8.1 Lacase (benzenodiol : oxigênio oxiredutase, EC 1.10.3.2)

A lacase tem sido encontrada e diferenciada em plantas superiores e fungos (Leontievsky et al., 1997). Esta enzima, pertence ao grupo das enzimas cobre oxidases ou oxidases do cobre. É uma fenol oxidase que catalisa a oxidação de um elétron de uma série de compostos aromáticos e substâncias inorgânicas, incluindo mono, di e polifenóis, com concomitante redução do oxigênio a água (Revankar & Lele, 2006; Duran et al., 2002; Baiocco et al., 2003). É uma verdadeira fenoloxidase, que atua em substrato específico, oxida fenóis e compostos fenólicos, na estrutura da lignina por retirada de um elétron com formação de radicais. Esses radicais atuam em reações não catalíticas, como acoplamento de radical-radical desprotonação e devido ao ataque nucleofílico da

água, levando a reações de polimerização, quebras e oxidações nos C_α e desmetilações. As reações de desmetilação, nas unidades terminais fenólicas catalisadas pela lacase, resultam na despolimerização da lignina (Tuor et al., 1995; Kiiskinen et al., 2004).

As lacases de origem fúngica possuem quatro átomos de cobre por molécula da enzima, que são distribuídos nos diferentes sítios de ligação e são classificados de acordo com a ligação com a proteína, em cobre 1, 2 e 3, que podem ser distinguidos usando espectrofotometria. Essa classificação é dada pelas propriedades específicas dos mesmos. No tipo 1, o cobre dá a coloração azul para a proteína numa absorvância de 600nm. No tipo 2, o cobre não confere cor à proteína e é detectável por ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e no tipo 3 o par de átomos de cobre dão uma fraca absorção próximo ao ultravioleta (UV) (330nm) e não tem sinal de RPE. Os tipos 2 e 3 estão arranjados em um único grupo trinuclear de cobre, que é capaz de ligar-se ao oxigênio (Leontievsky et al., 1997).

A produção de ligninases e outras misturas de componentes pelos fungos, como os mediadores, permite uma contínua deslignificação do polímero lignocelulósico. O mediador é uma molécula com função de transportar elétrons entre as enzimas e os compostos fenólicos (Figura 4). A molécula oxidada do mediador, que apresenta baixo peso molecular, difunde-se do sítio ativo da enzima e passa a oxidar outros compostos que, em função do seu alto peso molecular, não poderiam entrar no sítio ativo da enzima. O fato de as enzimas ligninolíticas apresentarem alto peso molecular, impede a sua penetração na madeira, por isso os mediadores migram para longe das enzimas e oxidam os outros componentes da lignina (Baiocco et al., 2003; Gonzáles et al., 2002).

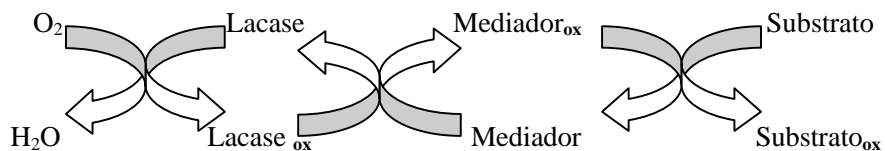


FIGURA 4 Função do mediador na reação da lacase (Fabrini et al., 2002; Baiocco et al; 2003).

Os mediadores mais conhecidos são o 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), também chamado de ABST e o 1-hidroxibenzotiazol (HBT). Essas duas substâncias são oxidadas pela lacase, formando (HBT⁰) e os cátions (ABST⁺) e (ABTS⁺²) (Figura 5) (Fabrini et al., 2002).

O potencial de degradação ligninolítico da lacase tem sido explorado na biodegradação e remoção de compostos fenólicos de efluentes da produção de vinhos e sucos de frutas (Arora & Gill, 2001), bem como na produção de papel (Fabrini et al., 2002).

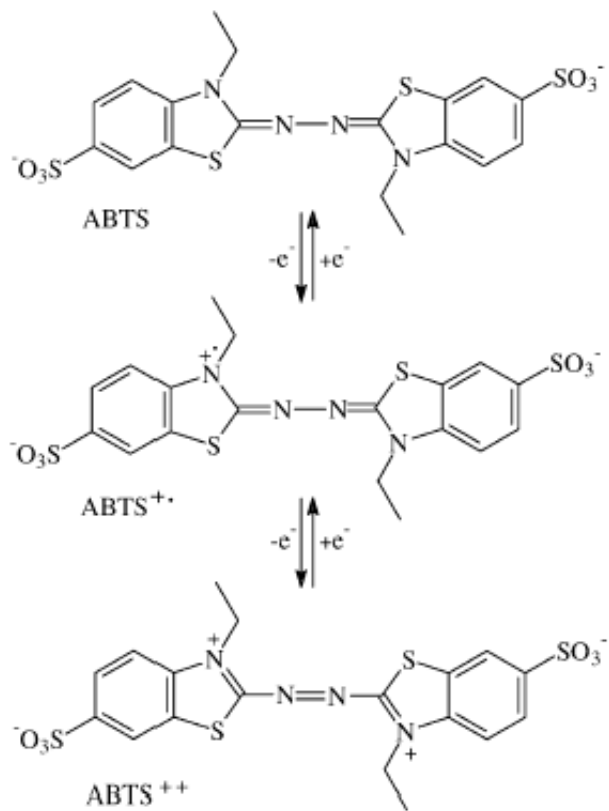
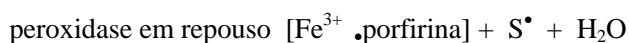
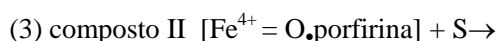
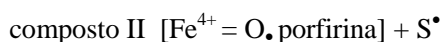
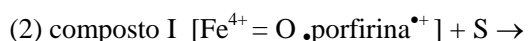
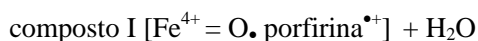
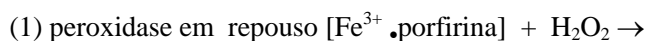


FIGURA 5 Estado oxidado do ABST (Fabrini et al., 2002).

2.8.2 Lignina peroxidase (EC 1.11.1.14)

A lignina peroxidase (LiP) juntamente com a enzima manganês peroxidase de *Phanerochaete chrysosporium*, tem sido intensamente estudada e são consideradas as enzimas mais importantes na degradação do polímero de lignina (Call & Mücke, 1997). A enzima lignina peroxidase catalisa diversas oxidações na cadeia lateral da lignina, que é inicialmente oxidada pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e oxida também núcleos aromáticos (fenólicos e não fenólicos), retirando um elétron e formando radicais reativos (Wesenberg et al., 2003). A enzima apresenta um grupo heme, que contém Fe protoporfirínico IX como grupo prostético, sendo dependente de H₂O₂ (Kersten & Cullen, 2007).

A reação catalisada pela LiP consiste de três reações:



O peróxido de hidrogênio é o aceptor natural de elétrons, oxidando Fe³⁺ para Fe⁴⁺ na reação (1), resultando na formação do composto I. Por redução do composto I, pela transferência de um elétron é formado o composto II, na reação (2) e (3), retornando a enzima ao seu estado nativo (repouso) (Martinez, 2002).

A LiP é relativamente inespecífica para seu substrato redutor, uma característica compartilhada com outras peroxidases não ligninolíticas, oxidando substratos fenólicos e corantes. No entanto, difere destas devido sua preferência por substratos de compostos aromáticos não fenólicos. Enquanto os radicais fenólicos são os primeiros produtos da reação de oxidação de substratos fenólicos pelas peroxidases em geral, os cátions aromáticos são formados após a oxidação de anéis aromáticos não fenólicos pela lignina peroxidase (Martinez, 2002).

O álcool veratrílico (Figura 6), um metabólito secundário produzido por diversos fungos, principalmente basidiomicetos. É designado como cofator fisiológico da lignina peroxidase, um papel chave na despolimerização da lignina, sendo um excelente substrato para LiP. A função essencial do álcool veratrílico é como um mediador redox entre a LiP e a degradação da lignina e também na proteção da LiP durante o ciclo redox da produção metabólica excessiva de H_2O_2 (Suguimoto et al., 2001). Na presença de peróxido de hidrogênio, a LiP oxida o álcool veratrílico a veratraldeído (Figura 6), reação de determinação em ensaios de atividade de lignina peroxidase (Tien & Kirk, 1984).

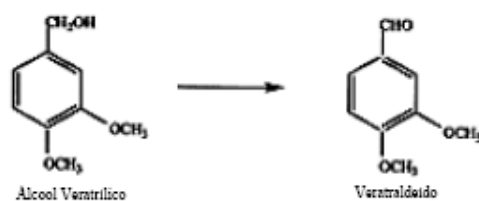


FIGURA 6 Oxidação do álcool veratrílico a veratraldeído (Fabrini et al., 2002).

2.8.3 Manganês peroxidase (Manganês dependente de peroxidase EC 1.11.1.13)

A manganês peroxidase (MnP) é também uma glicoproteína, não específica, com Fe porfírico IX como grupo prostético e requer H_2O_2 para a sua atividade, usa Mn^{2+} como substrato oxidando-o a Mn^{3+} (Karimniaee-Hameaani et al., 2007). É a peroxidase ligninolítica mais comum produzida pelos basidiomicetos de degradação-branca (Wesenberg et al., 2003).

O ciclo catalítico da MnP inicia com a ligação do H_2O_2 com o ferro presente na enzima, com formação do complexo ferro-peróxido (Figura 7). A clivagem subsequente da ligação oxigênio-oxigênio (O-O) do peróxido requer a transferência de dois elétrons do grupo heme, resultando na formação do complexo Fe^{4+} -oxo-porfirina (composto I). Em seguida, a ligação dioxigênica é clivada heteroliticamente e uma molécula de água é liberada. A redução subsequente, ocorre com formação do complexo MnP-II (Fe^{4+} -oxo-porfirina) (composto II). Um íon Mn^{2+} atua como doador de 1 elétron para esta porfirina,

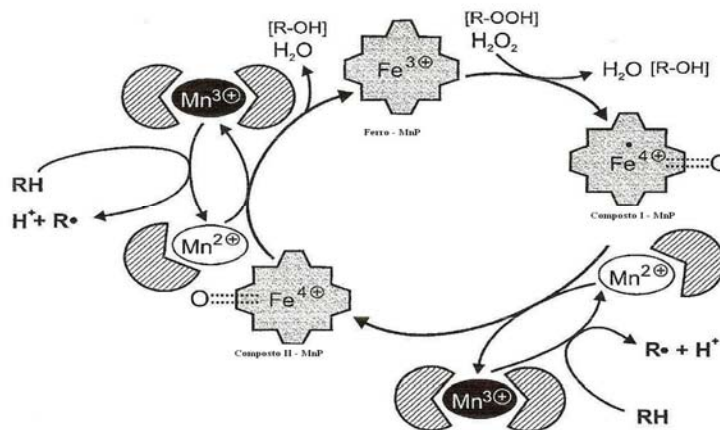


FIGURA 7 Ciclo catalítico da manganês-peroxidase (Hofrichter, 2002).

sendo oxidado a Mn^{3+} . A redução do composto II gera outro Mn^{3+} a partir de um segundo Mn^{2+} levando a regeneração da enzima na forma original e liberando uma segunda molécula de água. Entretanto o composto I da MnP, semelhante ao da LiP, pode ser reduzido para Mn^{2+} e também por outros diferentes doadores de elétrons, o composto II da MnP é pouco reduzido por outros substratos e requer Mn^{2+} para completar o ciclo catalítico (Hofrichter, 2002).

A produção dessas enzimas pelo cogumelo é de grande importância na colonização do substrato e determinante no rendimento dos cogumelos (Buswell et al., 1995).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAHAR-MURUGKAR, D.; SUBBULAKSHMI, G. Nutritional value of edible wild mushrooms collected from the Khasi hills of Meghalaya. **Food Chemistry**, Oxford, v. 89, n. 4, p. 599-603, Mar. 2005.

ARDON, O.; KEREM, Z.; HADAR, Y. Enhancement of laccase activity in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus* by cotton stalk extract. **Journal of Biotechnology**, Israel, v. 51, p. 201-207, July 1996.

ARORA, D. S.; GILL, P. K.; Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi. **Bioresource Technology**, India, v. 77, p. 89-91, Aug. 2001.

BAIOCCO, P.; BARRECA, A.M.; FABRINI, M.; GALLI, C.; GENTILLI, P. Promoting laccase activity towards non-phenolic substrates: a mechanistic investigation with some laccase-mediator systems. **Organic Biomolecular Chemistry**, v. 1, n.1, p. 191-197. 2003.

BELLINI, M. F.; GIACOMINI, N. L.; EIRA, A. F.; RIBEIRO, L. R.; MANTOVANI, M. S. Anticlastogenic effect of aqueous extract of *Agaricus blazei* on CHO- k1 cells, studying different developmental phases of the mushroom. **Toxicology in Vitro**, v. 17, n. 4, p. 465-469, Aug. 2003.

BOER, C.G.; OBICI, L.; SOUZA, C.G.M.; PERALTA, R.M. Purification and some properties of Mn peroxidase from *Lentinus edode* . **Process Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1203-1207, May 2006.

BONATTI, M.; KARNOPP, P.; SOARES, H. M. ; FURLAN, S. A. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. **Food Chemistry**, Oxford, n. 1, v. 88, p. 425-428, Dec. 2004.

BRAGA, G. C.; EIRA, A. F. **Cultivo do cogumelo do sol**. Viçosa: CPT, 1997. 60 p.

BUSWELL, J. A.; CAI, Y.; CHANG, S. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula*

(*Lentinus*) *edodes*. **FEMS Microbiology Letters**, Hong-Kong, v. 128, p. 81-88, Feb. 1995.

CAI, Y.J. ; BUSWELL, J.A.; CHANG, S.T. β -Glicosidase componentes of the cellulolytic system of the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, n. 2, p. 122-129, Feb. 1998.

CALL, H.P.; MÜCKE, I. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym[®]-process). **Journal of Biotechnology**, v. 53, n. 2/3, p. 163-202, Mar. 1997.

COLAUTO, N. B.; DIAS, E. S.; GIMENES, M. A.; EIRA, A. F. Genetic characterization of isolates of the basidiomycete *Agaricus blazei* by RAPD. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 131-133, Apr./June 2002.

COUTO, S.R.; RIVELA, I.; MUÑOS, M.R.; SANROMÁN, A. Stimulation of ligninolytic enzyme production and the ability to decolorize Poly R478 in semi-solid-state of *Phanerochate chrysosporium*. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 74, n. 2, p. 159-164, Sept. 2000.

CRISAN, E. B.; SANDS, A. Nutritional value. In: CHANG, S. T. ; HAYES, W. A. (Ed.) **The biology and cultivation of mushrooms**. New York: Academic, 1978. 137 p.

DIAS, E. S. **Cultivo dos cogumelos champignon e *Agaricus blazei***. Lavras: UFLA, 2003. 52 p.

DÍEZ, V. A.; ALVAREZ, A. Compositional and nutritional studies on two wild edible mushrooms from northwest Spain. **Food Chemistry**, Oxford, v. 75, n. 4, p. 417-422, Dec. 2001.

DURAN, N.; ROSA, M. A.; D'ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 907-931, July 2002.

EIRA, A. F. **Cultivo do cogumelo medicinal *Agaricus blazei* (Murril) ss Heinemann ou *Agaricus brasiliensis* (Wasser et al.)**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2003. 398 p.

FABRINI, M.; GALLI, C.; GENTILLI, P. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 16, n. 5/6, p. 231-240, Feb. 2002.

FIRENZUOLI, F.; GORI, L.; LOMBARDO, G. The medicinal mushroom *Agaricus blazei*: review of literature and pharmaco-toxicological problems. **eCAM Advance Access Published**, Italy, v. 27, p. 1-13, Mar. 2007.

FU, S. Y.; YU, H.; BUSWELL, J. A. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Pleurotus sajor-caju*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 147, n. 1, p. 133-137, Jan. 1997.

GERN, R. M. M.; WISBECK, E.; RAMPINELLI, J. R.; NINOW, J. L.; FURLAN, S. A. Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 99, n. 1, p. 76-82, Jan. 2008.

GONZALES, L.; HERNÁNDES, J. R.; PERESTELO, F.; CARCINERO, A.; FALCÓN, M.A. Relationship between mineralization of synthetic lignins and the generation of hydroxyl radicals by laccase and a low molecular weight substance produced by *Petriellidium fusoidium*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 4, p. 474-481, Apr. 2002.

GUTERREZ, Z. R.; MANTOVANI, M. S. ; EIRA, A. F.; RIBEIRO, L. R.; JORDÃO, B. Q. Variation of the antimutagenicity effects of water extracts of *Agaricus blazei* Murrill in vitro. **Toxicology in Vitro**, v. 18, n. 3, p. 301-309, June 2004.

HAKALA, T.K.; LUNDELL, T.; GALKIN, S.; MAIJALA, P.; NALKKINEN, N.; HATAKKA, A. Manganese peroxidase, laccases and oxalic acid from the selective white-rot fungus *Physisporinus rivulosus* grown on spruce wood chips. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 4, p. 461-468, Mar. 2005.

HERRERA, O. M. **Produção, economicidade e parâmetros energéticos do cogumelo *Agaricus blazei* um enfoque na Cadeia Produtiva**. 2001. 183 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrônomicas) - Faculdade de Ciências Agrônômicas. Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

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

JUNG, H.; XU, F.; LI, K. Purification and characterization of laccase from wood-degrading fungus *Trichophyton rubrum* LKY -7. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 2, p. 161-169, Feb. 2002.

KARIMINIAAE-HAMEDAANI, H. R.; SAKURAI, A.; SAKAKIBARA, M. Decolorization of synthetic dyes by a new manganese peroxidase-producing White rot fungus. **Dyes and Pigments**, Japan, v. 72, p. 157-162, Oct. 2007.

KASHANGURA, C.; HALLSWORTH, J. E.; MSWAKA, A. Y. Phenotypic diversity amongst strains of *Pleurotus sajor-caju*: implications for cultivation in arid environments. **Mycological Research**, Zimbabwe, v. 110, n. 3, p. 312-317, Mar. 2006.

KAWAGISHI, H.; KANDO, T.; INAGAKI, R.; MIZUNO, T.; SHIMUZA, K.; ITO, H. KAGIWARA, T.; NAKAMURA, T. Formolysis of a potent antitumor (1→6)-Beta-D- glucan-protein complex from *Agaricus blazei* fruiting a bodies and antitumor activity of the resulting products. **Carbohydrate Polymers**, v. 12, n. 4, p. 393-403, 1990.

KEREM, Z.; HADAR, Y. Effect of manganese on preferential degradation of lignin by *Pleurotus ostreatus* during solid-state fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 8, p. 3057-3062, Aug. 1995.

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

KERSTEN, M. A. S. H.; ARNINKHOF, M. J. C.; CAMP, H. J. M. O D.; GRIENSVEN, L. J. L. D. V.; DRIFT, C. van der. Transport of amino acids and ammonium in mycelium of *Agaricus bisporus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1428, n. 2/3, p. 260-272, Aug. 1999.

KERSTEN, P.; CULLEN, D. Extracellular oxidative systems of lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Fungal Genetics and Biology**, USA, v. 44, n. 2, p.77-87, Feb. 2007.

KIISKINEN, L.L.; PALONEN, H.; LINDER, M.; VIKARI, L.; KRUUS, K. Laccase fom *Melanocarpusalbomyces* binds effectively to cellulose. **FEBS Letters**, Finland, v. 576, n. 1/2, p. 251-255, Oct. 2004.

KUFORJI, O. O.; FASIDI, I. O. Enzyme activities of *Pleurotus tuber-regium* (Fries) singer, cultivated on selected agricultural wastes. **Bioresource Technology**, Nigeria, v. 99, p. 4275-4278, June 2008.

LA-GUARDIA, M.; VENTURELLA, G.; VENTURELLA, F. On the Chemical composition and nutritional value of *Pleurotus* taxa growing on umbelliferous plants (Apiaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Italy, v. 53, n. 15, p. 5997-6002, July 2005.

LECHNER, B. E.; PAPINUTTI, V. L. Production of lignocellulosic enzyme during growth and fruiting of the edible fungus *Lentinus tigrinus* on wheat straw. **Process Biochemistry**, Argentina, v. 41, n. 3, p. 594-598, Mar. 2006.

LEONTIEVSKY, A. A.; VARES, T.; LANKINEN, P.; SHERGILL, J. K. ; POZDNYAKOVA, N. N.; MYASOEDOVA, N. M.; KALKKINEN, N.; GOLOVLEVA, L. A.; CAMMACK, R.; THURSTON, C. F.; HATAKKA, A.; Blue e yellow laccase of ligninolytic fungi. **FEMS Microbiology Letters**, Russia, v. 156, n.1, p. 9-14, Nov. 1997.

MACHADO, K. M. G.; MATHEUS, D. R. Biodegradation of remazol brilliant blue r by ligninolytic enzymatic complex produced by *Pleurotus ostreatus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 468-473, Oct./Dec. 2006.

MACHADO, K.M.G.; MATHEUS, D.R.; BONONI, V.L. Ligninolytic enzymes production and remazol brilliant blue r decolorization by tropical Brazilian basidiomycetes fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 246-252, July/ Sept. 2005.

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

MARTINEZ, A. T. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. **Enzyme and Microbial Technology**, Spain, v. 30, n. 4, p. 425-444, Apr. 2002.

MATA, G.; HERNANDEZ, D.M.M.; ANDREU, L. G. I. Changes in lignocellulolytic enzyme activities in six *Pleurotus* spp. : strains cultivated on coffee pulp in confrontation with *Trichoderma* spp. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Mexico, v. 21, p. 143-150, June 2005.

MENDIL, D.; DOGAN, U.; TÜZEN, M.; HASDEMIR, E.; SARI, H. Trace metal levels in mushroom samples from Ordu, Turkey. **Food Chemistry**, Turkey, v. 91, n. 3, p. 463-467, July 2005.

MENOLI, R. C. R. N.; MANTOVANI, M. S.; RIBEIRO, L. R.; SPEIT, G.; JORDÃO, B. Q. Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murril extracts on V79 cell. **Genetic Toxicology & Environmental Mutagenesis**, Brasil, v. 96, p. 5-13, Jan. 2001.

MIKIASHVILI, N.; WASSER, S. P.; NEVO, E.; ELISASHVILI, V. Effects of carbon and nitrogen sources on *pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Israel, v. 22, p. 999-1002, Jan. 2006.

MIZUNO, T. Kawariharatake, *Agaricus blazei* murril: medicinal and dietary effects. **Food Reviews International**, New York, v. 11, n 1, p. 167-172, 1995.

MIZUNO, T.; INAGAKI, R.; KANAO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, K.; SUMIYA, T.; ASAKURA, A. Antitumor activity and some properties of water-insoluble hetero-glycans from "Himematsutake," the fruiting body of *Agaricus blazei* Murril. **Agricultural Biological Chemistry**, Japan, v.54, n. 11, p. 2897-2905, May 1990.

PANDEY, K.K.; PITMAN, A.J. FTIR studies of the changes in wood chemistry following decay by brown-rot and white-rot fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**, India, v. 52, n. 3, p. 151-160, Oct. 2003.

PASCHOLATI, S. F.; STANGARLIN, J. R.; PICCININ, D. **Cogumelos**: cultivo e comercialização, (*Shiitake* e cogumelo do sol). Cuiabá, MT: SEBRAE, 1998, 85 p. (Coleção Agroindústria, 17).

PRAMANIK, M.; MONDAL, S.; CHAKRABORTY, I.; ROUT, D.; ISLAM, S. S. Structural investigation of a polysaccharide (Fr. II) isolated from the aqueous extract of an edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. **Carbohydrate Research**, Oxford, v.340, n. 4, p. 629-636, Mar. 2005.

RAGUNATHAN, R.; SWAMINATHAN, K. Nutritional status of *Pleurotus* spp. grown on various agro-wastes. **Food Chemistry**, India, v. 80, n. 3, p. 371-375, Mar. 2003.

REVANKAR, M. S.; LELE, S.S. Enhanced production of lacase using a new isolated of white rot fungus WR-1. **Process Biochemistry**, Índia, v. 41, n.3, p. 581-588, Mar. 2006.

SALIBA, E. O. S.; RODRIGUEZ, N. M.; MORAIS, S. A. L.; PILÓ-VELOSO, D. Ligninas : métodos de obtenção e caracterização química. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 5, p. 917-928, 2001.

SANCHES, C. Modern aspects of mushroom culture technology. **Applied Microbiology Biotechnology**, Mexico, v. 64, p. 756-762, Feb. 2004.

SAVOIE, J. M.; BRUNEAU, D.; MAMOUN, M. Resource allocation ability of wild isolates of *Agaricus bisporus* on conventional mushroom compost. **FEMS Microbiology Ecology**, França, v. 21, p. 285-292, Aug. 1996.

SOUZA, C.G.M.; ZILLY, A.; PERALTA, R.M. Production of laccase as the sole phenoloxidase by a Brazilian strain of *Pleurotus pulmonarius* in solid state fermentation. **Journal Basic Microbiology**, Brasil, v. 42, n. 2, p. 83-90, Nov. 2002.

SOUZA, D. F.; TYCHANOWICZ, G. K.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Co-production of ligninolytic enzymes by *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state cultures. **Journal Basic Microbiology**, Brasil, v. 46, n. 2, p. 126-134, July 2006.

STURION, G. L.; OETTERER, M. Composição química de cogumelos comestíveis (*Pleurotus* spp) originados de cultivos em diferentes substratos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 189-193, jul./dez. 1995a.

STURION, G. L.; OETTERER, M. Utilização da folha de bananeira como substrato para cultivo de cogumelos comestíveis (*Pleurotus* spp). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 194-200, jul./dez. 1995b.

SUGUIMOTO, H.H.; BARBOSA, A. M.; DEKKER R. F.H.; CASTRO-GOMES, R. J. H. Veratryl alcohol stimulates fruiting body formation in the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 194, n. 2, p. 235-238, Jan. 2001.

TAN, Y.H.; WAHAB, M.N. Extracellular enzyme production during anamorphic growth in the edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Malaysia, v. 13, p. 613-617, Dec. 1997.

TIEN, M.; KIRK, K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. **Proceeding of the National Academy of Sciences USA**, EUA, v. 81, p. 2280-2284, Apr. 1984.

TOMIZAWA, M. M. ; DIAS, E. S.; ASSIS, L. J.; GOMIDE, P. H. O.; SANTOS, J. B. Variabilidade genética de isolados de cogumelos *Agaricus blazei* por meio de marcadores RAPD. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n. 4, p. 1242-1249, jul./ago. 2007.

TUOR, U.; WINTERHALTER, K.; FIECHTER, A. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. **Journal of Biotechnology**, Switzerland, v. 41, p. 1-17, Mar. 1995.

TURKEKUL, I.; ELMASTAS, M.; TÜZEN, M. Determination of iron, copper, manganese, zinc, lead, and cadmium in mushroom samples from Tokat, Turkey. **Food Chemistry**, Turkey, v.84, n.3, p. 389-392, Feb. 2004.

URBEN, A. F. **Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2001. 151p.

VALÁSKOVÁ, V.; SNAJDR, J.; BITTNER, B.; CAJTHAML, T.; MERHAUTOVÁ, V.; HOFRICHTER, M.; BALDRIAN, P. Production of lignocellulose-degrading enzymes and degradation of leaf litter by saprotrophic basidiomycetes isolated from a *Quercus petraea* forest. **Soil Biology and Biochemistry**, Czech republic, v. 39, n. 10, p. 2651-2660, June 2007.

VÁLAZQUEZ-CEDEÑO, M.A.; MATA, G.; SAVOIE, J.M. Waste reducing cultivation of pleurotus and pleurotus pulmonaris on coffee pulpe changes in the production of some lignocellulolytic enzymes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Mexico, v. 8, n.3, p. 201-207, Jan. 2002.

WASSER, S.P.; DIDUKH, M. Y. AMAZONAS, M. A. L.; NEVO, E.; STAMETS, P.; EIRA, A. F. Is a widely cultivated culinary-medicinal Royal Sun Agaricus (the Himematsutake Mushroom) indeed *Agaricus blazei* Murril? **International Journal of Medicinal Mushrooms**, Dordrecht, v. 4, p. 267-290, 2002.

WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S.N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances**, Belgium, v. 22, n. 1/2, p. 161-187, Dec. 2003.

YILDIZ, S. YILDIZ, Ü.C.; GEZER, E. D.; TEMİZ, A. Some lignocellulosic wastes used as raw material in cultivation of the *Pleurotus ostreatus* culture mushrooms. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 3, p. 301-306, Nov. 2002.

CAPÍTULO 2

COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE CORPOS DE FRUTIFICAÇÃO DE COGUMELOS MEDICINAIS, CULTIVADOS EM DIFERENTES TEORES DE NITROGÊNIO

RESUMO

SILVA, Evânia Geralda da. Composição química de corpos de frutificação de cogumelos cultivados em diferentes teores de nitrogênio. In: _____. **Caracterização química e enzimática de cogumelos medicinais**. 2007. p. 36-63. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Os substratos de cultivo para cogumelos são, em geral, materiais lignocelulósicos, ricos em carbono e pobres em nitrogênio. A deficiência do nitrogênio no substrato, acarreta em baixa produtividade do cogumelo. Sendo o nitrogênio, essencial para desenvolvimento do cogumelo é necessária a suplementação do composto de cultivo com este elemento. A composição química do cogumelo *P. sajor-caju* e *A. blazei* pode variar de acordo com a linhagem, com o substrato de cultivo e o método de cultivo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a composição química de corpos de frutificação de *P. sajor-caju* e *A. blazei*, isolado CS1, cultivados em resíduos à base de bagaço de cana-de-açúcar, farelo de trigo e capim coast-cross suplementado com diferentes teores de nitrogênio, na forma de uréia. Foram usadas cinco concentrações de nitrogênio 0,65%; 0,85%; 1,30%; 1,75% e 2,20% para *P.sajor-caju* e três concentrações para *A. blazei* de 1% , 1,5% e 2% . A suplementação com nitrogênio foi feita no preparo do composto de cultivo para *P. sajor-caju* e na compostagem, após a quarta revirada das pilhas, para *A. blazei*. Após a produção, os cogumelos colhidos e desidratados foram submetidos às análises químicas. Os resultados das análises químicas, apresentaram diferença significativa em relação à proteínas, cinzas e lipídeos para *P. sajor-caju* e açúcares totais, glicose, sacarose, e aminoácidos para *A. blazei*. Pelos dados obtidos observa-se que quanto maiores os teores de nitrogênio no substrato de cultivo, maior o teor de proteína nos corpos de frutificação e maiores os teores dos aminoácidos lisina, ácido aspártico, prolina, alanina, isoleucina e leucina. Sendo assim, a variação de nitrogênio no composto de cultivo altera a composição química de corpos de frutificação de *P. sajor-caju* e *A. blazei*, isolado CS1.

Comitê orientador: Dr. Eustáquio Souza Dias – UFLA (Orientador), Dra. Rosane Freitas Schwan – UFLA

ABSTRACT

SILVA, Evânia Geralda da. Chemical composition of mushroom fruiting bodies cultivated in different nitrogen contents. In:_____.**Chemical and enzymatic characterization of medicinal mushrooms**. 2007. p. 36-63. Thesis (Doctorate in Food Science) – Federal University of Lavras, Lavras.

The substrates for mushroom cultivation are, in general, lignocellulosic materials, rich in carbon and poor in nitrogen. The impairment of nitrogen in the substratum results in a low mushroom productivity. Once nitrogen is essential for the mushroom growth, it is necessary a supplementation of the compost cultivation with this element. The chemical composition of *P. sajor-caju* and *A. blazei* mushroom may vary according to the strain, with the substrate and method of cultivation. The objective of this work was to evaluate the chemical composition of *P. sajor-caju* and *A. blazei* fruiting bodies, CS1 isolate, cultivated in residues based on sugar cane bagasse, wheat bran and coast-cross hay supplemented with urea in different concentrations. Five concentrations of nitrogen were used for *P. sajor-caju* (0,65%; 0,85%; 1,30%; 1,75% and 2,20%) and three concentrations for *A. blazei* (1,0%; 1,5% and 2,0%). The supplementation with nitrogen took place at the beginning in the preparation of the compost for *P. sajor-caju* and after the fourth turn of the composting piles for *A. blazei*. After the production, dry mushrooms were submitted to chemical analysis. The results of the chemical analysis showed significant difference in relation to the proteins, ashes and lipids for *P. sajor-caju* and total sugars, glucose, sucrose, and amino acids for *A. blazei*. By the obtained data, it's observed that the greater the nitrogen content in the substrate, the greater the protein content in the fruiting bodies and the greater the contents of lysine, aspartic acid, proline, alanine, isoleucine, and leucine. Therefore, the variation of nitrogen in the compost cultivation modifies the chemical composition of fruiting bodies of *P. sajor-caju* and *A. blazei* CS1.

Advisory committee: Professor Dr. Eustáquio Souza Dias – UFLA (Advisor), Dra. Rosane Freitas Schwan – UFLA.

1 INTRODUÇÃO

Os cogumelos comestíveis são cultivados em uma grande variedade de resíduos agrícolas e são considerados grandes transformadores destes resíduos, representando um dos processos mais eficientes de reciclagem (Zang et al., 2002). Alguns cogumelos, entre eles *Agaricus bisporus* e *A. blazei*, requer substrato compostado. A compostagem é o processo de decomposição aeróbia por microrganismos nativos, que atingem temperaturas elevadas, permitindo o desenvolvimento de microrganismos termófilos (Eira, 2003).

Os resíduos agrícolas aproveitados para o cultivo de cogumelos geralmente são disponíveis na região, o que minimiza os custos de produção e facilita a repetibilidade da formulação entre as produções. A formulação do composto interfere diretamente na produtividade (Eira, 2003).

O composto à base de resíduos agrícolas, como palhas vegetais e capins são deficientes em nitrogênio. Como o nitrogênio é um elemento essencial para a formação de aminoácidos, ácidos nucleicos, síntese de proteínas e outros, ele deve ser corrigido com a adição de suplementos, pois a deficiência, no composto de cultivo, acarreta em baixo rendimento micelial e conseqüentemente baixa produtividade de cogumelo.

A composição química dos cogumelos pode variar conforme a linhagem, método de cultivo e composição do substrato em que é desenvolvido (Sturion & Oetterer, 1995; Crisan & Sands, 1978). Diante disso, alé de sua importância sobre a produtividade, é importante estabelecer a concentração ideal de nitrogênio no substrato, visando cogumelos mais ricos em proteínas.

O objetivo deste trabalho foi o de cultivar *Pleurotus sajor-caju* e *A. blazei* em substratos com diferentes teores de nitrogênio e verificar a sua composição química.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo: fonte

Os isolados utilizados de *Pleurotus sajor-caju* e *Agaricus blazei* CS1 pertencem à coleção de culturas do Laboratório de Cogumelos Comestíveis e Medicinais do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras – Lavras –MG.

2.2 Meio de cultivo

Para a manutenção das culturas e crescimento, o isolado de *Pleurotus sajor-caju* foi mantido em meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA), constituído por extrato de 200g de batata cozida em um litro de água destilada, ao qual adicionou-se 15 g de dextrose e 13 g de ágar biológico; o isolado de *A. blazei* foi mantido em meio básico completo (MBC), constituído de 1% de glicose, 0,1% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1% de KH_2PO_4 , 0,5% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05% de CaCl_2 , 0,1% de extrato de levedura, 0,1% de peptona e os micronutrientes ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 10mg, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 7mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 4mg, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 1mg/l). Para o cultivo em placas foram acrescidos de 1,5% de ágar. O pH do meio foi mantido a 5,5.

2.3 Produção de inoculante

Para a produção de inoculante, os isolados foram cultivados em substrato de arroz em casca enriquecido com 10% de farelo de trigo, 2% de cálcário, 2% de gesso e 1% de superfosfato simples. O arroz em casca foi pré-cozido por 30 minutos, separado da água de cozimento e acrescido dos demais ingredientes, colocados em frascos de vidro, fechados com tampão de algodão e autoclavados por dois ciclos de 1 hora com intervalo de 24h, a 121°C.

Após resfriamento em temperatura ambiente, cada frasco foi inoculado com micélio do fungo colonizado em meio BDA, para *Pleurotus sajor-caju*, e MBC, para *A. blazei*. Foram incubados em sala de colonização de inoculantes com temperatura de 20°C a 28°C, até a completa colonização do substrato.

2.4 Substrato para cultivo de *Pleurotus sajor-caju*

Para a produção dos cogumelos, foram usados 5 tratamentos com 15 repetições. O substrato base foi composto por feno de capim coast-cross [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.] e bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) em iguais proporções. Para a formulação dos demais tratamentos, foram utilizados, farelos de trigo sempre a 10% e uréia, em diferentes porcentagens sobre o volume final do substrato (Tabela 1).

A uréia foi solubilizada em água e misturada ao substrato. O material foi acondicionado em sacos de polipropileno (400g de substrato úmido/saco) e autoclavado a 121° C por 2 ciclos de 1 hora cada. A seguir, cada saco foi inoculado com, aproximadamente, 10 g de inoculante. Após a colonização, os

TABELA 1 Composição do substrato utilizado para o cultivo do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* com diferentes teores de nitrogênio.

Tratamento	Capim coast-cross (g)	Bagaço de cana (g)	Farelo de trigo (g)	Uréia (g)	N (%)
I	500	500	-	-	0,65
II	450	450	100	-	0,85
III	450	450	100	10	1,30
IV	450	450	100	20	1,75
V	450	450	100	30	2,20

sacos foram colocados em casa de frutificação, em delineamento experimental inteiramente casualizado, com 10 repetições. Para a indução da frutificação, os sacos foram furados com lâmina estéril, expondo-se o substrato colonizado ao ar para surgimento dos basidiocarpos (corpos de frutificação). Os basidiocarpos colhidos foram pesados e desidratados para as análises posteriores. A produtividade foi calculada tomando-se por base a massa da matéria fresca dos cogumelos em relação à massa do substrato úmido (Chang & Hayes, 1978; Dias et al., 2003). A eficiência biológica foi calculada considerando a massa de cogumelos frescos em relação à matéria seca do substrato utilizado (Chang & Hayes, 1978; Dias et al., 2003).

2.4.1 Análises químicas – *Pleurotus sajor-caju*

Para as análises químicas dos corpos de frutificação, foram utilizadas 3 repetições de cada tratamento. Os cogumelos foram pesados, desidratados a 55°C por 36 horas aproximadamente, sendo pesados novamente, moídos em mini-processador para a obtenção da granulometria necessária para cada tipo de análise, embalados em potes de polietileno, fechados e armazenados sob refrigeração, a $5 \pm 2^\circ\text{C}$.

Para os basidiocarpos foram determinados, segundo procedimentos adotados pelo Instituto Adolfo Lutz (1985), umidade em estufa a 105°C por 6 horas; extrato etéreo por gravimetria; cinza após incineração das amostras; e fibra bruta após digestão com ácido. A fração protéica foi determinada pelo método “Kjeldahl”, sendo a proteína bruta do cogumelo determinada a partir do teor de nitrogênio, utilizando-se o fator de conversão $N \times 4,38$ de acordo com Miles & Shu-Ting (1997).

2.4.2 Estatística

A avaliação estatística no cultivo dos cogumelos foi realizada por delineamento inteiramente casualizado (DIC). Os resultados foram submetidos à análise de variância e ao teste de média Scott-Knott, a 5% de probabilidade, com auxílio do Software Sisvar 4.3, desenvolvido no Departamento de Ciências Exatas da Universidade Federal de Lavras (Ferreira, 2000).

2.5 Composto de cultivo – *Agaricus blazei*

Os resíduos utilizados para o cultivo do isolado de *A. blazei* CS1 foram bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), capim coast-cross [*Cynodon dactylon* (L.)] e farelo de trigo, que foram pesados no momento de montagem das medas para chegar a 100 Kg de matéria seca por pilha, (Tabela 2). A suplementação foi feita na quarta revirada da pilha com 1 kg de superfosfato simples, 2 kg de calcário, 2 Kg de gesso agrícola e uréia, segundo a concentração desejada, sendo: pilha 1 sem adição de uréia (tratamento 1 com aproximadamente com 0,9% de nitrogênio inicial), pilha 2 com 1,5 Kg de uréia (tratamento 2 com 1,5% de nitrogênio inicial) e pilha 3 com 2,6 Kg de uréia (tratamento 3 com 2% de nitrogênio inicial). Antes da montagem das medas o capim coast-cross foi mergulhado em água para melhor umedecimento.

TABELA 2 Matéria-prima e quantidades (Kg) para montagem de cada tratamento.

Tratamentos N (%)	Bagaço de cana	Capim coast-cross	Farelo de trigo	Uréia (Kg)
0,9	45,5	41,8	9,0	-
1,5	43,5	51,0	9,0	1,5
2,0	46,0	43,8	9,0	2,6

As pilhas foram montadas em estrado de madeira de 1,0 x 1,0 x 1,0 m, com resíduos dispostos em camadas e adição de água em abundância. Foram montadas quatro medas por tratamento.

As pilhas foram reviradas, segunda, quarta e sexta-feira em dias alternados da semana, durante seis semanas, num total de 18 reviradas. A revirada consistia no desmanche da pilha e revolvimento de todo o material, de modo a deixá-lo o mais homogêneo possível, e novamente montagem da pilha no estrado.

2.5.1 Determinação do teor de nitrogênio total

O teor de nitrogênio total das matérias primas e do composto, depois da pasteurização à vapor, foi determinado por método de Kjeldahl (Silva & Queiroz, 2002), no Departamento de Zootecnia desta Universidade. Por digestão com ácido sulfúrico concentrado, o nitrogênio é transformado em amônio (NH_4^+), o qual é posteriormente separado por destilação formando amônia que no final desta etapa forma borato ácido de amônio que é então titulado com ácido clorídrico. As análises foram realizadas em triplicata.

2.5.2 Pasteurização a vapor

Após seis semanas de compostagem, o composto foi colocado no pasteurizador, sobre tablado de madeira, forrado com sombrite. O processo de pasteurização consistiu na emissão de vapor, na parte inferior do túnel, proveniente de canos galvanizados ligados a um tambor de 200 L de capacidade, com água, aquecido em fogão à lenha. O tempo de pasteurização foi de 48h de fluxo contínuo. A pasteurização foi dividida em duas etapas de 24h de vapor contínuo com uma revirada de cada composto (tratamento) no intervalo.

2.5.3 Inoculação e incubação

Após o resfriamento do composto pasteurizado, este foi acondicionado em sacolas plásticas (10 Kg/sacola). Inoculou-se 200 ml de *A. blazei* CS1, produzido em substrato de arroz com casca, para cada sacola. O fungo foi espalhado por todo o composto para melhor colonização.

A incubação foi feita na casa de colonização, onde as sacolas após serem semi-fechadas, foram dispostas em prateleiras. A temperatura ambiente variou de 8°C a mínima (durante a noite) nos meses de junho e julho e 26°C a máxima.

2.5.4 Indução e terra de cobertura

Após a completa colonização micelial do fungo, nas sacolas, 5 Kg do substrato colonizado foram transferidos para vasos de polietileno (capacidade de 20 L) os quais receberam 5 cm de terra de cobertura. A terra de cobertura utilizada foi o Latossolo vermelho distroférico (LVdf) de horizonte B, misturada a carvão vegetal triturado e peneirado, na proporção de 4:1(v:v). O pH do solo foi corrigido para 6,5 com adição de calcário calcítico. Os substratos, nos vasos foram umedecidos e dispostos na casa de colonização à temperatura ambiente.

2.5.5 Cultivo e colheita

Durante o cultivo a temperatura oscilou entre 14°C e 28°C. A umidade do ar foi mantida por umedecimento do piso, enquanto que, a terra de cobertura foi irrigada sempre que necessário. Os cogumelos foram colhidos quando atingiram tamanhos máximos, porém, com as suas laterais ainda paralelas. Em seguida foram limpos com esponja e lavados para retirar pedaços de carvão e terra, fatiados ao meio e colocados em estufa à 60°C para desidratação. Após desidratação, foram triturado em um mini processador, acondicionado em frascos

plástico, com tampa e armazenados sob refrigeração a $5 \pm 2^\circ\text{C}$ para análises posteriores.

2.6 Determinação da composição centesimal –*A. blazei*

Na determinação da composição centesimal, de corpos de frutificação de *A. blazei* CS1 foram utilizadas seis repetições para todas as análises centesimais.

2.6.1 Umidade

A umidade foi determinada por gravimetria, em estufa regulada de 103 a 105°C até peso constante por 2 repetições consecutivas de acordo com Instituto Adolfo Lutz (1985).

2.6.2 Extrato etéreo

Para a determinação de extrato etéreo, utilizou-se o método de “Soxhlet”, um método de extração contínua em aparelho tipo “Soxhlet”, utilizando-se como solvente o éter etílico em extração a quente. O processo é gravimétrico e se baseia na perda de peso do material submetido à extração em éter etílico (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

2.6.3 Proteína bruta

A determinação de proteína foi pelo método de “Kjeldahl”, que é um dos métodos mais utilizados na determinação de proteína. Este método consiste de três etapas; a digestão, destilação e titulação. Na digestão, o nitrogênio é capturado na forma de sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) pela ação de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). Na destilação o nitrogênio é transformado em hidróxido de amônio (NH_4OH) pela ação do hidróxido de sódio (NaOH) em reações subseqüentes o nitrogênio é transformado a borato ácido de amônio

(NH₄ H₂BO₃) e finalmente na titulação o borato ácido de amônio é titulado com ácido clorídrico gerando cloreto de amônio (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

Para a determinação do teor de proteína foi utilizado o fator de conversão N x 4,38 em vez de 6,25.

2.6.4 Fibra bruta

A fibra bruta corresponde ao resíduo da digestão ácida de um alimento, sendo os componentes da parede celular que não são digeridos pelo organismo humano. A determinação da fibra bruta trata-se da determinação de celulose e lignina insolúveis em ácido. O método é gravimétrico e baseia-se na diferença de peso de um cadinho de fundo poroso (filtro) antes e após receber a amostra digerida em meio ácido (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

2.6.5 Açúcares totais, glicose e sacarose

A determinação dos açúcares totais foi de acordo com a metodologia de Somogyi modificado por Nelson (1944).

2.6.6 Determinação de aminoácidos

Para a quantificação dos aminoácidos lisina, histidina, arginina, ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutâmico, prolina, glicina, alanina, cistina, valina, metionina, isoleucina, leucina, tirosina e fenilalanina, as amostras, previamente delipidadas foram analisadas no Centro de Química de Proteínas – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP- SP, segundo metodologia de Moore, Spackman & Stein, 1958. As amostras sofreram hidrólise ácida e foram preparadas para aplicação no aparelho Nicolas V (construído no Centro de Química de Proteínas), o qual consiste em duas colunas de troca iônica, sendo uma para separação de aminoácidos ácidos e neutros e outra para separação de

aminoácidos básicos e triptofano. A resina usada foi PC 6A Aminoacid Analysis Resin Pierce. Foram analisadas seis repetições por amostra.

2.6.7 Estatística

Para as análises de composição centesimal, açúcares e aminoácidos os resultados foram submetidos à análise de teste de média de Tukey, a 5% de probabilidade, com auxílio de Software Sisvar 4.3 (Ferreira, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Colonização do substrato – *Pleurotus sajor-caju*

O cogumelo *P. sajor-caju* foi cultivado em substrato à base de capim coast-cross, bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo, enriquecido com uréia para a suplementação de nitrogênio. Dos cinco tratamentos testados, não ocorreu colonização nos substratos IV e V pelo *P. sajor-caju*. Esses resultados mostraram que o teor de nitrogênio a partir de 1,75% inibe completamente o crescimento micelial, sendo que o crescimento micelial só foi possível nas concentrações de 0,65; 0,85; e 1,30% de nitrogênio. Segundo Leley & Janben (1993), o conteúdo nutricional dos substratos pôde ser melhorado pela suplementação com nitrogênio. Zadrazil & Brunnert (1979) ressaltaram que a suplementação com nitrogênio pode aumentar o rendimento da produtividade, mas até certo nível, pois valores elevados de nitrogênio podem inibir a frutificação dos cogumelos *Pleurotus sajor-caju*. De acordo com Motos (1989), há inibição do crescimento de *Pleurotus ostreatus*, quando cultivado em bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado sem adição de nitrogênio ou quando a adição das diferentes fontes de nitrogênio resulta em teores iguais ou superiores a 1,5% de nitrogênio, com base na matéria seca. Neste estudo, constatou-se a colonização em substrato com até 1,3% de nitrogênio, enquanto que a partir de 1,75% não houve colonização dos substratos. No entanto, não foi testada uma concentração intermediária entre 1,3 e 1,75%, por isso, é possível também que, para o *Pleurotus sajor-caju*, a concentração limite esteja em torno de 1,5% de nitrogênio.

3.1.2 Produtividade e eficiência biológica

Considerando que não houve colonização nos substratos IV e V, são apresentados na Tabela 3 os resultados de produção apenas dos tratamentos I, II e III. A maior produtividade foi de 143,8 g.kg⁻¹, obtida com o tratamento II, o qual apresentava 0,85% de nitrogênio, no entanto, as diferenças observadas entre os tratamentos não foram significativas. Estes resultados mostram que a concentração de nitrogênio no substrato não afetou a produção do cogumelo *P. sajor-caju*, no substrato utilizado. A suplementação com compostos nitrogenados é apontada como um fator positivo para a produção dos cogumelos do gênero *Pleurotus* (Bisaria et al., 1996), no entanto, no presente trabalho, como o substrato utilizado à base de bagaço de cana e capim “coast-cross”, o enriquecimento com uréia não proporcionou maior produtividade do *Pleurotus sajor-caju*.

TABELA 3 Produtividade (g de cogumelos frescos.kg⁻¹ de substrato úmido) e eficiência biológica (g de cogumelos frescos. kg⁻¹ de substrato seco, multiplicado por 100) de cogumelos *Pleurotus sajor-caju* nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Produtividade (g. kg ⁻¹)	Eficiência Biológica (%)
I	140,3 a	35,1 a
II	143,8 a	35,9 a
III	135,9 a	34,0 a

As médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

3.1.3 Qualidade nutricional dos basidiocarpos

Apesar de não se observar um efeito de concentração de nitrogênio sobre a produtividade do cogumelo, verificou-se um efeito significativo do teor de nitrogênio sobre a composição química dos basidiocarpos produzidos, sendo que o maior teor de proteína foi encontrado nos corpos de frutificação do tratamento III, com 28,0% (Tabela 4). A correção de proteína utilizada foi de N x 4,38, em vez de N x 6,25. Segundo Miles & Shu-Thing (1997), esse fator de correção para o cálculo de proteína é dado em consequência do nitrogênio não protéico contido na parede celular dos fungos, o qual é digerido e detectado no método de determinação do conteúdo de nitrogênio protéico (método Kjeldhal). O fator de conversão 4,38 é o valor empregado em diversos trabalhos para fazer a conversão do valor de nitrogênio para proteína bruta (Silva et al., 2002; Sturion & Oetterer, 1995; Del Toro et al., 2006), os quais encontraram teores de proteína bastante variáveis em função do tipo de substrato utilizado.

Zang & Fadel (2002), citaram que os teores de proteína dos basidiocarpos de *Pleurotus* spp podem variar de 26,3 – 36,7%, porém Ragunathan & Swaminathan (2003), relataram que estes valores podem ser maiores variando entre 25,6 – 44,3%.

TABELA 4 Composição química de *Pleurotus sajor-caju* em diferentes tratamentos.

Tratamentos	Lipídeos (%)	Cinzas (%)	Fibra bruta (%)	Proteína (%)
I	2,50 a	4,53 c	3,84 b	17,1 c
II	2,03 b	5,64 b	3,84 b	20,4 b
III	1,91 b	6,40 a	4,70 a	28,0 a

As médias seguidas da mesma letra nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Scott-knott ao nível de 5% de probabilidade

Portanto, o tipo de substrato usado para o cultivo de *Pleurotus sajor-caju*, influencia na composição nutricional dos corpos de frutificação, ou seja, o teor de proteína bruta dos corpos de frutificação parece estar relacionado com o teor de nitrogênio no substrato inicial bruto, combinado ou suplementado com farelos e/ou adubos agrícolas (Lelley & Janben, 1993; Sturion & Oetterer, 1995). Alguns aspectos podem ser apontados como fatores que influenciam a composição nutricional dos cogumelos do gênero *Pleurotus*, tais como; tipos de cepas, composição do substrato e estágio de desenvolvimento do corpo de frutificação (Colauto et al., 1998). Neste trabalho, pode-se observar também que, com o aumento do teor de proteína nos basidiocarpos, ocorreu à diminuição do teor de lipídeos (Tabela 4). Os teores de lipídeos podem variar entre 2 a 8% da matéria seca do corpo de frutificação variando com a espécie cultivada e o substrato utilizado (Sturion & Oetterer, 1995), porém, no presente trabalho, os cogumelos com 28% de proteína apresentaram 1,91% de lipídeos. Os teores de fibra bruta nos cogumelos secos foram iguais entre os tratamentos I e II (3,84%), entretanto o tratamento III apresentou 4,70% de fibra bruta, enquanto que os teores de cinza variaram de 4,53 a 6,40% (Tabela 4), aumentando em função da maior concentração de nitrogênio no substrato de cultivo. Portanto, ao contrário do que ocorreu com o teor de lipídeos, os valores de fibra bruta e cinzas foram maiores nos basidiocarpos mais ricos em proteína, os quais foram produzidos nos substratos com concentração maior de nitrogênio. Os valores para fibra bruta e cinzas estabelecidos neste trabalho, estão abaixo daqueles relatados em alguns trabalhos citados na literatura, segundo os quais os cogumelos podem apresentar teores de fibra bruta variando de 3 a 32% e cinzas em torno de 10,1% (Bonatti et al., 2004; Miles & Shu-Thing, 1997; Sturion & Oetterer, 1995).

De um modo geral, os trabalhos sobre a composição química dos cogumelos do gênero *Pleurotus* mostraram que esses valores podem variar em função dos substratos e das espécies de *Pleurotus* cultivadas. Assim, neste

trabalho, foi possível observar que ocorreram mudanças significativas na composição química e na qualidade biológica dos cogumelos quando suplementados com diferentes teores de nitrogênio.

3.2 Produtividade e eficiência biológica – *Agaricus blazei*

Os resultados apresentados na Tabela 5 mostram a produção [(gramas de cogumelos frescos/grama de substrato úmido) x 100] e eficiência biológica [(gramas de cogumelos frescos /grama de substrato seco) x 100], nos tratamentos com diferentes concentrações de nitrogênio. A maior produtividade foi de 8,5 % no tratamento com 1,5% de N, nos tratamentos com 0,9 e 2,0% de N as diferenças não foram significativas. Esses resultados mostram que a concentração de 1,5% de nitrogênio no substrato apresentou maior produtividade. Portanto, verificou-se que, ao contrário do que foi observado para o *P. sajor-caju*, a concentração de nitrogênio do substrato de cultivo, afetou a produtividade de cogumelos para o *A. blazei*.

TABELA 5 Produtividade e eficiência biológica dos cogumelos *A. blazei*.

Tratamentos N(%)	Produtividade(%)	Eficiência biológica (%)
0,9	6,4c	21,2c
1,5	8,5b	28,4b
2,0	6,1c	20,3c

As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

3.2.1 Determinação do teor de nitrogênio total

Os teores estimados de nitrogênio total das matérias-primas (inicial) antes da pasteurização foram 0,9% (tratamento 1), 1,5% (tratamento 2) e 2,0% (tratamento 3). Após a pasteurização os teores de nitrogênio total atingiram os valores de 2,16%; 2,84% e 2,80%, para os tratamentos 1, 2 e 3 respectivamente, apresentando pequena diferença entre os tratamentos.

3.2.2 Determinação da composição química

Na Tabela 6 estão os valores médios da composição química (teor de umidade, matéria seca, proteína, gordura, cinza, fibra bruta, açúcares totais, glicose e sacarose) dos corpos de frutificação de *A. blazei*.

O composto com 2% de nitrogênio inicial apresentou o maior teor de proteína nos cogumelos desidratados, sendo que os dois outros tratamentos não apresentaram diferença significativa. Entretanto, a diferença do teor de proteína entre os tratamentos foi menor do que aquela observada para o cogumelo *P. sajor-caju* (Tabela 4 e 6). A principal explicação para isso é que, para o *P. sajor-caju* trabalhou-se com substrato axênico, nos quais a concentração inicial de nitrogênio foi basicamente a mesma concentração do substrato ao final do processo, ao passo que, para o *A. blazei*, a concentração final do substrato foi bastante diferente da concentração inicial. Considerando que o substrato passou por um processo de compostagem, houve perda de matéria seca do composto por volatilização na forma de CO₂ e NH₃, porém, como a perda por CO₂ é maior, há uma tendência de aumento da concentração de nitrogênio no composto. Assim sendo, a análise de nitrogênio total mostrou que o composto com concentração inicial de 0,9% de nitrogênio apresentou uma concentração final de 2,16%; o composto com 1,5% de N inicial ficou com 2,84% ao final do processo, enquanto que o composto com 2% de N inicial ficou com 2,80%. Por esses resultados, era esperado que os substratos com 1,5% e 2% apresentassem cogumelos com o

mesmo teor de proteína. Porém, como a diferença foi muito pequena (menor de 1%), pode-se inferir que a concentração inicial de nitrogênio no substrato de cultivo não apresenta efeito expressivo sobre a concentração de proteína do cogumelo *A. blazei*, pelo fato de que, ao final do processo de compostagem os substratos de cultivo apresentarão concentração final de nitrogênio semelhantes.

TABELA 6 Valores médios em porcentagem da composição química de corpos de frutificação de *A. blazei* Murril cultivados em diferentes teores de nitrogênio.

Análises Determinadas	Tratamentos (% de N)		
	0,9	1,5	2,0
Umidade	10,043 a	9,926 a	8,523 a
Matéria seca	89,956 a	90,076 a	91,476 a
Proteína	28,333 b	28,493 a	29,353 a
Gordura	1,655 a	2,055 a	2,140 a
Cinzas	6,711 a	6,971 a	6,788 a
Fibras brutas	5,766 a	6,345 a	6,166 a
Açúcares totais	0,8323 c	1,0609 b	1,6810 a
Glicose	0,5718 c	0,6717 b	0,6914 a
Sacarose	0,2476 c	0,3698 b	0,9402 a

Valores em porcentagem. As médias seguidas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

De acordo com Bellini et al. (2003), basidiocarpos de *Agaricus blazei* Murril, desidratados, são ricos em proteína (40 - 45%), carboidratos (3 - 4%), fibras brutas (6 - 8%) e lipídeos (3 - 4%).

Shibata & Demiate (2003), encontraram 39,8% de proteína (N x 6,25), 9,65% de fibra, 7,75% de cinzas, 0,89% de lipídeos e 41,91% de carboidratos em *Agaricus blazei* Murril em base seca, cultivado em composto com: bagaço de cana (34%), feno (22%), esterco de estrebaria (25%), farelo de soja (10%), calcário (4,0%), sulfato de amônio (1,25%), uréia (0,75%), fosfato super simples (1%) e gesso (2,0%).

A composição centesimal das análises dos corpos de frutificação de *A. blazei* Murril revelou concentração de proteína 30,13% (N x 6,25), fibra bruta 14,57%, lipídeos 1,48%, umidade 9,67% e resíduo mineral 9,37% (Oliveira et al., 1999). A composição química do *A. blazei* encontrada neste estudo difere dos valores encontrados na literatura, uma vez que alguns autores multiplicam o teor de N-Kjeldahl pelo fator 6,25 em vez de 4,38. A correção da concentração de proteína, N x 4,38 em vez de N x 6,25 é consequência do nitrogênio não protéico contido nas paredes celulares dos fungos, o qual é detectado na determinação de nitrogênio protéico pelo método de Kjeldhal (Miles & Chang, 1997). Segundo Eira & Minhoni (1997), a composição química de corpos de frutificação de cogumelo varia de acordo com a espécie e a linhagem avaliada. Para Sturion & Oetterer (1995), o valor nutricional dos fungos pode ser geralmente afetado pelo substrato de cultivo. Crisan & Sands (1978) relataram que a composição química dos cogumelos pode variar de acordo com a espécie utilizada, o método de cultivo empregado e a composição do substrato em que esses são cultivados.

Os teores de fibra bruta (Tabela 6), nos cogumelos desidratados, foram iguais nos três tratamentos, enquanto que os teores de açúcares totais variaram de 0,8323 a 1,6810%. Os teores de glicose variaram de 0,5718 a 0,6914 e os teores de sacarose variaram de 0,2476 a 0,9402 (Tabela 6). Portanto, ao contrário do

que ocorreu com os teores de umidade, matéria seca, proteína, gordura e resíduo mineral, os valores de açúcares totais, glicose e sacarose, nos corpos de frutificação, foram maiores com maior concentração de nitrogênio no substrato de cultivo.

3.2.3 Determinação de aminoácidos

Neste trabalho, além da determinação do teor de proteínas, foi importante avaliar o teor de aminoácidos uma vez que qualidade protéica também é importante. Os resultados referentes à determinação de aminoácidos em *Agaricus blazei* cultivados em diferentes teores de nitrogênio, estão apresentados na Tabela 7.

Os cogumelos comestíveis são fontes importantes de proteínas e são agradáveis como alimentos, no entanto não há na literatura relatos quantitativos da composição de aminoácidos essenciais (La Guardia et al., 2005).

Pelos resultados mostrados na Tabela 7 o maior valor de aminoácido foi de 0,1848 micromols/mg para alanina com 2% de nitrogênio no substrato de cultivo e 0,0089 micromols/mg, o menor valor, para ½ cistina com 1% de nitrogênio no substrato de cultivo. Para alguns aminoácidos há diferença significativa em função do teor de nitrogênio inicial do composto e mesmo para os que não apresentaram diferença significativa há uma tendência de maior teor de aminoácido para maior o teor de nitrogênio inicial do substrato de cultivo.

TABELA 7 Valores médios de aminoácidos em micromols/mg de peso seco de *A. blazei* Murril cultivados em diferentes teores de nitrogênio.

Aminoácidos determinados	Tratamentos (% de N)		
	0,9	1,5	2,0
Lisina	0,0954 b	0,1011 b	0,1107 a
Histidina	0,0300 a	0,0331 a	0,0342 a
Arginina	0,0614 a	0,0640 a	0,0741 a
Acido aspártico	0,1412 b	0,1554 a	0,1675 a
Prolina	0,0940 b	0,1254 a	0,1261 a
Glicina	0,1280 b	0,1449 b	0,1609 a
Alanina	0,1570 b	0,1775 a	0,1848 a
½ Cistina	0,0098 a	0,0103 a	0,0111 a
Valina	0,0838 a	0,0949 a	0,1038 a
Metionina	0,0130 a	0,0246 a	0,0188 a
Isoleucina	0,0610 b	0,0772 a	0,0838 a
Leucina	0,0955 b	0,1155 a	0,1274 a
Tirosina	0,0357 a	0,0381 a	0,0431 a
Fenilalanina	0,1150 a	0,1222 a	0,0879 a

Médias seguidas da mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Não se observou diferença estatística para os aminoácidos histidina, arginina, ½ cistina, valina, metionina, tirosina e fenilalanina (Tabela 7), analisados nos corpos de frutificação cultivados em diferentes teores de nitrogênio. Entretanto, para lisina, ácido aspártico, prolina, glicina, alanina, isoleucina e leucina houve diferença significativa entre os cultivos com diferentes teores de nitrogênio, sendo os maiores valores de aminoácidos encontrados no cogumelo cultivado em 2% de nitrogênio. O aminoácido glicina foi o mais abundante, depois da alanina e os aminoácidos cistina e metionina os de menores valores.

Os resultados apresentados de lisina, metionina, histidina, isoleucina, leucina, valina são valores baixos, quando comparados com os demais aminoácidos da Tabela 7. Estes aminoácidos são considerados aminoácidos essenciais (Díez & Álvares, 2001; Mdachi et al., 2004).

4 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos quanto à composição química de *P. sajor-caju* e *A. blazei* Murril cultivados em diferentes teores de nitrogênio, conclui-se que:

- O teor de nitrogênio não afetou a produtividade do cogumelo *P. sajor-caju* utilizando-se o substrato à base de bagaço de cana-de-açúcar e capim coast-cross.

- O substrato com teor de nitrogênio de 1,30% de N apresentou uma produção de cogumelos *P. sajor-caju* mais rico em proteína, cinzas e fibra bruta, e mais pobres em lipídeos. Substratos com 1,70 e 2,20% de N não permitiram a colonização do cogumelo *P. sajor-caju*.

- O substrato de cultivo, com o teor inicial de nitrogênio de 2% apresentou uma produção de cogumelos *Agaricus blazei* (CS1) mais ricos em proteínas, açúcares totais, glicose e sacarose.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELLINI, M. F.; GIACOMINI, N. L.; EIRA, A. F.; RIBEIRO, L. R.; MANTOVANI, M. S. Anticlastogenic effect of aqueous extract of *Agaricus blazei* on CHO- k1 cells, studying different developmental phases of the mushroom. **Toxicology in vitro**, v. 17, n. 4, p. 465-469, Aug. 2003.

BISARIA, R.; MADAN, M.; VASUDEVAN, P. Utilization of agro residues as animal feed through bioconversion. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 59, n. 1, p. 5-8, Jan. 1996.

BONATTI, M.; KARNOPP, P.; SOARES, H. M.; FURLAN, S. A. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in diferent lignocellulosic wastes. **Food Chemistry**, Oxford, v. 88, n. 3, p. 425-428, Dec. 2004.

CHANG, S. T.; HAYES, W. A. **The biology and cultivation of edible musrooms**. New York: Academic, 1978. 819 p.

COLAUTO, N. B.; EIRA, A. F.; MINHONI, M. T. A. Fatores físicos que afetam a produtividade do cogumelo comestível *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer. **Científica**, São Paulo, v. 26, n. 1/2, p. 25-43, 1998.

CRISAN, S. T.; SANDS, A. Nutritional value. In: CHANG, S. T.; HAYES, W. A. (Ed.). **The biology and cultivation of mushrooms**. New York: Academic, 1978. 137 p.

DEL TORO, G. V.; VEJA, R. C.; GARIN-AGUILKAR, M. E.; LARA, H. L. Biological quality of proteins from three strains of *Pleurotus* spp. **Food Chemistry**, Oxford, v. 94, n. 4, p. 494-497, Mar. 2006.

DIAS, S. E.; KOSHIKUMO, E.M. S.; SCHWAN, R. F.; SILVA, R. Cultivo do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* em diferentes resíduos agrícolas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 6, p. 1363-1369, 2003.

DÍEZ, V. A.; ALVARES, A. Compositional and nutritional studies on two wild edible mushrooms from northwest Spain. **Food Chemistry**, Oxford, v. 75, n. 4, p. 417-422, May 2001.

EIRA, A. F. **Cultivo do cogumelo medicinal *Agaricus blazei* (Murril) ss Heinemann ou *Agaricus brasiliensis* (Wasser et al.)**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2003, 398 p.

EIRA, A. F.; MINHONI, M. T. A. **Manual teórico-prático do cultivo de cogumelos comestíveis: modulo de cogumelos**. 2. ed. Botucatu:Unesp-FEPAF, 1997. 115 p.

FERREIRA, D. F. **Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados – SISVAR** : programa de análises estatísticas e planejamento de experimentos, versão 4.3. Lavras: UFLA / DEX, 2000.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas, métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1985, v. 1, 533 p.

LA-GUARDIA, M.; VENTURELLA, G.; VENTURELLA, F. On the chemical composition and nutritional value of *Pleurotus* taxa growing on Umbelliferous plants (Apiaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n.15, p. 5997-6002, July 2005.

LELLEY, J. I.; JANBEN, A. Productivity improvement of oyster mushrooms substrate with a controlled release of nutrient. **Mushroom News**, Kennett Square, v. 41, n. 2, p. 6 -13, 1993.

MDACHI, S. J. M.; NKUNYA, M. H. H.; NYIGO, V. A.; URASA, I. T. Amino acid composition of some Tanzanian wild mushrooms. **Food Chemistry**, Oxford, v. 86, n. 2, p. 179-182, June 2004.

MILES, P. G.; CHANG, S. T. **Mushroom biology**: concise basics and current developments. Hong Kong: World Scientific, 1997. p. 161-175.

MILES, P. G.; SHU-THING, C.H. **Biología de las setas**: fundamentos básicos y acontecimientos actuales. Hong Kong: World Scientific, 1997. 133 p.

MOTOS, J.R. **Avaliação de substratos a base de cana-de-açúcar para o crescimento do cogumelo *Pleurotus ostreatus***. 1989. 53 p. Monografia (Graduação em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

NELSON, N. A Photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. **The Journal of Biological Chemistry, USA**, v. 153, n. 2, p. 375-380, Feb. 1944.

OLIVEIRA, E. C. M.; OLIVEIRA, E. R.; LIMA, L.C.O.; VILAS-BOAS, E. V. B. Composição centesimal do Cogumelo de sol (*Agaricus blazei*). **Revista Universitária Alfnas**, Alfnas, v. 5, p. 169-172, nov. 1999.

RAGUNATHAN, R.; SWAMINATHAN, K. Nutritional status of *Pleurotus* spp. grown on various agro-wastes. **Food Chemistry, Oxford**, v. 80, n. 3, p. 371-375, Mar. 2003.

SHIBATA, C. K. R.; DEMIATE, I. M. Cultivo e análise da composição química do cogumelo do sol (*Agaricus blazei Murril*). **Ciência Biologia e Saúde**, Ponta Grossa, v. 9, n. 2 p. 21-32, jun. 2003.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2002. 235 p.

SILVA, S. O.; COSTA, S. M. G.; CLEMENTE, E. Chemical composition of *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel., substrates and residue after cultivation. **Brazilian Archives of Biology and Technology, Curitiba**, v. 45, n. 4, p. 531-535, Oct./Dec. 2002.

STURION, G. L.; OETTERER, M. Composição química de cogumelos comestíveis (*Pleurotus* spp) originados de cultivos em diferentes substratos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas**, v. 15, n. 2, p. 189-193, maio/ago. 1995.

ZADRAZIL, F.; BRUNNERT, H. Influence of ammonium nitrate on the grown and decomposition of higher fungi. **Zeitschrift fur Pflanzenernaehr Bondenkd**, Deerfiel Beach, v. 142, n. 3, p. 446-455, 1979.

ZHANG, R. H.; LI, X.; FADEL, J. G. Oyster mushroom cultivation with rice and wheat straw. **Bioresource Technology, Oxford**, v. 82, n. 3, p. 277-284, May 2002.

CAPÍTULO 3

DETERMINAÇÃO DE LIGNINASES EM ISOLADOS DE *Agaricus blazei* MURRIL CULTIVADOS EM MEIO LÍQUIDO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO

RESUMO

SILVA, Evânia Geralda da. Determinação de ligninases em diferentes isolados de *Agaricus blazei* Murril cultivados em diferentes concentrações de nitrogênio. In: _____. **Caracterização química e enzimática de cogumelos medicinais**. 2007. p. 64-90. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Os fungos secretam enzimas ligninolíticas, celulolíticas e hemicelulolítica para degradar os resíduos lignocelulósicos para a obtenção de nutrientes necessários durante seu ciclo de produção. Os basidiomicetos são grupos de fungos especializados na degradação da lignina. Esta característica torna estes organismos importantes para o ecossistema por causa da habilidade em degradar os substratos de resíduos da produção agrícola. A lignina, sendo uma macromolécula, requer para a sua quebra, a ação de enzimas ligninases que inclui lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase. Alguns fungos produzem três ligninases, outros produzem somente uma ou duas delas. Este trabalho teve como objetivo determinar a produção de lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase em cultivo em meio líquido com diferentes concentrações de nitrogênio, acrescido ao meio de cultura na forma de extrato de levedura e sulfato de amônio, de isolados de *A. blazei*, CS1, CS2, CS5 e CS7. O cultivo estendeu-se por trinta dias sob agitação e em intervalos de 5 dias, foram retiradas alíquotas para as determinações enzimáticas. Ao final dos 30 dias de cultivo a massa micelial foi recolhida para a avaliação do crescimento. As maiores atividades enzimáticas detectadas estiveram relacionadas a lacase. Dentre os isolados destacou-se o isolado CS7 com maior atividade de lacase ($0,287 \text{ U.mL}^{-1}$), CS2 para a maior atividade de manganês-peroxidase ($0,022 \text{ U.mL}^{-1}$) e CS5 para maior atividade de lignina-peroxidase ($0,008 \text{ U. mL}^{-1}$). Assim, de modo geral, diferentes concentrações de nitrogênio no meio de cultivo interferem na atividade enzimática.

Comitê orientador: Dr. Eustáquio Souza Dias – UFLA (Orientador), Dra. Rosane Freitas Schwan – UFLA

ABSTRACT

SILVA, Evânia Geralda da. Determination of ligninases in different *Agaricus blazei* Murril isolating cultivated in different concentrations of nitrogen. In: _____. **Chemical and enzymatic characterization of medicinal mushrooms**. 2007. p. 64-90. Thesis (Doctorate in Food Science) – Federal University of Lavras, Lavras.

The fungi secrete lignolytic, cellulolytic and hemicellulosic enzymes to degrade the lignocellulosic residues in order to obtain the necessary nutrients during the production cycle. Basidiomycetes are fungi specialized in degradation of lignin. This characteristic makes these organisms important for the ecosystem due to the ability of degrading residues of the agricultural production. The lignin, being a macromolecule, requires to its break, the action of the ligninase enzymes, which includes laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase. Some fungi produce three ligninases, others produce just one or two of them. The objective of this work was to determine the production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase in liquid culture medium with different concentrations of nitrogen, added to the culture medium like yeast extract and ammonium sulphate of *A.blazei*, CS1, CS2, CS5 and CS7 isolates. The cultivation was extended for thirty days under agitation and in intervals of five days, samples were removed for enzymatic determinations. At the end of the thirty days of cultivation, the mycelial mass was collected in order to evaluate its growth. The biggest detected enzymatic activities were related to laccase. Among the isolates, CS7 highlighted with a higher laccase activity ($0,287\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$), CS2 for the biggest manganese peroxidase activity ($0,022\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) and CS5 for the biggest lignin peroxidase activity ($0,008\text{ mL}^{-1}$). Therefore, in general, different concentrations of nitrogen in the culture medium interfere in the enzymatic activity.

Advisory committee: Professor Dr. Eustáquio Souza Dias – UFLA (Advisor),
Dra. Rosane Freitas Schwan – UFLA.

1 INTRODUÇÃO

O *Agaricus blazei* é um basidiomiceto que se desenvolve em material rico em celulose e lignina os quais são pobres em açúcares solúveis. Assim o fungo depende da produção de enzimas para a degradação dessas moléculas para a sua nutrição. Esse tipo de estudo pode ser importante na seleção de linhagens mais eficientes e com maior potencial de melhoramento genético. Além disso, o conhecimento do arsenal enzimático é importante para buscar novas estratégias em termos de formulação do composto de cultivo.

Uma colonização eficiente do substrato, com utilização dos resíduos lignocelulósicos depende da secreção de um complexo de enzimas denominadas ligninases. A produção dessas enzimas é importante na produção dos corpos de frutificação (Mata et al., 2005).

A degradação do polímero de lignina por basidiomicetos envolve diversas enzimas, como lignina-peroxidase, manganês-dependente peroxidase e lacase. A produção dessas enzimas pelo micélio fúngico é atividade importante durante o processo de colonização e parâmetro determinante no rendimento em cogumelos (Buswell et al., 1995).

A expressão e a atividade enzimática variam de acordo com a espécie de fungo utilizada e a disponibilidade de material no substrato de cultivo, além das condições físicas de crescimento (Valázquez-Cedeño et al., 2002).

Este trabalho teve como objetivo determinar a atividade de ligninases em quatro isolados de *A. blazei*, cultivados em meio líquido, com diferentes teores de nitrogênio, disponíveis em duas fontes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismos

Foram utilizados quatro isolados de *Agaricus blazei* (CS1, CS2, CS5 e CS7), pertencentes à coleção do Laboratório de Cogumelos Comestíveis e Medicinais do Departamento de Biologia da UFLA, os quais foram obtidos de produtores e inoculantes de diferentes fontes comerciais.

2.2 Meio de Cultivo e manutenção

Para a manutenção das culturas e crescimento fúngico, os isolados foram cultivados em um meio de cultura denominado Meio Básico Completo (MBC), com a seguinte composição em g/L: glicose 10,0; extrato de levedura 1,0; peptona 1,0; KH_2PO_4 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 ; CaCl_2 0,5 e os micronutrientes $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,01; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,007; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,004; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,001. Para o cultivo em placas de petri foram acrescidos 1,5% de ágar e o pH mantido a 5,5. Os isolados foram incubados a 25°C em BOD.

2.3 Curva de crescimento

Com o objetivo de determinar-se a massa micelial inoculada de *A. blazei*, em meio líquido, determinou-se a curva de crescimento. Retirou-se um disco de micélio (6 mm de diâmetro), da margem de uma cultura em placa de petri, com dezoito dias de crescimento, e inoculou-se em tubos de cultura contendo 10mL de meio MBC. Os tubos de cultura foram incubados a 25°C por um período de 40 dias. Em intervalos de 5 dias o micélio foi filtrado em papel de filtro previamente seco e pesado, colocado em estufa a 60°C, e pesado com intervalos de 24 horas até atingir peso constante. Para cada intervalo de 5 dias foram realizadas três repetições (Fig 1A - Anexo).

2.4 Meios de cultivo para produção enzimática

2.4.1 Diferentes concentrações de extrato de levedura

Para a produção enzimática foi utilizado meio líquido MBC, (composição descrita no item 2.2) com variação da concentração do extrato de levedura em 0,05%, 0,1%, 1%, 2% e 4%. Extrato de levedura apresenta 8,9% de nitrogênio total (dado do fabricante- Micromed- Isofar Indústria e Comércio de Produtos Químicos), fornecendo assim: 0,0445g, 0,089g, 0,89g, 1,78g e 3,56g de N total.L⁻¹. As demais fontes de nitrogênio tradicionalmente utilizadas no meio como peptona e sulfato de amônio foram suspensas. O frasco controle apresentou 0,1% de extrato de levedura, sendo essa concentração utilizada no meio original. Cinco discos de micélio da cultura de *A. blazei* com idade de 18 dias foram inoculados em frascos contendo 200mL de meio líquido MBC, pH 5,5. Para maior uniformidade fisiológica do experimento, um mesmo conjunto de placas foi utilizado para todos os tratamentos e repetições, sendo que para cada frasco inoculado, foram utilizados discos de placas diferentes e sempre da margem da colônia. Um disco de ágar equivale a 8,5 mg de micélio/disco de ágar, (curva de crescimento- Fig 1A - anexo). Os frascos ficaram sob agitação a 150 rpm por 30 dias a 25°C. Nos intervalos de 5, 10, 15 , 20 e 30 dias de crescimento foram retirados 3 mL do meio de cultivo, os quais foram considerados como fonte enzimática. As amostras foram filtradas e congeladas para posterior análise das atividades enzimáticas.

2.4.2 Diferentes concentrações de uréia (CO(NH₂)₂)

Os quatros isolados de *A. blazei*, também foram cultivados em meio líquido MBC, com diferentes concentrações de uréia, 0,5% , 1,0% e 1,5%, fornecendo 3,75g; 7,76g e 11,65g de nitrogênio/L, respectivamente. Essas concentrações foram referenciadas em trabalhos anteriores, ainda não publicados. Como não houve crescimento, as concentrações de uréia foram substituídas para

0,1; 0,2 e 0,3%, como também não houve crescimento micelial, a fonte de nitrogênio foi substituída por sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄).

2.4.3 Diferentes concentrações de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄)

Conforme o procedimento descrito no item 2.4.2. a fonte de nitrogênio foi substituída por sulfato de amônio nos teores de 0,1; 0,2; 0,3 e 0,5 %, fornecendo 0,212g, 0,424g, 0,636g e 1,06g de nitrogênio/L de meio MBC; as demais fontes de nitrogênio foram suspensas. O frasco controle foi 0,1% de extrato de levedura. As alíquotas foram coletadas nos mesmos intervalos de dias, filtradas e congeladas, para posterior determinação enzimática.

2.5 Avaliação do crescimento

Após 30 dias de crescimento o micélio foi recolhido em papel de filtro previamente seco e pesado, colocado em estufa com circulação forçada a 60°C por 24h até peso constante.

2.6 Determinação da atividade enzimática

As atividades enzimáticas da lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase foram determinadas nos quatro isolados de *A. blazei* (CS1, CS2, CS5 e CS7), cultivados em diferentes concentrações de extrato de levedura e sulfato de amônio. As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia - UFLA.

2.6.1 Atividade de Lacase (benzenodiol : oxigênio oxiredutase, EC 1.10.3.2)

A atividade de lacase foi determinada por método espectrofotométrico indireto utilizando-se 2,2'-azino-bis-etilbentiazoline (ABST) em mistura de reação de 1 mL contendo, 0,3 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0); 0,1 mL de ABST 1mM (em água) e 0,6 mL da fonte enzimática. A oxidação do

ABST foi medida pelo aumento da absorbância a 420nm a 30°C (Buswell et al., 1995), contra tubo branco contendo todos os reagentes e substituindo a fonte enzimática pelo meio de cultivo sem inóculo. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μmol de ABST por minuto ($\epsilon_{420} = 3,6 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Para cada amostra foram realizadas três repetições.

2.6.2 Atividade de manganês peroxidase (Manganês dependente de peroxidase EC 1.11.1.13)

A atividade de manganês peroxidase foi medida usando o vermelho de fenol ($1,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) como substrato ($\epsilon = 4.460 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) de acordo com a metodologia descrita por Kuwahara et al. (1984). A mistura de reação de 1 mL contendo 500μL do extrato enzimático, 100 μL de solução de vermelho de fenol ($1,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), 100 μL de lactato de sódio pH 4,5 ($250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 200μL de albumina bovina (0,5%), 50 μL de sulfato de manganês ($2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) e 50μL de H_2O_2 ($2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) em tampão succinato de sódio ($20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) pH 4,5. A solução resultante foi incubada por 5 minutos a 30°C e a reação foi interrompida pela adição de 40 μL NaOH ($2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$). A mistura de reação foi incubada por 5 minutos a 30°C. A absorbância foi medida a 610nm contra um tubo branco contendo todos os reagentes exceto a fonte enzimática que foi substituída por meio de cultivo sem o inóculo. Uma unidade de manganês peroxidase foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1μmol de vermelho de fenol por minuto. Para cada amostra foram realizadas três repetições.

2.6.3 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 ($\epsilon = 9.300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$),

através da oxidação de álcool veratrílico de acordo com a metodologia descrita por Tien & Kirk (1984). A mistura de reação de 2 mL, constou de 0,5 mL da fonte enzimática, 0,5 mL de H₂O₂ 2mM, 0,5 mL de álcool veratrílico 10 mM e 1 mL de tartarato de sódio 0,125 M pH 3,0. A mistura de reação foi incubada a 30°C por 6 minutos. A absorbância foi medida em 310 nm contra um tubo branco contendo todos os reagentes exceto a fonte enzimática que foi substituída por meio de cultivo sem o inóculo. Para cada determinação foram realizadas três repetições. Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 µmol de álcool veratrílico a veratraldeído por minuto.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação do crescimento

Todos os isolados apresentaram crescimento nos meios de cultivo nas concentrações de 0,05; 0,1; 1,0; 2,0; e 4,0 % de extrato de levedura e 0,1; 0,2; 0,3 e 0,5 % de sulfato de amônio. Porém, o crescimento micelial com o aumento da concentração de extrato de levedura apresentou inibição no crescimento micelial enquanto que as diferentes concentrações de sulfato de amônio não apresentaram diferenças significativas sobre o crescimento micelial (Figura 1).

O isolado CS7 apresentou o melhor crescimento em 0,1% de extrato de levedura, 0,5925g de micélio seco/30 dias de crescimento (valor médio, desvio padrão de 0,00785). Na concentração com 4% de extrato de levedura, os isolados apresentaram os menores crescimentos. Para os isolados CS1, CS2 e CS5 à medida que foram aumentando as concentrações de extrato de levedura o crescimento foi diminuindo. A concentração de 0,1% de extrato de levedura (meio controle) apresentou os melhores crescimentos para os isolados CS2, CS5 e CS7. O isolado CS1 apresentou o melhor crescimento micelial em maiores concentrações de sulfato de amônio, enquanto que para os demais isolados, o aumento da concentração do sulfato de amônio não afetou o crescimento micelial. Mikiashvili et al. (2006), testaram diferentes fontes de nitrogênio, como peptona, extrato de levedura, caseína hidrolisada e nitrogênio inorgânico, na forma de nitrato e amônio, para cultivo de *Pleurotus ostreatus* e verificaram que todas as fontes de nitrogênio testadas estimularam o crescimento do cogumelo, aumentando a biomassa final, após 8 dias de cultivo submerso.

Neste trabalho, a utilização de extrato de levedura como fonte de nitrogênio permitiu maior produção de massa micelial quando comparada à utilização de sulfato de amônio, com exceção do isolado CS1 que se destacou dos

demais isolados, produzindo maior massa micelial quando se utilizou o sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. O isolado CS7 apresentou o comportamento inverso, destacando-se dos demais isolados ao produzir maior massa micelial quando se utilizou o extrato de levedura como fonte de nitrogênio (Figura 1).

A melhor concentração de extrato de levedura de modo geral, para os isolados de *A. blazei* foi 0,1% com exceção do CS1.

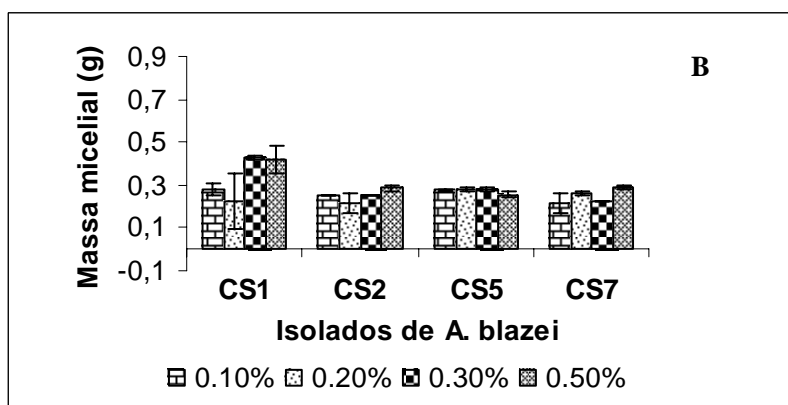
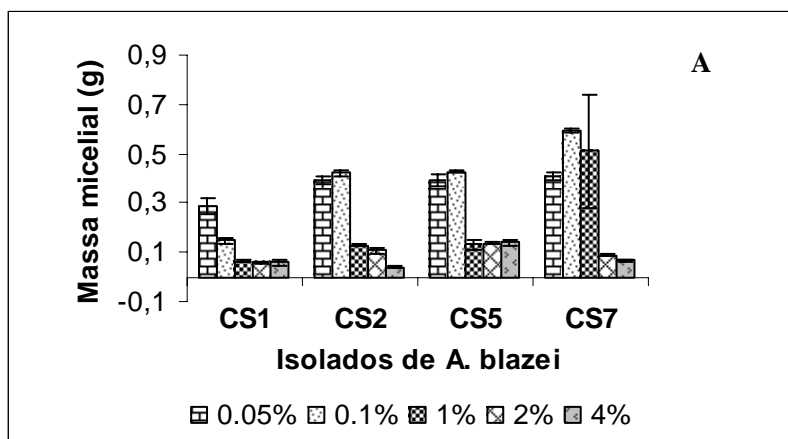


FIGURA 1 Crescimento micelial de isolados de *A. blazei* em meio MBC, incubados por 30 dias. **A**- em diferentes concentrações de extrato de levedura. **B**- em diferentes concentrações de sulfato de amônio. Valores médios e seus respectivos desvios-padrões.

3.2 Atividade enzimática

Os quatros isolados de *Agaricus blazei* foram testados quanto à produção de ligninases com crescimento em meio líquido, enriquecido com extrato de levedura e sulfato de amônio para a variação do teor de nitrogênio. Os quatros isolados apresentaram padrões diferenciados quanto à produção de enzimas ligninolíticas.

3.2.1 Lacase

As maiores atividades enzimáticas detectadas foram relacionadas à atividade de lacase. O nível máximo detectado foi para o isolado CS7 com $0,287 \text{ U.mL}^{-1}$ (Figura 2), cultivado em 1% de extrato de levedura com 15 dias de cultivo, seguido pelo isolado CS5 com $0,173 \text{ U.mL}^{-1}$, cultivado em 1% de extrato de levedura com 30 dias de cultivo. Para o meio de cultivo com sulfato de amônio, a maior atividade foi de $0,078 \text{ U.mL}^{-1}$, para o isolado CS7 com 30 dias de cultivo na concentração de 0,5% de sulfato de amônio (Figura 3). As menores atividades foram detectadas nos isolados CS1 com $0,005 \text{ U.mL}^{-1}$, utilizando-se 0,3% de sulfato de amônio em 30 dias de cultivo e CS2 com $0,007 \text{ U.mL}^{-1}$ utilizando-se 0,1% de sulfato de amônio em 30 dias de cultivo.

Os quatros isolados começaram a sintetizar a lacase a partir do 10º dia de determinação espectrofotométrica, para o meio enriquecido com extrato de levedura. Na concentração de 0,05% de extrato de levedura o isolado CS1 não apresentou nenhuma atividade enzimática, nos dias de cultivo avaliados e os isolados CS2, CS5 e CS7 apresentaram as menores atividades da lacase (menor valor de $0,0032 \text{ U.mL}^{-1}$ e maior valor de $0,145 \text{ U.mL}^{-1}$). A concentração de 0,1% de extrato de levedura (meio controle), foi a que permitiu melhor atividade enzimática, para o isolado CS1 em 20 dias de cultivo de $0,113 \text{ U.mL}^{-1}$; $0,159 \text{ U.mL}^{-1}$, para o isolado CS2 em 10 dias de cultivo; para o isolado CS5 a

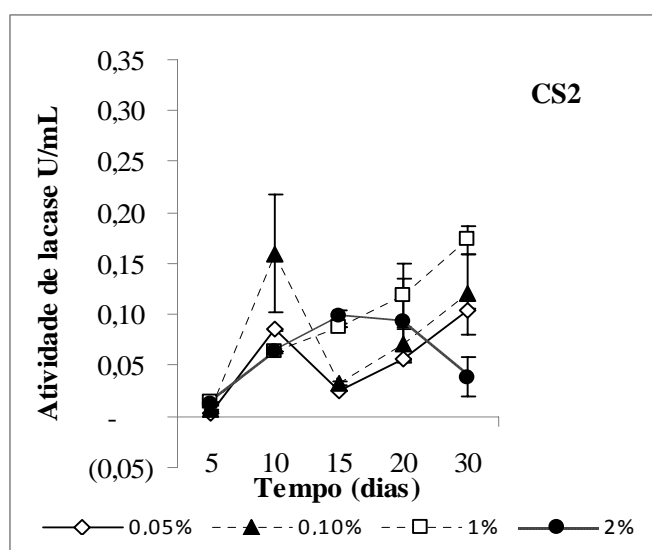
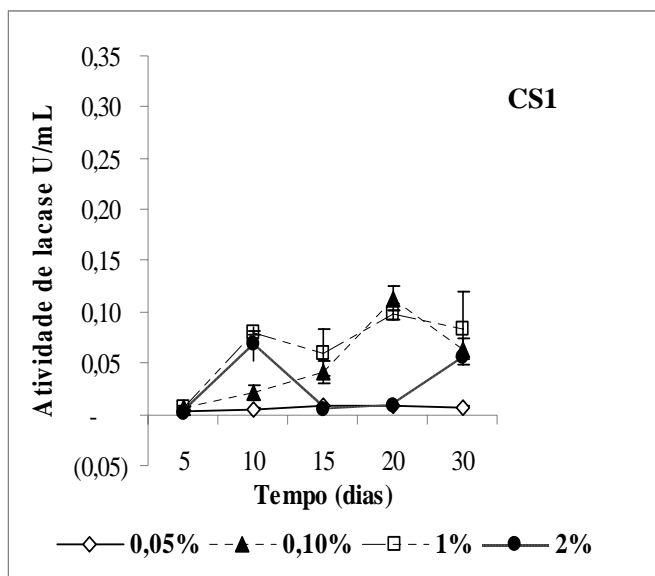


FIGURA 2 Atividade de lacase pelos isolados de *Agaricus blazei* CS1, CS2, em diferentes concentrações de extrato de levedura e dias de cultivo. As barras verticais indicam o desvio padrão.

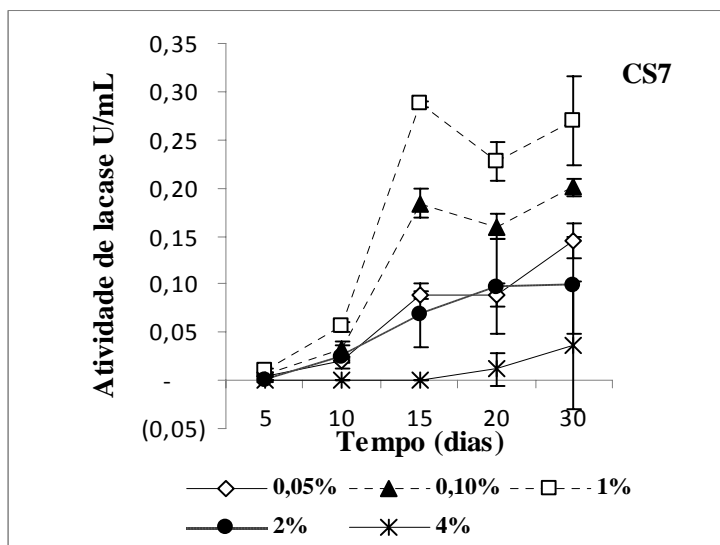
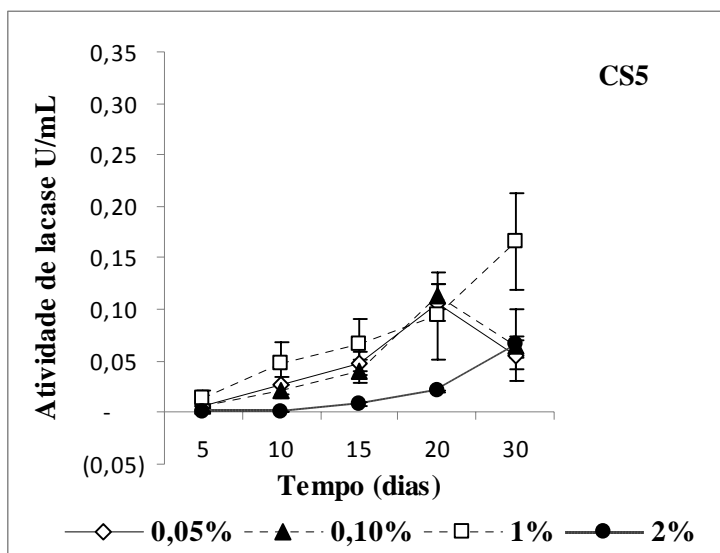


FIGURA 3 Atividade de lacase secretada pelos isolados de *Agaricus blazei* CS5 e CS7 em diferentes concentrações de extrato de levedura e dias de cultivo. As barras verticais indicam o desvio padrão.

20 dias de cultivo $0,113 \text{ U.mL}^{-1}$ e $0,184 \text{ U.mL}^{-1}$ a 15 dias de cultivo para o isolado CS7. Para a produção de lacase, o meio com 0,1% de extrato de levedura foi o melhor para o isolado CS1 ($0,113 \text{ U.mL}^{-1}$ em 20 dias de cultivo) e CS2 ($0,159 \text{ U.mL}^{-1}$ em 10 dias de cultivo). A concentração de 1% de extrato de levedura foi significativamente melhor para a atividade de lacase no isolado CS7, seguida pela concentração de 0,1%. Para os demais isolados a concentração de 1% tendeu a ser melhor ou igual a concentração de 0,1%, porém, as atividades enzimáticas foram inferiores quando comparadas a do isolado CS7. Em todas as concentrações de extrato de levedura houve crescimento micelial.

Quando o extrato de levedura foi substituído pelo sulfato de amônio como fonte de nitrogênio no meio de cultivo do *A. blazei*, a atividade de lacase foi muito pequena (Tabela 1). A maior atividade foi para o isolado CS7 de $0,078 \text{ U.mL}^{-1}$ em 10 dias de cultivo a 0,5% de sulfato de amônio.

Revankar & Lele (2006) avaliaram a melhor fonte de nitrogênio em meio básico, suplementado com extrato de levedura, peptona, sulfato de amônio e asparagina, tendo glicose como fonte de carbono, para a produção de lacase de um novo fungo (designado como WR-1), isolado de casca de árvore em Mumbai - Índia. Esses autores constataram que a melhor fonte de nitrogênio foi o extrato de levedura, sendo que a máxima atividade de lacase obtida foi de 134 U.mL^{-1} . Galhaup et al. (2002), estudaram o efeito de diferentes fontes de nitrogênio orgânico na produção de lacase por *Trametes pubescens*. A maior produção da enzima (310 U.mL^{-1}) foi obtida quando foi utilizada a peptona como única fonte de nitrogênio. A substituição da peptona por extrato de levedura levou ao decréscimo da atividade enzimática (100 U.mL^{-1}), porém o crescimento microbiano não foi afetado.

TABELA 1 Valores médios da atividade de lacase (U.mL⁻¹), com seus respectivos desvios-padrão multiplicado por 10⁴, para os isolados de *Agaricus blazei* CS1, CS2, CS5 e CS7, em diferentes concentrações de sulfato de amônio, em diferentes dias de cultivo.

Dias	Isolados	Sulfato de amônio (%)			
		0,1	0,2	0,3	0,5
5	CS1	1,0.10 ⁻³ ±1	2,0.10 ⁻³ ±1	5,0.10 ⁻³ ±3	7,0.10 ⁻³ ±1
	CS2	1,4.10 ⁻³ ±1	1,3.10 ⁻³ ±5	1,9.10 ⁻³ ±5	1,5.10 ⁻³ ±4
	CS5	1,8.10 ⁻³ ±4	2,3.10 ⁻³ ±7	1,8.10 ⁻³ ±2	3,1.10 ⁻³ ±14
	CS7	3,0.10 ⁻³ ±4	1,6.10 ⁻³ ±14	2,6.10 ⁻³ ±7	5,0.10 ⁻³ ±8
10	CS1	1,2.10 ⁻³ ±8	3,2.10 ⁻³ ±4	5,0.10 ⁻³ ±3	5,0.10 ⁻³ ±16
	CS2	5,0.10 ⁻³ ±4	4,3.10 ⁻³ ±12	4,3.10 ⁻³ ±3	4,6.10 ⁻³ ±5
	CS5	5,1.10 ⁻³ ±5	5,8.10 ⁻³ ±1	5,8.10 ⁻³ ±2	8,6.10 ⁻³ ±25
	CS7	1,3.10 ⁻³ ±3	4,9.10 ⁻³ ±4	4,1.10 ⁻³ ±1	3,7.10 ⁻³ ±4
15	CS1	3,9.10 ⁻³ ±14	4,6.10 ⁻³ ±7	4,6.10 ⁻³ ±8	4,6.10 ⁻³ ±4
	CS2	6,9.10 ⁻³ ±2	5,6.10 ⁻³ ±16	6,7.10 ⁻³ ±2	5,9.10 ⁻³ ±7
	CS5	4,4.10 ⁻³ ±17	5,2.10 ⁻³ ±12	5,5.10 ⁻³ ±5	4,6.10 ⁻³ ±8
	CS7	29.10 ⁻³ ±59	5,4.10 ⁻³ ±1	5,9.10 ⁻³ ±1	7,9.10 ⁻³ ±10
20	CS1	4,7.10 ⁻³ ±7	5,0.10 ⁻³ ±2	4,0.10 ⁻³ ±15	4,7.10 ⁻³ ±8
	CS2	7,5.10 ⁻³ ±8	6,6.10 ⁻³ ±14	6,6.10 ⁻³ ±5	5,9.10 ⁻³ ±8
	CS5	3,3.10 ⁻³ ±12	4,5.10 ⁻³ ±11	2,6.10 ⁻³ ±4	4,6.10 ⁻³ ±15
	CS7	6,9.10 ⁻³ ±12	5,7.10 ⁻³ ±3	6,2.10 ⁻³ ±1	5,6.10 ⁻³ ±4
30	CS1	4,5.10 ⁻³ ±7	3,5.10 ⁻³ ±13	5,4x10 ⁻³ ±5	3,9x10 ⁻³ ±11
	CS2	7,5.10 ⁻³ ±8	5,7.10 ⁻³ ±20	6,6x10 ⁻³ ±6	3,8x10 ⁻³ ±17
	CS5	4,1.10 ⁻³ ±13	4,5.10 ⁻³ ±13	4,6x10 ⁻³ ±10	3,9x10 ⁻³ ±13
	CS7	7,810 ⁻³ ±32	5,6.10 ⁻³ ±11	5,2x10 ⁻³ ±2	5,1x10 ⁻³ ±2

Eggert et al. (1996) relataram que a atividade enzimática é maior em condições limitantes de nitrogênio. Ullrich et al. (2005), encontraram 5 U.mL^{-1} em 14 dias de cultivo de *Agaricus blazei* (VTCC 5051) em meio líquido Kirk modificado contendo suco de tomate, diluído 50:50 (v/v), com água destilada. Esses autores observaram também drástica elevação no pH do meio de cultivo de 4,5 para 7,0. Ardon et al. (1996) observaram que a atividade de lacase de *Pleurotus ostreatus* foi de $0,07 \text{ U.mL}^{-1}$ em meio de cultivo sintético básico, mas quando o meio foi acrescido de extrato de talo de algodão, a atividade média de lacase foi de 0,68 e 1,3U em dois dias de cultivo. É possível que a maior atividade de lacase no meio com extrato de levedura se deva à presença de substâncias que atuam na indução da expressão gênica para esta enzima, enquanto que, na presença de sulfato de amônio a expressão dessa enzima ficaria apenas no nível basal. Esses resultados indicam que, para uma melhor avaliação da atividade da enzima entre os isolados, seria necessário um sistema no qual estivesse presente o substrato da enzima.

As diferenças variação na atividade enzimática apresentada pelos quatro isolados de *A. blazei* podem ser explicadas pelo fato dos basidiomicetos apresentarem duas a quatro formas diferentes da enzima. Em muitas espécies de fungos ocorre a presença de lacase indutivas e constitutivas (Eggert et al., 1996). A produção de lacase pode ser afetada por muitos fatores como pH, temperatura, composição do meio de cultivo, tempo de incubação e aeração. Algumas características da lacase como massa molecular, pH ótimo de atividade e substrato específico, são extremamente diversas (Mayer & Staples, 2002).

3.2.2 Manganês peroxidase

A atividade de manganês peroxidase (EC 1.11.1.13), foi baixa, para todos os isolados tanto com a utilização de extrato de levedura como de sulfato de amônio, sendo a maior atividade observada para o isolado CS2 com $0,022 \text{ U.mL}^{-1}$ quando se utilizou extrato de levedura e para o isolado CS7 com

0,025 U.mL⁻¹ quando se utilizou sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. (Tabela 2). Ullrich et al. (2005) não encontraram atividade de manganês-peroxidase em *A. blazei* (VTCC) cultivado por 20 dias, em meio líquido Kirk modificado contendo suco de tomate. Segundo Hofrichter et al. (1999) os basidiomicetos produzem enzimas ligninolíticas de forma constitutiva, porém elas podem ser influenciadas pelas condições de cultivo. Papinutti et al., (2001), afirmaram que o substrato ligninolítico pode induzir a atividade de Mn-P e de lacase por basidiomicetos lignocelulolíticos. A atividade de Mn-P é sensível à presença de alguns metais como ferro, zinco, molibdênio, cobre e manganês. Esses metais são essenciais para o crescimento fúngico (Baldrian et al., 2005). O meio de cultivo utilizado neste estudo foi MBC líquido que apresentam vários metais os quais podem ter inibido a atividade ou a produção da manganês-peroxidase pelos isolados de *A. blazei*.

TABELA 2 Valores médios da atividade de Manganês-peroxidase (U.mL⁻¹), com seus respectivos desvios-padrão multiplicado por 10⁻⁴, para os isolados de *Agaricus blazei* CS1, CS2, CS5 e CS7, em diferentes concentrações de extrato de levedura, em diferentes dias de cultivo.

Dias	Isolados	Extrato de levedura (%)				
		0,05	0,1	1	2	4
5	CS1	6,0.10 ⁻³ ±4	12.10 ⁻³ ±2	1,0.10 ⁻³ ±14	0,0±0	0,0±0
	CS2	0,0±0	11,2.10 ⁻³ ±2	0,0±0	12.10 ⁻³ ±10	22.10 ⁻³ ±13
	CS5	2,0.10 ⁻³ ±15	1,2.10 ⁻³ ±9	0,0±0	0,0±0	0,0±0
	CS7	0,0±0	0,0±0	0,0±0	5,5.10 ⁻³ ±10	0,0±0
10	CS1	8,7.10 ⁻³ ±20	12,6.10 ⁻³ ±3	1,6.10 ⁻³ ±5	0,0±0	0,0±0
	CS2	0,0±0	10,3.10 ⁻³ ±3	0,0±0	12.10 ⁻³ ±10	22.10 ⁻³ ±13
	CS5	0,1.10 ⁻³ ±18	1,3.10 ⁻³ ±3	0,0±0	0,0±0	0,0±0
	CS7	0,0±0	0,0±0	0,0±0	5,5.10 ⁻³ ±1	0,0±0
15	CS1	7,5.10 ⁻³ ±5	12,2.10 ⁻³ ±9	5,0.10 ⁻³ ±12	0,0±0	0,0±0
	CS2	0,0±0	10,5.10 ⁻³ ±4	0,0±0	13.10 ⁻³ ±10	21,5.10 ⁻³ ±5
	CS5	1,9.10 ⁻³ ±7	1,7.10 ⁻³ ±15	0,0±0	1,3.10 ⁻³ ±9	0,0±0
	CS7	0,0±0	0,0±0	9,0.10 ⁻³ ±2	8,5.10 ⁻³ ±10	0,0±0
20	CS1	6,0.10 ⁻³ ±12	9,5.10 ⁻³ ±8	0,1.10 ⁻³ ±36	0,0±0	0,0±0
	CS2	0,0±0	10,4.10 ⁻³ ±6	0,0±0	16.10 ⁻³ ±53	21.10 ⁻³ ±1
	CS5	2,0.10 ⁻³ ±4	2,4.10 ⁻³ ±9	0,0±0	9,0.10 ⁻³ ±8	0,0±0
	CS7	0,0±0	0,0±0	6,0.10 ⁻³ ±20	7,9.10 ⁻³ ±3	0,0±0
30	CS1	6,6.10 ⁻³ ±3	10.10 ⁻³ ±13	4,6.10 ⁻³ ±9	0,0±0	0,0±0
	CS2	0,0±0	10,8.10 ⁻³ ±2	10.10 ⁻³ ±10	15x10 ⁻³ ±71	20x10 ⁻³ ±8
	CS5	2,0.10 ⁻³ ±27	6,0.10 ⁻³ ±10	0,0±0	1,2x10 ⁻³ ±7	0,0±0
	CS7	0,0±0	0,0±0	18,3.10 ⁻³ ±131	8,3x10 ⁻³ ±11	0,0±0

Os dados para atividade de manganês-peroxidase em meio com diferentes concentrações de sulfato de amônio estão demonstrados na Tabela 3. Observou-se a maior atividade enzimática para o isolado CS7, ($0,025 \text{ U.mL}^{-1}$), em 20 dias de cultivo, com 0,5% de sulfato de amônio.

TABELA 3 Valores médios da atividade de manganês peroxidase (U.mL⁻¹), com seus respectivos desvios-padrão multiplicado por 10⁻⁴, para os isolados de *Agaricus blazei* CS1, CS2, CS5 e CS7, em diferentes concentrações de sulfato de amônio, em diferentes dias de cultivo.

Dias	Isolados	Sulfato de amônio (%)			
		0,1	0,2	0,3	0,5
5	CS1	1,0.10 ⁻³ ± 8	2,8.10 ⁻³ ±17	1,0.10 ⁻³ ±1	6,0.10 ⁻³ ±6
	CS2	0,0±0	1,3.10 ⁻³ ±1	0,4.10 ⁻³ ±2	0,5.10 ⁻³ ±2
	CS5	1,1.10 ⁻³ ±4	0,5.10 ⁻³ ±2	0,5.10 ⁻³ ±3	1,9.10 ⁻³ ±15
	CS7	0,7.10 ⁻³ ±5	1,3.10 ⁻³ ±4	1,4.10 ⁻³ ±2	6,3.10 ⁻³ ±55
10	CS1	0,7.10 ⁻³ ±26	2,7.10 ⁻³ ±11	0,6.10 ⁻³ ±4	1,1.10 ⁻³ ±2
	CS2	0,0±0	1,3.10 ⁻³ ±5	1,4.10 ⁻³ ±4	3,1.10 ⁻³ ±35
	CS5	1,9.10 ⁻³ ±4	0,6.10 ⁻³ ±6	1,3.10 ⁻³ ±0	4,1.10 ⁻³ ±4
	CS7	0,5.10 ⁻³ ±5	0,9.10 ⁻³ ±4	1,1.10 ⁻³ ±2	13.10 ⁻³ ±25
15	CS1	5,1.10 ⁻³ ±14	5,6.10 ⁻³ ±56	0,4.10 ⁻³ ±3	1,9.10 ⁻³ ±11
	CS2	0,0±0	1,4.10 ⁻³ ±6	1,0.10 ⁻³ ±2	0,9.10 ⁻³ ±8
	CS5	1,8.10 ⁻³ ±6	0,9.10 ⁻³ ±4	1,2.10 ⁻³ ±5	3,9.10 ⁻³ ±4
	CS7	0,0±0	0,9.10 ⁻³ ±0	1,7.10 ⁻³ ±13	20.10 ⁻³ ±46
20	CS1	4,3.10 ⁻³ ±28	4,7.10 ⁻³ ±11	0,8.10 ⁻³ ±1	1,6.10 ⁻³ ±11
	CS2	0,0±0	1,1.10 ⁻³ ±4	0,9.10 ⁻³ ±2	3,0.10 ⁻³ ±3
	CS5	1,9.10 ⁻³ ±3	1,6.10 ⁻³ ±5	1,1.10 ⁻³ ±3	4,0.10 ⁻³ ±1
	CS7	0,6.10 ⁻³ ±4	1,3.10 ⁻³ ±2	1,5.10 ⁻³ ±6	25.10 ⁻³ ±44
30	CS1	3,7.10 ⁻³ ±6	0,6.10 ⁻³ ±10	0,8x10 ⁻³ ±5	1,9x10 ⁻³ ±6
	CS2	0,0±0	0,7.10 ⁻³ ±2	0,7x10 ⁻³ ±2	0,2x10 ⁻³ ±4
	CS5	1,4.10 ⁻³ ±5	2,2.10 ⁻³ ±18	2,2x10 ⁻³ ±9	3,7x10 ⁻³ ±2
	CS7	5,010 ⁻³ ±5	1,9.10 ⁻³ ±5	1,2x10 ⁻³ ±6	15x10 ⁻³ ±40

3.2.3 Lignina peroxidase

A máxima atividade de lignina-peroxidase detectada foi encontrada no cultivo do isolado CS5, sendo de $0,0083 \text{ U.mL}^{-1}$, com 0,05% de extrato de levedura com 30 dias de cultivo (Tabela 4). Não foram detectadas atividade nos isolados CS2 e CS7 cultivados em diferentes concentrações de extrato de levedura. Para os cultivos com sulfato de amônio a atividade foi muito baixa ou ausente.

Durrant et al. (1991), demonstraram que no cultivo de *Agaricus brunnescens*, a lignina-peroxidase não foi detectada, no entanto, houve degradação do polímero de lignina, principalmente durante a fase vegetativa. Assim, conforme os autores, o fato de não haver atividade de lignina-peroxidase detectada não implica que a lignina não será degradada.

As condições de cultivo podem influenciar a atividade enzimática (Tan & Wahab, 1997) e, de acordo com Kumar et al. (2006), altas atividades de lignina-peroxidase secretadas por fungos de decomposição branca são detectadas em condições com baixa concentração de nitrogênio.

A lignina peroxidase é considerada a enzima chave na degradação da lignina, pois atua diretamente na oxidação de compostos não fenólicos presentes na estrutura da lignina, os quais representam mais que 90% da estrutura (Tien & Kirk, 1984). *Phanerochaete chrysosporium*, fungo de degradação branca apresentaram atividade de ligninases com secreção de Li-P e Mn-P. Entretanto, os fungos de degradação branca *Dichomitus squalens* e *Ceriporiopsis subvermispota* podem degradar eficientemente a lignina secretando apenas Li-P (Jung et al., 2002).

TABELA 4 Valores médios da atividade de Lignina-peroxidase ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$), com seus respectivos desvios-padrão multiplicado por 10^{-4} , para os isolados de *Agaricus blazei* CS1 e CS5 em diferentes concentrações de extrato de levedura, em diferentes dias de cultivo.

Dias	Isolados	Extrato de levedura (%)				
		0,05	0,1	1	2	4
5	CS1	$0,1\cdot 10^{-3}\pm 5$	$0,0\pm 0$	$0,15\cdot 10^{-3}\pm 1$	$0,0\pm 0$	$0,0\pm 0$
	CS5	$0,0\pm 0$	$0,0\pm 0$	$0,0\pm 0$	$0,0\pm 0$	$0,0\pm 0$
10	CS1	$0,0\pm 0$	$0,0\pm 0$	$0,0\pm 0$	$2,1\cdot 10^{-3}\pm 28$	$2,2\cdot 10^{-3}\pm 39$
	CS5	$1,6\cdot 10^{-3}\pm 17$	$0,0\pm 0$	$0,0\pm 0$	$0,0\pm 0$	$0,0\pm 0$
15	CS1	$0,0\pm 0$	$0,0\pm 0$	$0,0\pm 0$	$0,05\cdot 10^{-3}\pm 4$	$0,0\pm 0$
	CS5	$0,1\cdot 10^{-3}\pm 1$	$0,0\pm 0$	$0,0\pm 0$	$0,0\pm 0$	$0,0\pm 0$
20	CS1	$0,47\cdot 10^{-3}\pm 8$	$0,0\pm 0$	$18\cdot 10^{-3}\pm 67$	$2,0\cdot 10^{-3}\pm 45$	$0,0\pm 0$
	CS5	$0,5\cdot 10^{-3}\pm 4$	$0,0\pm 0$	$0,0\pm 0$	$0,0\pm 0$	$0,0\pm 0$
30	CS1	$2,8\cdot 10^{-3}\pm 12$	$0,0\pm 0$	$0,0\pm 0$	$0,0\pm 0$	$1,3\cdot 10^{-3}\pm 24$
	CS5	$8,3\cdot 10^{-3}\pm 67$	$0,0\pm 0$	$0,0\pm 0$	$0,0\pm 0$	$0,0\pm 0$

3.3 Considerações finais

Os resultados deste estudo demonstraram que o meio de cultivo líquido (MBC) com diferentes concentrações de nitrogênio, favoreceu diferenças na atividade enzimática de acordo com o teor de nitrogênio, para cada isolado de *A. blazei*. O isolado CS7 apresentou a melhor atividade de lacase em meio líquido. Esses resultados podem indicar que o isolado CS7 pode ser o mais eficiente na produção dessa enzima em condições de cultivo do cogumelo.

4 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos quanto à determinação de ligninases nos quatro isolados de *A. blazei* Murril, conclui-se que:

Todos os isolados de *A. blazei* apresentaram atividade de lacase, porém, o isolado CS7 destacou-se dentre os demais.

Os isolados de *A. blazei* utilizados neste estudo não apresentaram alta atividade de Mn e lignina-peroxidase nas condições testadas.

5 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ARDON, O.; KEREM, Z.; HADAR, Y. Enhancement of laccase activity in liquid cultures of the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus* by cotton stalk extract. **Journal of Biotechnology**, v. 51, n.3, p.201-207, Nov. 1996.

BALDRIAN, P.; VALÁSKOVÁ, V.; MERHAUTOVÁ, V.; GABRIEL, J. Degradation of lignocellulose by *Pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 5/6, p. 670-676, June/July 2005.

BUSWELL, J. A.; CAI, Y.; CHANG, S.T. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, n.1, p. 81-88, Apr. 1995.

DURRANT, A. J.; WOOD, D. A.; CAIN, R. B. Lignocelulose biodegradation by *Agaricus bisporus* during solid state fermentation. **Journal of Genera Microbiology**, v. 137, p. 751-755, 1991.

EGGERT, C.; TEP, U.; ERIKSSON, K. E. Laccase-producing white-rot fungus lacking ligninperoxidase, and manganese peroxidase. In: JEFFRIES, T.; VIKARI, L. (Ed.). **Enzyme for pulp and paper processing**. Washington: American Chemical, 1996. p. 130-150.

GALHAUP, C.; WAGNER, H.; HINTERSTOISSER, B.; HALTRICH, D. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. **Enzyme and Microbial Technology**, Austria, v. 30, p. 529-536, 2002.

HOFRICHTER, M.; VARES, T.; KALSI, M.; GALKIN, S.; SCHEIBNER, K.; FRITSCH, W.; HATAKKA, A. Production of manganese peroxidase and organic acids and mineralization of ¹⁴C-labelled lignin (¹⁴C-DHP) during solid state fermentation of wheat straw with the white rot fungus *Nematolona frowadii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Finland, v. 65, p. 1864-1870, 1999.

JUNG, H.; XU, F.; LI, K. Purification and characterization of laccase from wood-degrading fungus *Trichophyton rubrum* LKY -7. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 2, p. 161-169, Feb. 2002.

KUMAR, A. G.; SEKARAN, G.; KRISHNAMOORTHY, S. Solid state fermentation of *Achras zapota* lignocellulose by *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 97, n. 3, p. 1521-1528, Sept. 2006.

MATA, G.; HERNANDEZ, D.M.M.; ANDREU, L. G. I. Changes in lignocellulolytic enzyme activities in six *Pleurotus* spp. Strains cultivated on coffee pulp in confrontation with *Trichoderma* spp. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Mexico, v. 21, p. 143-150, 2005.

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

MIKIASHVILI, N.; WASSER, S. P.; NEVO, E.; ELISASHVILI, V. Effect of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, p. 999-1002, 2006.

PAPINUTTI, V. L.; DIORIO, L. A.; FORCHIASSIN, F. Production of laccase and manganese peroxidase by *Fomes sclerodermeus* grown on wheat bran. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 157-160, 2001.

REVANKAR, M. S.; LELE, S. S. Enhanced production of laccase using a new isolate of White rot fungus WR-1. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 581-588, Mar. 2006.

TAN, Y.H.; WAHAB, M.N. Extracellular enzyme production during anamorphic growth in the edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Malaysia, v.13, p. 613-617, Jan.1997.

TIEN, M.; KIRK, K. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. **Science**, v.221, p. 661-663, 1983.

ULLRICH, R.; HUONG, L. M.; DUNG, N. L. Laccase from the medicinal mushroom *Agaricus blazei*: production, purification and characterization. **Applied Microbiology Biotechnology**, Germany, v. 67, p. 357-363, Jan. 2005.

VÁLAZQUEZ-CEDENO, M. A.; MATA, G., SAVOIE, J. M. Waste reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulpe changes in the production of some lignocellulolytics enzymes. **Word Journal of Microbiology and Biotechnology, Mexico**, v.18, n.3, p. 201-207, Jan. 2002.

ANEXO

ANEXO		Página
FIGURA 1 A	Curva de crescimento <i>Agaricus blazei</i> em meio MBC.....	92

ANEXO

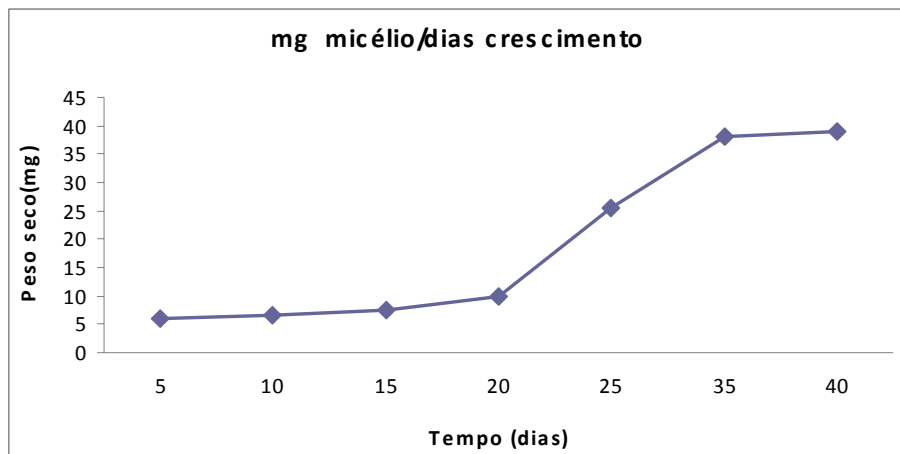


Figura 1A Curva de crescimento *Agaricus blazei* em meio MBC.