



**MAIARA ANDRADE DE CARVALHO SOUSA**

**ATIVIDADE DE PEROXIDASES, LECTINA E  
TEOR DE  $\beta$ -GLUCANO DURANTE AS FASES  
DE CULTIVO DE *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler**

**LAVRAS – MG**

**2014**

**MAIARA ANDRADE DE CARVALHO SOUSA**

**ATIVIDADE DE PEROXIDASES, LECTINA E TEOR DE  $\beta$ -GLUCANO  
DURANTE AS FASES DE CULTIVO DE *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler**

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

Orientador

Dr. Eustáquio Souza Dias

**LAVRAS – MG**

**2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Sousa, Maiara Andrade Carvalho.

Atividade de peroxidases, lectina e teor de  $\beta$ -glucano durante as fases de cultivo de *Lentinula edodes* (Berk) Pegler / Maiara Andrade Carvalho Sousa. – Lavras: UFLA, 2014.

96 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Eustáquio Souza Dias.

Bibliografia.

1. Shiitake. 2. Ciclo de cultivo. 3. Enzimas. 4. Composição nutricional. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 635.8

**MAIARA ANDRADE DE CARVALHO SOUSA**

**ATIVIDADE DE PEROXIDASES, LECTINA E TEOR DE  $\beta$ -GLUCANO  
DURANTE AS FASES DE CULTIVO DE *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler**

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

APROVADA em 15 de agosto de 2014.

Dr. Eustáquio Souza Dias	UFLA
Dr. Disney Ribeiro Dias	UFLA
Dra. Simone Cristina Marques	UFLA
Dra. Luciana Lopes Silva Pereira	UFLA
Dr. Diego da Cunha Zied	UNESP

Dr. Eustáquio Souza Dias  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2014**

*A Deus.*

*Aos meus amados pais, Sueli e Hermes.*

*Ao meu amado esposo, Hudson.*

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as graças concedidas durante a minha vida e por aquelas que tenho certeza que ainda vai conceder.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

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

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

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

Às meninas da república, Manu, Kaliane, Hellen e Thaís, pela boa convivência. À grande amiga que fiz, Alessandra, por todos os conselhos e, principalmente, por escutar meus desabafos.

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

A Ivani e Cidinha, sempre prontas a ajudar. Ao Paulinho, por todo o suporte e ajuda na montagem do experimento. Sem sua ajuda não seria possível a realização desse trabalho.

A Taísa, pela dedicação e competência.

Aos colegas do Laboratório de Cogumelos Comestíveis, Janaira, Carol Collela, Carol Faria, Pedro, Raul, Manu, Andreísa, Simone, Lívia, William, Moysa, Cibelli, Fernanda, Jéssica, Amanda, Giovana e Natália, pela boa convivência e ajuda nos momentos em que mais precisei.

A Rose, pela educação, sempre disposta a ajudar.

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

## RESUMO GERAL

Os cogumelos são valorizados por suas propriedades nutricionais e terapêuticas, tornando-se atraentes como alimento funcional e como fonte de compostos bioativos. O presente trabalho foi realizado com os objetivos de avaliar o ciclo de cultivo de linhagens de *Lentinula edodes* a partir da produção de enzimas, lectina e  $\beta$ -glucano e avaliar o consumo de celulose, hemicelulose e lignina e a produtividade de cogumelos, bem como a composição centesimal, a atividade antioxidante e o teor de lectina, de lacase e de tirosinase. Os resultados apontaram um aumento no teor de lectina e lacase no micélio pigmentado. A produção de tirosinase foi maior na capa micelial marrom. O teor de  $\beta$ -glucano, para todas as linhagens, sofreu variações ao longo do ciclo. As linhagens apresentaram diferentes capacidades de consumir celulose, hemicelulose e lignina. As linhagens UFLA-LE4 e UFLA-LE6 foram as mais produtivas, com produtividade de 26,9% e 26,2%, respectivamente. A linhagem UFLA-LE2 apresentou maior teor de proteína bruta ( $30,71 \pm 0,82\%$ ) e cinzas ( $5,49 \pm 0,23\%$ ); UFLA-LE3, maior teor de lipídeos ( $3,14 \pm 0,14\%$ ); UFLA-LE6, maior teor de fibras ( $16,40 \pm 0,20\%$ ) e UFLA-LE5, maior teor de carboidratos ( $66,59 \pm 0,90\%$ ). A linhagem UFLA-LE4 apresentou maior atividade antioxidante ( $53,0 \pm 0,1\%$ ). As linhagens UFLA-LE3 e UFLA-LE6 apresentaram maior atividade de lectina ( $32 \text{ UH } 50\mu\text{L}^{-1}$ ). A atividade de lacase foi maior para a linhagem UFLA-LE6 ( $13,78 \pm 0,62 \text{ U kg}^{-1}$ ). Não foi detectada atividade de tirosinase no cogumelo de nenhuma linhagem. Como a linhagem UFLA-LE4 apresentou maior atividade antioxidante, a linhagem UFLA-LE2 apresentou maior teor de proteínas e cinzas e menor teor de lipídeos e a linhagem UFLA-LE6 se destacou quanto à maioria dos parâmetros nutricionais, atividade de lectina e maior produtividade em cogumelos, essas linhagens podem ser selecionadas para futuros trabalhos de melhoramento genético.

Palavras-chave: Shiitake. Ciclo de cultivo. Lectina. Composição nutricional. Atividade antioxidante.

## GENERAL ABSTRACT

The mushrooms are prized for their nutritional and therapeutic properties become attractive as a functional food and as a bioactive compounds source. This study aimed to evaluate the crop cycle of *Lentinula edodes* strains from the production of enzymes, lectin and  $\beta$ -glucan and to assess the intake of cellulose, hemicellulose and lignin and the mushrooms productivity, as well as the centesimal composition, antioxidant activity and the content of lectin, laccase and tyrosinase. The results showed an increase in lectin content and laccase in the pigmented mycelium. The tyrosinase production was increased in brown mycelial cover. The  $\beta$ -glucan content for all strains suffered variations throughout the cycle. The strains showed different capacities to consume cellulose, hemicellulose and lignin. The strains UFLA-LE4 and UFLA-LE6 were the most productive with productivity of 26.9% and 26.2%, respectively. The strain UFLA-LE2 showed higher crude protein ( $30.71\pm 0.82\%$ ) and ash ( $5.49\pm 0.23\%$ ), UFLA-LE3 higher lipid content ( $3.14\pm 0.14\%$ ), UFLA-LE6 higher fiber content ( $16.40\pm 0.20\%$ ) and UFLA-LE5 higher carbohydrate content ( $66.59\pm 0.90\%$ ). The strain UFLA-LE4 showed higher antioxidant activity ( $53.0\pm 0.1\%$ ). The strains UFLA-LE3 and UFLA-LE6 showed greater lectin activity ( $32 \text{ UH } 50\mu\text{L}^{-1}$ ). The laccase activity was higher for the strain UFLA-LE6 ( $13.78\pm 0.62 \text{ U kg}^{-1}$ ). It was not detected tyrosinase activity on mushroom in any strain. As the strain UFLA-LE4 showed higher antioxidant activity; the strain UFLA-LE2 showed higher content of protein and ash and lower lipid content; and the strain UFLA-LE6 stood out as the most nutritional parameters, lectin activity and higher productivity in mushrooms, these strains can be selected for future breeding projects.

Keywords: Shiitake. Cultivation cycle. Lectin. Nutritional composition. Antioxidant activity.

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b> .....	10
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	12
<b>2.1</b>	<b>Cultivo de shiitake (<i>Lentinula edodes</i> Berk. Pegler)</b> .....	12
<b>2.2</b>	<b>Formação da capa micelial pigmentada</b> .....	14
<b>2.3</b>	<b>Lectina</b> .....	15
<b>2.4</b>	<b>Melanina</b> .....	17
<b>2.5</b>	<b>Tirosinases</b> .....	19
<b>2.6</b>	<b>Lignina, celulose e hemicelulose</b> .....	21
<b>2.7</b>	<b>Ligninases</b> .....	22
<b>2.7.1</b>	<b>Lignina peroxidase [1,2-bis (3,4- dimetoxifenil) propano-1,3 diol: hidrogenperóxido oxidoredutases, EC 1.11.1.14] - LiP</b> .....	22
<b>2.7.2</b>	<b>Lacase (benzenodiol: oxigênio oxidoredutases (EC 1.10.3.2)</b> .....	24
<b>2.7.3</b>	<b>Manganês peroxidase [Mn (II): hidrogeno-peróxido oxidoredutases, EC 1.11.1.13) – MnP</b> .....	25
<b>2.8</b>	<b>Importância nutricional e composição centesimal de cogumelos ...</b>	26
<b>2.9</b>	<b><math>\beta</math>-glucano</b> .....	29
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	30
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	31
	<b>SEGUNDA PARTE</b> .....	48
	<b>ARTIGO 1 Atividade de peroxidases, lectina e <math>\beta</math>-glucano, durante o cultivo do cogumelo <i>Lentinula edodes</i></b> .....	48
	<b>ARTIGO 2 Composição centesimal, atividade antioxidante e enzimas do cogumelo <i>Lentinula edodes</i></b> .....	78

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUÇÃO

O cogumelo shiitake (*Lentinula edodes* Berk. Pegler) é um representante de basidiomiceto xilotrófico. É muito popular entre os consumidores de cogumelos, estando em segundo lugar na produção mundial, depois do champignon (*Agaricus bisporus*) (SZETO et al., 2008). É valorizado como um cogumelo comestível de alta qualidade, apresentando alto valor gastronômico e destacando-se não só pelo seu agradável sabor como também por suas propriedades nutricionais e terapêuticas (MENOLLI JUNIOR; PACCOLA-MEIRELLES, 2010). Os cogumelos comestíveis são excelentes alimentos que podem ser incorporados a dietas bem balanceadas, devido ao baixo teor de lipídeos, às baixas calorias e ao alto teor de fibra alimentar e de compostos funcionais (BRENE, 2010).

O cultivo do shiitake é tradicionalmente feito em toros de madeira, principalmente eucalipto, mas o cultivo axênico em substratos sintéticos à base de diversos resíduos agrícolas vem ganhando espaço na produção comercial deste cogumelo, uma vez que a colheita acontece mais rapidamente e a eficiência biológica do fungo é bastante elevada (PHILIPPOUSSIS; DIAMANTOPOULOU; ISRAILIDES, 2007). Pelo menos quatro fases já foram identificadas durante o ciclo de cultivo do shiitake: crescimento micelial vegetativo, formação da capa micelial marrom, formação de primórdios e desenvolvimento dos corpos de frutificação (TANG et al., 2013).

A formação da capa micelial marrom é muito importante para o ciclo de cultivo do shiitake, já que é fundamental para o desenvolvimento dos corpos de frutificação. Embora a formação da capa micelial marrom preceda o aparecimento dos corpos de frutificação (CHUM et al., 2008) e venha sendo

descrita como uma etapa peculiar na morfogênese para shiitake (ALEKSANDROVA et al., 1998; TSIVILEVA et al., 2005), os mecanismos moleculares e bioquímicos da formação da capa micelial marrom ainda não estão claros (TANG et al., 2013).

Alguns trabalhos apontam o envolvimento da proteína lectina na formação da capa micelial marrom (TSIVILEVA et al., 2001; VETCHINKINA; SOKOLOV; NIKITINA, 2008), mas a formação dessa capa pode ser um evento muito complexo que envolve, além da participação da lectina, a participação de enzimas, tais como ligninases e tirosinase, bem como alterações morfológicas na parede celular, por meio de mudanças no teor de  $\beta$ -glucano, que é o principal constituinte da parede celular de cogumelos.

Dada a relevância da formação da capa micelial marrom para a formação de corpos de frutificação em shiitake, é importante investigar a dinâmica de produção de algumas enzimas e o teor de  $\beta$ -glucano ao longo do ciclo de cultivo, para verificar se algumas dessas macromoléculas podem estar, juntamente com a lectina, envolvidas na formação da capa micelial marrom.

O presente trabalho foi realizado com os seguintes objetivos: i) verificar a produção de lectina, ligninases e tirosinase, ao longo do ciclo de cultivo de seis linhagens de *Lentinula edodes*; ii) determinar o teor de  $\beta$ -glucano das linhagens ao longo do ciclo de cultivo; iii) determinar o consumo de celulose, hemicelulose e lignina de cada linhagem ao final do ciclo de cultivo; iv) comparar a produtividade das linhagens e v) comparar a composição centesimal, atividade antioxidante, atividade de lectina, lacase e tirosinase dos cogumelos das seis linhagens de *Lentinula edodes*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Cultivo de shiitake (*Lentinula edodes* Berk. Pegler)

O shiitake (*Lentinula edodes* Berk. Pegler) é o segundo cogumelo mais produzido no mundo, depois do champignon (*Agaricus bisporus*) (SZETO et al., 2008). É muito popular entre os consumidores de cogumelos e é valorizado como um cogumelo comestível de alta qualidade, apresentando alto valor gastronômico, destacando-se não só pelo seu agradável sabor como também por suas propriedades nutricionais e terapêuticas (MENOLLI JUNIOR; PACCOLA-MEIRELLES, 2010).

Seu cultivo teve início na China, por volta de 960 d.C. e, em 1500, foi introduzido no Japão pelos agricultores chineses (PRZYBYLOWICZ; DONOGHUE, 1991). Posteriormente, o plantio se expandiu para os demais países da Ásia Oriental, tornando-se um produto agrícola e industrial importante (CHANG; MILES, 1989).

*Lentinula edodes* (Berk) Pegler (shiitake) é, atualmente, produzido de duas formas: em toros, método tradicional utilizado há mais de 900 anos e em cultivo axênico, no qual são utilizados blocos de serragem suplementada com nutrientes (ZHANXI; ZHANHUA, 2001). O cultivo axênico, comparado com o cultivo em toros, tem a desvantagem do alto custo de esterilização e exige um controle ambiental rigoroso, além de mão de obra especializada. Por isso, no Brasil, o cultivo de shiitake por pequenos produtores tem sido realizado quase que exclusivamente em toros e, dentre as espécies arbóreas, o eucalipto é o mais utilizado (EIRA; MINHONI, 1996). Mas, o cultivo axênico em substratos sintéticos à base de diversos resíduos agrícolas vem ganhando espaço na produção comercial deste cogumelo, uma vez que a colheita acontece mais

rapidamente e a eficiência biológica do fungo é bastante elevada (PHILIPPOUSSIS; DIAMANTOPOULOU; ISRAILIDES, 2007).

Pelo menos quatro fases já foram identificadas durante o ciclo de cultivo do shiitake. São elas: crescimento micelial vegetativo, formação da capa micelial marrom, formação de primórdios e desenvolvimento dos corpos de frutificação (TANG et al., 2013) (Figura 1). O crescimento micelial refere-se ao crescimento imediatamente após a inoculação, até que o substrato seja completamente colonizado pelo fungo (CHANG; MILES, 1989). Nesta fase, o micélio absorve nutrientes, os quais serão utilizados na sua estrutura e na conversão da energia necessária para seu metabolismo e crescimento.



Figura 1 Etapas do ciclo de crescimento de *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler

Ao final do crescimento micelial começa a fase de estabilização e maturação do micélio, que vai até o endurecimento e o escurecimento da capa micelial, que se torna amarronzada (CHANG; MILES, 1989). A formação da capa micelial é muito importante, pois ela age como uma barreira à perda de umidade, sendo também uma defesa contra contaminações (PRZYBYLOWICZ; DONOGHUE, 1991). As áreas marrons são resultantes da síntese de melaninas. Esses pigmentos protegem contra a iluminação excessiva e reduzem a permeabilidade da parede celular a agentes tóxicos e patogênicos (LEATHAM; STAHMANN, 1981).

Ambas as fases de crescimento são afetadas pela proporção de lignina e celulose, bem como o teor de nitrogênio do substrato (PHILIPPOUSSIS; DIAMANTOPOULOU; ZERVAKIS, 2003). Para a degradação da lignicelulose, este fungo de podridão-branca secreta uma infinidade de enzimas hidrolíticas (celulases e hemicelulases) e oxidativas (ligninases) (KACHLISHVILI et al., 2005; MAKKAR et al., 2001).

Embora a formação da capa micelial marrom preceda o aparecimento dos corpos de frutificação (CHUM et al., 2008) e venha sendo descrita como uma etapa peculiar na morfogênese para shiitake (ALEKSANDROVA et al., 1998; TSIVILEVA et al., 2005), os mecanismos moleculares e bioquímicos da formação da capa micelial marrom ainda não estão claros (TANG et al., 2013).

## **2.2 Formação da capa micelial pigmentada**

Morfologia, ciclos de vida e genética do basidiomiceto *Lentinus edodes* (Berk.) Pegler se tornaram pontos de interesse da ciência apenas nas últimas três décadas, lançando as bases científicas dos métodos atuais de seleção e cultivo do cogumelo (PRZYBYLOWICZ et al., 1991). No entanto, os aspectos bioquímicos do desenvolvimento de *L. edodes* ainda não foram totalmente elucidados. Entre os metabólitos de basidiomicetos, as proteínas denominadas lectinas têm destaque importante.

O trabalho de Jeune et al. (1990) foi pioneiro nas descrições de lectinas de shiitake, utilizando o corpo de frutificação de *L. edodes* para o isolamento de lectina. Nos trabalhos anteriores foi estudada a atividade de lectina em cultura líquida e no micélio submerso de *L. edodes*, com o estabelecimento da especificidade de ligação das lectinas por carboidratos e explorando a atividade de lectina em relação a alguns fatores de cultivo (TSIVILEVA et al., 2001), como a formação da capa micelial pigmentada.

A capa micelial pigmentada tem se mostrado um tema atraente e interessante, a partir do aspecto da pesquisa e produção, uma vez que a formação dessa capa pode ser considerada um passo de morfogênese peculiar para shiitake, normalmente seguida pela formação de primórdios e, em seguida, de corpos de frutificação (ALEKSANDROVA et al., 1998).

O envolvimento de lectinas de *L. edodes* na formação da capa micelial pigmentada foi confirmado por alguns experimentos. Em primeiro lugar, foi elucidada a relação entre a atividade de lectina de extratos de micélios cultivados em vários meios sólidos e a frutificação desses micélios. Quanto maior foi o teor de lectina, mais rápida foi a formação da capa pigmentada e maior a atividade de lectina na capa formada (TSIVILEVA et al., 2001). Em segundo lugar, a atividade de lectina de *L. edodes* foi examinada em diferentes etapas da morfogênese. A atividade de lectina aumentou à medida que a morfologia foi alterada de micélio para capa micelial e, em seguida, diminuiu com a produção de primórdios e corpos de frutificação. Estes resultados foram observados em diferentes substratos (TSIVILEVA et al., 2001).

### **2.3 Lectina**

Durante o desenvolvimento do *Lentinula edodes*, ocorre diferenciação química sob a influência de vários fatores, que servem como base para a diferenciação morfogenética. Em resposta à mudança das condições de desenvolvimento, novas vias metabólicas se iniciam (BENNETT; CIEGLER, 1983). Para a assimilação do substrato e para o desenvolvimento e o crescimento de uma colônia, é requerida agregação micelial e o fungo precisa de mobilização e transporte de açúcares. Nesta fase, um papel importante é desempenhado por lectinas, que estão envolvidas no reconhecimento de carboidratos, ligação intercelular e transdução de sinal em sistema biológico (KONSKA, 2006).

Lectina é uma classe bem conhecida de proteínas de origem não imune que reconhecem estruturas de açúcares diversos e se ligam a eles com um elevado grau de estereoespecificidade de uma forma não catalítica (SHARON; LIS, 1989).

As lectinas têm sido encontradas em vários organismos e isoladas a partir de uma diversidade de plantas, animais e microrganismos, e desempenham muitos papéis importantes em seus processos de crescimento. A maioria das lectinas vegetais tem potencial papel na defesa, quando a planta ou a semente são atacadas por insetos e fungos (PEUMANS; DAMME, 1995). Algumas lectinas de leguminosas mediam a associação simbiótica entre leguminosas e bactérias fixadoras de nitrogênio. Lectinas que reconhecem  $\beta$ -galactosídeos de animais regulam a diferenciação e a formação de órgãos (SHARON; LIS, 1983).

Lectinas de plantas e animais têm sido muito estudadas (FUJII et al., 2009; KAUR; KAMBOJ; SINGH, 2006; OCCENA; MOJICA; MERCA, 2007; TANAKA; TOYAMA; AKASHI, 2009), porém, pouca informação sobre lectinas de fungos está disponível (KONSKA, 2006). A primeira lectina fúngica foi relatada por Kobert, em 1891, a partir de *Amanita phalloides* (HOREJSI; KOCOUREK, 1978) e, nos últimos anos, as lectinas de cogumelos e outros fungos têm atraído grande atenção, devido à sua atividade antitumoral, antiproliferativa e imunomoduladora (WANG; GAO; NG, 2000; WASSER; WEIS, 1999).

Devido à sua capacidade de reconhecer diferentes estruturas, as lectinas são um elemento importante do sistema biológico. Seu papel fisiológico está relacionado com a identificação de estruturas glicosiladas no nível de células, tecidos e organismos inteiros. Um dos seus papéis biológicos documentados anteriormente é a participação na formação de primórdios e na criação de estruturas de micélio para facilitar a penetração dos fungos parasitas no organismo hospedeiro, bem como micorrização, introduzindo alterações

morfológicas no hospedeiro e em dormência (KONSKA, 2006). Uma lectina pode estar envolvida no sentido de assegurar a coesão entre as hifas durante o desenvolvimento do basidioma, como se vê em *Pleurotus cornucopiae* (KANEKO et al., 1993).

## **2.4 Melanina**

Alguns fungos produzem pigmentos escuros, conhecidos como melaninas (ELLIS; GRIFFITHS, 1974). Esses pigmentos parecem ser essenciais para a proteção dos organismos contra o estresse ambiental. Em estudos *in vitro* foi demonstrado que fungos que produzem melanina são mais resistentes à luz ultravioleta, a temperaturas extremas e a enzimas hidrolíticas do que aqueles que não a produzem (BELL; WHEELER, 1986; DADACHOVA et al., 2007; SINGARAVELAN et al., 2008).

As melaninas são um grupo de diversas substâncias, tendo todas as propriedades semelhantes (BELL; WHEELER, 1986; HENSON; BUTLER; DAY, 1999; WHEELER; BELL, 1988). São macromoléculas formadas por polimerização oxidativa de compostos fenólicos ou indólicos (Figura 3). Muitas vezes, o que resulta são pigmentos marrons ou pretos, mas muitas outras cores também foram observadas (LANGFELDER et al., 2003).

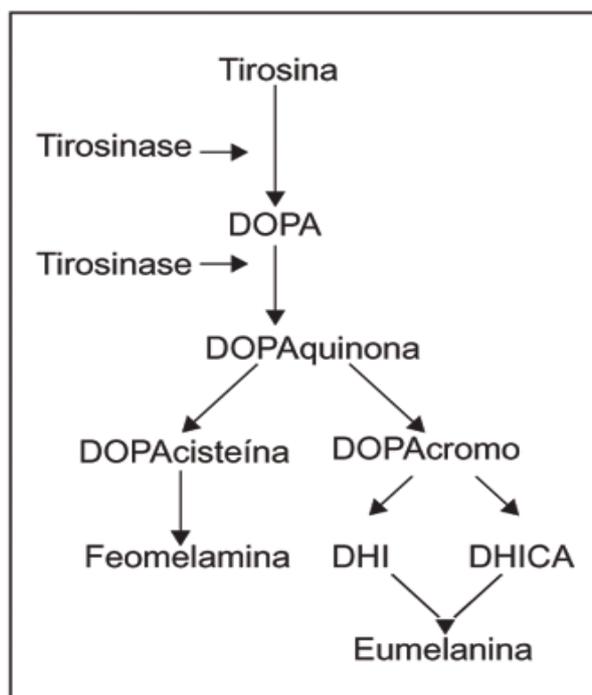


Figura 3 Biossíntese da melanina (ROCHA; MOREIRA, 2007)

Em geral, melaninas fúngicas são classificadas em quatro tipos:  $\beta$ -(3,4-di-hidroxifenil) alanina (DOPA) melanina derivada da tirosina,  $\gamma$ -glutaminil-3,4-di-hidroxibenzeno (GDHB) melanina derivada do  $\gamma$ -glutaminil-4-hidroxibenzeno (GHB), catecol melanina derivada do catecol e di-hidroxinaftaleno (DHN) (BELL; WHEELER, 1986). Em todos os casos, estes compostos fenólicos são oxidados enzimaticamente a quinonas, que polimerizam por meios não enzimáticos para formar os pigmentos de melanina. A oxidação destes compostos fenólicos é, geralmente, catalisada por tirosinase (Tyr; EC 1.14.18.1) (NAGAI et al., 2003).

Estudos apontam para a ligação entre a produção de um complexo de enzimas, em alguns fungos, incluindo *Lentinula edodes*, e a síntese de melaninas

na formação de estruturas, tais como a capa micelial. A capa micelial é uma estrutura densa rica em pigmentos, que parece realizar uma função de proteção, no início da formação do corpo de frutificação. A formação do corpo de frutificação é, muitas vezes, acompanhada pela atividade de fenol oxidases. Este processo, por sua vez, está intimamente relacionado com a formação de pigmentos extracelulares e prossegue em paralelo com a polimerização oxidativa dos componentes da parede celular e o reforço da adesão intercelular (LEATHAM; STAHMANN, 1981).

## 2.5 Tirosinases

Tirosinases (EC 1. 14. 18. 1) pertencem a um grande grupo de proteínas que estão envolvidas no passo inicial da síntese de melanina pela oxidação de fenóis. A particularidade das tirosinases é catalisar a hidroxilação de monofenóis e da subsequente oxidação dos difenóis resultantes em quinonas, usando oxigênio molecular para ambas as reações (Figura 4). Posteriormente, as quinonas sofrem reações não enzimáticas, produzindo pigmentos castanho-escuros (SOLER-RIVAS et al., 1999).

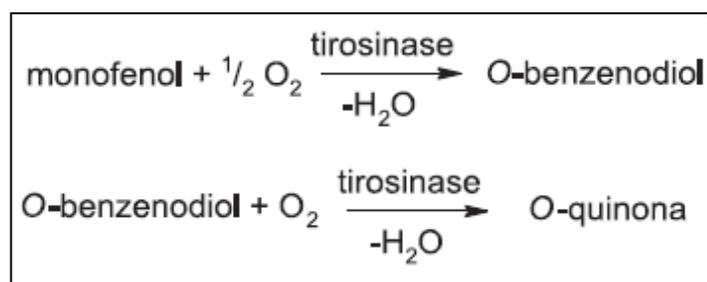


Figura 4 Reações catalisadas pela tirosinase (MARQUES; YAMANAKA, 2008)

As tirosinases são encontradas em uma vasta gama de organismos, incluindo microrganismos procariotos e eucariotos, plantas, invertebrados e mamíferos, e estão envolvidas em uma variedade de funções biológicas, como pigmentação da pele em mamíferos, escurecimento em plantas e cogumelos e sistemas de defesa em artrópodes (CLAUS; DECKER, 2006; JOLIVET et al., 1998; WANG; HEBERT, 2006).

Foram, primeiramente, caracterizadas em mamíferos, pelo seu papel no desenvolvimento de melanomas e por sua implicação em problemas na pigmentação, como o albinismo e o vitiligo (RILEY, 1997). Em fungos, são, geralmente, associadas com a formação e a estabilidade de esporos, com mecanismos de defesa e virulência e também com escurecimento e pigmentação (KURAHASHI; PONTZEN, 1998; SOLER-RIVAS et al., 1999).

Durante as últimas décadas, os estudos foram essencialmente voltados para tirosinases do basidiomiceto *Agaricus bisporus* (ROBB; GUTTERIDGE, 1981; WICHERS et al., 2003; WICHERS; GERRITSEN; CHAPELON, 1996). A maioria deles era especialmente motivada pelo escurecimento enzimático do cogumelo durante o desenvolvimento e o armazenamento pós-colheita, o que, particularmente, diminui o valor comercial do produto (JOLIVET et al., 1998). Outros estudos sobre tirosinases de outros fungos, tais como *Neurospora crassa* (KUPPER et al., 1989), *Lentinula edodes* (KANDA et al., 1996) e *Aspergillus oryzae* (NAKAMURA et al., 2000), deram novas informações sobre características bioquímicas e moleculares das tirosinases fúngicas.

Potenciais aplicações biotecnológicas de tirosinases em tratamento de águas residuais (DURAN; ESPOSITO, 2000) e síntese de medicamentos de alto valor agregado (HAQ; ALI; QADEER, 2002) têm resultado em um aumento do interesse por essas enzimas.

## 2.6 Lignina, celulose e hemicelulose

*Lentinula edodes* (Berk) Pegler tem a capacidade de se desenvolver em substratos lignocelulósicos. Lignocelulose é um complexo macromolecular, consistindo de lignina, celulose e hemicelulose. A lignina é composta de heteropolímeros resultantes do acoplamento oxidativo de três p-hidroxicinamil álcoois monolignóis: p-cumaril, coniferil e sinapil álcoois. O principal papel da lignina é proteger os polissacarídeos da parede celular contra o ataque hidrolítico por microorganismos saprófitas e patogênicos. Por conseguinte, a degradação da lignina é o passo chave para a transformação de lignocelulose. A recalcitrância da lignina contra a biodegradação deve-se à sua natureza volumosa e aromática que limita a acessibilidade de enzimas microbianas e diminui a sua biodegradabilidade (HERNÁNDEZ-ORTEGA; FERREIRA; MARTÍNEZ, 2012; HUANG et al., 2008; PÉREZ et al., 2002; VANHOLME et al., 2010).

Celulose, um homopolímero linear de unidades de  $\beta$ -1,4-glucopiranosose com inúmeras ligações de hidrogênio inter e intramoleculares, é altamente resistente à dissolução em água e em solventes orgânicos comuns.

As hemiceluloses são polissacarídeos de cadeia curta ramificados, com uma estrutura amorfa compreendendo diferentes monossacarídeos, que variam entre as espécies de plantas (KING et al., 2009).

A alta cristalinidade da celulose, complexas ligações químicas cruzadas entre os componentes e o revestimento da celulose pela hemicelulose e lignina, todos contribuem para a difícil degradação da lignocelulose para o tratamento químico, o qual limita a sua utilização e impede a conversão economicamente viável em produtos de valor agregado (MOSIER et al., 2005).

Atualmente, muita atenção tem sido dada à degradação da lignocelulose utilizando micro-organismos, devido à sua capacidade única de degradar

lignocelulose (HUANG et al., 2010). A biodegradação da lignina resulta da ação de enzimas extracelulares microbianas, incluindo lacase (Lac), lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e várias outras peroxidases, como peroxidase versátil (VP). Estas enzimas são responsáveis pela geração de radicais livres altamente reativos e não específicos que contribuem para a degradação da lignina (MARTÍNEZ et al., 2005).

## **2.7 Ligninases**

Os fungos filamentosos desempenham papel importante na decomposição de lignocelulose. Existem três tipos de fungos que vivem em madeira morta que efetivamente degradam uma ou mais componentes da madeira: fungos de podridão-mole, fungos de podridão-marrom e fungos de podridão-branca. Os fungos de podridão-mole, assim como os de podridão-marrom, podem degradar a celulose, mas degradam a lignina apenas parcialmente (CANNON; KIRK, 2007). Já os fungos de podridão-branca, que são, principalmente, basidiomicetos, são dotados de um sistema lignilítico constituído de peroxidases (lignina peroxidase e manganês peroxidase) e lacase que está diretamente envolvido na degradação da lignina (ABRAHÃO et al., 2008). Alguns fungos que degradam a madeira contêm todas as três enzimas modificadoras de lignina, enquanto os outros contêm apenas uma ou duas destas enzimas (DHOUIB et al., 2005).

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

LiP (lignina peroxidase; EC 1.11.1.16) é uma heme peroxidase classificada na classe II da superfamília de peroxidases de plantas, fungos e

bactérias (RUIZ-DUEÑAS; MARTÍNEZ, 2010). É uma enzima de interesse biotecnológico, devido ao seu elevado potencial redox e à capacidade de oxidar moléculas grandes (MARTÍNEZ et al., 2009; RUIZ-DUEÑAS; MARTÍNEZ, 2009, 2010). Essa enzima tem papel central na biodegradação dos constituintes da parede celular vegetal. LiP catalisa a despolimerização  $H_2O_2$ -dependente de uma variedade de compostos da lignina não fenólicos, diarilpropano e uma grande variedade de compostos fenólicos, como, por exemplo, guaiacol, álcool vanílico, catecol e ácido sirínico (WONG, 2009).

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

Lignina peroxidase foi a primeira enzima descoberta que catalisa a despolimerização parcial da lignina *in vitro* (TIEN; KIRK, 1983). Desde a sua descoberta em *Phanerochaete chrysosporium*, mais LiP foram encontradas em diferentes cepas de *P.chrysosporium* (RENGANATHAN; MIKI; GOLD, 1985; TIEN; KIRK, 1984) e outros fungos de podridão-branca, como *Trametes versicolor* (JOHANSSON; WELINDER; NYMAN, 1993). Além disso, genes de LiP foram detectados em diferentes espécies de fungos, incluindo *Panus* sp., *P. coccineus*, *P. sanguineus* e *Perenniporia medula* (POINTING et al., 2005). *Lentinula edodes* apresentou atividade de LiP em meio contendo extrato de malte como fonte de carbono (ESPOSITO; CANHOS; DURDN, 1991). LiP foi também detectada em algumas bactérias, tais como *Acinetobacter calcoaceticus*

NCIM 2890 (GHODAKE et al., 2009) e *Streptomyces viridosporus* T7A (GOTTSCHALK; BON; NOBREGA, 2008).

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

Lacases (benzenodiol: oxigênio oxidoredutases, EC 1.10.3.2) pertencem à família das multicobre oxidoredutases que catalisam a oxidação de uma variedade de substratos aromáticos por meio da redução de oxigênio à água (PAOLA, 2010). As lacases são amplamente distribuídas em muitas bactérias, fungos e plantas (BALDRIAN et al., 2006). É uma enzima que é capaz de atuar em um amplo espectro de substratos, podendo, esses substratos, ser expandidos consideravelmente na presença de mediadores de oxidação-redução adequados (CAMARERO et al., 2005). Portanto, lacases têm um potencial promissor em muitas aplicações industriais e de biotecnologia (COUTO; HERRERA, 2006).

Na maioria das vezes, lacases foram encontradas e estudadas em fungos de podridão-branca, como *Lentinus tigrinus* (FERRARONI et al., 2007), *Pleurotus ostreatus* D1 (POZDNIAKOVA et al., 2006), *Cerrena unicolor* estirpe 137 (MICHNIEWICZ et al., 2006), *T. versicolor* (NECOCHEA et al., 2005), *Trametes* sp. linhagem AH28-2 (XIAO et al., 2003), *Trametes pubescens* (SHLEEV et al., 2007) e *Cyathus bulleri* (SALONY; BISARIA, 2006).

Estudos têm apontado para o envolvimento de lacase na formação do filme micelial marrom (TANG et al., 2013). A formação do filme micelial marrom é acelerada pelo oxigênio e o envolvimento de lacase pode ser considerado pela formação de gotículas de água em consequência da oxidação de compostos fenólicos acoplada à redução de oxigênio à água (RODGERS et al., 2010). Estudos anteriores também ligaram lacases com o desenvolvimento do corpo de frutificação (CHEN; GE; BUSWELL, 2004; OHGA et al., 2000) e a produção de pigmentos em cogumelos comestíveis (LEATHAM; STAHMANN, 1981).

### 2.7.3 Manganês peroxidase [Mn (II): hidrogeno-peróxido oxidorredutases, EC 1.11.1.13) – MnP

Manganês peroxidases são glicoproteínas heme que têm a capacidade de catalisar a oxidação de  $Mn^{+2}$  para  $Mn^{+3}$ . O  $Mn^{+3}$  complexa com ácidos orgânicos que, por sua vez, oxida estruturas fenólicas presentes na lignina e também compostos relacionados com a lignina (TAKANO; NAKAMURA; YAMAGUCHI, 2010). Na natureza, manganês peroxidase catalisa a despolimerização da lignina, juntamente com um complexo de enzimas lignolíticas. Como tem a capacidade de oxidar uma ampla gama de substratos, se torna uma enzima interessante para aplicações biotecnológicas em diversas indústrias (IQBAL; ASGHER, 2013).

Desde a descoberta de manganês peroxidase em *Phanerochaete chrysosporium* (GLENN; GOLD, 1985), mais manganês peroxidases foram encontradas em basidiomicetos, tais como *Panus tigrinus* (LISOV; LEOTIEVSKY; GOLOVLEVA, 2003), *Lenzites betulinus* (HOSHINO et al., 2002), *Phanerochaete flavido-alba* (RUBIA et al., 2002), *Agaricus bisporus* (LANKINEN et al., 2001), *Bjerkandera* sp. (PALMA et al., 2000) e *Nematoloma frowardii* b19 (HILDEN et al., 2008). *Lentinula edodes* tem sido descrito como um bom produtor de manganês peroxidase (BOER et al., 2006).

*L. edodes* secreta enzimas, lacase e manganês peroxidase, que degradam a lignina, em meios à base de serragem (BUSWELL; CAI; CHANG, 1995; LEATHAM, 1985; MAKKER et al., 2001; TOKIMOTO et al., 1987), mas não normalmente em meios líquidos. Sakamoto et al. (2009) verificaram que a principal isoenzima produzida por *L. edodes* em meios de serragem foi manganês peroxidase lemp2. Este achado sugere que estas enzimas desempenham papel importante na degradação da serragem durante o cultivo e a

expressão e as propriedades das enzimas influenciam o crescimento micelial e o desenvolvimento de corpos de frutificação (WOOD; MATCHAM; FERMOR, 1988).

## **2.8 Importância nutricional e composição centesimal de cogumelos**

Os cogumelos comestíveis são excelentes alimentos que podem ser incorporados em dietas bem balanceadas devido ao baixo teor de gordura, energia e alto teor de fibra alimentar e compostos funcionais (BRENE, 2010; MANZI; AQUZZI; PIZOFERRATO, 2001). O shiitake (*Lentinula edodes*) tem alto valor nutricional e contém diversos compostos bioativos, incluindo polissacarídeos, antioxidantes, fibras dietéticas, ergosterol, vitaminas B1, B2 e C, folatos, niacina e minerais (MATTILA; SUONPAA; PIIRONEN, 2000). A composição de nutrientes de alguns cogumelos selecionados pode ser observada na Tabela 1.

Em geral, o teor de proteína bruta de cogumelos comestíveis varia consideravelmente e vai de 15% a 35% do peso seco, dependendo das espécies, das variedades e do estágio de desenvolvimento do corpo de frutificação (LONGVAH; DEOSTHALE, 1998; MANZI et al., 1999; MDACHI et al., 2003). Eles têm baixo teor de lipídeos, normalmente menos que 5% do peso seco (YILMAZ et al., 2006). Os cogumelos são, portanto, uma excelente fonte de proteínas e fibras e um alimento que contém baixo teor de lipídeos.

O conteúdo de carboidrato total de cogumelos, incluindo de carboidratos digeríveis e não digeríveis, varia com a espécie, entre 35% a 70% do peso seco (LONGVAH; DEOSTHALE, 1998; MAU et al., 2001). Carboidratos de fácil digestão encontrados em cogumelos incluem manitol e glicose, geralmente presentes em quantidades muito pequenas (menos de 1% do peso seco) e glicogênio (5%-10% do peso seco). Carboidratos de cogumelos, por

consequente, não são uma importante fonte de energia para os seres humanos. Carboidratos não digeríveis incluem oligossacarídeos, como trealose e polissacarídeos não amiláceos, tais como quitina,  $\beta$ -glucanos e mananas, que são a maior parte dos carboidratos de cogumelos. Os carboidratos não amiláceos de cogumelos podem ser considerados como fibra dietética, a qual pode trazer benefícios fisiológicos para os seres humanos (DÍEZ; ALVAREZ, 2001).

O teor de cinzas dos cogumelos comestíveis varia de 6% a 11% do peso seco e contém uma grande variedade de minerais (ZAKHARY et al., 1983). Cogumelos comestíveis, tais como *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes* e *Agaricus bisporus*, têm sido relatados contendo variados teores de potássio (2.700-4.700 mg/100 g), fósforo (500-1.400 mg/100 g do peso seco), magnésio (20-200 mg/100 g), zinco (4,7-9,2 mg/100 g) e cobre (0,50-3,5 mg/100 g do peso seco) (VERMA et al., 1987; VETTER, 1990; ZAKHARY et al., 1983).

Os cogumelos são valiosos na alimentação, na medicina e como nutracêuticos. Eles contêm uma variedade de nutrientes e compostos bioativos que proporcionam benefícios à saúde (LAKHANPAL; RANA, 2005).

Tabela 1 Composição centesimal de algumas espécies de cogumelos comuns que podem ser utilizadas como alimento.  
Adaptado de Cheung (2010)

<b>Espécie</b>	<b>Proteínas<sup>†</sup></b>	<b>Lipídeos</b>	<b>Carboidratos<sup>‡</sup></b>	<b>Fibras<sup>¥</sup></b>	<b>Cinzas</b>
<i>Agaricus bisporus</i>	23,9-34,8	1,7-8,0	51,3-62,5	8,0-10,4	7,7-12,0
<i>Agaricus blazei</i>	26,7	2,6	45,5	18,3	6,8
<i>Auricularia auricula-judae</i>	8,1	1,5	81,0	6,9	9,4
<i>Boletus edulis</i>	29,7	3,1	51,7	8,0	5,3
<i>Cantharellus cibarius</i>	21,5	5,0	64,9	11,2	8,6
<i>Cordyceps sinensis</i>	21,9	8,2	21,2	n.d. <sup>¶</sup>	2,9
<i>Ganoderma tsugae</i>	8,8	5,7	10,4	73,4	1,7
<i>Grifola frondosa</i>	21,1	3,1	58,8	10,1	7,0
<i>Hericiium erinaceus</i>	22,3	3,5	57,0	7,8	9,4
<i>Lentinus edodes</i>	13,4-17,5	4,9-8,0	67,5-78	7,3-8,0	3,7-7,0
<i>Pleurotus ostreatus</i>	10,5-30,4	1,6-2,2	57,6-81,8	7,5-8,7	6,1-9,8
<i>Tremella fuciformis</i>	4,6	0,2	94,8	1,4	0,4
<i>Tricholoma giganteum</i>	16,1	4,3	70,1	4,5	5,0
<i>Tuber melanosporum</i>	23,3	2,2	66,2	27,9	8,3
<i>Volvariella volvacea</i>	30,1	6,4	50,9	11,9	12,6

\*Todos os dados foram apresentados como porcentagem em matéria seca

<sup>†</sup>O fator de nitrogênio utilizado para o cálculo de proteína foi de 4,38

<sup>‡</sup>O teor de carboidrato foi calculado por diferença

<sup>¥</sup>As fibras contêm, principalmente, a fração insolúvel

<sup>¶</sup>n.d. não determinado.

## 2.9 $\beta$ -glucano

$\beta$ -glucanos são polissacárideos de cadeia longa presentes nas células da parede celular de fungos, leveduras, algumas bactérias e plantas. Eles não são encontrados em animais e, por isso, estes carboidratos podem ser reconhecidos pelo sistema imunológico de vertebrados (BROWN; GORDON, 2003). Eles podem diretamente ativar os leucócitos e os fagócitos (SMIDERLE et al., 2008) e também estimular os mediadores pró-inflamatórios, como citocinas e quimiocinas (SCHEPERKIN; QUINN, 2006) e têm atividade antitumoral (MIZUNO et al., 1990), antioxidante (TOKLU et al., 2006), anti-inflamatória (DORE et al., 2007) e imunomodulante (ZHANG et al., 2007).

Vários polissacárideos de cogumelos com imunopotencial foram relatados. Um polissacárideo biologicamente ativo, lentinan, de *Lentinula edodes*, contendo (1-3)(1-6)- $\beta$ -D-glucano, é utilizado para a terapia do câncer (SASAKI; TAKASURA, 1976).

A estrutura da parede celular dos fungos está constantemente em mudança durante o crescimento micelial e no ciclo celular. As alterações morfológicas envolvendo a síntese, a reorientação e a lise da estrutura da parede celular é um processo essencial em fungos (ENDERLIN; SELITRENNIKOFF, 1994; SEILER; PLAMANN, 2003). A parede celular forma um complexo de múltiplas camadas de polissacáridos, glicoproteínas e proteínas com ligações cruzadas. Os polissacárideos consistem de  $\beta$ -glucanas (principalmente  $\beta$ -1,3-glucano e  $\beta$ -1, 6-glucano), quitina, quitosana, manana e  $\alpha$ -glucanas (AIMANIANDA et al., 2009; FONTAINE et al., 2000).

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo do ciclo de vida de *Lentinula edodes* (Berk) Pegler é muito importante para estabelecer quais são os fatores determinantes para a formação da capa micelial marrom e dos corpos de frutificação e esse estudo deve ser realizado nas reais condições de cultivo desse cogumelo, dada a carência de estudos nessas condições. A formação da capa micelial marrom e dos corpos de frutificação é evento complexo que pode envolver a participação de várias moléculas, como enzimas, proteínas e carboidratos.

As informações obtidas neste trabalho são importantes para o melhor entendimento do ciclo de cultivo de *Lentinula edodes*.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, M. C. et al. Ligninolytic activity from newly isolated basidiomycete strains and effect of these enzymes on the azo dye orange II decolourisation. **Annals of Microbiology**, Berlin, v. 58, n. 3, p. 427-432, Sept. 2008.
- AIMANIANDA, V. et al. Cell wall  $\beta$ -(1,6)-glucan of *Saccharomyces cerevisiae*: structural characterization and in situ synthesis. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 284, n. 20, p. 13401-13012, May 2009.
- ALEKSANDROVA, E. A. et al. Obtaining of fruiting bodies and submerged mycelium of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler]. **Microbiology**, New York, v. 67, p. 535-539, Feb. 1998.
- BALDRIAN, P. Fungal laccases-occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 30, n. 2, p. 215-242, Mar. 2006.
- BELL, A. A.; WHEELER, M. H. Biosynthesis and functions of fungal melanins. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 24, p. 411-451, 1986.
- BENNETT, J. W.; CIEGLER, A. **Secondary metabolism and differentiation in fungi**. New York: CRC, 1983. 504 p.
- BOER, C. G. et al. Purification and some properties of Mn peroxidase from *Lentinula edodes*. **Process Biochemistry**, London, v. 41, n. 5, p. 1203-1207, May 2006.
- BRENE, W. M. Nutritional and medicinal value of specially mushrooms. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 53, n. 10, p. 883-894, 2010.

- BROWN, G. D.; GORDON, S. Fungal  $\beta$ -glucans and mammalian immunity. **Immunology**, Oxford, v. 19, n. 3, p. 311-315, Sept. 2003.
- BUSWELL, J. A.; CAI, Y. J.; CHANG, S. T. Effect of nutrient and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 128, n. 1, p. 81-88, Apr. 1995.
- CAMARERO, S. et al. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 4, p. 1775-1784, Apr. 2005.
- CANNON, P. F.; KIRK, P. M. **Fungal families of the world**. Wallingford: CABI, 2007. 456 p.
- CHANG, S. T.; MILES, P. G. **Edible mushrooms and their cultivation**. Boca Raton: CRC, 1989. 345 p.
- CHEN, S. C.; GE, W.; BUSWELL, J. A. Molecular cloning of a new laccase from the edible straw mushroom *Volvariella volvacea*: possible involvement in fruit body development. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 230, n. 2, p. 171-176, Jan. 2004.
- CHEUNG, P. C. K. The nutritional and health benefits of mushrooms. **Nutrition Bulletin**, Davis, v. 35, n. 4, p. 292-299, Nov. 2010.
- CHUM, W. W. Y. et al. Gene expression studies of the dikaryotic mycelium and primordium of *Lentinula edodes* by serial analysis of gene expression. **Mycological Research**, Cambridge, v. 112, n. 8, p. 950-964, Aug. 2008.
- CLAUS, H.; DECKER, H. Bacterial tyrosinases. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 29, n. 1, p. 3-14, 2006.

COUTO, S. R.; HERRERA, J. L. T. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. **Biotechnology Advances**, New York, v. 24, n. 5, p. 500-513, Sept. 2006.

DADACHOVA, E. et al. Ionizing radiation changes the electronic properties of melanin and enhances the growth of melanized fungi. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 2, n. 5, p. 457-470, 2007.

DHOUIB, A. et al. Screening for ligninolytic enzyme production by diverse fungi from Tunisia. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 21, n. 8/9, p. 1415-1423, Dec. 2005.

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.

DORE, C. M. P. G. et al. Antiinflammatory, antioxidant and cytotoxic actions of  $\beta$ -glucan-rich extract from *Geastrum saccatum* mushroom. **International Immunopharmacology**, New York, v. 7, n. 9, p. 1160-1169, Sept. 2007.

DURAN, N.; ESPOSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B: Environmental**, Amsterdam, v. 28, n. 2, p. 83-99, 2000.

EIRA, A. F.; MINHONI, M. T. A. **Cultivo de cogumelos comestíveis**. Botucatu: Instituto de Economia Associativa, 1996. 68 p.

ELLIS, D. H.; GRIFFITHS, D. A. The location and analysis of melanins in the cell walls of some soil fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 20, n. 10, p. 1379-1386, 1974.

ENDERLIN, C. S.; SELITRENNIKOFF, C. P. Cloning and characterization of a *Neurospora crassa* gene required for (1,3) $\beta$ -glucan synthase activity and cell wall formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, n. 20, p. 9500-9504, Sept. 1994.

ESPOSITO, E.; CANHOS, V. P.; DURDN, N. Screening of lignin-degrading fungi for removal of color from kraft mill wastewater with no additional extra carbon-source. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 13, n. 8, p. 571-576, Aug. 1991.

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

FONTAINE, T. et al. Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, n. 36, p. 27594-27607, Sept. 2000.

FUJII, Y. et al. Purification and characterization of a d-galactoside-binding lectin purified from bladder moon shell (*Glossaulax didyma* Roding). **Journal of Biological Sciences**, Singapore, v. 9, n. 4, p. 319-325, 2009.

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

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

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

HAQ, I.; ALI, S.; QADEER, M. A. Biosynthesis of L-DOPA by *Aspergillus oryzae*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 85, n. 1, p. 25-29, 2002.

HENSON, J. M.; BUTLER, M. J.; DAY, A. W. The dark side of the mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 447-471, 1999.

HERNÁNDEZ-ORTEGA, A.; FERREIRA, P.; MARTÍNEZ, A. T. Fungal aryl-alcohol oxidase: a peroxide-producing flavoenzyme involved in lignin degradation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 93, n. 4, p. 1395-1410, Feb. 2012.

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

HOREJSI, V.; KOCOUREK, J. Studies on lectins: properties of some lectins prepared by affinity chromatography on O-glycosyl polyacrylamide gels. **Biochimica et Biophysica Acta**, Alberta, v. 538, n. 2, p. 299-315, 1978.

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

HUANG, D. L. et al. Changes of microbial population structure related to lignin degradation during lignocellulosic waste composting. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 11, p. 4062-4067, June 2010.

HUANG, D. L. et al. Degradation of lead-contaminated lignocellulosic waste by *P. chrysosporium* and the reduction of lead toxicity. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 42, n. 13, p. 4946-4951, July 2008.

IQBAL, H. M. N.; ASGHER, M. Decolorization applicability of sol-gel matrix immobilized manganese peroxidase produced from an indigenous white rot fungal strain *Ganoderma lucidum*. **BMC Biotechnology**, London, v. 13, n. 56,

July 2013. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1472-6750/13/56>>. Acesso em: 10 mar. 2014.

JEUNE, K. H. et al. Studies on lectins from Korean higher fungi: IV., a mitogenic lectin from the mushroom *Lentinus edodes*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 56, n. 6, p. 592-595, 1990.

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

JOLIVET, S. et al. *Agaricus bisporus* browning: a review. **Mycological Research**, Santiago, v. 102, n. 12, p. 1459-1483, 1998.

KACHLISHVILI, E. et al. Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 22, n. 4, p. 391-397, Apr. 2005.

KANDA, K. et al. Purification and properties of tyrosinase isozymes from the gill of *Lentinus edodes* fruiting body. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 60, n. 8, p. 1273-1278, 1996.

KANEKO, T. et al. Developmental appearance of lectin during fruit body formation in *Pleurotus cornucopiae*. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 39, n. 1, p. 83-90, 1993.

KAUR, A.; KAMBOJ, S. S.; SINGH, J. Isolation of a new lectin from the bulbs of *Crinum latifolium* (L.). **Journal of Biological Sciences**, Singapore, v. 6, n. 1, p. 9-14, 2006.

KING, A. W. T. et al. Hydrophobic interactions determining functionalized lignocellulose solubility in dialkylimidazolium chlorides, as probed by P-31 NMR. **Biomacromolecules**, London, v. 10, n. 2, p. 458-463, Feb. 2009.

KONSKA, G. Lectins of higher fungi (Macromycetes)-their occurrence, physiological role, and biological activity. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, Redding, v. 8, n. 1, p. 19-30, 2006.

KUPPER, U. et al. Isolation and characterization of the tyrosinase gene from *Neurospora crassa*. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 264, n. 29, p. 17250-17258, 1989.

KURAHASHI, Y.; PONTZEN, R. Carpropamid: a new melanin biosynthesis inhibitor. **Pfanzenschutz-Nachrichten Bayer**, Stuttgart, v. 51, n. 3, p. 245-256, 1998.

LAKHANPAL, T. N.; RANA, M. Medicinal and nutraceutical genetic resources of mushrooms. **Plant Genetic Research**, Cambridge, v. 3, n. 2, p. 288-303, Aug. 2005.

LANGFELDER, K. et al. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 38, n. 2, p. 143-158, 2003.

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

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

LEATHAM, G. F.; STAHMANN, M. A. Studies on the laccase of *Lentinus edodes*: specificity, localization and association with the development of fruiting bodies. **Journal of General Microbiology**, London, v. 125, p. 147-157, 1981.

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

LONGVAH, T.; DEOSTHALE, Y. G. Composition and nutritional studies on edible wild mushroom from northeast India. **Food Chemistry**, Oxford, v. 63, n. 3, p. 331-334, Dec. 1998.

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

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

MANZI, P. et al. Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. **Food Chemistry**, Oxford, v. 65, n. 4, p. 477-482, June 1999.

MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1791-1799, 2008.

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

MARTÍNEZ, A. T. et al. Enzymatic delignification of plant cell wall: from nature to mill. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 20, n. 3, p. 348-357, June 2009.

MATTILA, P.; SUONPAA, K.; PIIRONEN, V. Functional properties of edible mushrooms. **Nutrition**, Philadelphia, v. 16, n. 7/8, p. 694-696, July/Aug. 2000.

MAU, J. L. et al. Non-volatile taste components of several specialty mushrooms. **Food Chemistry**, Oxford, v. 73, n. 4, p. 461-466, June 2001.

MDACHI, S. J. M. et al. Amino acid composition of some Tanzanian wild mushrooms. **Food Chemistry**, Oxford, v. 86, n. 2, p. 179-182, June 2003.

MENOLLI JUNIOR, N.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Obtention of *Lentinula edodes* strains resistant to high temperatures and selection of strains resistant to *Trichoderma* sp. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, p. 1640-1646, dez. 2010. Edição especial.

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

MIZUNO, T. et al. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from Himematsutake, from the fruiting body of *Agaricus blazei* *Murill.* **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 54, n. 11, p. 2889-2896, 1990.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, n. 6, p. 673-686, Apr. 2005.

NAGAI, M. et al. Important role of fungal intracellular laccase for melanin synthesis: purification and characterization of an intracellular laccase from *Lentinula edodes* fruit bodies. **Microbiology**, New York, v. 149, n. 9, p. 2455-2462, 2003.

NAKAMURA, M. et al. Identification of copper ligands in *Aspergillus oryzae* tyrosinase by site-directed mutagenesis. **Biochemical Journal**, London, v. 350, n. 2, p. 537-545, 2000.

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

OCCENA, I. V.; MOJICA, E. R. E.; MERCA, F. E. Isolation and partial characterization of a lectin from the seeds of *Artocarpus camansi* Blanco. **Asian Journal of Plant Sciences**, Beijing, v. 6, n. 5, p. 757-764, 2007.

OHGA, S. et al. Transcriptional regulation of laccase and cellulase in relation to fruit body formation in the mycelium of *Lentinula edodes* on a sawdust-based substrate. **Mycoscience**, Tokyo, v. 41, n. 2, p. 149-153, Apr. 2000.

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

PAOLA, G. Laccases: a never-ending story. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 67, n. 3, p. 369-385, Feb. 2010.

PÉREZ, J. et al. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **International Microbiology**, Madrid, v. 5, n. 2, p. 53-63, June 2002.

PEUMANS, W. J.; DAMME, E. J. M. V. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 109, n. 2, p. 347-352, 1995.

PHILIPPOUSSIS, A.; DIAMANTOPOULOU, P.; ISRAILIDES, C. Productivity of agricultural residues used for the cultivation of the medicinal fungus *Lentinula edodes*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Birmingham, v. 59, n. 3, p. 216-219, Apr. 2007.

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

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

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

PRZYBYLOWICZ, P.; DONOGHUE, J. **Shiitake growers handbook: the art and science of mushroom cultivation**. Dubuque: Kendall, 1991. 217 p.

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

RILEY, P. A. Molecules in focus: melanin. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Exeter, v. 29, n. 11, p. 1235-1239, 1997.

ROBB, D. A.; GUTTERIDGE, S. Polypeptide composition of two fungal tyrosinases. **Phytochemistry**, Saint Paul, v. 20, n. 7, p. 1481-1485, 1981.

ROCHA, L. M.; MOREIRA, L. M. A. Diagnóstico laboratorial do albinismo oculocutâneo. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 1, p. 25-30, 2007.

RODGERS, C. J. et al. Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 28, n. 2, p. 63-72, Feb. 2010.

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

RUIZ-DUEÑAS, F. J.; MARTÍNEZ, A. T. Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. **Microbial Biotechnology**, New York, v. 2, n. 2, p. 164-177, Mar. 2009.

RUIZ-DUEÑAS, F. J.; MARTÍNEZ, A. T. **Structural and functional features of peroxidases with a potential as industrial biocatalysts**. Berlin: Springer, 2010. 23 p.

SAKAMOTO, Y. et al. Cloning of *Lentinula edodes* lemnp2, a manganese peroxidase that is secreted abundantly in sawdust medium. **Mycoscience**, Tokyo, v. 50, n. 2, p. 116-122, Mar. 2009.

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

SASAKI, T.; TAKASURA, N. Further study of the structure of lentinan, an anti-tumor polysaccharide from *Lentinus edodes*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 47, n. 1, p. 99-104, Mar. 1976.

SCHEPERKIN, I. A.; QUINN, M. T. Botanical polysaccharides: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **International Immunopharmacology**, New York, v. 6, n. 3, p. 317-333, Mar. 2006.

SEILER, S.; PLAMANN, M. The genetic basis of cellular morphogenesis in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Molecular Biology of the Cell**, San Francisco, v. 14, n. 11, p. 4352-4364, Nov. 2003.

SHARON, N.; LIS, H. Lectin receptors as lymphocyte surface markers. **Advances in Immunology**, Oxford, v. 34, p. 213-298, 1983.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science**, New York, v. 246, n. 4927, p. 227-234, 1989.

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

SINGARAVELA, N. N. et al. Adaptive melanin response of the soil fungus *Aspergillus niger* to UV radiation stress at "evolution canyon", Mount Carmel, Israel. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 3, n. 8, p. 2993-2998, 2008.

SMIDERLE, F. R. et al. Anti-inflammatory and analgesic properties in a rodent model of a (1-3), (1-6)-linked  $\beta$ -glucan isolated from *Pleurotus pulmonarius*. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 597, n. 1/3, p. 86-91, Nov. 2008.

SOLER-RIVAS, C. et al. Biochemical and physiological aspects of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 23, n. 5, p. 591-614, 1999.

SZETO, C. Y. Y. et al. Isolation and transcript analysis of two-component histidine kinase gene *Le.nik1* in Shiitake mushroom, *Lentinula edodes*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 112, n. 1, p. 108-116, Jan. 2008.

TAKANO, M.; NAKAMURA, M.; YAMAGUCHI, M. Glyoxal oxidase supplies hydrogen peroxide at hyphal tips and on hyphal wall to manganese peroxidase of white-rot fungus *Phanerochaete crassa* WD1694. **Journal of Wood Science**, London, v. 56, n. 4, p. 307-313, 2010.

TANAKA, H.; TOYAMA, J.; AKASHI, R. Molecular characterization of a galactose-binding lectin from *Momordica charantia* seeds and its expression in tobacco cells. **Asian Journal of Plant Sciences**, Beijing, v. 8, n. 8, p. 544-550, 2009.

TANG, L. et al. Transcriptome analysis of candidate genes and signaling pathways associated with light-induced brown film formation in *Lentinula edodes*. **Applied Microbiology & Biotechnology**, Berlin, v. 97, n. 11, p. 4977-4989, June 2013.

TIEN, M.; KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds. **Science**, New York, v. 12, n. 221, p. 661-663, Aug. 1983.

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

TOKIMOTO, K. et al. Activities of enzymes in bedlogs of *Lentinus edodes* during fruitbody development. **Report Tottori Mycology Institute**, Kyoto, v. 25, p. 24-35, 1987.

TOKLU, H. Z. et al.  $\beta$ -glucan protects against burn-induced oxidative organ damage in rats. **International Immunopharmacology**, New York, v. 6, n. 2, p. 156-169, Aug. 2006.

TSIVILEVA, O. M. et al. Effect of media components on the mycelial film formation in submerged culture of *Lentinus edodes* (Shiitake). **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 43, n. 3, p. 227-234, 2005.

TSIVILEVA, O. M. et al. Lectin activity of *Lentinus edodes*. **International Microbiology**, Madrid, v. 4, n. 1, p. 41-45, 2001.

VANHOLME, R. et al. Lignin biosynthesis and structure. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 153, n. 3, p. 895-905, July 2010.

VERMA, A. et al. Mineral content of edible (dehydrated) mushrooms. **Indian Journal of Nutrition and Dietitians**, New Delhi, v. 24, p. 141-144, 1987.

VETCHINKINA, E. P.; SOKOLOV, O. I.; NIKITINA, V. E. Intracellular lectins of *Lentinus edodes* at various developmental stages of the fungus. **Microbiology**, New York, v. 77, n. 4, p. 496-501, 2008.

VETTER, J. Mineral element content of edible and poisonous macrofungi. **Acta Alimentaria**, Budapest, v. 19, n. 1, p. 27-40, 1990.

WANG, H.; GAO, J.; NG, T. B. A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 275, n. 3, p. 810-816, 2000.

WANG, L. et al. Function of the iron-binding chelator produced by *Coriolus versicolor* in lignin biodegradation. **Science in China Series C: Life Sciences**, Beijing, v. 51, n. 3, p. 214-221, 2008.

WANG, N.; HEBERT, D. N. Tyrosinase maturation through the mammalian secretory pathway: bringing color to life. **Pigment Cell Research**, London, v. 19, n. 1, p. 3-18, 2006.

WASSER, S. P.; WEIS, A. L. Therapeutic effects of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. **Critical Reviews in Immunology**, Boca Raton, v. 19, n. 1, p. 65-96, 1999.

WHEELER, M. H.; BELL, A. A. Melanins and their importance in pathogenic fungi. In: MCGINNIS, M. R. (Ed.). **Current topics in medical mycology**. New York: Springer Verlag, 1988. p. 338-387.

WICHERS, H. J. et al. Cloning, expression, and characterisation of two tyrosinase cDNAs from *Agaricus bisporus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 61, n. 4, p. 336-341, 2003.

WICHERS, H. J.; GERRITSEN, Y. A.; CHAPELON, C. G. J. Tyrosinase isoforms from the fruitbodies of *Agaricus bisporus*. **Phytochemistry**, Saint Paul, v. 43, n. 2, p. 333-337, 1996.

WONG, D. W. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 157, n. 2, p. 174-209, 2009.

WOOD, D. A.; MATCHAM, S. E.; FERMOR, T. R. Production and function of enzymes during lignocelluloses degradation. In: ZADRAZIL, F.; REINIGER, P. (Ed.). **Treatment of lignocellulosics with white rot fungi**. London: Elsevier, 1988. p. 43-49.

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

YILMAZ, N. et al. Fatty acid composition in some wild edible mushrooms growing in the middle Black Sea region of Turkey. **Food Chemistry**, Oxford, v. 99, n. 1, p. 168-174, 2006.

ZAKHARY, J. W. et al. Chemical composition of wild mushrooms collected from Alexandria. **Food Chemistry**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 31-41, May 1983.

ZHANG, M. et al. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristic and antitumor activity. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 18, n. 1, p. 4-19, Jan. 2007.

ZHANXI, L.; ZANHUA, L. **Juncao technology**. Beijing: China Agricultural Sciencetech, 2001. 252 p.

## SEGUNDA PARTE

### ARTIGO 1

#### **Atividade de peroxidases, lectina e $\beta$ -glucano, durante o cultivo do cogumelo *Lentinula edodes***

**Artigo submetido conforme normas da Revista Journal of Agricultural and Food Chemistry**

#### RESUMO

O presente trabalho foi realizado com os objetivos de avaliar o ciclo de cultivo de linhagens de *Lentinula edodes* a partir da produção de enzimas, lectina e  $\beta$ -glucano. Foram avaliados o consumo de celulose, hemicelulose e lignina e a produtividade de cogumelos. Os resultados apontaram um aumento no teor de lectina e lacase no micélio pigmentado. A produção de tirosinase foi maior na capa micelial marrom. O teor de  $\beta$ -glucano, para todas as linhagens, sofreu variações ao longo do ciclo. O consumo de celulose foi maior para as linhagens UFLA-LE1 e UFLA-LE3. UFLA-LE1, UFLA-LE2 e UFLA-LE6 consumiram mais hemicelulose, enquanto a linhagem LE5 consumiu mais lignina. As linhagens UFLA-LE4 e UFLA-LE6 foram as mais produtivas. A formação da capa micelial pigmentada e dos corpos de frutificação é um evento complexo que envolve a participação de várias enzimas, proteínas e carboidratos.

Palavras-chave: Shiitake. Capa marrom. Lectina. Enzimas.  $\beta$ -glucano

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the crop cycle of *Lentinula edodes* strains from the production of enzymes, lectin and  $\beta$ -glucan. The consumption of cellulose, hemicellulose and lignin and mushrooms productivity were evaluated. The results showed an increase in lectin content and laccase in the pigmented mycelium. The tyrosinase production was higher in brown mycelial cover. The  $\beta$ -glucan content for all strains suffered variations over the cycle. The cellulose consumption was greater for the strains UFLA-LE1 and UFLA-LE3. The strains UFLA-LE1, UFLA-LE2 and UFLA-LE6 consumed more hemicellulose, while UFLA-LE5 strain consumed more lignin. The strains UFLA-LE4 and UFLA-LE6 were the most productive. The formation of pigmented mycelial cover and fruiting bodies is a complex event that involves the participation of several enzymes, proteins and carbohydrates.

Keywords: Shiitake. Brown cover. Lectin. Enzymes.  $\beta$ -glucan.

## INTRODUÇÃO

O cogumelo shiitake (*Lentinula edodes* Berk. Pegler) é um representante de basidiomiceto xilotrófico. Muito popular entre os consumidores de cogumelos, está em segundo lugar na produção mundial, após o champignon (*Agaricus bisporus*),<sup>1</sup> sendo valorizado como um cogumelo comestível de alta qualidade, por apresentar alto valor gastronômico, destacando-se não só pelo seu agradável sabor como também por suas propriedades nutricionais e terapêuticas.<sup>2</sup>

O cultivo do shiitake é, tradicionalmente, feito em toros de madeira, principalmente eucalipto, no entanto, o cultivo axênico, em substratos sintéticos, à base de diversos resíduos agrícolas, vem ganhando espaço na produção comercial deste cogumelo, uma vez que a colheita acontece mais rapidamente e a eficiência biológica do fungo é bastante elevada.<sup>3</sup>

Pelo menos quatro fases já foram identificadas durante o ciclo de cultivo do shiitake. São elas: crescimento micelial vegetativo, formação da capa micelial marrom, formação de primórdios e desenvolvimento dos corpos de frutificação.<sup>4</sup> As fases de crescimento são afetadas pela proporção de lignina e celulose, bem como o teor de nitrogênio do substrato.<sup>5</sup> Para a degradação da lignicelulose, este fungo de podridão-branca secreta enzimas hidrolíticas (celulases e hemicelulases) e oxidativas (ligninases).<sup>6</sup>

Para a assimilação do substrato e para o desenvolvimento e o crescimento de uma colônia, é requerida agregação micelial e o fungo precisa de mobilização e transporte de açúcares. Nesta fase, um papel importante é desempenhado por lectinas, que estão envolvidas no reconhecimento de carboidratos, ligação intercelular e transdução de sinal em sistema biológico.<sup>7</sup> Além disso, durante o crescimento micelial e no ciclo celular, a estrutura da

parede celular dos fungos está constantemente em mudança. As alterações morfológicas envolvendo a síntese, a reorientação e a lise da estrutura da parede celular são um processo essencial em fungos.<sup>8,9</sup> A parede celular forma um complexo de múltiplas camadas de polissacarídeos, glicoproteínas e proteínas com ligações cruzadas. Os polissacarídeos consistem de  $\beta$ -glucanas (principalmente  $\beta$ -1,3-glucano e  $\beta$ -1, 6-glucano), quitina, quitosana, manana e  $\alpha$ -glucanas.<sup>10</sup>

Embora a formação da capa micelial marrom preceda o aparecimento dos corpos de frutificação<sup>11</sup> e tenha sido descrita como uma etapa peculiar na morfogênese para shiitake<sup>12,13</sup> os mecanismos moleculares e bioquímicos de formação dessa capa ainda não estão claros.<sup>4</sup>

Em alguns trabalhos têm sido relatadas as moléculas envolvidas no processo de formação da capa micelial marrom. Esses estudos apontam a proteína lectina como a provável responsável pela formação da capa, mas os estudos até então publicados foram realizados apenas em meios de cultura sintéticos, não refletindo, portanto, as reais condições de formação da capa, já que o cultivo de shiitake é feito em substratos à base de serragem e farelos.<sup>13-17</sup>

Este trabalho foi realizado com os objetivos de: i) avaliar a produção de ligninases, tirosinase e lectina, em quatro fases do crescimento de linhagens de *Lentinula edodes*, a fim de investigar as macromoléculas possivelmente envolvidas no desenvolvimento da capa micelial marrom; ii) determinar o teor de  $\beta$ -glucano em cada fase, para acompanhar as mudanças na parede celular nas diferentes fases do crescimento e iii) verificar o consumo de lignina, celulose e hemicelulose de cada linhagem. Os resultados deste estudo vão contribuir para o entendimento da morfogênese de shiitake.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Fungo e condições de cultura.** Foram utilizadas, no experimento, seis linhagens de *Lentinula edodes* (UFLA-LE1, UFLA-LE2, UFLA-LE3, UFLA-LE4, UFLA-LE5 e UFLA-LE6) pertencentes à coleção do Laboratório de Cogumelos Comestíveis da Universidade Federal de Lavras. As culturas estoque (matriz primária) foram mantidas em meio ágar malte (15,0 g L<sup>-1</sup> de glicose; 15,0 g L<sup>-1</sup> de extrato de malte; 15,0 g L<sup>-1</sup> de ágar) e incubadas, a 25 °C.

**Preparo da matriz secundária (“spawn”).** A matriz secundária foi preparada utilizando-se serragem (9 kg), farelo de trigo (1 kg), gesso (200 g) e calcário (200 g). A umidade foi ajustada para 60% e 170 g desse substrato foram distribuídos em frascos de vidro. Foram realizados dois processos de autoclavagem de 2 horas, com um intervalo de 24 horas entre um processo e outro. Após a inoculação das linhagens, a incubação foi feita à temperatura ambiente (25±2 °C) na câmara de cultivo, até que o substrato fosse completamente colonizado pelo fungo.

**Cultivo axênico das linhagens.** O substrato para o cultivo axênico das linhagens de *L. edodes* foi preparado utilizando-se serragem (25 kg), farelo de arroz (2 kg), farelo de trigo (0,3 kg), farelo de algodão (0,3 kg), fubá grosso (0,3 kg) e carbonato de cálcio (0,06 kg). A umidade foi ajustada para 60% e 1 kg de substrato foi distribuído em cada bloco para cultivo. Foram realizados dois processos de autoclavagem de 2 horas, com um intervalo de 24 horas entre um processo e outro. A proporção inicial de C/N do substrato foi de 37,8/1,4. A inoculação das linhagens foi feita utilizando-se a matriz secundária e os blocos de substratos inoculados foram incubados à temperatura ambiente (25±2 °C).

**Indução da frutificação.** Com 90 dias de crescimento, foi feita a indução da frutificação. Os blocos foram retirados dos sacos e colocados na sala de cultivo, à temperatura de  $18 \pm 2$  °C e umidade de  $89 \pm 5\%$ . Após a indução da frutificação, a colheita dos cogumelos foi feita por 36 dias, compreendendo o primeiro fluxo. Ao final do primeiro fluxo, os blocos estavam com 126 dias de crescimento. Depois do primeiro fluxo, foi dado um choque térmico nos blocos, imergindo-os em água à temperatura de  $14 \pm 2$  °C, por 12 horas. Após o choque térmico, os blocos foram novamente colocados na sala de cultivo e foram feitas colheitas de cogumelos por 33 dias, compreendendo o segundo fluxo. Os blocos estavam com 159 dias de crescimento, ao final do segundo fluxo. Ao final do segundo fluxo foi dado um novo choque térmico. O terceiro fluxo de produção teve a duração de 30 dias. Portanto, todo o ciclo de produção, desde a inoculação até o final da colheita, totalizou 189 dias.

**Determinação da produtividade.** Os cogumelos colhidos eram pesados, para a determinação da produtividade (%), segundo a equação 1.

$$P(\%) = \frac{\text{Massa dos cogumelos frescos}}{\text{Massa do substrato úmido}} \times 100$$

Equação 1

**Coleta de amostras.** Foram realizadas quatro coletas de amostras. A primeira coleta foi com 60 dias de crescimento, tempo que corresponde ao momento em que todos os blocos de todas as linhagens estavam completamente colonizados. A segunda coleta foi feita com 90 dias de crescimento, no momento da indução da frutificação. Com 126 dias, ou seja, com 36 dias após a indução da frutificação, foi realizada a terceira coleta, no final do primeiro fluxo, antes

de ser realizado o choque térmico. A quarta e última coleta foi feita com 159 dias de crescimento, ao final do segundo fluxo, antes de ser realizado o choque térmico. A partir de 60 dias de crescimento, a capa micelial pigmentada começou a ser formada e, com 126 dias de crescimento, essa capa já estava madura. Para cada amostra coletada foi determinado o teor de lectina,  $\beta$ -glucano, atividade de tirosinase e ligninases.

**Preparo do extrato bruto proteico.** O extrato bruto para as análises de lectina foram preparados de acordo com Vetchinkina et al. (2008a),<sup>14</sup> com modificações. O micélio foi separado do substrato, macerado e extraído, por 2 horas, com 20 mL de tampão Tris-HCl 20 mmol L<sup>-1</sup> (pH 8,0), para cada 200 mg de micélio, centrifugado e filtrado. A solução obtida foi utilizada nos ensaios de hemaglutinação.

Para as análises de tirosinase e ligninases o extrato bruto foi preparado de acordo com Luz et al. (2012).<sup>18</sup> Os ensaios enzimáticos e de hemaglutinação foram realizados em triplicata.

### **Ensaio enzimáticos**

**Lacase (EC 1.10.3.2).** A atividade de lacase foi determinada por método espectrofotométrico indireto, utilizando-se 2,2-azino-bis etilbenziazoline (ABTS), em mistura de reação de 1 mL contendo 0,3 mL de tampão acetato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 5,0), 0,1 mL de ABTS 1 mmol L<sup>-1</sup> (em água) e 0,6 mL da fonte enzimática. A mistura de reação foi incubada, por 10 minutos, a 37 °C e a oxidação do ABTS foi medida pelo aumento da absorbância, a 420 nm.<sup>20</sup> Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1  $\mu$ mol de ABST por minuto ( $\epsilon_{420} = 3,6 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ ), por kg.

**Manganês peroxidase (EC 1.11.1.13).** A atividade de manganês peroxidase foi medida utilizando-se o vermelho de fenol ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) como substrato ( $\epsilon = 4.460 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ ).<sup>21</sup> A mistura de reação de 1 mL contendo 0,5 mL do extrato enzimático, 0,1 mL de solução de vermelho de fenol ( $1.0 \text{ g L}^{-1}$ ), 0,1 mL de lactato de sódio pH 4,5 ( $250 \text{ mmol L}^{-1}$ ), 0,2 mL de albumina bovina (0,5%), 0,05 mL de sulfato de manganês ( $2 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e 0,05 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $2 \text{ mmol L}^{-1}$ ), em tampão succinato de sódio ( $20 \text{ mmol L}^{-1}$ ), pH 4,5. A solução resultante foi incubada, por 15 minutos, a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  e a reação foi interrompida pela adição de 0,04 mL de NaOH ( $2 \text{ mol L}^{-1}$ ). A absorbância foi medida a 610 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar  $1 \text{ } \mu\text{mol}$  de vermelho de fenol por minuto, por kg.

**Lignina peroxidase (EC 1.11.1.14).** A atividade de lignina peroxidase foi determinada pelo monitoramento da absorção em 310 nm da formação de veratraldeído ( $\epsilon = 9.300 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ ), por meio da oxidação de álcool veratrílico.<sup>22</sup> A mistura de reação de 2 mL foi composta de 0,5 mL da fonte enzimática, 0,5 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$   $2 \text{ mmol L}^{-1}$ , 0,5 mL de álcool veratrílico  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  e 1 mL de tartarato de sódio  $0,125 \text{ mol L}^{-1}$  pH 3,0, incubada, por 10 minutos, a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar  $1 \text{ } \mu\text{mol}$  de álcool veratrílico a veratraldeído por minuto, por kg.

**Tirosinase (E.C.1.14.18.1).** A atividade de tirosinase foi determinada pela taxa de oxidação de L-di-hidroxi-fenilalanina (L-DOPA)  $2 \text{ mmol L}^{-1}$  em tampão Tris-HCl  $50 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH 7,5), a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , por 10 minutos. A oxidação da L-DOPA para DOPA quinona foi medida pelo aumento da absorbância a 475 nm ( $\epsilon_{475} 3700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).<sup>19</sup> Uma unidade de atividade enzimática foi definida

como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de L-di-hidroxifenilalanina (L-DOPA) por minuto, por kg.

**Ensaio de hemaglutinação.** A hemaglutinação foi realizada para verificar a atividade de lectina. O ensaio foi realizado por uma diluição seriada da amostra, usando o kit TOXO-HAI Gold Analisa (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), que contém o diluente e uma suspensão de eritrócitos de ave 2%. A atividade foi expressa em UH  $50 \mu\text{L}^{-1}$ , o qual representa o inverso da maior diluição da amostra que causou hemaglutinação detectável, após 2 horas, à temperatura ambiente.<sup>15</sup>

**Extração e quantificação de  $\beta$ -glucano.** A extração e a quantificação de  $\beta$ -glucano foram feitas utilizando-se o kit  $\beta$ -Glucan (Yeast & Mushroom) da Megazyme (Megazyme International Ireland, Bray Business Park, Bray, Co. Wicklow, Ireland).

**Determinação de lignina, celulose e hemicelulose.** Foi feita a determinação de lignina, celulose e hemicelulose do substrato usado no cultivo das linhagens antes da inoculação e no final do terceiro fluxo, com 189 dias após a inoculação, para verificar o quanto de cada componente do substrato foi consumido por cada linhagem. A análise do teor de matéria seca (MS) foi realizada conforme recomendações da Association of Official Analytical Chemist.<sup>23</sup> Os teores de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), hemicelulose (HEM), celulose (CEL) e lignina (LIG) foram determinados segundo as técnicas descritas por Silva (1998).<sup>24</sup>

**Estatística.** O experimento foi realizado utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC). A cada coleta foram retirados três blocos por

linhagem, para se proceder às extrações para a quantificação de lectina, enzimas e  $\beta$ -glucano. As análises para a determinação de lignina, celulose e hemicelulose foram feitas com três repetições. Para avaliar a produtividade, foram utilizadas seis repetições. As médias da produtividade e do consumo de celulose, hemicelulose e lignina foram comparadas estatisticamente pelo software SISVAR,<sup>25</sup> por meio do teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Atividade enzimática.** A atividade de lacase foi maior com 126 e 159 dias, para todas as linhagens. Nesse mesmo período, a linhagem UFLA-LE4 foi a que apresentou maior atividade dessa enzima (12,84 e 22,45 U kg<sup>-1</sup>, respectivamente). Para as linhagens UFLA-LE4 e UFLA-LE6 é possível observar uma atividade crescente dessa enzima. Essas duas linhagens foram as que apresentaram as maiores atividades de lacase, com 159 dias de crescimento, sendo de 22,45 U kg<sup>-1</sup> para UFLA-LE4 e 20,18 U kg<sup>-1</sup> para UFLA-LE6 (Figura 1). Em *Lentinula edodes*, a atividade de lacase está associada à formação de pigmentos. A formação de corpos de frutificação pode envolver a síntese catalisada por lacase de pigmentos extracelulares relacionados com a polimerização oxidativa de componentes da parede celular para o fortalecimento de adesão célula-célula.<sup>30,31</sup>

Estudos têm apontado para o envolvimento de lacase na formação do filme micelial marrom<sup>4</sup>, a qual é acelerada pelo oxigênio, e o envolvimento de lacase pode ser considerado pela formação de gotículas de água em consequência da oxidação de compostos fenólicos, acoplada à redução de oxigênio à água.<sup>30</sup> Em estudos anteriores também ligaram-se lacases com o desenvolvimento do corpo de frutificação e a produção de pigmentos em cogumelos comestíveis.<sup>33,34</sup>

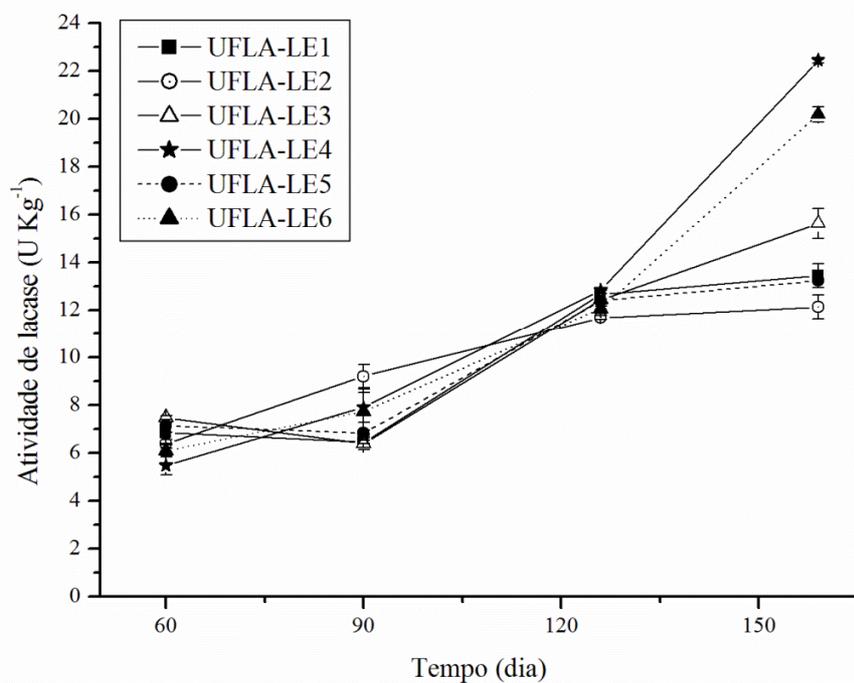


Figura 1 Atividade de lacase para as linhagens de *Lentinula edodes*

A atividade inicial de manganês peroxidase foi maior para as linhagens UFLA-LE1 e UFLA-LE2 (22,20 e 21,38 U kg<sup>-1</sup>, respectivamente). A maior atividade dessa enzima foi detectada com 159 dias de cultivo para a linhagem UFLA-LE3 (33,56 U kg<sup>-1</sup>) (Figura 2).

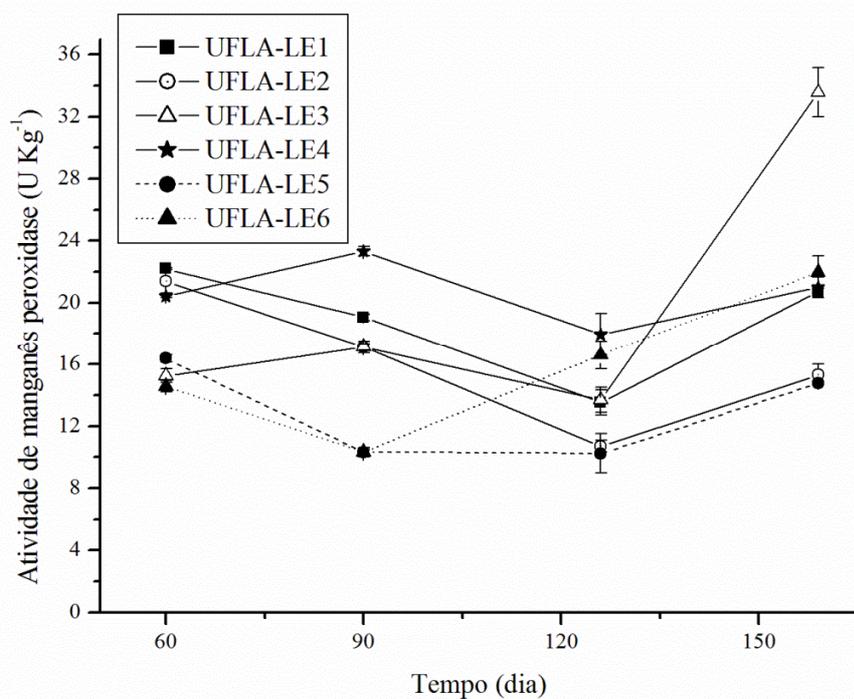


Figura 2 Atividade de manganês peroxidase para as linhagens de *Lentinula edodes*

Atividade de lignina peroxidase foi detectada em todos os tempos para todas as linhagens (Figura 3). A linhagem UFLA-LE5 foi a que apresentou menor atividade inicial ( $172,79 \text{ U kg}^{-1}$ ), porém, a atividade máxima de lignina peroxidase foi detectada para essa linhagem com 126 dias de cultivo ( $801,28 \text{ U kg}^{-1}$ ). A linhagem UFLA-LE1 apresentou o comportamento mais distinto entre as linhagens com maior atividade inicial de lignina peroxidase ( $438,10 \text{ U kg}^{-1}$ ).

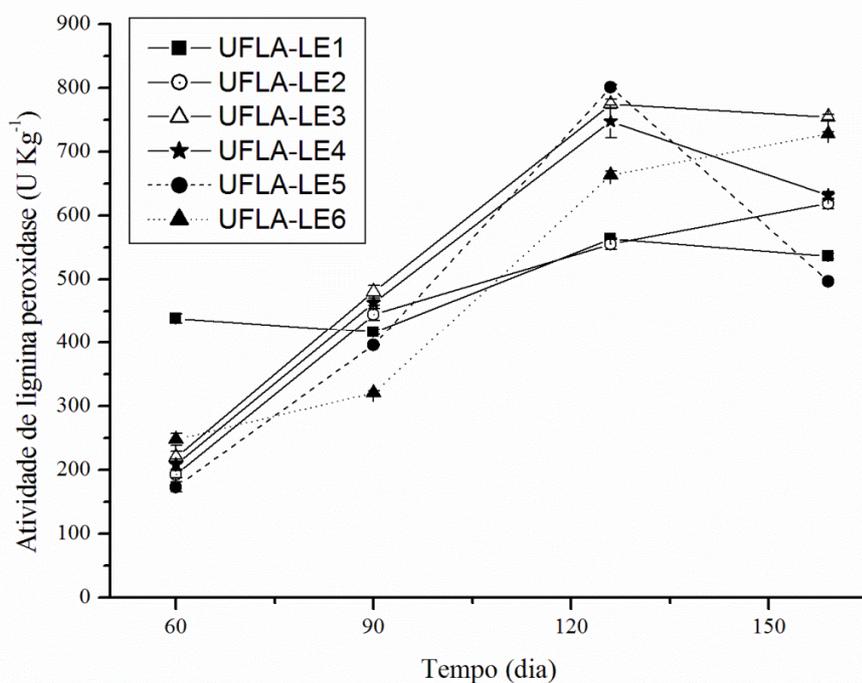


Figura 3 Atividade de lignina peroxidase para as linhagens de *Lentinula edodes*

Em contraste com manganês peroxidase e lignina peroxidase, o baixo potencial redox da tirosinase sugere que esta enzima não participa de processos de degradação, sendo seu envolvimento maior na produção de pigmentos.<sup>29</sup> A linhagem UFLA-LE4 foi a que apresentou maior atividade de tirosinase inicial (314,19 U kg<sup>-1</sup>) e a UFLA-LE5 apresentou maior atividade final dessa enzima (1510,27 U Kkg<sup>-1</sup>). Todas as linhagens apresentaram a maior atividade de tirosinase com 159 dias de crescimento (Figura 4).

A capacidade de degradar a lignina depende da produção de enzimas lignolíticas lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase. As atividades de lacase e manganês peroxidase foram mais baixas em relação à atividade de

lignina peroxidase, para todas as linhagens, em todos os tempos estudados. Lignina peroxidase e manganês peroxidase são descritos como ligninases verdadeiras, devido ao seu elevado potencial redox, estando diretamente relacionadas com a eficiência da degradação da lignina.<sup>26,27</sup>

Segundo Esposito et al. (1991),<sup>28</sup> em geral, quando a atividade de lignina peroxidase é alta, as atividades de lacase e manganês peroxidase são menores. É possível observar essa correlação, já que todas as linhagens apresentaram atividades de lacase e manganês peroxidase menores que a atividade de lignina peroxidase.

Vetchinkina et al. (2008b)<sup>35</sup> avaliaram as enzimas lacase, manganês peroxidase e tirosinase no curso da morfogênese de *Lentinula edodes* em meio sólido. Estes autores detectaram atividade de lacase e manganês peroxidase com 7 e 14 dias de incubação e com 28 dias não detectaram essas enzimas. Com 40 dias, a atividade de lacase voltou a ser detectada e aumentou até 70 dias, que corresponde ao tempo de formação do corpo de frutificação. A atividade de manganês peroxidase voltou a ser detectada com 50 dias, mas declinou com 60 dias de cultivo. A atividade de tirosinase foi maior que a de lacase e manganês peroxidase e foi detectada em todos os tempos, com máxima atividade no micélio pigmentado. Assim como para Vetchinkina et al. (2008b)<sup>35</sup>, foi possível observar uma flutuação na atividade dessas enzimas, ao longo do ciclo de cultivo.

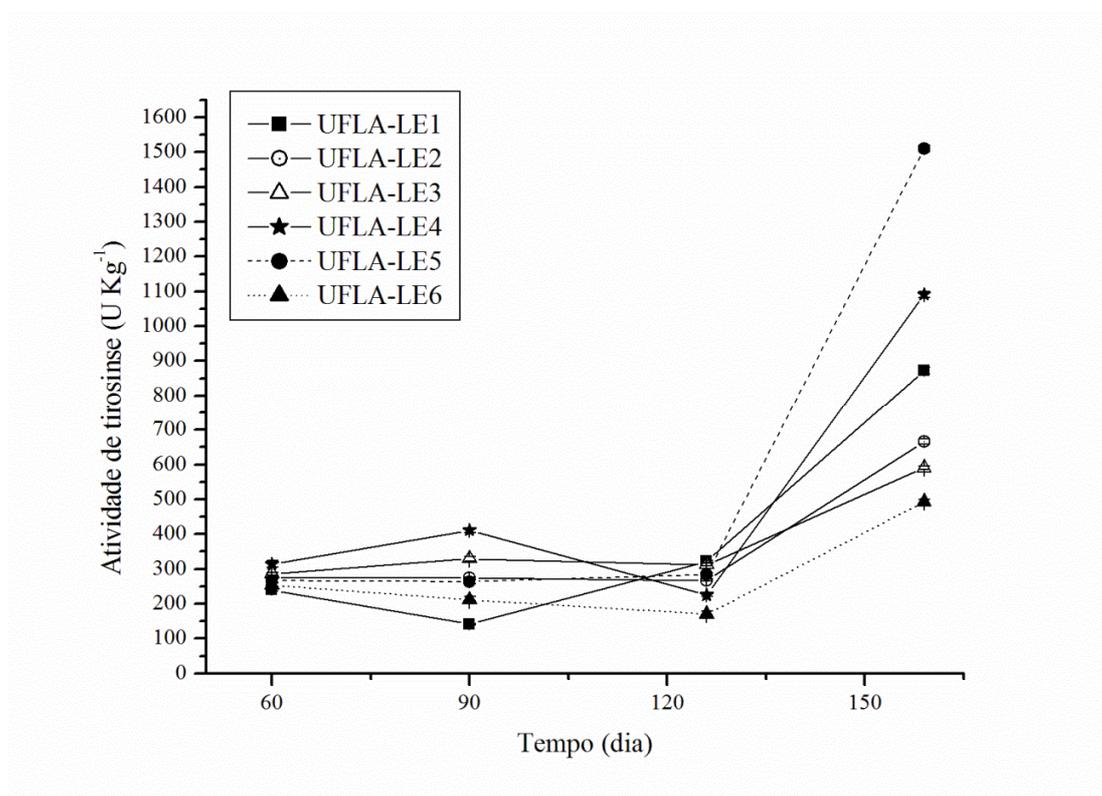


Figura 4 Atividade de tirosinase para as linhagens de *Lentinula edodes*

**Atividade de lectina.** A proteína lectina tem papel importante na adesão célula-célula e tem sido apontada como a molécula envolvida na formação da capa micelial pigmentada. O comportamento de cada linhagem com relação à produção de lectina foi variado (Figura 5). A produção de lectina somente não foi detectada no estágio inicial do cultivo (60 dias) para a linhagem UFLA-LE1. Fato contrário foi observado para a linhagem UFLA-LE6, que apresentou a maior atividade inicial de lectina. A maior atividade de lectina ( $32 \text{ UH } 50 \mu\text{L}^{-1}$ ) foi detectada para as linhagens UFLA-LE3 e UFLA-LE4, com 159 e 126 dias de cultivo, respectivamente. Para todas as linhagens, a atividade de lectina aumentou dos estágios de micélio para micélio pigmentado. A linhagem UFLA-

LE6 foi a que apresentou um comportamento diferente das demais, sua atividade inicial de lectina foi a maior ( $8 \text{ UH } 50 \mu\text{L}^{-1}$ ), no entanto, essa atividade diminuiu nos tempos de 90 e 126 dias, voltando a crescer no tempo de 159 dias. Esse comportamento foi coincidente com o da atividade de tirosinase.

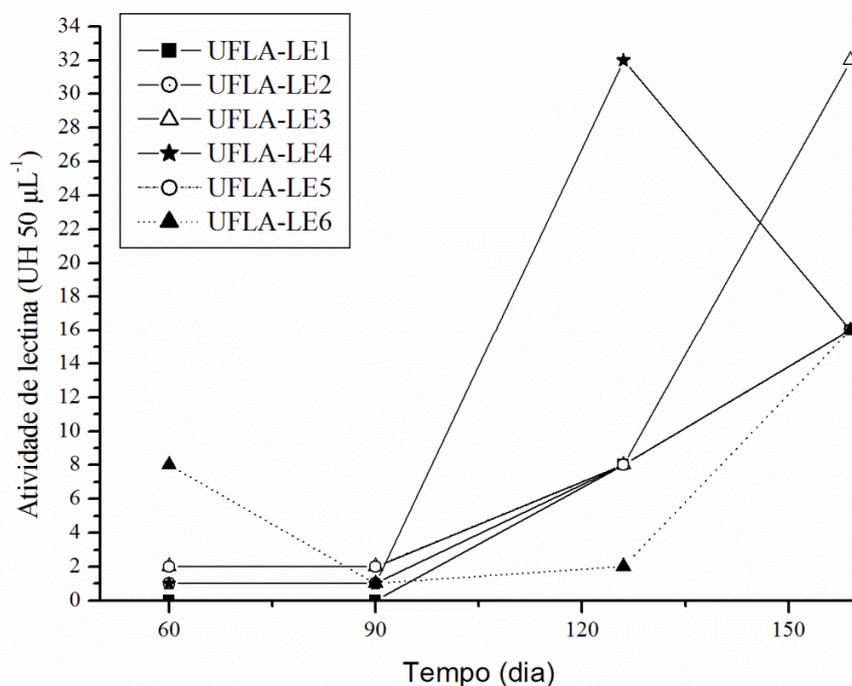


Figura 5 Atividade de lectina para as linhagens de *Lentinula edodes*

De acordo com Tsivileva et al. (2001)<sup>15</sup>, títulos de hemaglutinação foram máximos na capa micelial marrom, o que pode ser explicado pelo possível envolvimento de aglutininas na formação da capa micelial pigmentada.

Os estudos de Vetchinkina et al. (2008c)<sup>16</sup> indicaram que a atividade de lectina depende do estágio da morfogênese de shiitake, tendo a atividade no

filme micelial marrom sido de três a quatro vezes maior que no micélio não pigmentado.

Tsivileva et al. (2005)<sup>13</sup> avaliaram a formação da capa micelial marrom e acompanharam a produção de lectina em meio líquido com diferentes fontes de nitrogênio e diferentes relações de C/N de uma linhagem de *Lentinula edodes* e observaram que o maior título de hemaglutinação, que corresponde à maior atividade de lectina, foi de 1.024 e foi obtido do meio contendo cloreto de amônio e uma relação de C/N de 150/1. A formação da capa micelial marrom foi observada somente com 55 a 60 dias de crescimento. Uma maior relação de C/N, portanto, aumenta a produção de lectina.

As atividades de lacase e lectina foram maiores para todas as linhagens nos tempos de 126 e 159 dias. De acordo com Vetchinkina et al. (2008d)<sup>17</sup>, lectinas de *Lentinula edodes* estabilizam a atividade de lacases. Os autores demonstraram esse fato depois de realizarem experimentos nos quais a atividade de lacase aumentou após ser incubada com um extrato de lectina. No presente trabalho foi possível observar o aumento de lectina e lacase de forma conjunta, indicando uma relação entre essas macromoléculas, como observado por Vetchinkina et al. (2008d).<sup>17</sup>

**Teor de  $\beta$  – glucano.** As paredes das células de fungos são construídas, principalmente, a partir da quitina e  $\beta$ -glucano, e estes polissacarídeos são autodegradados por  $\beta$ -glucanases, associadas com paredes celulares durante mudanças morfológicas.<sup>36</sup> Durante o ciclo de crescimento de *Lentinula edodes* foi possível observar essas mudanças morfológicas a partir dos diferentes teores de  $\beta$ -glucano obtidos para as linhagens (Figura 6).

O teor de  $\beta$ -glucano foi maior para todas as linhagens com 126 dias de cultivo, com exceção da linhagem UFLA-LE6, que apresentou os maiores teores de  $\beta$ -glucano, com 60 e 90 dias de cultivo ( $8,5\pm 0,49\%$  e  $8,2\pm 0,53\%$ , respectivamente). As linhagens UFLA-LE1, UFLA-LE3 e UFLA-LE5

apresentaram o mesmo comportamento quanto ao teor de  $\beta$ -glucano. Essas linhagens tiveram o teor de  $\beta$ -glucano diminuído de 60 para 90 dias de cultivo, com máximo teor com 126 dias e declínio novamente com 159 dias de cultivo. As linhagens UFLA-LE4 e UFLA-LE2 tiveram um teor de  $\beta$ -glucano crescente, com máximo aos 126 dias de cultivo e declínio com 159 dias (Figura 6).

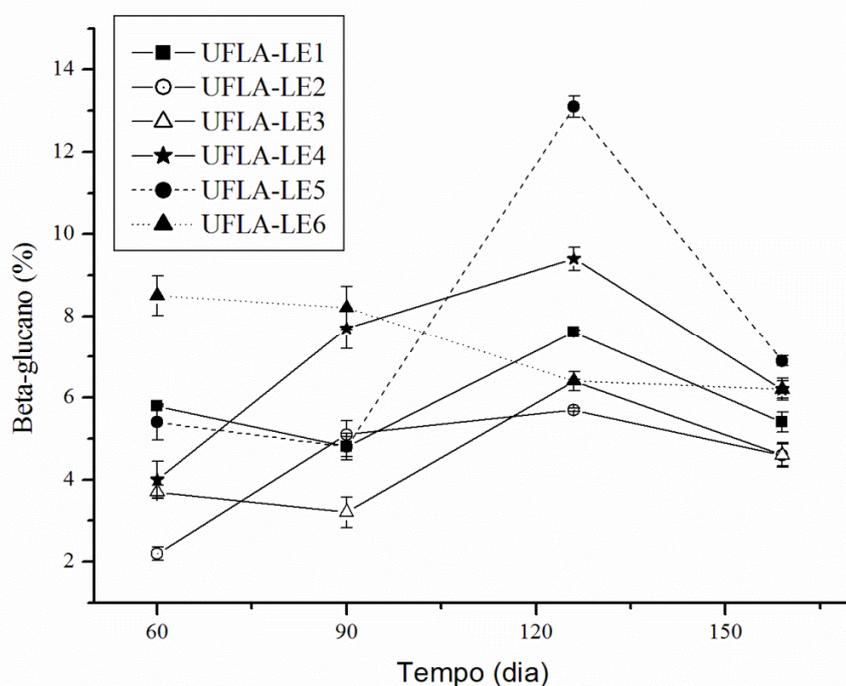


Figura 6 Teor de  $\beta$ -glucano para as linhagens de *Lentinula edodes*

**Lignina, celulose e hemicelulose.** Os cogumelos têm a capacidade de degradar lignina usando as enzimas lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacase e o quanto é secretado dessas enzimas afeta o quanto de substrato pode ser consumido e, conseqüentemente, o ciclo de crescimento do cogumelo.<sup>37</sup> Neste trabalho, o substrato utilizado para o cultivo das linhagens de *Lentinula*

*edodes* tinha um maior teor de celulose (40,3%), seguido de hemicelulose (20,7%) e lignina (20,8%). As linhagens apresentaram diferentes capacidades de consumo desses componentes do substrato (Tabela 1). As linhagens UFLA-LE1 e UFLA-LE3 foram as que mais consumiram celulose. A hemicelulose foi mais consumida pelas linhagens UFLA-LE1, UFLA-LE2 e UFLA-LE6, enquanto a lignina foi mais eficientemente degradada pela linhagem UFLA-LE5. Esse consumo maior de lignina pela linhagem UFLA-LE5 pode ser em função da maior produção de lignina peroxidase por esta linhagem.

Tabela 1 Consumo de celulose, hemicelulose e lignina (%) de diferentes linhagens de *Lentinula edodes*

<b>Linhagem</b>	<b>Celulose (%)</b>	<b>Hemicelulose (%)</b>	<b>Lignina (%)</b>
UFLA-LE1	10,8±0,17 <sup>a</sup>	6,9±0,20 <sup>a</sup>	5,2±0,40 <sup>b</sup>
UFLA-LE2	6,6±0,12 <sup>c</sup>	6,0±0,40 <sup>a</sup>	5,0±0,25 <sup>b</sup>
UFLA-LE3	11,0±0,44 <sup>a</sup>	3,5±0,40 <sup>b</sup>	4,0±0,20 <sup>c</sup>
UFLA-LE4	4,9±0,10 <sup>c</sup>	5,0±0,45 <sup>b</sup>	3,2±0,20 <sup>d</sup>
UFLA-LE5	8,9±0,51 <sup>b</sup>	4,2±0,42 <sup>b</sup>	6,5±0,50 <sup>a</sup>
UFLA-LE6	5,6±0,31 <sup>d</sup>	6,3±0,32 <sup>a</sup>	4,4±0,47 <sup>c</sup>

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

A lignina é particularmente difícil de biodegradar e reduz a biodisponibilidade de outros constituintes da parede celular vegetal e, além disso, a celulose não é, geralmente, prontamente disponível como fonte de carbono.<sup>38</sup> Moyson e Verachtert (1991)<sup>39</sup> demonstraram que a decomposição de materiais lignocelulósicos por *L. edodes* é, inicialmente, associada ao teor de hemicelulose do substrato, uma vez que a hemicelulose e outros açúcares solúveis em água são utilizados, principalmente, durante a fase de crescimento ativo, antes da quebra da lignina e da celulose. Philippoussis et al. (2003)<sup>5</sup> testaram três formulações de substratos para cultivo de linhagens de *Lentinula edodes* contendo concentrações crescentes de hemicelulose e observaram crescimento mais rápido e frutificação precoce das linhagens de *Lentinula edodes*, nos dois substratos com maior teor de hemicelulose.

**Produção de cogumelos.** As linhagens UFLA-LE4 e UFLA-LE6 foram as mais produtivas, enquanto as demais linhagens tiveram produtividade significativamente menor (Tabela 2). A formação da capa micelial marrom é de extrema importância para a produção de cogumelos, uma vez que a formação da capa precede à dos corpos de frutificação. Vários fatores estão envolvidos na formação da capa micelial pigmentada e, conseqüentemente, dos corpos de frutificação, dentre eles, a produção de lacase e lectina.<sup>33,34,15</sup>

Consideráveis mudanças na atividade enzimática ocorrem durante a frutificação, indicando a conexão na regulação do desenvolvimento de corpos de frutificação. Em *Agaricus bisporus* e *Lentinula edodes*, a atividade de lacase é maior imediatamente antes da formação dos corpos de frutificação e declina rapidamente com a formação de agregados.<sup>40</sup>

O tempo de 126 dias de crescimento, período este que corresponde à capa micelial marrom já bem desenvolvida, representou uma etapa importante na morfogênese de shiitake, já que, nesse tempo, as linhagens, de forma geral, tiveram um aumento nos teores de  $\beta$ -glucano, lectina e lacase. Todas as

linhagens apresentaram um aumento da produção de lacase e lectina de 90 dias, que representa o momento da indução da frutificação, para 126 dias de crescimento, que corresponde à capa pigmentada madura. Dentre as linhagens estudadas, UFLA-LE4 foi uma das que apresentaram maior atividade de lacase e lectina, com 126 dias de crescimento e também maior produtividade.

A linhagem UFLA-LE1, apesar de ter uma atividade de lacase maior que a das demais linhagens com 126 dias de crescimento, apresentou um retardo na produção de lectina, iniciando a produção somente com 126 dias de crescimento, o que pode ter afetado sua produtividade e feito com que essa linhagem não fosse também uma das mais produtivas.

É importante destacar o envolvimento do teor de  $\beta$ -glucano em conjunto com o teor de lectina na formação da capa micelial marrom. É possível observar que, para as linhagens UFLA-LE1, UFLA-LE2, UFLA-LE3, UFLA-LE4 e UFLA-LE5, o teor de  $\beta$ -glucano começou baixo e aumentou de 90 para 126 dias de cultivo. A atividade de lectina também cresceu nesse período. Para a linhagem UFLA-LE6, que apresentou comportamento distinto das demais linhagens, enquanto o teor de  $\beta$ -glucano começou maior e caiu de 90 para 126 dias, o mesmo aconteceu com a atividade de lectina.

Foi possível observar comportamentos distintos para as duas linhagens mais produtivas, não sendo possível estabelecer exatamente quais são os fatores determinantes na formação da capa micelial pigmentada e, conseqüentemente, dos corpos de frutificação. É possível afirmar que há o envolvimento de lectinas no processo de formação da capa, já que houve um aumento no seu teor do micélio para micélio pigmentado. No entanto, a lectina não é a única molécula envolvida nessa formação.

A formação da capa micelial pigmentada e dos corpos de frutificação é um evento complexo que envolve a participação de várias enzimas, proteínas e carboidratos.

Mudanças na parede celular ocorreram ao longo do ciclo de cultivo, com o maior teor de  $\beta$ -glucano observado, para a maioria das linhagens, com 126 dias de desenvolvimento, tempo este que corresponde à etapa de maturação da capa micelial pigmentada.

O consumo de celulose, lignina e hemicelulose foi diferente, dependendo da linhagem. Maior consumo de celulose e lignina não implicou em uma maior produtividade. O maior consumo de hemicelulose pode contribuir para um crescimento micelial mais rápido e frutificação precoce, mas não é um fator determinante para se ter boa produtividade, uma vez que a linhagem UFLA-LE6, que consumiu mais hemicelulose, foi uma das mais produtivas. Porém, a linhagem UFLA-LE4, que também foi uma das mais produtivas, apresentou consumo menor de hemicelulose.

Tabela 2 Produtividade total e por fluxo de linhagens de *Lentinula edodes*

Produtividade (%)				
Linhagem	Primeiro fluxo <sup>†</sup>	Segundo fluxo <sup>‡</sup>	Terceiro fluxo <sup>¥</sup>	Total
UFLA-LE1	2,0	1,4	2,8	6,20 <sup>b</sup>
UFLA-LE2	5,7	3,1	4,3	13,1 <sup>b</sup>
UFLA-LE3	1,2	0,0	1,4	2,60 <sup>b</sup>
UFLA-LE4	17,7	6,3	2,9	26,9 <sup>a</sup>
UFLA-LE5	0,0	0,0	5,5	5,50 <sup>b</sup>
UFLA-LE6	16,2	3,0	7,0	26,2 <sup>a</sup>

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

<sup>†</sup>36 dias de colheita de cogumelos

<sup>‡</sup>33 dias de colheita de cogumelos

<sup>¥</sup>30 dias de colheita de cogumelos

## Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Szeto, C. Y. Y.; Wong, Q. W. L.; Leung, G. S.; Kwan, H. S. Isolation and transcript analysis of two-component histidine kinase gene *Le.nik1* in Shiitake mushroom, *Lentinula edodes*. *Mycol. Res.* **2008**, 112 (1), 108–116.
- (2) Menolli Junior, N.; Paccola-Meirelles, L. D. Obtention of *Lentinula edodes* strains resistant to high temperatures and selection of strains resistant to *Trichoderma* sp. *Cienc. Agrotecnol.* **2010**, 34 (Special edition), 1640-1646.
- (3) Philippoussis, A.; Diamantopoulou, P.; Israilides, C. Productivity of agricultural residues used for the cultivation of the medicinal fungus *Lentinula edodes*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2007**, 59 (3), 216–219.
- (4) Tang, L.; Jian, H.; Song, C.; Bao, D.; ShanG, X.; Wu, D.; Tan, Q.; Zhang, X. Transcriptome analysis of candidate genes and signaling pathways associated with light-induced brown film formation in *Lentinula edodes*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, 97 (11), 4977–4989.
- (5) Philippoussis, A.N.; Diamantopoulou, P.A.; Zervakis, G.I. Correlation of the properties of several lignocellulosic substrates to the crop performance of the shiitake mushroom *Lentinula edodes*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, 19 (6), 551–557.
- (6) Kachlishvili, E.; Penninckx, M. J.; Tsiklauri, N.; Elisashvili, V. Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, 22 (4), 391–397.

(7) Kanska, G. Lectins of higher fungi (Macromycetes)—their occurrence, physiological role, and biological activity. *Int. J. Med. Mushrooms*. **2006**, 8 (1), 19–30.

(8) Enderlin, C. S.; Selitrennikoff, C. P. Cloning and characterization of a *Neurospora crassa* gene required for (1,3) $\beta$ -glucan synthase activity and cell wall formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, 91 (20), 9500–9504.

(9) Seiler, S.; Plamann, M. The genetic basis of cellular morphogenesis in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Mol. Biol. Cell* **2003**, 14 (11), 4352–4364.

(10) Aïmanianda, V.; Clavaud, C.; Simenel, C.; Fontaine, T.; Delepierre, M.; Latgé, J. P. Cell wall  $\beta$ -(1,6)-glucan of *Saccharomyces cerevisiae*: structural characterization and in situ synthesis. *J. Biol. Chem.* **2009**, 284 (20), 13401–13012.

(11) Chum, W. W. Y.; Ng, K. T. P.; Shih, R. S. M.; Au, C. H.; Kwan, H. S. Gene expression studies of the dikaryotic mycelium and primordium of *Lentinula edodes* by serial analysis of gene expression. *Mycol. Res.* **2008**, 112 (8), 950–964.

(12) Aleksandrova, E. A.; Zav'yalova, L. A.; Tereshina, V. M.; Garibova, L. V.; Feofilova, E. P. Obtaining of fruiting bodies and submerged mycelium of *Lentinus edodes* (Berk.) Sing [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler]. *Microbiol.* **1998**, 67 (5), 535–539.

(13) Tsivileva, O. M.; Pankratov, A. N.; Nikitina, V. E.; Garibova, L. V. Effect of media components on the mycelial film formation in submerged culture of *Lentinus edodes* (Shiitake). *Food Technol. Biotechnol.* **2005**, 43 (3), 227–234.

(14) Vetchinkina, E. P.; Sokolov, O. I.; Nikitina, V. E. Intracellular lectins of *Lentinus edodes* at various developmental stages of the fungus. *Microbiol.* **2008a**, 77 (4), 496–501.

(15) Tsivileva, O. M.; Nikitina, V. E.; Garibova, L. V.; Ignatov, V. V. Lectin activity of *Lentinus edodes*. *Int. Microbiol.* **2001**, 4 (1), 41–45.

(16) Vetchinkina, E. P.; Nikitina, V. E.; Tsivileva, O. M.; Garibova, L. V. Activity of *Lentinus edodes* Intracellular Lectins at Various Developmental Stages of the Fungus. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2008c**, 44 (1), 66-72.

(17) Vetchinkina, E. P.; Pozdnyakova, N. N.; Nikitina, V. E. Laccase and Lectin Activities of Intracellular Proteins Produced in a Submerged Culture of the Xylotrophic Basidiomycete *Lentinus edodes*. *Curr. Microbiol.* **2008d**, 57 (4), 381-385.

(18) Luz, J. M. R.; Nunes, M. D.; Paes, S. A.; Torres, D. P.; Silva, M. C. S.; Kasuya, M. C. M. Lignocellulolytic enzyme production of *Pleurotus ostreatus* growth in agroindustrial wastes. *Braz. J. Microbiol.* **2012**, 43 (4), 1508-1515.

(19) Pomerantz, S. M.; Murthy, V. V. Purification and Properties of Tyrosinases from *Vibrio tyrosinaticus*. *Arch. Biochem. Biophys.* **1974**, 160 (1), 73-82.

(20) Buswell, J. A.; Cai, Y. J.; Chang, S. T. Effect of nutrient and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMS Microbiol. Lett.* **1995**, 128 (1), 81-88.

(21) Kuwahara, M.; Jeffrey, K. G.; Meredith, A. M.; Michael, H. G. Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* **1984**, 169 (2), 247-250.

(22) Tien, M.; Kirk, T. K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1984**, 81 (8), 2280-2284.

(23) Association of Official Analytical Chemists (AOAC). *Official methods of the Association of Official Analytical Chemists*. 17 ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA, **2000**; pp 190.

(24) Silva, D.J. *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. Ed.a UFV: Viçosa, Minas Gerais, Brasil, **1998**; pp 166.

(25) Ferreira, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. *Revista Symposium* **2008**, 6 (1), 36-41.

(26) Gold, M. H.; Youngs, H. L.; Gelpke, M. D. Manganese peroxidase. *Met. Ions Biol. Syst.* **2000**, 37, 559-586.

(27) Martínez, A. T. Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, 30 (4), 425-444.

(28) Esposito, E.; Canhos, V. P.; Durdn, N. Screening of lignin-degrading fungi for removal of color from kraft mill wastewater with no additional extra carbon-source. *Biotechnol. Lett.* **1991**, 13 (8), 571-576.

(29) Ghosh, D.; Mukherjee, R. Modeling tyrosinase monooxygenase activity. Spectroscopic and magnetic investigations of products due to reactions between copper(I) complexes of xylyl- based dinucleating ligands and dioxygen: aromatic ring hydroxylation and irreversible oxidation products. *Inorg. Chem.* **1998**, 37 (26), 6597-6605.

(30) Arora, D. S.; Sharma, R. K. Ligninolytic Fungal Laccases and Their Biotechnological Applications. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2010**, 160 (6), 1760-1788.

(31) Leatham, G.; Stahmann, M. A. Studies on the laccase of *Lentinus edodes*: specificity, localization and association with the development of fruiting bodies. *J. Gen. Microbiol.* **1981**, 125, 147-157.

(32) Rodgers, C. J.; Blanford, C. F.; Giddens, S. R.; Skamnioti, P.; Armstrong, F. A.; Gurr, S. J. Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes. *Trends Biotechnol.* **2010**, 28 (2), 63-72.

(33) Ohga, S.; Cho, N. S.; Thurston, C. F.; Wood, D. A. Transcriptional regulation of laccase and cellulase in relation to fruit body formation in the mycelium of *Lentinula edodes* on a sawdust-based substrate. *Mycoscience* **2000**, 41 (2), 149-153.

- (34) Chen, S. C.; Ge, W.; Buswell, J. A. Molecular cloning of a new laccase from the edible straw mushroom *Volvariella volvacea*: possible involvement in fruit body development. *FEMS Microbiol. Lett.* **2004**, 230 (2), 171–176.
- (35) Vetchinkina, E. P.; Pozdnyakova, N. N.; Nikitina, V. E. Enzymes of the Xylotrophic Basidiomycete *Lentinus edodes* F-249 in the Course of Morphogenesis. *Microbiology.* **2008b**, 77 (2), 144-150.
- (36) Minato, K.; Kawakami, S.; Nomura, K.; Tsuchida, H.; Mizuno, M. An exo  $\beta$ -1,3 glucanase synthesized de novo dgrades lentinan during storage of *Lentinula edodes* and diminishes immunomodulating activity of the mushroom. *Carbohydr. Polym.* **2004**, 56, 279–286.
- (37) Xu, J. Z.; Zhang, J. L.; Hu, K. H.; Zhang, W. G. The relationship between lignin peroxidase and manganese peroxidase production capacities and cultivation periods of mushrooms. *Microb. Biotechnol.* **2013**, 6 (3), 241–247.
- (38) Eriksson, K. E. L.; Blanchette, R. A.; Ander, P. Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components; Springer-Verlag, New York, USA, **1990**, 407 pp.
- (39) Moyson, E.; Verachtert, H. Growth of high fungi on wheat straw and their impact on the digestibility of the substrate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1991**, 36 (3), 421–424.
- (40) Kües, U.; Liu, Y. Fruiting body production in basidiomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, 54 (2), 141-15.

## ARTIGO 2

### Composição centesimal, atividade antioxidante e enzimas do cogumelo

#### *Lentinula edodes*

#### Artigo submetido conforme normas da Revista Food Chemistry

### RESUMO

Os cogumelos são valorizados por suas propriedades nutricionais e terapêuticas, tornando-se atraentes como alimento funcional e como fonte de compostos bioativos. Os objetivos foram determinar a composição centesimal, a atividade antioxidante e o teor de lectina de seis linhagens de *Lentinula edodes* e determinar a atividade das enzimas lacase e tirosinase, que, se presentes nos corpos de frutificação após a colheita, podem influenciar a senescência do cogumelo. As linhagens UFLA-LE2, UFLA-LE4 e UFLA-LE6 apresentaram os maiores teores de proteína bruta ( $30,71 \pm 0,82\%$ ;  $29,63 \pm 0,83\%$  e  $30,53 \pm 1,30\%$ , respectivamente) e cinzas ( $5,49 \pm 0,23\%$ ;  $5,31 \pm 0,22\%$  e  $5,62 \pm 0,03\%$ , respectivamente); UFLA-LE1, o maior teor de lipídeos ( $3,14 \pm 0,14\%$ ); UFLA-LE6, o maior teor de fibras ( $16,40 \pm 0,20\%$ ) e UFLA-LE5, o maior teor de carboidratos ( $66,59 \pm 0,90\%$ ). A linhagem UFLA-LE4 apresentou maior atividade antioxidante ( $53,0 \pm 0,1\%$ ). As linhagens UFLA-LE3 e UFLALE6 apresentaram maior atividade de lectina ( $32 \text{ UH } 50 \mu\text{L}^{-1}$ ). A atividade de lacase foi maior para a linhagem UFLA-LE6 ( $13,78 \pm 0,62 \text{ U kg}^{-1}$ ). Não foi detectada atividade de tirosinase em nenhuma linhagem. Como a linhagem UFLA-LE4 apresentou maior atividade antioxidante, a linhagem UFLA-LE2 apresentou maior teor de proteínas e cinzas e menor teor de lipídeos e a linhagem UFLA-LE6 se destacou quanto à maioria dos parâmetros nutricionais, atividade de lectina e maior produtividade em cogumelos, elas podem ser selecionadas para futuros trabalhos de melhoramento genético.

Palavras-chave: Shiitake. Enzimas. Lectina. Composição nutricional.

## ABSTRACT

The mushrooms are prized for their nutritional and therapeutic properties become attractive as a functional food and as a bioactive compounds source. The objectives were determine the centesimal composition, antioxidant activity and lectin content of six strains - *Lentinula edodes* - and determine the activity of tyrosinase and laccase enzymes, which is present in fruiting bodies after harvesting may influence the mushroom's senescence. The strains UFLA-LE2, UFLA-LE4 and UFLA-LE6 showed higher crude protein ( $30.71\pm 0.82\%$ ;  $29.63\pm 0.83\%$  and  $30.53\pm 1.30\%$ , respectively) and ash ( $5.49\pm 0.23\%$ ;  $5.31\pm 0.22\%$  and  $5.62\pm 0.03\%$ , respectively); UFLA-LE1 higher lipid content ( $3.14\pm 0.14\%$ ); UFLA-LE6 higher fiber content ( $16.40\pm 0.20\%$ ) and UFLA-LE5 higher carbohydrate content ( $66.59\pm 0.90\%$ ). The strain UFLA-LE4 showed higher antioxidant activity ( $53.0\pm 0.1\%$ ). The strains UFLA-LE3 and UFLA-LE6 showed greater lectin activity ( $32 \text{ UH } 50 \mu\text{L}^{-1}$ ). The laccase activity was higher for the strain UFLA-LE6 ( $13.78\pm 0.62 \text{ U kg}^{-1}$ ). It was not detected tyrosinase activity in any strain. As the strain UFLA-LE4 showed higher antioxidant activity; the strain UFLA-LE2 showed higher content of protein and ash and lower lipid content; and the strain UFLA-LE6 stood out as the most nutritional parameters, lectin activity and higher productivity in mushrooms, these strains can be selected for future breeding projects.

Keywords: Shiitake. Enzymes. Lectin. Nutritional composition.

## 1. Introdução

Os cogumelos comestíveis são excelentes alimentos que podem ser incorporados a dietas balanceadas devido ao baixo teor de lipídeos, às poucas calorias e ao alto teor de fibra alimentar e de compostos funcionais (Brene, 2010). Nos últimos anos, aumentou o interesse pela saúde humana, e a nutrição e a prevenção de doenças têm aumentado a demanda dos consumidores por alimentos funcionais.

Na verdade, os cogumelos têm se tornado atraentes como alimento funcional e como uma fonte de compostos bioativos (Zhang, Cui, Cheung & Wang 2007). Numerosas moléculas sintetizadas por cogumelos são conhecidas por serem bioativas, incluindo polissacarídeos, glicoproteínas, terpenóides e lectinas (Santos-Neves et al. 2008).

A quantidade de cogumelos consumida aumentou grandemente, devido ao contínuo desenvolvimento no cultivo, na colheita, na pós-colheita, no processamento e nos tratamentos de armazenamento, o que facilita o consumo ao longo do ano. Além das propriedades nutricionais (Barros, Baptista, Correia, Morais & Ferreira 2007), foi apontado que os cogumelos apresentam propriedades medicinais, tais como anti-inflamatórias, antitumorais, antibacterianas e antioxidantes (Barros, Baptista, Correia, Morais & Ferreira 2007; Chen, Wang & Wu 2009; Dore et al. 2007; Faccin et al. 2007; García-Lafuente et al. 2010). Além disso, eles exibem propriedades antialérgicas, hipoglicemiante, hematológicas e estão envolvidos em terapia imunomoduladora (Guillamón et al. 2010).

*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, também conhecido como shiitake, é um dos cogumelos mais consumidos no mundo, pois tem propriedades nutricionais. O shiitake tem atividade antitumoral e hipocolesterolemiantes, bem como ação

antimicrobiana e antioxidante (Kitzberger, Smânia Jr., Pedrosa & Ferreira 2007). O cogumelo shiitake é altamente nutritivo, com baixas calorias e quantidades elevadas de vitaminas, proteínas e minerais, e contém alguns elementos essenciais para a nutrição humana, como cálcio, cobre, fósforo, manganês, magnésio e zinco (Emery 2005; Manzi & Pizzoferrato, 2000).

O shiitake tem grande potencial de mercado. No entanto, normalmente, ele é comercializado *in natura* e seu tecido tem grande teor de água e forte metabolismo que favorecem a perda de água e o escurecimento, fazendo com que o prazo de validade seja curto e o valor comercial diminua facilmente após a colheita, se um procedimento adequado de armazenamento não for realizado (Nerya, Ben-Arie, Luzzatto, Musa, Khativ & Vaya 2006; Jing-jun, Jian-rong, Xiao-xiang, Lei, Tian-jia & Miao 2012).

Os objetivos, no presente trabalho, foram determinar a composição centesimal, a atividade antioxidante e o teor de lectina de seis linhagens de *Lentinula edodes* cultivadas em substrato contendo farelos e serragem, e determinar a atividade das enzimas lacase e tirosinase, que podem estar presentes nos corpos de frutificação após a colheita, podendo influenciar o escurecimento e a senescência do cogumelo.

## **2. Material e métodos**

### *2.1. Microrganismos*

Foram utilizados cogumelos de seis linhagens de *Lentinula edodes* (UFLA-LE1, UFLA-LE2, UFLA-LE3, UFLA-LE4, UFLA-LE5 e UFLA-LE6), cultivados em substrato axênico contendo serragem, farelo de trigo, farelo de algodão, farelo de arroz, calcário e fubá grosso. Após a colheita, os cogumelos foram pesados e colocados em estufa, a 60 °C, até peso constante. Os cogumelos

secos foram triturados e, a seguir, foram realizadas as análises de composição centesimal. Para as análises de atividade antioxidante, lacase, tirosinase e lectina foram utilizados cogumelos frescos.

### *2.2. Análise da composição centesimal*

Para a determinação do extrato etéreo foi utilizado o método de extração contínua, utilizando-se como solvente o éter etílico. O resíduo mineral fixo (cinzas) foi determinado pela calcinação da amostra em mufla, a 550 °C, até a obtenção de cinzas claras. O valor de proteína bruta foi obtido pelo método de micro Kjeldahl por meio da determinação do nitrogênio, usando o fator de 4,38 para o cálculo. A fração fibra foi determinada segundo o método gravimétrico, após digestão em meio ácido. A fração glicídica foi obtida por diferença de 100% da soma dos demais componentes (AOAC 2000).

### *2.3. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH*

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante foi realizada monitorando-se o consumo do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) pelas amostras, por meio da medida do decréscimo da absorbância de soluções de diferentes concentrações. As medidas de absorbância foram feitas em espectrofotômetro, a 515 nm, tendo como controles positivos o 3,5-Di-tert-butil-4-hidroxiltolueno e o ácido L-ascórbico (Brand-Williams, Cuvelier & Berset 1995).

### *2.4. Preparo do extrato bruto proteico*

O extrato bruto para as análises de lectina foi preparado de acordo com Vetchinkina, Sokolov & Nikitina (2008), com modificações. Os cogumelos foram fatiados e macerados e os extratos foram preparados pela agitação dos cogumelos, por 2 horas, com 20 mL de tampão Tris-HCl 20 mmol L<sup>-1</sup> (pH 8,0), para cada 200 mg de cogumelo. A mistura foi filtrada e a solução obtida foi utilizada nos ensaios de hemaglutinação.

Para as análises de tirosinase e lacase o extrato bruto foi preparado de acordo com Luz, Nunes, Paes, Torres, Silva & Kasuya (2012). Os cogumelos foram fatiados e 20 g foram colocados em um Erlenmeyer (250 mL) com 100 mL de tampão citrato de sódio (50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 4,8) e agitados, a 150 rpm, durante 2 horas. O extrato bruto enzimático foi obtido por filtração, depois da separação dos resíduos utilizando papel de filtro (Whatman n. 1).

### *2.5. Ensaio de hemaglutinação*

A hemaglutinação foi realizada para verificar a atividade de lectina. O ensaio foi realizado por uma diluição serial da amostra, usando o kit TOXO-HAI Gold Analisa (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), que contém o diluente e uma suspensão de eritrócitos de ave 2%. A atividade foi expressa em termos de títulos (UH 50 µL<sup>-1</sup>), o qual representa o inverso da maior diluição da amostra que causou hemaglutinação detectável após 2 horas, à temperatura ambiente (Tsvileva, Nikitina, Garibova & Ignatov 2001).

### *2.6. Ensaios enzimáticos*

#### *2.6.1. Tirosinase (E.C.1.14.18.1)*

A atividade de tirosinase foi determinada pela taxa de oxidação de L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) 2 mmol L<sup>-1</sup> em tampão Tris-HCl 50 mmol L<sup>-1</sup> (pH 7,5), a 37 °C, por 10 minutos. A oxidação da L-DOPA para DOPA quinona

foi medida pelo aumento da absorbância A 475 nm ( $\epsilon_{475}$  3700 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) (Pomerantz & Murthy 1974). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1  $\mu$ mol de L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) por minuto, por kg.

#### 2.6.2. *Lacase (EC 1.10.3.2)*

A atividade de lacase foi determinada por método espectrofotométrico indireto, utilizando-se 2,2-azino-bis etilbentiazoline (ABTS) em mistura de reação de 1 mL contendo 0.3 mL de tampão acetato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 5,0), 0,1 mL de ABTS 1 mmol L<sup>-1</sup> (em água) e 0,6 mL da fonte enzimática. A mistura de reação foi incubada, por 10 minutos, a 37 °C e a oxidação do ABTS foi medida pelo aumento da absorbância a 420 nm (Buswell, Cai & Chang 1995). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1  $\mu$ mol de ABST por minuto ( $\epsilon_{420} = 3,6 \times 10^4$  mol<sup>-1</sup> L cm<sup>-1</sup>), por kg.

#### 2.7. *Estatística*

As análises químicas e enzimáticas foram realizadas em triplicata e as médias de cada variável analisada foram comparadas estatisticamente, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

### **3. Resultados e discussão**

#### 3.1. *Composição centesimal*

A composição química variou entre as linhagens de *Lentinula edodes* (Tabela 1). Os maiores teores de umidade foram apresentados pelas linhagens UFLA-LE3 e UFLA-LE4 e a linhagem UFLA-LE5 foi a que apresentou o menor

teor. A vida útil curta dos cogumelos é atribuída ao alto teor de água que eles contêm. O teor de umidade varia entre a espécie de cogumelo, sendo o *Lentinula edodes* o que tem menor teor de umidade, comparado com *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus eryngii* e *Flammulina velutipes* (Reis, Barros, Martins & Ferreira 2012).

A linhagem UFLA-LE1 apresentou o maior teor de lipídeos. Reis, Barros, Martins & Ferreira (2012) determinaram o valor nutricional de cinco espécies de cogumelos e, dentre as espécies avaliadas, *Lentinula edodes* apresentou o maior teor de lipídeos. No entanto, o teor de lipídeo descrito por esses autores para esta espécie foi somente compatível com o teor determinado para a linhagem UFLA-LE5. Andrade, Minhoni & Zied (2008) obtiveram teores de lipídeos de linhagens de *Lentinula edodes* variando entre 2% e 3%. Neste trabalho esses teores variaram entre 0,1% a 3%. Furlani & Godoy (2007) descreveram um teor de lipídeo para *Lentinula edodes* próximo ao de *Pleurotus ostreatus* e menor que em *Agaricus bisporus*. Em cogumelos, o teor de lipídeo é muito baixo, em comparação com carboidratos e proteínas (Wani, Bodha & Wani 2010).

Quanto aos teores de proteínas e cinzas, as linhagens UFLA-LE2, UFLA-LE4 e UFLA-LE6 apresentaram os maiores teores. As cinzas fornecem uma indicação da riqueza da amostra em elementos minerais. Os principais constituintes nas cinzas são potássio e, dependendo do cogumelo, fósforo, magnésio, além do cálcio, cobre, ferro e zinco (Guillamón et al. 2010). De acordo com Carneiro et al. (2013), os teores de lipídeos, proteínas e cinzas são maiores em *Agaricus blazei* do que em *Lentinula edodes*. O valor de cinzas descrito por esses autores para *Lentinula edodes* é próximo ao descrito neste trabalho, porém, o teor de proteína encontrado foi maior do que o relatado por esses autores. Os teores de proteínas e cinzas foram semelhantes aos descritos por Andrade, Minhoni & Zied (2008). As proteínas são importantes constituintes

de cogumelos que, normalmente, contêm entre 19% e 35% de proteínas. Em comparação com outros alimentos, como arroz (7,3%), trigo (12,7%), soja (38,1%) e milho (9,4%) (Wani, Bodha & Wani 2010), pode-se observar que os cogumelos são uma fonte proteica interessante.

A linhagem UFLA-LE5 apresentou o maior teor de carboidratos. É possível observar que, na composição de todas as linhagens, os carboidratos são os constituintes nutricionais mais abundantes. De acordo com Wani, Bodha & Wani (2010), o teor de carboidratos em cogumelos representa a maior parte do corpo de frutificação, ocorrendo entre 50% e 65% em base seca. O teor de carboidratos de *Lentinula edodes*, segundo Furlani & Godoy (2007), é maior que o de *Agaricus bisporus*. Carneiro et al. (2013) relataram um teor de carboidrato em *Lentinula edodes* superior ao máximo teor descrito neste trabalho.

O teor de fibras foi maior para a linhagem UFLA-LE6. Furlani & Godoy (2007) relataram um teor de fibras para *Lentinula edodes* muito superior aos teores relatados neste trabalho. Estes autores mostraram que o teor de fibras de *Lentinula edodes* é aproximadamente igual ao encontrado em *Pleurotus ostreatus* e superior ao encontrado em *Agaricus bisporus*. Fibras em cogumelos compreendem, predominantemente, fibras insolúveis em água, principalmente quitina e  $\beta$ -glucanas, com baixos níveis de fibras solúveis em água (menos de 10%) (Cheung 2010).

Tabela 1 Composição química (%) das linhagens de *Lentinula edodes* (base seca)

<b>Linhagem</b>	<b>Umidade</b>	<b>Lipídeos</b>	<b>Proteínas<sup>†</sup></b>	<b>Fibras</b>	<b>Cinzas</b>	<b>Carboidratos</b>
UFLA-LE1	83,32±2,18 <sup>c</sup>	3,14±0,14 <sup>a</sup>	25,73±0,75 <sup>b</sup>	10,80±0,23 <sup>c</sup>	4,54±0,19 <sup>b</sup>	55,78±0,83 <sup>b</sup>
UFLA-LE2	84,66±1,35 <sup>bc</sup>	1,83±0,06 <sup>c</sup>	30,71±0,82 <sup>a</sup>	11,93±0,23 <sup>b</sup>	5,49±0,23 <sup>a</sup>	50,04±0,96 <sup>c</sup>
UFLA-LE3	87,86±0,16 <sup>ab</sup>	0,10±0,08 <sup>d</sup>	25,85±0,11 <sup>b</sup>	12,67±0,23 <sup>b</sup>	3,74±0,24 <sup>c</sup>	57,65±0,23 <sup>b</sup>
UFLA-LE4	90,39±0,64 <sup>a</sup>	2,53±0,25 <sup>b</sup>	29,63±0,83 <sup>a</sup>	10,4±0,31 <sup>c</sup>	5,31±0,22 <sup>a</sup>	52,24±0,79 <sup>c</sup>
UFLA-LE5	70,24±0,23 <sup>e</sup>	0,30±0,08 <sup>d</sup>	21,24±0,57 <sup>c</sup>	8,47±0,31 <sup>d</sup>	3,41±0,03 <sup>c</sup>	66,59±0,90 <sup>a</sup>
UFLA-LE6	77,80±1,90 <sup>d</sup>	1,47±0,15 <sup>c</sup>	30,53±1,30 <sup>a</sup>	16,40±0,20 <sup>a</sup>	5,62±0,03 <sup>a</sup>	45,98±1,41 <sup>d</sup>

Médias na coluna seguidas de letras diferentes diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

<sup>†</sup>O fator de nitrogênio usado para o cálculo de proteína bruta foi de 4,38

### 3.2. Atividade antioxidante

DPPHs são amplamente utilizados como substratos para a avaliação da capacidade de eliminação de radicais livres. O método é baseado na redução da solução metanólica de DPPH●, na forma não radicalar DPPH-H, na presença de um doador de hidrogênio antioxidante (Li, Li & Zhou 2007). A capacidade antioxidante, baseada no método de sequestro do radical livre DPPH●, foi medida nas diferentes linhagens de *Lentinula edodes*. Os resultados mostraram que todas as linhagens tiveram capacidade de eliminação do radical DPPH●. O efeito de eliminação de extratos de linhagens de *Lentinula edodes* no radical DPPH● diminuiu na ordem UFLA-LE4 > UFLA-LE2 > UFLA-LE, UFLA-LE3, UFLA-LE6 > UFLA-LE5 (Tabela 2). Estes resultados indicam que *Lentinula edodes* tem efeito na eliminação de radicais livres, ou seja, tem atividade antioxidante, mas esse efeito é diferente entre as linhagens.

Tabela 2 Atividade antioxidante das linhagens de *Lentinula edodes*

<b>Linhagem</b>	<b>Inibição (%)</b>
UFLA-LE5	40,4±0,2 <sup>d</sup>
UFLA-LE1	45,6±0,2 <sup>c</sup>
UFLA-LE3	46,0±0,1 <sup>c</sup>
UFLA-LE6	46,6±0,2 <sup>c</sup>
UFLA-LE2	51,6±0,2 <sup>b</sup>
UFLA-LE4	53,0±0,1 <sup>a</sup>

Médias na coluna seguidas de letras diferentes diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

Kim et al. (2008) determinaram a atividade antioxidante, pelo método de sequestro do radical livre DPPH●, de dez espécies de cogumelos e observaram que a atividade antioxidante de *Lentinula edodes* é menor que para os cogumelos *Pleurotus ostreatus*, *Agaricus bisporus* e *Agaricus blazei*. Segundo esses autores, a atividade antioxidante de *Lentinula edodes*, após 1 minuto de reação, foi de 20% e, após 30 minutos, foi de 31%.

Cheung, Cheung & Ooi (2003) avaliaram a atividade de eliminação de radical DPPH● em extratos de cogumelos em diferentes concentrações e informaram uma atividade antioxidante de 29% para um extrato metanólico (9 mg/ml) de *Lentinula edodes*.

### 3.3. Atividade de lectina

As linhagens de *Lentinula edodes* apresentaram diferentes teores de lectina (Figura 1). A linhagem UFLA-LE apresentou o menor teor, enquanto as linhagens UFLA-LE3 e UFLA-LE6 apresentaram o maior teor de lectina.

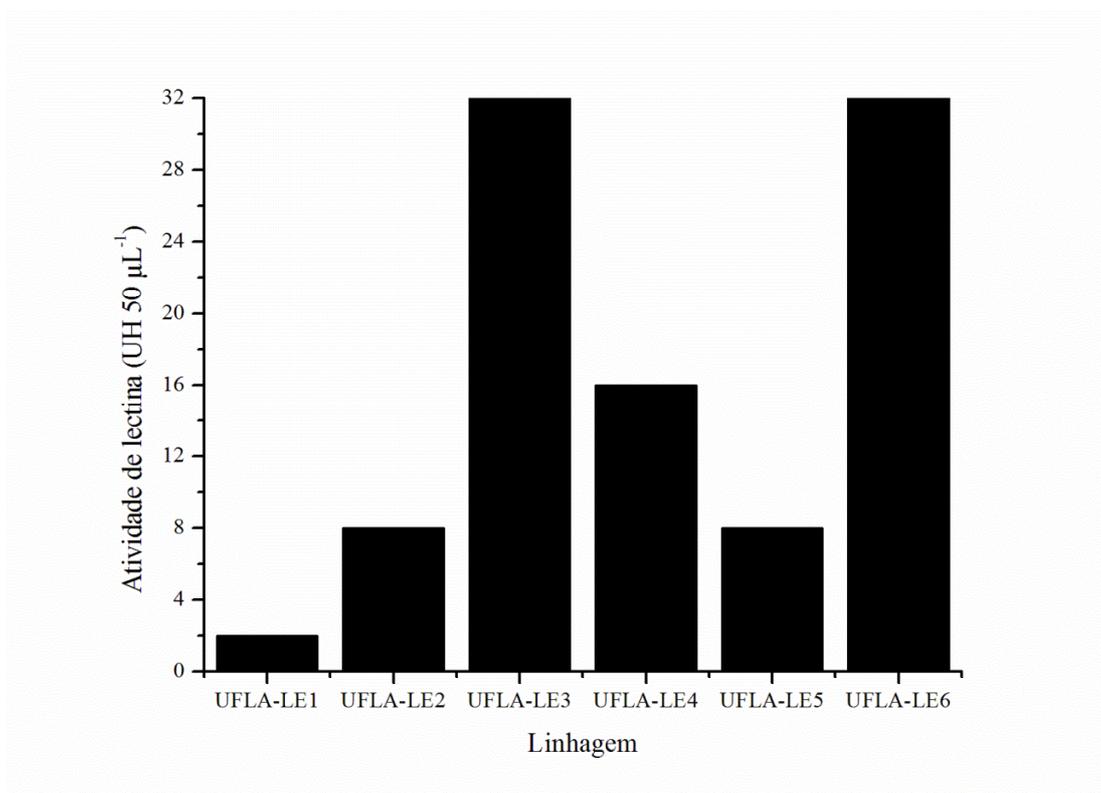


Figura 1 Atividade de lectina para as linhagens de *Lentinula edodes*

Tsivileva, Nikitina, Garibova & Ignatov (2001) relataram atividade de lectina de linhagens de *Lentinula edodes* variando entre 4 e 128 UH 50  $\mu\text{L}^{-1}$  e observaram que, à medida que o corpo de frutificação ficava maduro, a atividade de lectina diminuía.

Além da fração de polissacarídeos, que é mais extensivamente estudada, proteínas bioativas constituem o segundo componente funcional mais abundante em cogumelos. Cogumelos produzem um grande número de proteínas com atividades biológicas significativas, incluindo as lectinas (Xu, Yan, Chen & Zhang 2011).

As lectinas são proteínas que podem se ligar aos carboidratos da superfície das células, com capacidade de produzir aglutinação de células e que mostram várias atividades antiproliferativas e antitumorais contra células tumorais (Zhang, Sun, Wang & Ng 2009; Zhang, Sun, Wang & Ng 2010a). As lectinas são encontradas em muitas espécies de cogumelos, incluindo *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, *Tricholoma mongolicum*, *Agaricus subrufescens* e *Grifola frondosa* (Wang, Ng & Ooi 1998).

#### 3.4. Atividade enzimática

A enzima lacase é uma das proteínas produzidas por cogumelos que têm propriedades bioativas como atividade imunomoduladora, antitumoral e antimicrobiana (Li, Zhang, Wang & Ng 2010; Zhang, Wang, Zhang, Ng & Wang 2010b). As linhagens de *Lentinula edodes* produziram essa enzima e a maior atividade foi detectada para a linhagem UFLA-LE6 (Tabela 3).

Tabela 3 Atividade de lacase para as linhagens de *Lentinula edodes*

<b>Linhagem</b>	<b>Atividade de lacase (U kg<sup>-1</sup>)</b>
UFLA-LE1	3,77±0,28 <sup>c</sup>
UFLA-LE4	10,72±0,62 <sup>b</sup>
UFLA-LE2	10,88±0,28 <sup>b</sup>
UFLA-LE5	11,33±0,27 <sup>b</sup>
UFLA-LE3	11,75±0,30 <sup>b</sup>
UFLA-LE6	13,78±0,62 <sup>a</sup>

Médias na coluna seguidas de letras diferentes diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

Embora essa enzima apresente muitas propriedades benéficas, após a colheita do cogumelo, um aumento na atividade de lacase pode provocar o seu escurecimento, fazendo com que seu prazo de validade seja reduzido e o valor comercial diminuído facilmente, uma vez que sua aparência torna-se desagradável (Ye, Li, Han, Zhang, Jiang & Xia 2012).

Nagai et al. (2003) mostraram que a atividade de lacase aumentou proporcionalmente ao escurecimento do cogumelo *Lentinula edodes*, indicando o envolvimento dessa enzima no escurecimento pós-colheita desse cogumelo.

O aumento da atividade da enzima tirosinase também é responsável pelo escurecimento pós-colheita (Sato et al. 2009). Não foi detectada atividade dessa enzima em nenhuma linhagem de *Lentinula edodes*, o que pode ser explicado pelo fato de os extratos enzimáticos terem sido preparados logo após a colheita dos cogumelos.

#### **4. Conclusões**

A linhagem UFLA-LE6 se destacou pelo menor teor de umidade, alto teor de cinzas, proteínas, fibras e lectina. No entanto, como essa linhagem apresentou maior atividade de lacase, ela pode estar sujeita a um escurecimento mais rápido dos cogumelos.

Como a linhagem UFLA-LE4 apresentou maior atividade antioxidante, a linhagem UFLA-LE2 apresentou maior teor de proteínas e cinzas e menor teor de lipídeos e a linhagem UFLA-LE6 se destacou quanto à maioria dos parâmetros nutricionais e atividade de lectina, essas linhagens podem ser selecionadas para futuros trabalhos de melhoramento genético.

## Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro.

## Referências

- Andrade, M. C. N., Minhoni, M. T. A., & Zied, D. C. (2008). Bromatological characterization of *Lentinula edodes* strains (Shiitake) grown on *Eucalyptus grandis* logs. *Food Science and Technology (Campinas)*, 28, 793–797.
- AOAC. (2000). *Official methods of analysis*, 17th edn. Association of Official Analytical.
- Barros, L., Baptista, P., Correia, D. M., Morais, J. S., & Ferreira, I. C. F. R. (2007). Effects of conservation treatment and cooking on the chemical composition and antioxidant activity of Portuguese wild edible mushroom. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4781–4788.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 28, 25-30.
- Brene, W. M. (2010). Nutritional and medicinal value of specially mushrooms. *Journal of Food Protection*, 53, 883–894.
- Buswell, J. A., Cai, Y. J., & Chang, S. T. (1995). Effect of nutrient and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMS Microbiology Letters*, 128, 81–88.
- Carneiro, A. A. J., Ferreira, I. C. F. R., Dueñas, M., Barros, L., Silva, R., Gomes, E., & Santos-Buelga, C. (2013). Chemical composition and antioxidant activity of dried powder formulations of *Agaricus blazei* and *Lentinus edodes*. *Food Chemistry*, 138, 2168–2173.
- Chen, J. N., Wang, Y. T., & Wu, J. S. B. (2009). A glycoprotein extracted from golden oyster mushroom *pleurotus citrinopileatus* exhibiting growth inhibitory effect against U937 leukemia cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 6706–6711.

- Cheung, L. M., Cheung, P. C. K., & Ooi, V. E. C. (2003). Antioxidant activity and total phenolic of edible mushroom extracts. *Food Chemistry*, 81, 249–255.
- Cheung, P. C. K. (2010). The nutritional and health benefits of mushrooms. *Nutrition Bulletin*, 35, 292–299.
- Dore, C., Azevedo, T. C. G., Souza, M. C. R., Rego, L. A., Dantas, J. C. M., Silva, F. R. F., et al. (2007). Antiinflammatory, antioxidant and cytotoxic actions of betaglucan-rich extract from *Geastrum saecatum* mushroom. *International Immunopharmacology*, 7, 1160–1169.
- Emery, P. W. (2005). Metabolic changes in malnutrition. *Eye (London, United Kingdom)*, 19, 1029–1034.
- Faccin, L. C., Benati, F., Rincão, V. P., Mantovani, M. S., Soares, S. A., Gonzaga, M. L., et al. (2007). Antiviral activity of aqueous and ethanol extracts and of a isolated polysaccharide from *Agaricus brasiliensis* against poliovirus type 1. *Letters in Applied Microbiology*, 45, 24–28.
- Furlani, R. P. Z., & Godoy, H. T. (2007). Nutritional value of edible mushrooms. *Food Science and Technology (Campinas)*, 27, 154–157.
- García-Lafuente, A., Moro, C., Villares, A., Guillamón, E., Rostagno, M. A., D'Arrigo, M., et al. (2010). Mushrooms as a source of anti-inflammatory agents. *Antiinflammatory and Anti-allergy Agents in Medicinal Chemistry*, 9, 125–141.
- Guillamón, E., García-Lafuente, A., Lozano, M., D'Arrigo, M., Rostagno, M. A., Villares, A., & Martínez, J. A. (2010). Edible mushrooms: role in the prevention of cardiovascular diseases. *Fitoterapia*, 81, 715–723.
- Jing-jun, Y., Jian-rong, L., Xiao-xiang, H., Lei, Z., Tian-jia, J., & Miao, X. (2012). Effects of active modified atmosphere packaging on postharvest quality of shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*) stored at cold storage. *Journal of Integrative Agriculture*, 11, 474–482.
- Kim, M. Y., Seguin, P., Ahn, J. K., Kim, J. J., Chun, S. C., Kim, E. H., et al. (2008). Phenolic compound concentration and antioxidant activities of edible and medicinal mushrooms from Korea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7265–7270.
- Kitzberger, C. S. G., Smânia Jr., A., Pedrosa, R. C., & Ferreira, S.R.S. (2007). Antioxidant and antimicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. *Journal of Food Engineering*, 80, 631–638.
- Li, X. M., Li, X. L., & Zhou, A. G. (2007). Evaluation of antioxidant activity of the polysaccharides extracted from *Lycium barbarum* fruit in vitro. *European Polymer Journal*, 43, 488–497.
- Li, M. A., Zhang, G. Q., Wang, H. X., & Ng, T. (2010). Purification and characterization of a laccase from the edible wild mushroom *Tricholoma mongolicum*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, 1069–76.

- Luz, J. M. R., Nunes, M. D., Paes, S. A., Torres, D. P., Silva, M. C. S., & Kasuya, M. C. M. (2012). Lignocellulolytic enzyme production of *Pleurotus ostreatus* growth in agroindustrial wastes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43, 1508-1515.
- Manzi, P., & Pizzoferrato, L. (2000). Beta-glucans in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 68, 315–318.
- Nagai, M., Kawata, M., Watanabe, H., Ogawa, M., Saito, K., Takesawa, T., et al. (2003). Important role of fungal intracellular laccase for melanin synthesis: purification and characterization of an intracellular laccase from *Lentinula edodes* fruit bodies. *Microbiology*, 149, 2455–2462.
- Nerya, O., Ben-Arie, R., Luzzatto, T., Musa, R., Khativ, S., & Vaya, J. (2006). Prevention of *Agaricus bisporus* postharvest browning with tyrosinase inhibitors. *Postharvest Biology and Technology*, 39, 272-277.
- Pomerantz, S. M., & Murthy, V. V. (1974). Purification and properties of tyrosinases from *Vibrio tyrosinaticus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 160, 73–82.
- Poucheret, P., Fons, F., & Rapior, S. (2006). Biological and pharmacological activity of higher fungi: 20-Year retrospective analysis. *Mycologie*, 27, 311–333.
- Reis, F. S., Barros, L., Martins, A., & Ferreira, I. C. F. R. (2012). Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: An inter-species comparative study. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 191–197.
- Santos-Neves, J. C., Pereira, M. I., Carbonero, E. R., Gracher, A. H. P., Alquini, G., Gorin, P. A. J., et al. (2008). A novel branched  $\beta$ -D-glucan isolated from the basidiocarps of the edible mushroom *Pleurotus florida*. *Carbohydrate Polymers*, 73, 309–314.
- Sato, T., Kanda, K., Okawa, K., Takahashi, M., Watanabe, H., Hirano, T., et al. (2009). The tyrosinase-encoding gene of *Lentinula edodes*, *Letyr*, is abundantly expressed in the gills of the fruit-body during postharvest preservation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73, 1042-1047.
- Tsvileva, O. M., Nikitina, V. E., Garibova, L. V., & Ignatov, V. V. (2001). Lectin activity of *Lentinus edodes*. *International Microbiology*, 4, 41–45.
- Vetchinkina, E. P., Sokolov, O. I., & Nikitina, V. E. (2008). Intracellular lectins of *Lentinus edodes* at various developmental stages of the fungus. *Microbiology*, 77, 496-501.
- Wang, H., Ng, T. B., & Ooi, V. E. (1998). Lectins from mushrooms. *Mycological Research*, 102, 897–906.
- Wani, B. A., Bodha, R. H., & Wani, A. H. (2010). Nutritional and medicinal importance of mushrooms. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4, 2598-2604.

- Xu, X., Yan, H., Chen, J., & Zhang, X. (2011). Bioactive proteins from mushrooms. *Biotechnology Advances*, 29, 667–674.
- Ye, J., Li, J., Han, X., Zhang, L., Jiang, T., & Xia, M. (2012). Effects of active modified atmosphere packaging on postharvest quality of shiitake mushrooms (*Lentinula edodes*) stored at cold storage. *Journal of Integrative Agriculture*, 11, 474–482.
- Zhang, M., Cui, S. W., Cheung, P. C. K., & Wang, Q. (2007). Antitumor polysaccharides from mushrooms: A review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science and Technology*, 18, 4–19.
- Zhang, G. Q., Sun, J., Wang, H. X., & Ng, T. B. (2009). A novel lectin with antiproliferative activity from the medicinal mushroom *Pholiota adiposa*. *Acta Biochimica Polonica*, 56, 415–421.
- Zhang, G., Sun, J., Wang, H., & Ng, T. B. (2010a). First isolation and characterization of a novel lectin with potent antitumor activity from a *Russula* mushroom. *Phytomedicine*, 17, 775–781.
- Zhang, G. Q., Wang, Y.F., Zhang, X. Q., Ng, T. B., & Wang, H. X. (2010b). Purification and characterization of a novel laccase from the edible mushroom *Clitocybe maxima*. *Process Biochemistry*, 45, 627–633.