



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

**REQUERIMENTOS NUTRICIONAIS E  
CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE  
ISOLADOS DO COGUMELO *Agaricus blazei*.**

**PASCOAL JOSÉ GASPAR JÚNIOR**

**2003**

55538

MP n 047441

PASCOAL JOSÉ GASPAR JÚNIOR

**REQUERIMENTOS NUTRICIONAIS E  
CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE ISOLADOS DO  
COGUMELO *Agaricus blazei*.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”.

**Orientador  
Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias**



LAVRAS  
MINAS GERAIS-BRASIL  
2003

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

**Gaspar Júnior, Pascoal José**

Requerimentos nutricionais e caracterização enzimática de isolados do cogumelo *Agaricus blazei* / Pascoal José Gaspar Júnior. – Lavras : UFLA, 2003.

66 p. : il.

**Orientador: Eustáquio Souza Dias.**

**Dissertação (Mestrado) – UFLA.**

**Bibliografia.**

1. Cogumelo *Agaricus blazei* 2. Requerimento nutricional. 3. Celulase. 4. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**CDD-641.358**

**PASCOAL JOSÉ GASPAR JÚNIOR**

**REQUERIMENTOS NUTRICIONAIS E  
CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DE ISOLADOS DO COGUMELO**  
*Agaricus blazei.*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”.

**APROVADA em 27 de fevereiro de 2003**

**Profa. Dra. Rosane Freitas Schwan**

**UFLA**

**Profa. Dra. Kátia Regina Schwan-Estrada**

**UEM**



**Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias**  
**UFLA**  
**(Orientador)**

**LAVRAS**  
**MINAS GERAIS-BRASIL**  
**2003**

## *Dedicatória*

*Dedico essa conquista a Deus, aos meus pais pelo exemplo de coragem e determinação, a minha esposa Micheline e ao meu filhote Pascoal Neto, aos meus queridos irmãos, cunhados, sobrinhos, sogro, sogra e a toda Microbiologia pela força!!!*

## AGRADECIMENTOS

**Família.** Que seja essa a primeira palavra a ser dita nesse agradecimento pois é a base de tudo. Gostaria de enaltecer os meus pais, sr. Pascoal e d. Derly, meus heróis, grandes exemplos de coragem, fé e superação. À minha esposa Micheline, amor da minha vida e ao meu filho, Pascoal Neto, razão de tudo, todo amor que houver nessa vida. Aos meus irmãos, Regina, Marquinho, Fatinha e Zezé, meus pais por adoção, toda minha admiração e devoção pelos momentos de ajuda e pelos conselhos.

Ao professor Mozar José de Brito, que acreditou em mim desde o começo e que me convenceu a fazer o mestrado.

Ao professor Eustáquio, por ter me confiado essa missão (científica). Muito obrigado pela paciência, pelo respeito e pelos ensinamentos. Mais do que palavras, um exemplo a ser seguido.

À querida professora Rosane, mistura de mãe, amiga e professora. Obrigado pela atenção e pelo carinho.

Ao professor Romildo, obrigado pela amizade durante todo o tempo.

À minha irmãzinha Cláudia Labory, agradecer é muito pouco. Esse momento também é seu. Muito obrigado pelos momentos que passamos juntos, pelos almoços, pela dedicação e pela compreensão. Sua presença iluminou nosso trabalho. Ao professor João Cândido, obrigado pela paciência e amizade.

À minha querida amiga Márcia Tomizawa, por toda ajuda, pela amizade e pela disponibilidade. Esse trabalho também é seu.

À minha querida amiga Cris e família (Luis Robinho, Tom e Ana), pela amizade, por toda ajuda científica, pelo acolhimento e pelo carinho.

À minha querida amiga Cássia, nossa identificação sempre foi grande. Obrigado pela sua amizade e de toda a sua família.

À minha querida amiga Evânia, minha gratidão pela amizade e ajuda. Acredito em você e na sua capacidade de ser feliz.

À minha querida amiga Marisa e ao seu marido dr. Nelson, agradeço a amizade sincera e os vários conselhos.

À minha querida amiga Cidinha, mistura de paciência e doçura, a minha gratidão.

Às minhas queridas amigas Ivani e Magda, agradeço pela disponibilidade em ajudar, sempre.

Aos queridos amigos, Leidiane e Danilo, agradeço pela ajuda e pela amizade sincera.

Aos queridos amigos Sílvia e Fernando, tão corujas quanto eu, parabênzo pelo lindo filho e agradeço pela amizade.

As queridas amigas Aramália, Fernanda, Alcymara, Sheila, Luana, Cláudia (Formiga), papai Rogério, Cláudia Eugênia, Claudinelli e Raquel, obrigado pela amizade.

As queridas amigas dona Ironcina e Rosângela, pelo papo sincero e sempre amigo. Pelo cafezinho também.

Ao nosso querido e saudoso amigo Vinícius, a gratidão pela amizade e pelo sorriso sempre aberto. Agradeço a Deus a oportunidade de tê-lo conhecido.

Aos funcionários da Pascoal Drogaria e Farmácia de Manipulação, agradeço pela torcida e pela compreensão nos momentos de ausência.

A todos os amigos da Micro, um grande abraço.

E quando, de repente, existir silêncio no laboratório...

quando faltar uma piadinha aqui ou uma implicânciazinha acolá...

quando não mais existirem opiniões atravessadas...

quando conseguirem fechar a porta do laboratório sem assustar ninguém...

quando não mais precisarem de nenhum favor seu...

quando quinta-feira chegar e nada de anormal acontecer...

quando passar pelo corredor e ninguém mexer com você...

quando quiserem tomar café e não encontrarem ninguém disponível...

quando precisarem de uma tradução instantânea...

Lembrem-se de que estarei pensando em vocês e nos momentos que passamos juntos!!!

Gostaria de eternizá-los em minha memória para poder contar ao meu filho (quando ele crescer) que bela história de **amizade e fraternidade** seu pai viveu em Lavras!!! Amigos que se desprendiam de suas tarefas apenas pela **solidariedade em ajudar**. Poucas vezes tive tantos momentos de **caridade** explícitos...e em cada gesto a força da amizade!!!

Certa vez, um repórter perguntou a um goleiro de um famoso time brasileiro como ele gostaria que fosse lembrado. Ele respondeu: "Um cara legal". Acredito que se perguntarem isso sobre mim, a maioria responderá que sou um mala, um tradutor por excelência, um implicante talvez, um cruzeirense com certeza, um pai apaixonado, um estudante esforçado. Mas, na verdade, o que importará saber é que fui muito *feliz* ao lado de todos vocês!!!

# SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Características do Reino Fungi.....	3
2.2 Digestão extracelular de nutrientes.....	3
2.3 Classificação e importância de <i>Agaricus blazei</i> .....	4
2.4 Fontes nutricionais.....	6
2.4.1 Macroelementos essenciais.....	6
2.4.2 Carbono.....	6
2.4.3 Nitrogênio.....	9
2.4.4 Enxofre.....	11
2.5 Outros microelementos essenciais.....	11
2.5.1 Microelementos essenciais.....	12
2.5.2 Vitaminas.....	13
2.5.3 Lipídeos.....	14
2.6 Outros fatores.....	14
2.6.1 Concentração hidrogeniônica.....	14
2.7 Fatores físicos.....	15
2.8 Enzimas hidrolíticas.....	16
2.8.1 Modo de ação das celulasas.....	27
2.8.2 Produção de celulasas por fungos aeróbicos.....	28
2.9 Fungos de decomposição branca.....	29
2.10 Fungos de decomposição marrom.....	30



2.11 Produção de celulases por fungos anaeróbicos.....	31
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Organismo.....	33
3.2 Caracterização de <i>Agaricus blazei</i> quanto a diferentes fatores de crescimento..	33
3.3 Determinação da atividade enzimática.....	35
3.3.1 Atividade de exo $\beta$ -1,4 glucanase (EC 3.2.1.9.1).....	35
3.3.2 Atividade de endo $\beta$ -1,4 glucanase (ECC 3.2.1.4).....	36
3.3.3 Atividade de $\beta$ -glicosidase (EC 3.2.1.21).....	36
3.3.4 Atividade de xilanase (EC 3.2.1.8).....	37
3.3.5 Dosagem de proteínas totais.....	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1 Caracterização do <i>Agaricus blazei</i> quanto a diferentes fatores de crescimento..	38
4.1.1 Micronutrientes.....	38
4.1.2 Adição de extrato de levedura e peptona.....	40
4.1.3 Adição de caseína e inositol.....	41
4.1.4 Efeito da adição de cálcio ao meio básico.....	42
4.1.5 Crescimento micelial do <i>Agaricus blazei</i> em diferentes PH.....	43
4.1.6 Diferentes fontes de carbono.....	45
4.2 Atividade enzimática do <i>Agaricus blazei</i> .....	47
4.2.1 Atividade de exo $\beta$ -1,4 glucanase.....	49
4.2.2 Atividade de endo $\beta$ -1,4 glucanase.....	50
4.2.3 Atividade de $\beta$ -glicosidase.....	51
4.2.4 Atividade da xilanase.....	53
5 CONCLUSÕES.....	54
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
ANEXO.....	63

## RESUMO

**GASPAR JÚNIOR, P.J. Requerimentos nutricionais e caracterização enzimática de isolados do cogumelo *Agaricus blazei*. 2003. 66p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras MG.\***

Estudos recentes demonstraram que polissacarídeos ( $\beta$ -glucano e complexo glucano-proteína) do cogumelo *Agaricus blazei* apresentam uma alta atividade antitumoral. Dada a sua importância e conseqüente aumento de produção no Brasil, há uma grande necessidade de estudos básicos sobre essa espécie com o objetivo futuro de uma maior produtividade. Neste aspecto, a qualidade dos inoculantes utilizados como “semente” para a colonização do composto tem sido um ponto fundamental na produção do cogumelo. Isto torna necessário avaliar quais fatores nutricionais são necessários para o crescimento micelial e a formação dos corpos de frutificação, abrindo a possibilidade de utilização de diversos resíduos agro-industriais na composição do substrato de cultivo. Dessa forma, diferentes isolados crescem de maneira diferente em um mesmo meio de cultura, indicando possíveis diferenças fisiológicas entre os mesmos. Nesse aspecto, o objetivo desse trabalho foi determinar os requerimentos nutricionais do *Agaricus blazei* para a produção micelial em meio de cultura e avaliar o potencial enzimático de diferentes isolados com relação a celulose e xilana, as quais são algumas das principais substâncias presentes no composto de cultivo desse cogumelo. As análises nutricionais demonstraram que a adição de micronutrientes, peptona e extrato de levedura foi essencial para um crescimento micelial vigoroso do fungo, sendo assim definido um meio denominado meio básico completo (MBC) para a produção de massa micelial. Para os ensaios enzimáticos foi definido o meio básico (MB), constituído apenas dos sais mineirais, acrescido da fonte de carbono (celulose microcristalina ou carboximetilcelulose ou celobiose ou xilana a 1%) e extrato de levedura a 0,01%. A utilização de uma menor concentração de extrato de levedura foi importante para evitar a repressão da atividade enzimática. Foram feitos ensaios para caracterização enzimática de exoglucanase, endoglucanase,  $\beta$ -glicosidase e xilanase. Os resultados indicaram uma grande diversidade quanto a atividade enzimática, mostrando que, possivelmente, os isolados estudados são de diferentes origens. Através dos resultados obtidos, poderá ser possível correlacionar as atividades enzimáticas de cada isolado com a capacidade de utilização do composto e produção de cogumelos, permitindo estabelecer o seu potencial como inoculante comercial.

---

\* Comitê de orientação: Eustáquio Souza Dias – UFLA (Professor orientador), Rosane Freitas Schwan – UFLA.

## ABSTRACT

GASPAR JÚNIOR, P.J. Nutritional requirements and enzymatic characterization of isolates of the mushroom *Agaricus blazei*. 2003. 66p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras MG.\*

Recent studies showed that the polysaccharides ( $\beta$ -glucan and the complex glucan-protein) from the mushroom *Agaricus blazei* presented a high antitumoral activity. Due to its importance and consequent increase in the production in Brazil, there is a necessity of basic studies to improve the knowledge about this specie aiming to enhance the productivity. The quality of the inoculum utilized as 'spawn' for the colonization of the compost is one of the fundamental points for the production of the mushroom. For better understanding of the growth of the mushroom in those substrates it is necessary to evaluate the nutritional factors which are responsible for the mycelial growth and formation of fruiting body. This will increase the possibility of utilization of different residues in the composition of the substrate for cultivation of the mushroom. It is known that different isolates have different growth rates when growing in the same culture medium, which indicate possibly that there is physiological difference among them. The aim of this work was to determine the nutritional requirements of *Agaricus blazei* for the production of mycelia growth in culture medium and evaluate the enzymatic potential of these isolates in relation to cellulose and xylan, which are ones of the principal compounds present in the compost. The nutritional analyses indicated that the addition of micronutrients, peptone, calcium and yeast extract was essential for the mycelia growth of *Agaricus blazei*, so the medium contained these ingredients were called Complete Basic Medium (CBM) for the mycelia production. For the enzymatic assays it was used the Basic Medium (BM) supplemented with 0,01% of yeast extract and 1% of cellulose microcristalina or carboximetilcellulose or celobiose or xylan. It was important to utilize small concentration of yeast extract to avoid repression of the enzymatic activity. It was done characterization of exoglucanases, endoglucanases,  $\beta$ -glicosidase and xylanase. The results indicated that there is a great diversity in relation to enzyme activity, showing that possibly the isolates studied can be from different origins. Throughout this work, it will be possible to correlate the enzymatic activity of each isolate with the ability to utilize the compost and mushroom production with could establish its potencial as commercial inoculum.

\* Guidance committee: Eustáquio Souza Dias – UFLA (Major Professor),  
Rosane Freitas Schwan – UFLA.

# 1 INTRODUÇÃO

Estudos realizados no Japão mostraram que os corpos de frutificação do cogumelo *Agaricus blazei* apresentavam uma alta concentração de  $\beta$ -glucanos associados às proteínas, formando um complexo glucano-protéico com forte atividade antitumoral (Mizuno et al., 1990; Kawagishi et al., 1990; Chang et al., 2001). Esses cogumelos exibem atividade antimutagênica que pode contribuir para um possível efeito anticarcinogênico (Delmanto et al., 2001; Menoli et al., 2001) e ainda podem aumentar a resposta imunológica pelo aumento da produção de anticorpos (Nakajima et al., 2002). Takaku, Kimura e Okuda (2001) conseguiram isolar uma fração lipídica, o ergosterol, que inibe a angiogênese e não é inativado por via oral. Grube-Baiba et al. (2001) afirmaram que uma dieta rica em cogumelos pode diminuir a proliferação do câncer de mama.

As propriedades medicinais do *Agaricus blazei* despertaram um grande interesse do mercado consumidor japonês, o qual tornou-se o grande importador de *Agaricus blazei*. No entanto, o aumento de produção desse cogumelo no Brasil ocorreu sem que houvesse estudos científicos específicos para essa espécie. Com isso, a produção desse cogumelo foi implementada com base na tecnologia de cultivo do *Agaricus bisporus*.

O *Agaricus blazei* é um fungo que se assemelha muito ao *Agaricus bisporus* quanto às condições de cultivo para a produção de cogumelos, apresentando como principal diferença a temperatura de indução da frutificação (25° C para o *A. blazei* e 17° C para o *A. bisporus*). As duas espécies exigem condições muito semelhantes em relação ao substrato de cultivo e a indução da frutificação. Por isto, o processo de compostagem utilizado é basicamente o mesmo para as duas espécies, podendo-se utilizar também praticamente a mesma

matéria-prima. Considerando todas estas semelhanças, é de se esperar que o *A. blazei* apresente uma grande semelhança em relação ao *A. bisporus* quanto as suas exigências nutricionais e, conseqüentemente, um sistema enzimático muito parecido.

O conhecimento do potencial enzimático do *Agaricus blazei* com relação às principais substâncias presentes no composto de cultivo desse cogumelo, como a celulose, poderá ser importante para avaliar a capacidade de vários isolados quanto á utilização do composto e a produção de cogumelos, permitindo estabelecer o seu potencial como inoculante comercial.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Características do reino Fungi

Os fungos são organismos heterotróficos que utilizam compostos orgânicos formados por outros organismos. Alguns fungos são saprófitas, alimentando-se de organismos mortos ou de seus restos, como o esterco. Outros vivem como parasitas nas células de outros fungos, plantas ou animais. Eles absorvem seus nutrientes, secretando enzimas digestivas que quebram macromoléculas em substâncias simples que, dessa forma, podem entrar nas células por osmose ou outros mecanismos especializados de transporte (Landecker, 1996).

Enzimas extracelulares podem ser encontradas em mucilagens extracelulares que contêm uma grande proporção de polissacarídeos, principalmente  $\beta$ -glucanos, ramificados com polímeros de glicose que são constituintes normais da parede celular. O invólucro mucilaginoso pode ser um local de reserva para enzimas digestivas secretadas e também o local do início da absorção de nutrientes. Microfibrilas de quitina e/ou celulose estão entrelaçadas e embebidas na matriz amorfa que envolve os fungos, formando o esqueleto que confere a sua estrutura morfológica característica. Essa estrutura ocorre em uma camada simples enquanto as outras camadas ocorrem de forma homogênea, consistindo primariamente de proteínas amorfas e/ou carboidratos. A matriz contém proteínas e polissacarídeos, como as glucanas ou mananas e polímeros de glicose e manose, (Landecker, 1996).

## 2.2 Digestão extracelular de nutrientes

Os fungos estão em contato direto com nutrientes em seu meio. Moléculas menores, como açúcares simples e aminoácidos em solução, rodeiam a hifa, podendo ser absorvidas por ela. Grandes polímeros insolúveis, como celulose, amido e proteínas, precisam sofrer uma digestão preliminar antes de serem usados. As enzimas digestivas fúngicas extracelulares controlam as reações de hidrólise que clivam as grandes moléculas em componentes mais simples. As enzimas digestivas são altamente específicas. Uma vez absorvidas, as moléculas pequenas são atacadas por enzimas intracelulares (Landecker, 1996).

A habilidade para utilizar moléculas grandes depende da habilidade dos fungos em digeri-las, uma vez que isso depende do seu arsenal enzimático. Os fungos possuem um grande número de enzimas mas a maioria está inativada até que entrem em contato com o substrato, fazendo com que as enzimas possam atuar (Landecker, 1996).

Todas as moléculas e íons que entram em uma célula precisam passar pela parede celular e pela membrana plasmática. A membrana plasmática é uma membrana semipermeável que regula o movimento de solutos dentro da célula. Quase todos os íons são transportados ativamente, tanto os cátions (potássio, magnésio, manganês, ferro e amônio) como os ânions (fosfato e sulfato) (Landecker, 1996).

## 2.3 Classificação e importância do *Agaricus blazei*

O cogumelo *Agaricus blazei* é um fungo da família *Agaricaceae*, pertencente à divisão *Basidiomycota*. É um organismo saprófita que necessita do fornecimento de substâncias orgânicas em decomposição para o seu desenvolvimento.

Este cogumelo foi encontrado naturalmente nas regiões serranas da Mata Atlântica do sul do estado de São Paulo e passou a ser conhecido principalmente pelas suas propriedades medicinais. No Brasil, recebe o nome comercial de Cogumelo de Deus, Cogumelo Princesa e Cogumelo Piedade. Este último devido ao fato de ter sido no município de Piedade, sudoeste de São Paulo, o local em que se iniciou o cultivo nas décadas de 60 e 70. No Japão, recebe o nome de comercial de Himematsutake ou Kawariharatake (Kawagishi et al., 1990; Mizuno et al., 1990).

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

Takaku, Kimura e Okuda (2001) isolaram uma substância antitumoral da fração lipídica do *Agaricus blazei* chamada ergosterol que também é encontrado em *Lentinula edodes* e *Polyporus umbellatus*. Os resultados sugerem que o ergosterol e seu metabólito (ergocalciferol) estejam envolvidos na inibição da angiogênese.

Vários polissacarídeos anticarcinogênicos extraídos de basidiomicetos são compostos por ligações  $\beta$ -1,3 D-glicose. No entanto, a principal característica do *Agaricus blazei* é o fato de apresentar um conteúdo único de D-glucano, formado exclusivamente por ligações  $\beta$ -1,6 as quais estão associadas á atividade antitumoral (Menoli et al., 2001).

Segundo Grube-Baiba et al. (2001), a produção de aromatase/estrógeno sintetase desempenha um papel dominante no desenvolvimento do câncer de mama. Um extrato preparado de *Agaricus bisporus* suprimiu a atividade de aromatase dose dependente. Estes resultados sugerem que uma dieta rica em



cogumelos pode modular a atividade da aromatase e funcionar ativamente na prevenção pós-menopausa do câncer de mama pela redução da produção de estrógeno.

## **2.4 Fontes nutricionais**

Considerando que os fatores nutricionais são muito importantes para o crescimento micelial e a produção de cogumelos, é interessante a avaliação de diferentes isolados quanto aos seus requerimentos nutricionais e crescimento em diferentes substratos. Isolados mais rústicos, que apresentam crescimento mais rápido e vigoroso, podem ser importantes num programa de seleção de linhagens para a produção de inoculantes comerciais.

### **2.4.1 Macroelementos essenciais**

Moléculas orgânicas que nutrem qualquer organismo contêm grandes quantidades de carbono, hidrogênio e oxigênio, sendo consideradas macroelementos essenciais. Esses elementos são requeridos para sustentar o crescimento normal e o desenvolvimento fúngico porque fazem parte de componentes celulares e de enzimas envolvidas na sua sobrevivência. A obtenção de hidrogênio e oxigênio provém da água ou quando compostos orgânicos são metabolizados. Já o carbono provém principalmente de substratos orgânicos utilizados por fungos. Outros elementos são também requeridos pelos fungos, como macronutrientes, entre eles o nitrogênio, enxofre, potássio, magnésio, cálcio e fósforo (Griffin, 1994).

### **2.4.2 Carbono**

Metade do peso seco de células fúngicas consiste de carbono, o que indica a importância funcional desse componente. Compostos orgânicos são

usados na estrutura celular e também como fonte de energia através da sua oxidação. Os fungos podem utilizar uma ampla variedade de compostos orgânicos, que incluem carboidratos (mono, di, oligo e polissacarídeos), lipídeos, proteínas e ácidos orgânicos. No entanto, os carboidratos constituem a principal fonte de carbono (Landecker, 1996).

Cada molécula de açúcar (pentose ou hexose) tem um grupamento aldeído e cetona que pode ser reduzido para formar um derivado alcoólico de açúcar ou oxidado para formar um ácido derivado de açúcar (carboxílico). O açúcar que promove o crescimento de quase todos os fungos é D-Glicose. Muitos fungos podem utilizar ainda D-Frutose e D-Manose com bons resultados de crescimento. Das pentoses, a D-Xilose também pode obter bons resultados em alguns fungos, mas a maioria funciona como uma fonte pobre em carbono. Os açúcares alcoólicos podem ser usados como fonte de carbono, mas são menos eficientes do que os açúcares simples. O manitol (derivado da redução da D-Frutose ou D-Manose) é uma exceção, pois pode obter um crescimento equivalente a D-Glicose em alguns fungos (Landecker, 1996).

Os açúcares simples como a glicose e seus derivados produzem energia quando oxidados. Naffaa, Ravel & Guillaumin (1998), ao trabalharem com fungos endofíticos de gramíneas, observaram que a maioria dos isolados apresentaram crescimento mais rápido com altas concentrações de glicose (1 a 6%). Segundo os mesmos autores, esses monossacarídeos estão presentes em baixas concentrações quando comparados com outros organismos. Sua energia pode ser estocada no dissacarídeo trealose e em açúcares alcoólicos como glicerol e manitol. O glicerol foi encontrado nas lamelas de *Agaricus bisporus* recém-colhido, mas em quantidade inferior aos demais polióis (Beecher, Magan & Burton, 2001). O manitol acumula-se nos corpos de frutificação de cogumelos (30% peso seco), considerando que sua concentração no micélio é

significativamente mais baixa, de 1 a 5% (Wannet et al., 2000). Provavelmente, o manitol possui uma atividade osmótica durante o crescimento do esporóforo e é sintetizado através da redução da frutose pela manitol desidrogenase (Wannet et al., 2000). Os fungos produzem polissacarídeos que podem ser fonte de energia de reserva como glicogênio e quitina, que ocorrem na maioria das paredes celulares fúngicas (Wannet et al., 2000). Manitol e trealose também foram encontrados nos corpos de frutificação de *Agaricus blazei*, *Antrodia camphorata* e *Cordyceps militaris* (Chang et al., 2001). O dissacarídeo trealose é altamente resistente ao calor devido à ausência da extremidade redutora (Saito et al., 1998), apresentando a propriedade de estabilizar membranas e enzimas contra a desnaturação térmica, é encontrado em pequenas proporções, representando menos de 5% do peso seco do cogumelo (Maheshwari, Bharadwaj & Bhat, 2000).

Tanto dissacarídeos como polissacarídeos são importantes fontes de carbono na natureza. Em reações catabólicas de respiração e fermentação, os polissacarídeos utilizados como nutrientes podem ser digeridos e seus constituintes, assimilados (Kersten et al., 1999). Os dissacarídeos são abundantemente produzidos e podem também ser liberados pela quebra dos polissacarídeos. Para poder utilizá-los, os fungos precisam produzir enzimas digestivas extracelulares, que irão clivar as ligações glicosídicas entre os monômeros (Chantaraj et al., 2000). Depois, os açúcares e seus derivados poderão ser digeridos e o fungo poderá absorvê-los e utilizá-los eficientemente.

A habilidade dos fungos em usar esses elementos depende da sua habilidade em digeri-los e absorvê-los como açúcares simples. A incapacidade de usar um determinado complexo de carboidratos é devida à sua hidrólise ineficiente, não tendo nenhuma correlação com a sua absorção. Um fungo capaz de hidrolizar um polímero é capaz de crescer tanto em um meio com um polímero

de glicose como em um meio com glicose livre. Amido e celulose são amplamente utilizados como fontes de carbono pelos fungos (Miles & Buswell, 1993).

Os fungos diferem na sua habilidade em utilizar diferentes fontes de carbono, principalmente fontes específicas que podem ser alteradas por uma combinação de nutrientes presentes ou por alterações nas condições de cultivo, como a variação de pH. Se um fungo é nutrido por diversas fontes de carbono, haverá uma preferência por determinada fonte. Essa mistura de fontes provoca melhor crescimento do que uma fonte simples. Por exemplo, glicose e galactose em combinação proporcionam um crescimento melhor do que glicose ou galactose sozinhos (Miles & Buswell, 1993).

### 2.4.3 Nitrogênio

De 60 a 70% do nitrogênio total da célula fúngica é proteína. O nitrogênio que não existe como proteína ocorre como ácido nucléico, quitina, fosfolípidios, vitaminas e metabólitos não essenciais (Kersten et al., 1999; Boyle, 1998). As proteínas formadas pelos fungos são similares às outras de outros organismos, contando com a participação de 20 aminoácidos. Muitas proteínas são ligadas covalentemente com carboidratos para formar glicoproteínas e peptidoglicanos que são encontrados dentro de membranas ou paredes celulares. As glicoproteínas desempenham várias funções. Dentre elas, servem como componentes estruturais, enzimas ou como reguladores do contato celular como na fusão celular na plasmogamia. Outras proteínas servem como enzimas, atuando como catalisador em todas as funções metabólicas (Landecker, 1996).

Os fungos utilizam nitrogênio inorgânico na forma de nitrato, nítrito e amônia ou nitrogênio orgânico na forma de aminoácidos, peptídeos e peptonas (Miles & Buswell, 1993).

Nem todos os fungos usam as fontes de nitrogênio com a mesma facilidade. Alguns requerem uma forma específica de assimilação. Numerosos fungos utilizam nitrato como forma de nitrogênio, mas a incapacidade de assimilá-lo é comum entre os basidiomicetos. O nitrato, para ser usado por alguns fungos, precisa ser reduzido em amônia antes de ser incorporado em compostos orgânicos. O nitrito pode servir como fonte de nitrogênio em alguns fungos que, inclusive, são capazes de usar nitratos. No entanto, o nitrito pode exercer efeitos tóxicos pela desaminação de aminoácidos ou por interferir no metabolismo do enxofre. Nitritos não são usados rotineiramente em laboratórios na preparação de meios de cultura. Numerosos fungos, por não conseguirem reduzir o íon nitrato, utilizam o nitrogênio na forma de íon amônio ou na forma de nitrogênio orgânico, que possui o mesmo estado de oxidação. Em um meio de cultura, o nitrogênio orgânico pode ser proposto como aminoácidos, peptídeos ou peptonas (Landecker, 1996).

Ocorre uma grande variação na resposta ao uso de diferentes aminoácidos. Apesar de a resposta ser diferente em diferentes espécies, pode-se observar que quando a asparagina é adicionada ao meio de cultura, frequentemente o fungo apresenta bom crescimento. Isso também pode ser notado com o uso de glicina, ácido glutâmico e aspártico. Ao contrário, ao se usar leucina, o crescimento foi fraco. O crescimento é melhor quando se usam diversos aminoácidos juntos do que separadamente (Chang et al., 2001).

De acordo com Boyle (1998), a maioria dos suplementos que contém nitrogênio aumenta o crescimento micelial, enquanto outros elementos, como vitaminas ou carboidratos, têm um efeito menor. Complexos de nitrogênio como a caseína hidrolisada aumentam o crescimento micelial e inibem a degradação de lignina mais do que uma fonte simples como o glutamato.

Segundo Kersten et al. (1999), a absorção de glutamato é inibida pela concentração intra e extracelular de  $\text{NH}_4^+$ . Além de glicose e ácido succínico, os fungos termofílicos também utilizam sulfato de amônio como fonte de nitrogênio (Maheshwari, Bharadwaj & Bhat, 2000).

#### 2.4.4 Enxofre

Os componentes sulfúricos que são importantes para o crescimento e desenvolvimento fúngico incluem aminoácidos como cisteína, cistina e metionina e os peptídeos que os incorporam. As vitaminas tiamina e biotina também contêm enxofre. Alguns metabólitos que contêm enxofre produzem um flavor ou aroma característico. Para Naffaa, Ravel & Guillaumin (1998), a metionina não proporcionou melhores condições para o desenvolvimento de fungos endofíticos.

O suprimento de enxofre é usualmente pleno quando há a incorporação do íon sulfato, normalmente sulfato de magnésio, no meio de cultura. O enxofre entra na célula por transporte ativo, na qual é rapidamente reduzido e incorporado em moléculas orgânicas (Griffin, 1994).

#### 2.5 Outros macroelementos essenciais

O íon fosfato é um constituinte importante de macromoléculas, como DNA, RNA e fosfolípidos, e em pequenas moléculas, como NAD, FAD, coenzima A e algumas vitaminas. É também importante na estocagem de energia e na sua transferência celular, pois é componente de nucleotídeos como ATP e GTP. Normalmente, o requerimento de fósforo é suprido pela incorporação de fosfato inorgânico no meio de cultura (Latiff, Daran & Mohamed, 1996).

O potássio é importante no transporte e na regulação da pressão osmótica celular, sendo usado na forma inorgânica. Segundo Kupper (2000), o potássio é o mais importante dos nutrientes encontrados nos cogumelos comestíveis pela sua capacidade em diminuir a pressão sanguínea em humanos.

O magnésio é requerido como cofator de algumas enzimas envolvidas na glicólise ou no ciclo do TCA, na estrutura e funcionamento de membranas, sendo usado na forma inorgânica (Demirbas, 2001).

O cálcio tem um importante papel na manutenção da integridade de membranas, na atividade enzimática e no funcionamento de microtúbulos e microfilamentos. No entanto, não tem sido demonstrado ser universalmente requerido (Mattila et al., 2001; Manzi et al., 1999; Beyer et al., 1998). A necessidade de cálcio é uma questão relativa e difícil de ser avaliada, já que o nutriente pode vir na forma de contaminação. Beyer et al. (1998) avaliaram o efeito da adição de quelantes no substrato de cultivo do *Agaricus bisporus*. Os resultados sugerem que o acúmulo de cálcio pode inibir a frutificação do cogumelo.

### 2.5.1 Microelementos essenciais

Alguns fungos têm um requerimento específico por um microelemento que não é necessariamente dividido por todos. Microelementos desempenham diversas funções na célula, mas estão principalmente associadas com as enzimas. Uma enzima pode ser ativada por um microelemento ou pode conter um microelemento como parte de sua estrutura. Outros microelementos também podem ser componentes estruturais de vitaminas ou de metabólitos que são requeridos em suas sínteses (Landecker, 1996).

O ferro está contido na enzima catalase, no citocromo envolvido no transporte de elétrons e em outros pigmentos. O molibdênio, por exemplo, participa como um carreador de elétron na redução enzimática do nitrato em alguns fungos. O sódio é particularmente requerido por alguns fungos marinhos mais por regular a pressão osmótica do que como nutriente. O boro é essencial para plantas verdes mas não para fungos. O zinco e manganês ativam enzimas no

ciclo do Ácido Tricarboxílico. O cobre pode reduzir a pigmentação de esporos em alguns fungos (Landecker, 1996).

### 2.5.2 Vitaminas

Vitaminas são compostos orgânicos que funcionam como coenzimas ou como parte constituinte de coenzimas que catalizam reações específicas, mas não são usadas como parte estrutural das células. Todos os organismos requerem algumas vitaminas, variando a capacidade de sintetizá-la. Por exemplo, plantas verdes produzem suas próprias vitaminas, mas animais precisam obtê-las de uma fonte exógena. Alguns fungos, se supridos com açúcar, nitrogênio e minerais, são capazes de sintetizar suas próprias vitaminas.

Os fungos aparentemente não têm necessidade de vitamina C e de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) que normalmente são necessárias para os animais. As vitaminas que são requeridas e sintetizadas pelos fungos são hidrossolúveis (Matilla et al., 2001). As vitaminas do complexo B requeridas são tiamina (vit. B1), piridoxina (vit. B6), ácido nicotínico (vit. B3), ácido pantotênico (vit. B5), riboflavina (vit. B2) e cianocobalamina (vit. B12) (Matilla et al., 2001; Caglarlrmak, Unal & Otles, 2001). Inositol também pode ser considerado uma vitamina ou fator de crescimento (Eguchi, Yoshimoto & Higaki, 1995).

A tiamina tem ação na regulação do metabolismo de carboidratos. A forma ativa da tiamina é a tiamina pirofosfato, mais conhecida como coenzima da carboxilase. O ácido pirúvico, intermediário no metabolismo de carboidratos, é transformado em acetaldeído e dióxido de carbono pela carboxilase. O ácido pirúvico tende a acumular nas culturas fúngicas deficientes de tiamina.

A deficiência de biotina é menos comum que a de tiamina. Biotina promove a atividade de enzimas que transferem CO<sub>2</sub> ou grupamentos carboxila.



Essas enzimas são piruvato carboxilase, acetil-CoA carboxilase e uréia carboxilase. Em sua forma biologicamente ativa, a biotina se liga covalentemente com resíduos de lisina no sítio ativo da carboxilase. O complexo biotina-lisina funciona como uma coenzima que se liga ao CO<sub>2</sub> ou grupamento carboxila e, então, o transfere ao substrato (Griffin, 1994).

A vitamina D<sub>2</sub>, derivada por fotoirradiação do seu precursor ergosterol, é essencial para o ser humano. Segundo os estudos de Mattila et al. (2002), a vitamina D<sub>2</sub> esteve totalmente ausente em cogumelos cultivados (*Lentinula edodes*, *Agaricus bisporus* e *Pleurotus ostreatus*), mas presente nos silvestres. Já o ergosterol foi encontrado em níveis mais altos em cogumelos cultivados do que nos silvestres.

### 2.5.3 Lipídeos

Os lipídeos podem servir como fonte de energia e carbono. Fungos usualmente não requerem uma fonte exógena de lipídeos porque são capazes de sintetizá-los, não sendo adicionados ao meio de cultura normalmente. As reservas lipídicas consistem basicamente de triglicerídeos, que podem servir como fonte energética quando requeridos na germinação de esporos, por exemplo (Landecker, 1996).

## 2.6 Outros fatores

### 2.6.1 Concentração hidrogeniônica

Todos os fungos estão em contato com soluções aquosas na natureza ou no laboratório e a concentração de íon hidrogênio (pH) nessas soluções controla o crescimento fúngico. Íons metálicos podem ser afetados pelo pH, formando complexos insolúveis em determinadas faixas. Íons fosfato e magnésio podem

coexistir em pH baixo, porém em pH elevado, eles formam um complexo insolúvel, reduzindo a disponibilidade desses íons para o fungo. O ferro torna-se insolúvel em pH neutro a alcalino. Esse efeito é similar com íons cálcio e zinco. A permeabilidade celular é alterada com a variação entre acidez e alcalinidade, sendo o efeito particularmente notável em compostos que se ionizam. A explicação é que em pH baixo, a membrana plasmática se torna saturada com íons hidrogênio e a passagem de cátions fica limitada, enquanto, em pH elevado, a membrana se torna saturada com íons hidroxila, limitando a entrada de ânions essenciais (Landecker, 1996).

As enzimas são inativadas em faixas de pH extremos, tendo diferentes níveis ótimos para a atividade. Um pH desfavorável do meio externo pode alterar a atividade das enzimas digestivas extracelulares ou outros processos metabólicos (Zheng & Shetty, 2000). Os fungos invariavelmente alteram o pH do meio em que crescem. Um caso comum de decréscimo é o acúmulo de ácidos orgânicos, como ácido glucônico, pirúvico, cítrico e succínico, formados pelo metabolismo de açúcares. Dióxido de carbono, um subproduto do metabolismo de carboidrato, combina com água para formar ácido carbônico, abaixando o pH. A utilização pelo fungo do nitrogênio dos nitratos de sódio e potássio tende a liberar bases, aumentando o pH. Com o sulfato de amônio ocorre o contrário, já que o fungo tende a liberar ácidos.

A utilização de fontes de nitrogênio inorgânico e o seu efeito sobre o pH do meio foi estudado por Bohus (1998). Entre as espécies que usaram ambos,  $\text{NH}_4$  e  $\text{NO}_3$ , a mesma faixa foi satisfatória para a utilização das fontes de nitrogênio.

Em geral, um ligeiro grau de acidez é favorável à germinação dos esporos e ao rápido crescimento das colônias jovens (Landecker, 1996).

## 2.7 Fatores físicos

Os fatores físicos, que atuam em conjunto com os requerimentos nutricionais para a obtenção do crescimento micelial, diferem dos usados para a frutificação. Segundo Ohga & Royse (2001), o ambiente estimula a expressão de genes como a lacase e celulase em cogumelos de alto valor comercial.

A umidade do ar é um fator extremamente importante para a frutificação, devendo ser mantida entre 80 e 90% para evitar a evaporação a partir do substrato e permitir o desenvolvimento do corpo de frutificação (Miles & Buswell, 1993).

O crescimento em altas temperaturas pode incapacitar o fungo de sintetizar uma vitamina requerida ou inativar a ação de enzimas, impossibilitando até a sobrevivência micelial (Zheng & Shetty, 2000). A temperatura também é um dos fatores mais importantes para o crescimento de fungos, podendo ser diferente para o crescimento micelial e a frutificação. Um exemplo bem conhecido é o *Agaricus bisporus*, o qual requer temperatura de 25°C para o crescimento micelial e de 17°C para a formação dos corpos de frutificação.

No caso da luz forte, poderá haver destruição de vitaminas e má formação de estruturas reprodutivas. A luz influi diretamente sobre o desenvolvimento vegetativo e reprodutivo dos fungos. Na primeira fase, os fungos preferem a obscuridade ou luz difusa para se desenvolverem, e, na segunda, procuram a luz para formar as frutificações. A maioria dos efeitos da luz nos fungos é mais efetiva sobre a esporulação do que sobre o crescimento micelial (Griffin, 1994).

## 2.8 Enzimas hidrolíticas

Os fungos decompositores apresentam uma grande capacidade de degradação de resíduos de origem vegetal ricos em polissacarídeos complexos.

A parede celular das plantas é formada por três componentes estruturais: lamela média, parede primária e parede secundária. A lamela média é constituída principalmente por substâncias pécticas e compreende a região localizada entre as paredes de células adjacentes, atuando como um adesivo intercelular. A parede primária é formada principalmente por polissacarídeos como celulose, hemicelulose e por substâncias pécticas, sendo que, em células mais velhas, pode-se ainda encontrar lignina e suberina (Landecker, 1996).

A hemicelulose é composta principalmente por xilose, arabinose, glicose, manose e galactose, sendo que as xiloglucanas e as xilanas são os constituintes predominantes nas paredes primárias e secundárias, respectivamente. As xiloglucanas são formadas por moléculas de glicose com ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 e ramificações de xilose em ligações  $\alpha$ -1,6, enquanto as xilanas são cadeias de xilose em ligações  $\beta$ -1,4. A degradação das hemiceluloses requer a atuação de várias enzimas comumente denominadas de hemicelulases (Landecker, 1996).

De acordo com Groot et al. (1998), a xilana, o mais abundante componente hemicelulósico em compostos de palha para o cultivo de cogumelo, é um polímero que consiste de resíduos de xilosil, unidos por ligações  $\beta$ -1,4. A ação de algumas enzimas, incluindo endo-1,4- $\beta$ -xylanase,  $\beta$ -xylosidase,  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase,  $\alpha$ -glicoronidase e algumas esterases, assegura a conversão enzimática completa de xilana em açúcares monoméricos.

As substâncias pécticas (ácido pectínico ou pectina) são polissacarídeos formados por longas cadeias de ácido D-galacturônico com ligações  $\alpha$ -1,4, entremeadas com resíduos de ramnose, podendo haver cadeias laterais curtas de

D-galactose e outros açúcares. Dependendo do grau de metilação dos grupos carboxílicos dos resíduos de ácido galacturônico, esses polímeros são conhecidos como ácido pectínico ou pectina. Há várias enzimas, conhecidas como pectinases ou enzimas pectinolíticas, que degradam as substâncias pecticas: metilpoligalacturonases, poligalacturonases, pectina liases, trans-eliminases do ácido poligalacturônico e metilesterases da pectina (Pascholati, 1993).

De acordo com Zheng & Shetty (2000), as enzimas pecticas hidrolisam ou lisam substâncias preferenciais de acordo com seus padrões de ação. Elas são amplamente classificadas em: a) Pectinesterases: saponificam as porções esterificadas das cadeias pecticas; b) Despolimerases: são responsáveis pela quebra da cadeia.

Entre as despolimerases, a endopoligalacturonase (PG, EC 3.2.1.15) é a principal enzima com função hidrolítica. A poligalacturonase é amplamente usada na indústria alimentícia nos processos de maceração, liquefação, extração, clarificação e filtração de sucos de frutas ou vegetais e vinhos. É muito usada industrialmente por possuir elevada atividade enzimática em pH baixo, satisfazendo as aplicações de frutas e verduras ao processo industrial (Zheng & Shetty, 2000).

Preparações comerciais de poligalacturonases usadas na indústria alimentícia são usualmente derivadas de fontes fúngicas, especialmente *Aspergillus niger* e *Kluyveromyces marxianus* (Zheng & Shetty, 2000).

*Lentimus edodes* é capaz de produzir elevados níveis de poligalacturonase durante a fermentação em estado sólido de bagaço de morango. Essa enzima tem uma temperatura ótima elevada (50° C) e um pH ótimo baixo (pH=5,0), com boa estabilidade térmica acima de 50°C, e uma alta tolerância à variação de pH (3,0 a 6,5). Considerando o pH ácido natural da maioria das frutas, vegetais e sucos, a propriedade ácida faz com que essa enzima seja um

candidato ideal para a maceração de tecidos, extração e clarificação de sucos de frutas e vegetais no processo industrial (Zheng & Shetty, 1999).

A lignina, encontrada principalmente em plantas lenhosas, é um constituinte da parede celular derivado do ácido cinâmico. A deposição da lignina ocorre após a maturação da parede celular, em substituição às moléculas de água, conferindo-lhe rigidez através da ligação covalente com outros constituintes poliméricos. Sua degradação enzimática, embora não completamente esclarecida, é catalizada por ligninases (Griffin, 1994).

A primeira indicação de que *Agaricus bisporus* era capaz de degradar a lignina veio de Waksman e Nissen (1932), citado por Bonnen, Anton & Orth (1994). Segundo esses autores, há uma redução significativa de lignina do composto no fim do ciclo de produção do cogumelo.

A degradação de lignina tem sido estudada extensivamente no basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium*, que possui 2 tipos de peroxidases: lignina e manganês peroxidases (Broda et al., 1996; Groot et al., 1998). Estes são caracterizados por catalisarem a despolimerização inicial da lignina (Eggert, Temp e Eriksson, 1996; Groot et al., 1998).

A lacase é a terceira fenoloxidase implicada na degradação de lignina por muitos fungos de degradação branca, como o *Pycnoporus cinnabarinus*. A lacase é uma enzima que contém cobre e que cataliza a oxidação de compostos fenólicos pela redução do oxigênio em água (Maheshwari, Bharadwaj & Bhat, 2000). A produção de lacase por *P. chrysosporium* parece estar reprimida pela glicose, comumente usada como fonte de carbono em estudos lignolíticos, mas a sua atividade de lacase foi detectada quando o fungo cresceu em celulose (Eggert, Temp & Eriksson, 1996).

A lacase participa na degradação de lignina através da oxidação de compostos fenólicos. Isso implica num papel limitado para essa enzima na

degradação de lignina, já que as subunidades fenólicas fazem parte de uma pequena proporção dos polímeros de lignina (Bonnen, Anton & Orth, 1994).

A lacase de *A. bisporus* é expressa em altos níveis durante a colonização e o início do desenvolvimento do corpo de frutificação, tendo seu menor valor na maturação do corpo de frutificação. Além de atuar paralelamente com a manganês peroxidase, a atividade de lacase se correlaciona diretamente com a degradação de lignina e a perda de lignina do substrato do composto quando colonizado pelo *A. bisporus* (Bonnen, Anton & Orth, 1994). Segundo Zhao & Kwan (1999), o extrato de malte aumentou a produção de lacases em *A. bisporus*.

A degradação de lignina não provém como uma fonte primária de carbono e energia para o crescimento fúngico, mas é provavelmente um passo necessário na utilização dos polissacarídeos das plantas (Eggert, Temp & Eriksson, 1996). Os fungos decompositores de madeira, capazes de degradar lignina, não podem crescer utilizando-a como única fonte de carbono embora sejam capazes de gerar energia para o crescimento (Bonnen, Anton & Orth, 1994; Boyle, 1998).

Para Eggert, Temp & Eriksson (1996), a lignina é o segundo grupo mais abundante de biopolímeros na biosfera, sendo que sua degradação ocupa uma posição importante no ciclo global do carbono. Estudos da degradação de lignina são também de grande importância para possíveis aplicações biotecnológicas, já que os polímeros de lignina são os maiores obstáculos na utilização eficiente de materiais lignocelulósicos em uma ampla gama de processos industriais. A degradação de lignina ocorre primariamente através da ação dos fungos de decomposição branca. Conseqüentemente, esse grupo ecológico tem recebido uma atenção considerável.

O cultivo de cogumelos utiliza uma significativa quantidade de substratos de lignocelulose e é o maior processo bioconversor que utiliza madeira. A utilização de lignocelulose pelo cogumelo *Lentinula edodes* é dependente da sua habilidade em sintetizar enzimas hidrolíticas e oxidativas que fazem a conversão em componentes de baixo peso molecular para serem absorvidos e assimilados através da nutrição (Zhao & Kwan, 1999).

O amido é um polissacarídeo constituído de moléculas de glicose unidas por ligações  $\alpha$  1-4 na amilose e  $\alpha$  1-4 e  $\alpha$  1-6 na amilopectina. É a reserva glicídica de maior representatividade dos vegetais (Stryer, 1992).

A amilose é um polissacarídeo de cadeia reta que quando tratado com iodo, desenvolve coloração azulada e apresenta grânulos de estrutura resistente. A amilopectina é um polissacarídeo de cadeia ramificada constituído por ligações  $\alpha$  1-6 nas ramificações. Exibe coloração avermelhada quando tratada com iodo. Caracteriza-se por grânulos frágeis e géis com dificuldade de sofrer retrogradação (Stryer, 1992).

As propriedades da amilose e amilopectina são diferentes em função das suas estruturas. A gelatinização e a retrogradação são as principais propriedades do amido (Stryer, 1992).

O amido é uma molécula de energia estocada em que resíduos de glicose são unidos de uma maneira que impeça um arranjo ordenado de uma cadeia de polímeros. Essa estrutura, então, é facilmente penetrável pela água e, como resultado, é solúvel em água e prontamente hidrolisável por amilases e glicoamilases (Griffin, 1994).

A  $\alpha$  e  $\beta$ -amilases e as glicoamilases catalizam a hidrólise de ligações  $\alpha$ -1,4 de amido e glicogênio. Amilases são endoglucanases que rendem maltose e glicose de amidos não ramificados. Glicoamilases são exoglucanases que hidrolizam glicose dos finais não reduzidos do amido e glicogênio. Muitos fungos



produzem ambas, as amilases e as glicoamilases, que atuam sinergisticamente para clivar todas as ligações  $\alpha$ -1,4, rendendo glicose (Thormann, Currah & Bayley, 2002).

A maior função da glicoamilase fúngica é degradar os polímeros de amido, provendo, assim, fontes solúveis de carbono simples para a nutrição. É mais eficiente utilizar fontes de carbono prontamente disponíveis, sendo que a produção de glicoamilase está sob regulação catabólica de carbono. A glicoamilase de *L. edodes* hidroliza amido e glicogênio, convertendo-os completamente em glicose. Uma forte atividade de glicoamilase no estágio de frutificação indica a liberação de glicose do glicogênio, provendo nutrientes para o desenvolvimento, principalmente na morfogênese dos basidiomicetos (Zhao & Kwan, 2000).

As dextrinas são produtos resultantes da degradação parcial do amido. São moléculas grandes, porém menores que as de amido, formadas tanto pelo processo de preparação de alimentos como durante a digestão do amido. Se a hidrólise continua, as dextrinas produzem maltose e, finalmente, glicose (Thormann, Currah & Bayley, 2002).

A capacidade do basidiomiceto *Hericium erinaceum* em degradar amido e aperfeiçoar o valor nutricional do fubá foi estudado por Han (2003). Houve a produção de uma  $\alpha$ -amilase após o 15º dia de inoculação, que resultou em um rendimento de 52% de degradação do amido.

A celulose é o maior constituinte orgânico existente na natureza. Esta é uma macromolécula biológica composta por subunidades de glicose unidas linearmente a partir de ligações  $\beta$ -1,4, resultando em uma molécula forte, resistente a forças de tensão e à quebra e podendo alcançar uma extensão de 10000 subunidades. Os resíduos de glicose também estão unidos por uma ligação

entre o hidrogênio da hidroxila do C-3 e o anel de oxigênio da outra molécula (Ljungdahl & Eriksson, 1985).

O tamanho da molécula de celulose é freqüentemente dado em termos de grau de polimerização (DP), que é o número de estruturas de glicose na molécula. O DP em celulose de bactérias é baixo. No entanto, em amostras comerciais de celulose, o DP pode variar de 50 a 5000. Em celulosas nativas de plantas grandes, o DP normalmente chega a 14000 (Cai et al., 1999).

Celobiose, celotriose e celotetraose são solúveis em água (13,3; 11,7 e 7,5 g/100 mL de água a 25°C, respectivamente). No entanto, a solubilidade de celopentose é de apenas 0,59 g, e a de celoheptose, é de 0,18 g, mostrando que DP menor que 6 pode ser considerado insolúvel (Ljungdahl & Eriksson, 1985).

Na natureza, a celulose está organizada em fibrilas, que consistem de diversas moléculas de celulose arranjadas de forma paralela e ligadas por pontes de hidrogênio. Estas fibrilas estão envolvidas principalmente por lignina e hemicelulose. Quando as fibrilas elementares se unem para formar as microfibrilas, essas podem ter um arranjo altamente ordenado, chamado de região cristalina da celulose. Entretanto, em algumas partes, as fibrilas não se encontram muito bem ordenadas, denominando-se, então, de região amorfa. A cristalinidade, juntamente com a presença de lignina, são os maiores impedimentos na hidrólise enzimática da celulose. A hidrólise da celulose amorfa ocorre mais rapidamente do que com a celulose cristalina (Lynd et al., 2002).

Quando *A. bisporus* é cultivado em celulose cristalina como única fonte de carbono, o sistema de degradação da celulose é induzido, incluindo endo e exoglucanases e  $\beta$  glicosidases (Groot et al., 1998). De forma interessante, a taxa de crescimento exponencial de *Sporotrichum thermophile*, um fungo termófilo, em celulose é muito similar à taxa de glicose, revelando uma notável capacidade

de utilizar celulose tão eficientemente quanto glicose (Maheshwari, Bharadwaj & Bhat, 2000).

A celulose ainda é uma forma de estocagem de glicose, mas possui um grande potencial de conversão em uma variedade de compostos. A capacidade de utilizar a celulose como uma fonte de carbono e energia é encontrada entre eubactérias, mixobactérias, actinomicetos e fungos. O sistema de enzimas celulolíticas de distintos microrganismos é freqüentemente diferente, observando-se que alguns organismos são capazes de consumir a celulose nativa, enquanto outros não possuem esta capacidade. Em adição, muitos microrganismos que não são capazes de crescer em celulose nativa produzem enzimas celulolíticas. Nestes microrganismos, falta algum passo essencial para a hidrólise de celulose nativa, contudo eles podem utilizar parcialmente a celulose degradada para seu crescimento. Em bactérias, estas enzimas são freqüentemente produzidas em pequenas quantidades ou, como no caso de *Clostridium thermocellum*, formam-se complexos multienzimáticos ligados (celulossoma), os quais são difíceis de romper sem a perda dos componentes individuais. Já as celulases fúngicas são disponíveis em grandes quantidades e não parecem formar complexos físicos umas com as outras, contudo atuam em forte sinergismo (Goyal, Ghosh & Eveleigh, 1991; Lynd et al., 2002).

Celulase é um sistema ou um complexo enzimático no qual várias enzimas atuam em conjunto para hidrolisar a celulose. O complexo de enzimas varia de acordo com o microrganismo que o produziu, seu estado nutricional e sua fase de crescimento. Sendo assim, o modelo básico de ação das celulases está fundamentado principalmente no sistema dos fungos, em particular do *Trichoderma* (Ivanova, 1984; Gielkens et al., 1999; Palonen, Tenkanen & Linder, 1999).

As celulasas têm uma estrutura molecular com dois ou mais domínios funcionais separados e independentes. A ligação à celulose é mediada pelo domínio de ligação à celulose (CBD), considerando que o domínio catalítico (DC) irá mediar a hidrólise (Yague et al., 1997; Linder et al., 1996). O CBD exibe atividade que pode ser utilizada na degradação efetiva da celulose cristalina. O CBD está presente em muitas enzimas que degradam polissacarídeos e não somente nas celulasas. Em *T. reesei*, CBD foi encontrado na hemicelulase, em *Clostridium thermocellum*, na xilanase e em *Phanerochaete chrysosporium*, na  $\beta$ -glicosidase (Levy, Shani & Shoseyov, 2002). O sistema celulase do fungo termófilo *H. insolens* é muito parecido com o do *T. reesei*, diferindo basicamente na ausência de CBD da endoglucanase do primeiro (Lynd et al., 2002).

A hidrólise enzimática da celulose cristalina é um processo complexo que requer a participação de diversas enzimas. As enzimas fúngicas, isto é, as enzimas celulolíticas formadas por *Trichoderma*, *Phanerochaete* (*Sporotrichum*) e *Fusarium* têm sido as mais bem estudadas. Embora existam diferenças nas propriedades das enzimas de diferentes fungos, as principais características de degradação da celulose são as mesmas (Meinke et al., 1995).

Segundo Medve et al. (1998), existem três principais grupos de atividades celulolíticas produzidas por fungos:

a) **Endoglucanase** (1,4- $\beta$ -D-glucano 4 - glucanohidrolase, EC 3.2.1.4) - hidrolisa ao acaso ligações glicosídicas  $\beta$  - 1,4. Ela não ataca celobiose, mas hidrolisa celodextrinas, celulose ácida e celulosas substituídas como carboximetilcelulose (CMC) e hidroxietilcelulose (HEC). Algumas endoglucanases atuam na celulose cristalina. A especificidade desta enzima não deve ser muito alta, já que ela prontamente ataca celulosas altamente substituídas (Meinke et al., 1995). As endoglucanases são responsáveis primeiramente pela

diminuição do grau de polimerização, gerando oligossacarídeos de vários tamanhos e, conseqüentemente, novos fins de cadeias susceptíveis à ação das exoglucanases (Lynd et al., 2002). Utilizam como principais substratos a celulose amorfa, celotetraose e CMC (Goyal, Ghosh & Eveleigh, 1991). De acordo com Levy, Shani & Shoseyov (2002), a celulose cristalina, celobiose e uma mistura de carboximetilcelulose e celobiose induziram a produção máxima de endoglucanases.

b) **Exoglucanase (1,4-β-D-glucano celobiohidrolase, EC 3.2.1.91)** – atua sobre a celulose, liberando unidades de celobiose da extremidade não reduzida da cadeia (Kulminskaya et al., 2001). Esta enzima não ataca celuloses substituídas, o que reflete um maior grau de especificidade em relação ao substrato comparado com as endoglucanases (Stubbs et al., 1999). A celobiohidrolase hidrolisa celodextrinas, mas não celobiose. Utiliza como principais substratos a celulose cristalina, a celulose amorfa e a celotetraose (Meinke et al., 1995). A necessidade de duas exoglucanases têm sido atribuída às suas preferências em reduzir (CBH1) ou não (CBH2) as extremidades de cadeias de celulose quando em celulose microcristalina. Elas são os principais componentes do sistema de celulases do *T. reesei*, representando cerca de 60 e 20%, respectivamente, do total das celulases fúngicas. As exoglucanases são muito lentas ao diminuir o grau de polimerização da celulose (Lynd et al., 2002).

c) **β-Glicosidase (β-D-glicosídeo glicohidrolase, EC 3.2.1.21)** – hidrolisa celobiose e celo-oligossacarídeos para glicose. Esta enzima não ataca celulose ou celodextrinas de maior grau. Utiliza como substratos a celotetraose e a celobiose (Goyal, Ghosh & Eveleigh, 1991; Meinke et al., 1995). Apesar de a β-glicosidase não atuar diretamente na celulose, é considerada como componente do sistema

celulase por causa do estímulo à hidrólise de celulose (Maheshwari, Bharadwaj & Bhat, 2000). A presença de  $\beta$ -glicosidases intimamente próximas à parede celular fúngica pode limitar a perda de glicose para o meio (Lynd et al., 2002).

A deleção de curvas tridimensionais que cobrem o sítio ativo do *Trichoderma* permitem à exoglucanase hidrolizar as ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4 internas nas moléculas de celulose. Isso foi testado construindo-se um mutante *Cbh* $\Delta$ , da família 6 *exo*- $\beta$ -1,4 glucanase da *Cellulomonas fimi*, no qual os resíduos correspondentes à parte carboxil proximal do sítio ativo curvo do CBH II foram deletados (Meinke et al., 1995). Dessa forma, a diferença básica entre *exo* e *endoglucanase* é a acessibilidade dos seus sítios ativos às ligações glicosídicas internas  $\beta$ -1,4 do substrato, ou seja, o túnel moldado pela curvatura do sítio ativo restringe a hidrólise da exoglucanase mas permite a ação da endoglucanase pois os terminais amino e carboxil estão suficientemente afastados e não formam nenhum túnel que impeça a hidrólise (Levy, Shani & Shoseyov, 2002; Linder et al., 1995).

Os estudos de purificação e fracionamento têm revelado que os três principais tipos de enzimas celulolíticas ocorrem em formas múltiplas. O número de enzimas diferentes varia de organismo para organismo. Geralmente, o sistema de enzimas celulolíticas de fungos compreende de 4 a 8 endoglucanases, 1 a 3 celobiohidrolases e 1 a 3  $\beta$ -glicosidases diferentes. A natureza e a origem desses componentes têm sido objeto de muita discussão (Medve et al, 1998).

### **2.8.1 Modo de ação de celulases**

A endoglucanase atua sobre as regiões amorfas das fibras de celulose abrindo novas extremidades de cadeia para o ataque da celobiohidrolase, a qual remove as unidades de celobiose das extremidades não reduzidas da cadeia. Desta forma, o sinergismo entre as duas enzimas resultaria do fato de que o novo

substrato (extremidades de cadeias livres) para a celobiohidrolase é formado pela ação da endoglucanase (Lynd et al., 2002). Esse sinergismo é dependente da proporção entre as enzimas, da saturação e da qualidade do substrato (Medve et al., 1998). A  $\beta$ -glicosidase posteriormente aumenta a hidrólise total através da remoção da celobiose, um produto final inibitório da endoglucanase e da celobiohidrolase (Goyal, Ghosh & Eveleigh, 1991; Meinke et al., 1998).

A  $\beta$ -glicosidase da *Volvariella volvacea* descrita por Cai et al (1999), mostra que altos níveis de endo e exoglucanases foram registrados em culturas líquidas, contendo celulose microcristalina como fonte de carbono, enquanto baixos níveis foram detectados em carboximetilcelulose.

Em todos os microrganismos estudados até hoje, a síntese de celulase é induzida pela presença de celulose e reprimida pela presença de glicose ou outros açúcares prontamente metabolizáveis existentes no meio de cultura. Embora a natureza do real indutor não tenha ainda sido determinada, celulose, celobiose, sofrorose e lactose são todos bons indutores. Sendo a celulose insolúvel, o verdadeiro indutor deve ser algum composto derivado da celulose. Glicose e celobiose são os principais produtos de hidrólise e ambos são potentes inibidores do sinergismo (Medve et al., 1998).

## **2.8.2 Produção de celulases por fungos aeróbicos**

Entre os fungos aeróbicos mais efetivos na biodegradação natural dos resíduos lignocelulósicos estão os fungos de decomposição branca (white-rot-fungi), os fungos de decomposição marron (brown-rot-fungi) e os fungos de decomposição branda. No entanto, raramente essa decomposição é causada apenas por uma monocultura. Ao invés disso, há uma sucessão de microrganismos que colonizam a madeira morta. Garret (1963), citado por Ljungdahl & Eriksson (1985), dividiu essa sucessão em três estágios:

1. ataque de fungos saprofiticos primários que metabolizam os açúcares de baixo peso molecular e outros componentes que são mais facilmente degradados que a celulose;

2. fungos celulolíticos associados com saprofiticos secundários que vivem dos produtos de degradação da celulose;

3. fungos ligninolíticos.

A sucessão de microrganismos decompositores de madeira não é frequentemente tão simples e é fortemente influenciada pela maneira com o a madeira é morta e exposta aos microrganismos. O que influencia principalmente a taxa de degradação e a sucessão de microrganismos é se a madeira está em contato com o solo ou não (Ljungdahl & Eriksson, 1985).

## 2.9 Fungos de decomposição branca

Os fungos de decomposição branca possuem em comum a capacidade de degradar lignina tão bem quanto os polissacarídeos da madeira.

Todos os fungos de decomposição branca são capazes de produzir fenol-oxidases extracelulares. Formam um grupo heterogêneo e são os únicos microrganismos que degradam todos os componentes da madeira, inclusive a lignina. A maioria, em contraste com os fungos de decomposição marrom, despolimeriza os polissacarídeos da madeira somente na extensão em que os produtos são utilizados. Isto indica que a energia para degradar lignina precisa ser derivada de fontes de energia mais facilmente acessíveis, como os polissacarídeos da madeira e os açúcares de baixo peso molecular. As enzimas extracelulares produzidas atacam nas proximidades circunvizinhas das hifas fúngicas (Ljungdahl & Eriksson, 1985).

Os mecanismos de degradação enzimática da celulose têm sido mais estudados em dois fungos: *Sporotrichum pulverulentum* e *Trichoderma reesei*. O



padrão de hidrólise enzimática usado por ambos é muito similar, composto por endo e exoglucanases e  $\beta$ -glicosidases. A celulose amorfa pode ser degradada tanto por endo como exoglucanases separadamente. No entanto, é preciso existir um sinergismo entre essas enzimas para degradar a celulose cristalina, pois não conseguem atacá-la separadamente (Griffin, 1994).

*Phanerochaete chrysosporium*, fungo de decomposição branca, também tem sido estudado como um modelo na degradação de lignocelulose, produzindo celulases, hemicelulases e ligninases. A degradação de celulose e hemicelulose ocorre durante o metabolismo primário, considerando que a degradação de lignina é um evento de metabolismo secundário, provocado pela limitação de carbono, nitrogênio ou enxofre. *P.chrysosporium* também produz celobiose dehidrogenase que, na presença de  $O_2$ , oxida celobiose em celobionolactona. Por sua vez, celobionolactona reage espontaneamente com água para formar ácido celobiônico. Uma das possíveis funções biológicas para a celobiose dehidrogenase é gerar radicais hidroxila que podem atuar na despolimerização da lignina e da celulose (Lynd et al., 2002).

## 2.10 Fungos de decomposição marrom

Esses fungos geralmente pertencem aos basidiomicetos, sendo decompositores de polissacarídeos da madeira. O conteúdo de lignina é ligeiramente reduzido por esses fungos.

Nos primeiros estágios de degradação, ao contrário dos fungos de degradação branca, ocorre uma despolimerização de celulose mais rápida do que quando os produtos da degradação são usados. Devido ao seu alto conteúdo de lignina, as paredes primárias e a lamela média são muito resistentes à degradação pelos fungos de degradação marrom. Nos estágios avançados de decomposição, quando a maioria dos polissacarídeos já foram consumidos, a parede celular entra

em colapso. Esses fungos em crescimento produzem um fator capaz de se difundir e degradar celulose em distâncias consideráveis das hifas fúngicas. Apesar de degradar a celulose da madeira, eles não conseguem degradar a celulose pura, sozinha. É necessário ter acesso a açúcares de baixo peso molecular antes de atacar a celulose. Esses açúcares são oxidados para a formação de  $H_2O_2$ , que é necessário para a degradação da celulose cristalina por esses microrganismos (Ljungdahl & Eriksson, 1985).

Ao degradar extensivamente a celulose, os fungos de decomposição marrom utilizam mecanismos de degradação diferentes daqueles descritos para os fungos de decomposição branca. Os fungos de decomposição marrom produzem endoglucanases, mas falta a exoglucanase. Então, a celulose cristalina não é degradada por uma ação sinérgica entre endo e exoglucanases como em *S.pulverulentum* e *Trichoderma reesei*. Os fungos de decomposição marrom são fortes produtores de  $H_2O_2$ , muito mais que os de decomposição branca. O ataque à celulose cristalina é feito pela via  $H_2O_2/Fe^{2+}$ , oxidando a celulose. Esse ataque é feito a distâncias consideráveis das hifas fúngicas e utiliza a via química de moléculas de baixo peso molecular que podem se difundir facilmente pelas fibras da madeira do que a via enzimática que tem uma difusão limitada (Griffin, 1994).

### 2.11 Produção de celulases por fungos anaeróbicos

Entre os fungos anaeróbicos produtores de celulases destacam-se os fungos do rúmex, os quais sintetizam uma grande variedade de enzimas hidrolíticas. *Neocallimastix frontalis* e *Piromyces* spp. são fungos anaeróbicos presentes no rúmex de animais, porém, a grande maioria dos microrganismos anaeróbicos envolvidos na degradação da celulose no rúmex são bactérias.

O sistema de enzimas extracelulares produzidas pelo fungo *Neocallimastix frontalis*, crescido em co-cultura com a bactéria metanogênica

*Methanobrevibacter smithii*, foi capaz de solubilizar algodão com mais eficiência que o *T. reesei*.

Do ponto de vista evolucionário de produção de energia, as celulases de anaeróbicos têm uma atividade específica mais elevada do que as celulases aeróbicas para compensar a menor eficiência energética nos processos fermentativos (Goyal, Ghosh & Eveleigh, 1991).

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Organismo

Foi utilizado apenas o isolado *Agaricus blazei* CS6, da coleção do Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Lavras, para os testes de fatores de crescimento, já que testes preliminares indicaram que os diferentes isolados cresceram de maneira similar no MBC. Para a produção do micélio e manutenção do fungo, foi utilizado o meio BDA (200 g de batata, 15 g de glicose, 12 g de ágar para o meio sólido, água destilada q.s.p. 1000 mL). Para as análises, foi usado o meio básico (10 g de glicose; 1 g de fosfato de potássio; 0,5 g de sulfato de magnésio  $7.H_2O$ ; 1 g de sulfato de amônio; 0,5 g de cloreto de cálcio e 15 g de ágar para o meio sólido) e o meio básico completo, que é o meio básico acrescido de 0,1% de extrato de levedura e 0,1% de peptona.

### 3.2 Caracterização do *Agaricus blazei* quanto a diferentes fatores de crescimento

O crescimento micelial do isolado *Agaricus blazei* CS6 foi observado em meio de cultura líquido básico (MB) e básico completo (MBC), suplementado com diferentes nutrientes. Em todos os experimentos, foram feitas 5 repetições por tratamento. Os meios de cultura líquidos utilizaram 3 discos de 6 mm de micélio (15 dias) do fungo, em cada frasco com 50 mL, incubados à temperatura ambiente para a avaliação do crescimento micelial em mg/dia. Houve a filtragem dos micélios após o período de crescimento. Ocorreu, então, a secagem dos filtros à temperatura ambiente e em estufa com ventilação forçada a 65°C ambas por 24 horas. Em seguida, foi efetuada a pesagem dos micélios. Os meios de cultura sólidos utilizaram apenas um único disco de micélio no centro da placa de Petri para a avaliação do crescimento micelial em mm/dia.

**a) Efeito da adição de micronutrientes ao meio básico**

O meio básico e o meio básico completo foram usados tanto no estado líquido como no sólido. Foram preparadas soluções estoques e utilizados os seguintes micronutrientes no MB e no MBC: sulfato ferroso  $4.H_2O$  (0,01g/mL); sulfato de manganês  $4.H_2O$  (0,007g/mL); sulfato de zinco (0,004g/mL); sulfato de cobre  $5.H_2O$  (0,001g/mL). No estado líquido, o micélio foi pesado após duas semanas de crescimento. No estado sólido, foram medidos os raios dos micélios após um período de crescimento de 7 dias.

**b) Adição de extrato de levedura e de peptona ao meio básico**

Foram usadas várias concentrações de extrato de levedura e peptona juntas, em meio básico líquido, nas seguintes concentrações de 0; 0,01; 0,02; 0,04; 0,08 e 0,1%.

**c) Adição de caseína e inositol ao meio básico**

Foram utilizados o MB e o MBC líquido com e sem caseína (0,3g/L) e com ou sem inositol (0,03g/L).

**d) Efeito da adição de cálcio ao meio básico**

Utilizou-se o MBC líquido com e sem cloreto de cálcio a 0,05%.

**e) Crescimento do *Agaricus blazei* em diferentes pH**

Para a avaliação do crescimento em diferentes pH (4,0; 5,0; 5,5; 6,0; 7,0; 8,0), foi usado o MB sem cloreto de cálcio.

**f) Diferentes fontes de carbono**

Foi usado o meio básico líquido (MB) em tubos de ensaio de 10 mL suplementado com 0,1% de extrato de levedura, utilizando-se os seguintes

polissacarídeos como fontes de carbono a 1%: celulose, xilana, amido, pectina e quitina. Nos ensaios, a glicose foi substituída pela fonte de carbono a ser testada.

### 3.3 Determinação da atividade enzimática

Vários isolados de *Agaricus blazei* (CS1, CS2, CS4, CS5, CS6, CS7) foram utilizados na determinação enzimática da exoglucanase, endoglucanase,  $\beta$ -glicosidase e xilanase.

#### 3.3.1 Atividade de exo $\beta$ -1,4 glucanase (EC 3.2.1.9.1)

Foram utilizados 100 mL de MB suplementado com valores até 0,01% de extrato de levedura e com a substituição da glicose por celulose microcristalina 1% (Avicel). Em cada frasco erlenmeyer, foram colocados 5 discos de micélio de 6 mm de diâmetro. Os frascos foram incubados á temperatura ambiente e sob agitação constante de 150 rpm. Foram retiradas alíquotas de 5 mL do meio de cultivo no 2º, 4º, 7º, 14º e 21º dia, as quais foram conservadas a -20º C até as análises de atividade enzimática.

A atividade do exo  $\beta$ -1,4 glucanase foi determinada por método espectrofotométrico indireto, tendo como base a liberação de moléculas de glicose a partir da celulose microcristalina (Lever, 1972). Para a mistura de reação, foram utilizados 50  $\mu$ L da fonte enzimática e 450  $\mu$ L de celulose microcristalina 1% em tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5,0). A mistura foi incubada a 50°C por 30 minutos e a reação foi interrompida com a adição de 1,5 mL de hidrazida do ácido p-hidroxibenzóico 1% (HAPHB) (Sigma). Depois, a mistura foi mantida a 100º C por 5 minutos e, em seguida, resfriada em gelo. A leitura de absorvância foi feita a 410 nm contra branco (1,5 mL de HAPHB) + 0,5 mL de tampão acetato de sódio 0,05 M). De cada amostra, foi subtraído o valor do controle (mistura idêntica a da amostra mas sem incubação prévia). Foram utilizadas 3

repetições por amostra. As leituras de absorvância foram plotadas em curva-padrão para glicose e a atividade enzimática específica foi expressa em  $\mu\text{g}$  de glicose/ minuto/ mg de proteína.

### **3.3.2 Atividade de endo $\beta$ -1,4 glucanase (ECC 3.2.1.4)**

Carboximetilcelulose (CMC) 1% foi utilizada como indutor para a produção de endo  $\beta$ -1,4 glucanase. Foram utilizadas as mesmas condições de cultivo descritas no item anterior. Para a dosagem enzimática, foi empregada a mesma metodologia acima descrita, porém utilizando carboximetilcelulose como substrato.

### **3.3.3 Atividade de $\beta$ -glicosidase (EC 3.2.1.21)**

Celobiose 1% foi utilizada como indutor para produção da enzima e também como fonte de carbono no meio do cultivo MB líquido nas mesmas condições anteriores. Para determinar a atividade enzimática, foi utilizado *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo como substrato. A mistura de reação, consistindo de 300  $\mu\text{L}$  de *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosídeo 0,02M em tampão acetato de sódio 0,05 M (pH 5,0) e 200  $\mu\text{L}$  da fonte enzimática, foi incubada a 50° C por 30 minutos. Após a incubação, a reação foi paralisada pela adição de 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M. A atividade de  $\beta$ -glicosidase foi avaliada pela liberação do *p*-nitrofenol (*p*-NP), o qual foi determinado espectrofotometricamente a 405 nm (Deshpande & Eriksson, 1988). As leituras de absorvância foram plotadas em curva-padrão para *p*-nitrofenol e os resultados da atividade específica foram expressos em  $\mu\text{g}$  de *p*-NP/ minuto/ mg de proteína.

### 3.3.4 Atividade de xilanase (EC 3.2.1.8)

O *Agaricus blazei* foi cultivado em MB acrescido de CMC 1% como fonte de carbono, conforme descrito para atividade de endo  $\beta$ -1,4 glucanase e nas mesmas condições de cultivo. Para a atividade de xilanase, foi utilizada xilana carboximetilada marcada com remazol brilhante azul ("CM-xylan-RBB"). A determinação da atividade foi feita em espectrofotômetro a 595 nm em função da liberação de fragmentos solúveis de "CM-xylan-RBB" (Biely et al., 1988). A mistura de reação, contendo 200  $\mu$ L de CM-xylan RBB (4mg/mL), 200  $\mu$ L de tampão acetato de sódio 0,05M (pH 5,0) e 100  $\mu$ L da fonte enzimática, foi incubada a 30° C por 1 hora e a reação foi paralisada pela adição de 500  $\mu$ L de HCl 2 N e centrifugada a 10.000 g por 5 minutos a 4° C. A absorvância foi determinada a 595 nm e foi utilizado o tampão acetato 0,05 M na cubeta de referência. Os resultados foram expressos em unidade de absorvância/ hora/ mg de proteína, descontando-se os valores do controle (300  $\mu$ L de tampão acetato 0,05 M + 200  $\mu$ L de CM-xylan-RBB + 500  $\mu$ L de HCl 2 N).

### 3.3.5 Dosagem de proteínas totais

Para a quantificação de proteínas totais, foi utilizado o método de Bradford (1976). A reação consistiu de 0,8 mL da amostra e 0,2 mL do reagente concentrado de Bradford, o qual foi acrescentado à amostra sob agitação. A mistura foi incubada à temperatura ambiente por 5 minutos, fazendo-se, logo após, a leitura de absorvância a 595 nm. Como referência, foi utilizada uma mistura de 0,8 mL de água destilada e 0,2 mL de reagente concentrado de Bradford. A concentração de proteínas de cada amostra, expressa em termos de equivalentes  $\mu$ g de albumina de soro bovino (BSA) em 0,8 mL de amostra ( $\mu$ g de proteína/ 0,8 mL), foi determinada utilizando-se curva padrão de concentrações de BSA, variando de 0 a 20  $\mu$ g/0,8 mL.

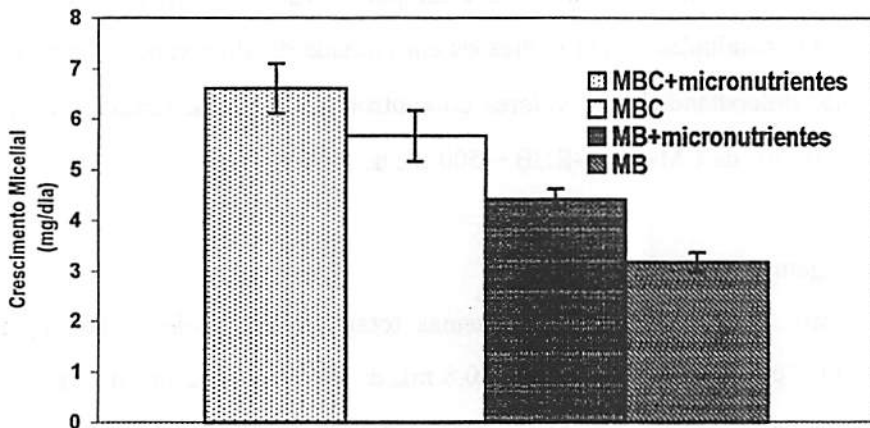


## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

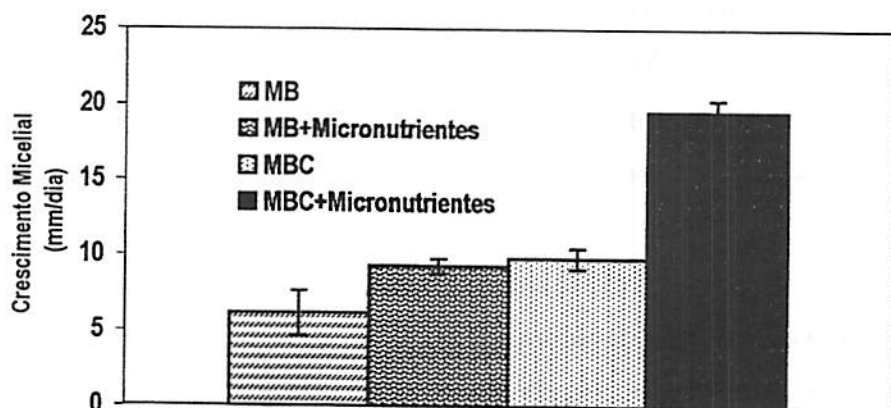
### 4.1 Caracterização do *Agaricus blazei* quanto a diferentes fatores de crescimento

#### 4.1.1 Micronutrientes

No presente trabalho, verificou-se que a adição de micronutrientes ao MBC proporcionou crescimento micelial significativamente melhor em relação ao meio sem micronutrientes tanto em meio líquido (Figura 1) como em meio sólido (Figura 2).



**FIGURA 1** Crescimento micelial do *Agaricus blazei* CS6 em diferentes meios líquidos com e sem a adição de micronutrientes (mg/dia).



**FIGURA 2** Crescimento micelial do *Agaricus blazei* CS6 em diferentes meios sólidos com e sem a adição de micronutrientes (mm/dia).

Isso sugere que os micronutrientes testados provavelmente desempenham diversas funções celulares, principalmente ligadas às funções enzimáticas. Na Figura 2, o MB acrescido de micronutrientes apresentou um crescimento mais superficial do que o MBC, que apresentou um crescimento mais uniforme e vigoroso. Em meio líquido, essa diferença não existiu, pois o micélio foi pesado ao final do período de crescimento (Figura 1).

Nem todos os fungos exigem a adição de micronutrientes ao meio de cultura. No entanto, sabe-se que alguns deles são essenciais ao metabolismo, atuando como cofatores nas atividades enzimáticas. Nesses casos, considera-se que esses elementos são fornecidos na forma de impurezas dos reagentes ou da água utilizada para o preparo do meio de cultivo. Para o *Agaricus blazei*, esse fornecimento indireto de micronutrientes não foi suficiente, tornando-se necessária a sua inclusão na receita do meio de cultura. Esse comportamento é

comum também em outras espécies de fungos celulolíticos, as quais requerem a adição de micronutrientes juntamente com os macronutrientes comumente utilizados (Lynd et al., 2002). Os microelementos utilizados no meio básico de cultivo em diferentes isolados de basidiomicetos por Inglis et al. (2000), também foram basicamente os mesmos usados nos testes de microelementos deste trabalho.

#### 4.1.2 Adição de extrato de levedura e peptona

O *Agaricus blazei* apresentou crescimento no meio básico (MB), o qual continha apenas sais minerais e glicose. No entanto, o crescimento foi melhor em todas as concentrações conjuntas de extrato de levedura e peptona do que apenas no MB, tendo sido mais efetivo nas concentrações de 0,08 e 0,1% (Figura 3).

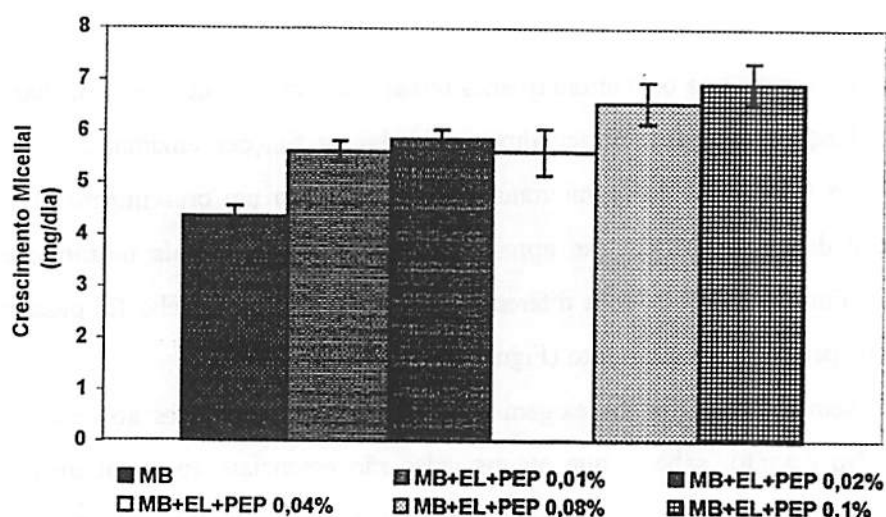
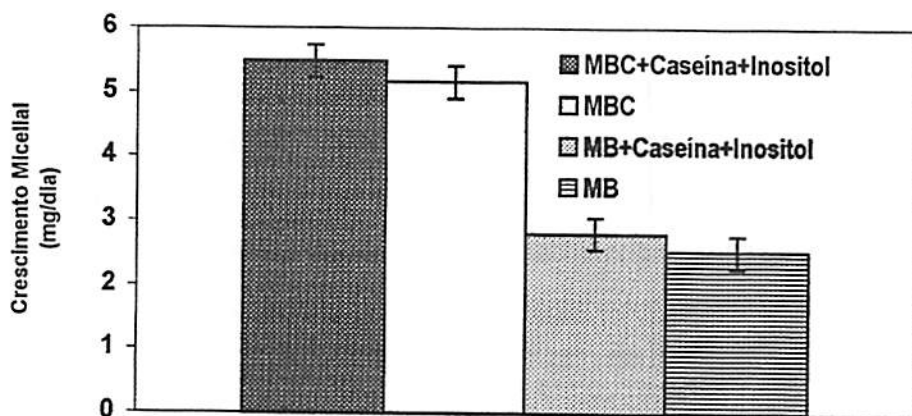


FIGURA 3 Crescimento micelial do *Agaricus blazei* CS6 em diferentes concentrações de extrato de levedura e peptona (mg/dia).

Além de carbono e nitrogênio, esses extratos são considerados como fonte de aminoácidos (peptona) e vitaminas (extrato de levedura). Segundo Lynd et al. (2002), peptonas e extrato de levedura são requerimentos adicionais, não sendo usualmente necessários. Por outro lado, a definição de um meio de cultura basal, no qual o fungo se desenvolve mesmo sem a adição de fontes complexas de nutrientes, foi importante por permitir estudos acerca de requerimentos específicos como vitaminas, aminoácidos e bases nitrogenadas.

#### 4.1.3 Adição de caseína e inositol

A adição de caseína e inositol ao MB não apresentou um efeito significativo para o crescimento micelial do *Agaricus blazei* CS6 tanto em MB como em MBC (Figura 4).

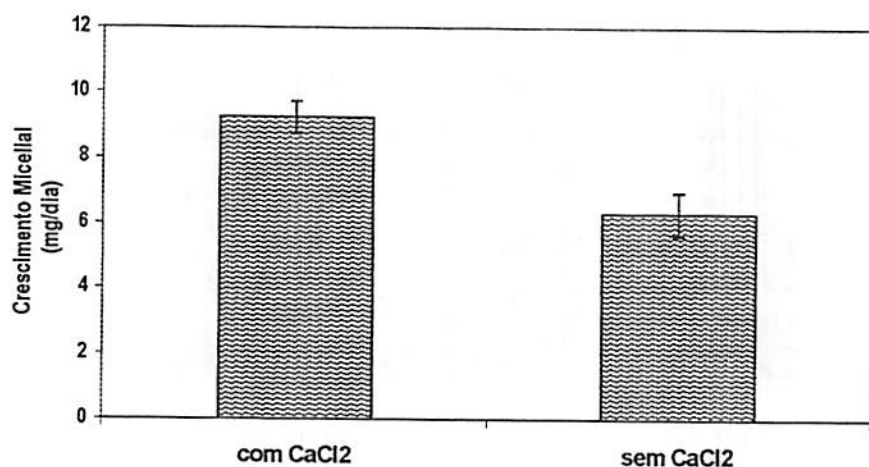


**FIGURA 4** Crescimento micelial do *Agaricus blazei* CS6 em diferentes meios com e sem a adição de caseína e inositol (mg/dia).

Eguchi (1995), ao relatar um procedimento para a obtenção de protoplastos do *Agaricus blazei*, citou um meio de cultura contendo casaminoácidos e inositol. Segundo ele, a adição de casaminoácidos e inositol é importante para a formação do corpo de frutificação de *Agaricus blazei*. Em eucariotos, o inositol é utilizado para a produção do fosfatidilinositol e derivados, os quais estão associados aos mecanismos de transdução de sinal na membrana plasmática (Lehninger et al., 1993). Por isso, é possível que o *Agaricus blazei* seja capaz de sintetizar esta substância ou que as condições experimentais adotadas não tenham permitido a sensibilidade suficiente para expressar o seu efeito de forma quantitativa. Quanto aos casaminoácidos, esperava-se que a sua adição contribuísse para o fornecimento de aminoácidos, além de nitrogênio orgânico. No entanto, não se verificou efeito positivo da sua adição na concentração testada.

#### **4.1.4 Efeito da adição de cálcio ao meio básico**

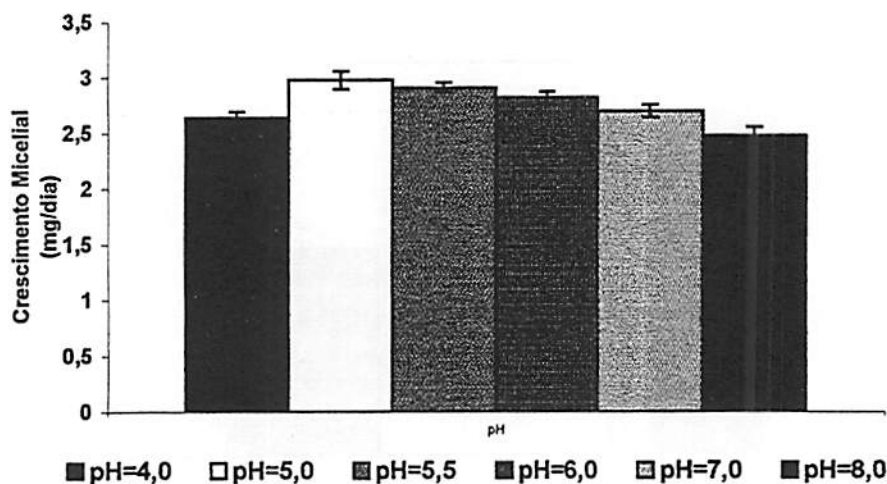
O *Agaricus blazei* apresentou um crescimento micelial mais efetivo quando acrescido de cloreto de cálcio ao meio básico (Figura 5). O cálcio tem sido apontado pelo seu importante papel na manutenção da integridade das membranas, atuando possivelmente também na atividade enzimática e no funcionamento de microtúbulos e microfilamentos (Landecker, 1996). No entanto, nem sempre os meios citados na literatura apresentam o cálcio como fonte necessária ao desenvolvimento de fungos. Normalmente, esse elemento apresenta problemas de precipitação com outras substâncias. Neste trabalho, constatou-se que o *Agaricus blazei* CS6 precisa da adição de cálcio ao meio de cultivo para o seu desenvolvimento, apresentando um crescimento até 40% superior em relação ao MB sem cálcio.



**FIGURA 5** Necessidade de CaCl<sub>2</sub> no crescimento micelial do *Agaricus blazei* CS6 em MB (mg/dia)

#### 4.1.5 Crescimento micelial do *Agaricus blazei* em diferentes pH

Ao avaliar o crescimento do *Agaricus blazei*, observaram-se os melhores resultados na faixa de pH entre 5 e 6 (Figura 6), confirmando os resultados apresentados por Eguchi et al. (1995), os quais afirmaram que o pH ideal para a formação dos corpos de frutificação do *Agaricus blazei* é 5,5.

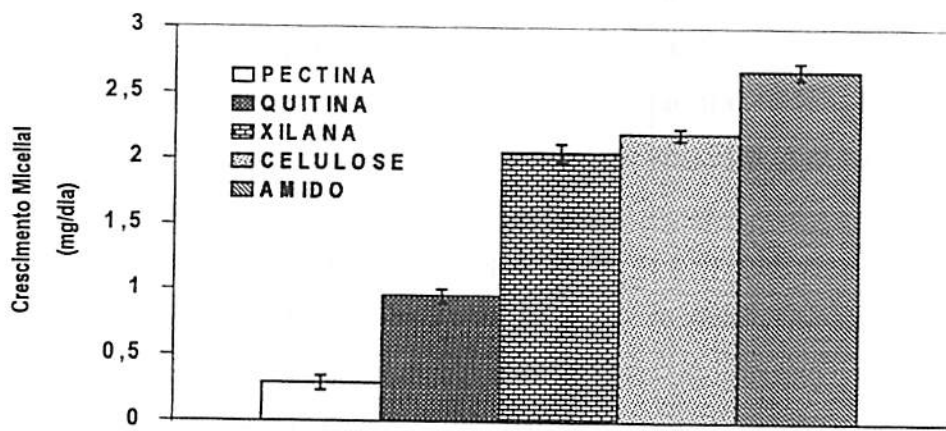


**FIGURA 6** Crescimento micelial do *Agaricus blazei* CS6 em diferentes valores de pH.

No entanto, no Brasil, recomenda-se que o pH do composto de cultivo e a terra de cobertura seja 7,0. Essa recomendação provavelmente veio da tecnologia de cultivo do cogumelo *Agaricus bisporus*. Por isso, em função dos resultados obtidos neste trabalho, deve-se questionar a prática de se adicionar calcário tanto no composto de cultivo quanto na terra de cobertura para ajustar o pH para 7,0. Portanto, novos estudos deverão ser conduzidos para se avaliar o efeito do pH tanto no composto como na terra de cobertura, de maneira que se possa ter uma recomendação específica para o *Agaricus blazei*.

#### 4.1.6 Diferentes fontes de carbono

O *Agaricus blazei* cresceu significativamente na presença de amido, celulose e xilana (Figura 7), revelando qualitativamente a sua capacidade de degradá-los, como já era esperado.



**FIGURA 7** Crescimento micelial do *Agaricus blazei* CS6 em meio básico líquido com extrato de levedura 0,1% (sem glicose) em diferentes fontes de polissacarídeos (mg/dia)



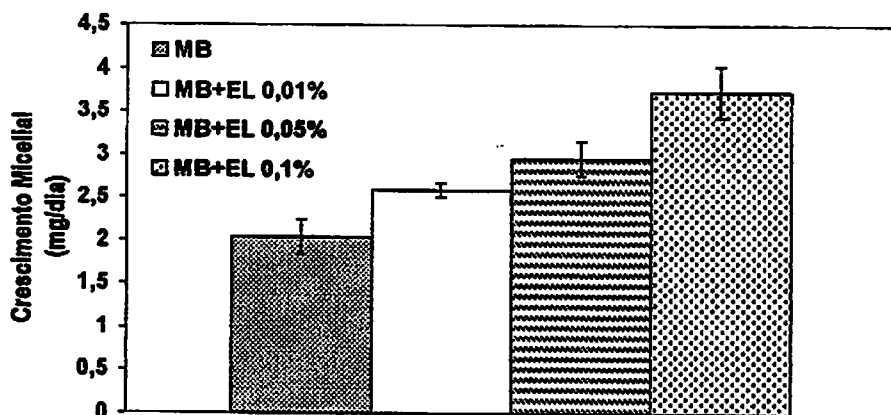
O crescimento micelial em pectina e quitina foi devido ao fornecimento residual de nutrientes do MB e não porque estes funcionaram como fonte de carbono. Os valores observados para quitina devem-se principalmente ao fato deste reagente ser insolúvel em água, tendo ficado retido no filtro.

O *Agaricus blazei* é considerado um decompositor secundário pelo fato de se desenvolver bem em substratos previamente e parcialmente decompostos por outros saprófitas. Por isso, os resultados encontrados neste trabalho são compatíveis com a natureza da espécie.

Com respeito à atividade de quitinase, a sua atividade em fungos está mais associada à síntese da parede celular durante o crescimento micelial, no qual é necessária uma quebra controlada da rede formada pela quitina para a adição de novas subunidades (Carlile & Watkinson, 1994). Entretanto, a capacidade de utilização de quitina pode ser encontrada em fungos decompositores de insetos e cogumelos (Inbar & Chet, 1995). Segundo Maheshwari, Bharadwaj & Bhat, (2000), poucos fungos termófilos degradam pectina.

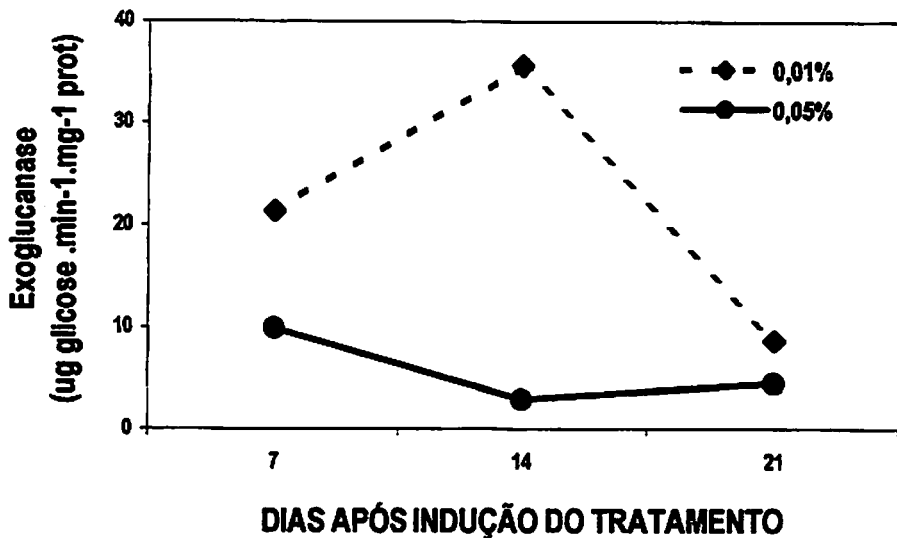
#### 4.2 Atividade enzimática do *Agaricus blazei*

Antes dos ensaios de atividade enzimática, foram testadas três diferentes concentrações de extrato de levedura (0,01, 0,05 e 0,1%) para o crescimento micelial do *Agaricus blazei* (Figura 8).



**FIGURA 8** Crescimento micelial do *Agaricus blazei* CS6 em diferentes concentrações de extrato de levedura (mg/dia)

Para a atividade de exoglucanase (Figura 9) do *Agaricus blazei*, foram testadas as concentrações de 0,01 e 0,05% de extrato de levedura com o objetivo de estabelecer a concentração ideal. Neste caso, esta deveria ser uma concentração que permitisse o crescimento do fungo sem apresentar um efeito de repressão na produção da enzima.

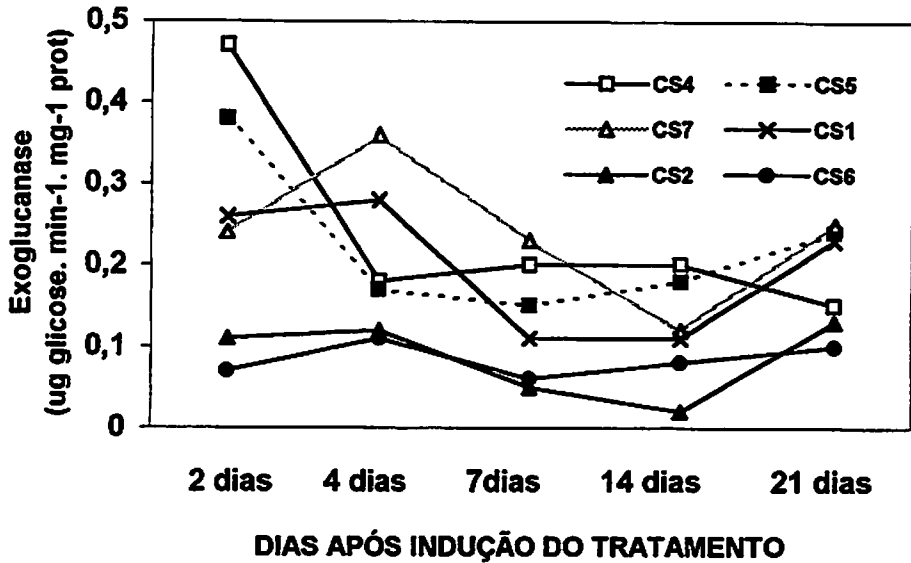


**FIGURA 9** Determinação da atividade de exoglucanase do *Agaricus blazei* CS6 em diferentes concentrações de extrato de levedura, em diferentes períodos

Verificou-se que a concentração de 0,01% foi a ideal para a indução da síntese de exoglucanase. É possível que o extrato de levedura na concentração de 0,05% apresente uma concentração de açúcar suficiente para promover um efeito de repressão catabólica sobre a síntese da enzima. É importante salientar, porém, que a concentração de extrato de levedura utilizada não é suficiente como fonte de carbono para o meio utilizado. Portanto, a concentração de 0,01% foi definida para todos os ensaios enzimáticos neste trabalho.

#### 4.2.1 Atividade de exo $\beta$ -1,4 glucanase

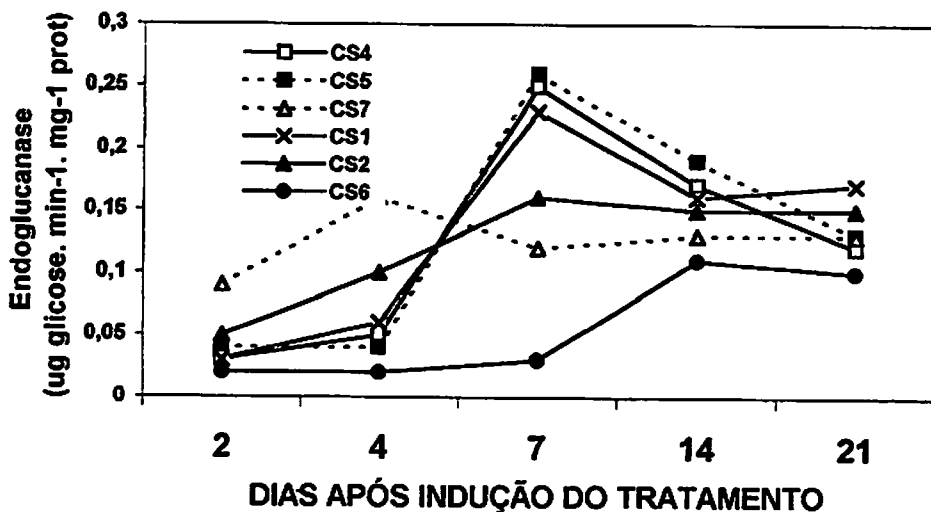
A análise de exoglucanase revelou uma maior atividade entre 2 e 4 dias na maioria dos isolados estudados. Este comportamento pode ser explicado por um sinergismo entre exo e endoglucanase quando o indutor enzimático foi a celulose cristalina. A presença de glicose e celobiose como produtos da hidrólise enzimática parece inibir a atividade da exoglucanase, pois observa-se uma tendência de queda após 4 dias (Figura 10). Os isolados CS4 e CS5 apresentaram os maiores picos de atividade, aos dois dias, seguidos de CS7 e CS1, aos 4 dias. Durante todo o tempo, os isolados CS2 e CS6 apresentaram a menor atividade de exoglucanase. Estes resultados apontaram para uma diferença entre os isolados quanto à capacidade de utilização da celulose como fonte de carbono. Na atividade enzimática de exoglucanase, observou-se um padrão de comportamento similar entre os isolados CS4 e CS5, CS7 e CS1, CS2 e CS6.



**FIGURA 10** Atividade enzimática de exoglucanase de vários isolados de *Agaricus blazei* ( $\mu\text{g}$  glicose/min/mg proteína)

#### 4.2.2 Atividade de endo $\beta$ -1,4 glucanase

Observou-se um pico de atividade de endoglucanase aos 7 dias para os isolados CS4, CS5, CS7 e CS1, seguido de uma queda acentuada, com exceção de CS1, que manteve a atividade constante até os 21 dias (Figura 11). O isolado CS2 apresentou um pico de atividade somente aos 14 dias, enquanto CS6 apresentou atividade máxima aos 4 dias, com posterior queda e mantendo atividade constante até os 21 dias.

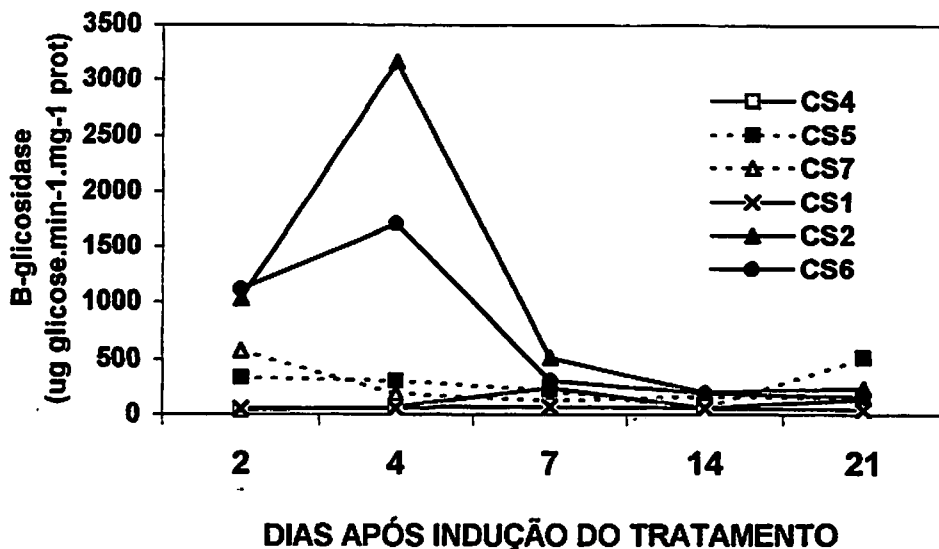


**FIGURA 11** Atividade enzimática de endoglucanase de vários isolados de *Agaricus blazei* ( $\mu\text{g}$  glicose/min/mg proteína).

Como observado para exoglucanase, os isolados CS2 e CS6 apresentaram menor atividade para endoglucanase. No entanto, os autores não fizeram qualquer referência acerca da atividade enzimática entre diferentes isolados. Alguns poucos trabalhos relatam o uso de marcadores moleculares para estudos de diversidade genética entre linhagens de *Agaricus bisporus* (Khush et al., 1992).

#### 4.2.3 Atividade de $\beta$ -glicosidase

Embora não tenha ação direta, a enzima  $\beta$ -glicosidase estimula a hidrólise da celulose (Cai et al., 1999), sendo considerada parte do sistema celulase. Por isso, a atividade dessa enzima foi também avaliada neste trabalho, cujos resultados estão expressos na figura 12.



**FIGURA 12** Atividade enzimática de  $\beta$ -glicosidase de vários isolados de *Agaricus blazei* ( $\mu\text{g}$  glicose/min/mg proteína)

Ao contrário do que se observou nos ensaios de exo e endoglucanase, os isolados CS2 e CS6 apresentaram os maiores picos de atividade de  $\beta$ -glicosidase em relação aos demais isolados. Observou-se também um padrão de comportamento similar entre os isolados observados.

Os resultados dos ensaios enzimáticos do complexo celulase evidenciam uma diferença de atividade entre os isolados, sendo que CS2 e CS6 apresentaram os menores picos de atividade de exo e endoglucanase. No entanto, para  $\beta$ -glicosidase, os mesmos isolados apresentaram maior atividade que os demais (Tabela 1).

**TABELA 1. Picos de atividades enzimáticas dos isolados de *A. blazei***

<b>Isolados de <i>A. blazei</i></b>	<b>Exoglucanase (<math>\mu\text{g}</math> glicose/min/mg proteína)</b>		<b>Endoglucanase (<math>\mu\text{g}</math> glicose/min/mg proteína)</b>		<b><math>\beta</math> glicosidase (<math>\mu\text{g}</math> p nitro fenol/min/mg proteína)</b>	
CS4	2 dias	0,47	7 dias	0,25	7 dias	238
CS5	2 dias	0,38	7 dias	0,26	21 dias	509
CS7	4 dias	0,36	7 dias	0,23	2 dias	573
CS1	4 dias	0,28	7 dias	0,16	7 dias	69
CS2	21 dias	0,13	14 dias	0,11	4 dias	3166
CS6	4 dias	0,11	4 dias	0,16	4 dias	1706

Esses resultados indicam que os isolados estudados poderiam ser separados em dois ou três grupos segundo a sua capacidade de utilização da celulose.

#### **4.4.4 Atividade de xilanase**

Nenhum dos isolados de *Agaricus blazei* apresentou atividade de xilanase suficiente para a sua medição pela sensibilidade do método utilizado. Somente aos 21 dias verificou-se um princípio de reação com o CM-xylan-RBB, no entanto, insuficiente para determinação da atividade. Portanto, serão necessários períodos de crescimento superiores aos utilizados neste trabalho para avaliação da atividade desta enzima entre os diferentes isolados de *A. blazei*. Segundo Lemos et al. (2001), o uso de extrato de levedura como suplemento de fonte de nitrogênio resultou em considerável aumento na produção de xilanases, mostrando a importância dessa fonte orgânica de nitrogênio para o metabolismo de *Aspergillus awamori*. Portanto, para futuros ensaios sobre atividade de xilanase, será interessante testar maiores concentrações de extrato de levedura com o objetivo de induzir uma maior atividade desta enzima.



## 5 CONCLUSÕES

A adição de micronutrientes, peptona, extrato de levedura e cálcio foi importante para o melhor crescimento micelial do *Agaricus blazei*. No entanto, a definição de um meio básico (sais minerais e fonte de carbono) para o seu desenvolvimento foi fundamental por permitir a realização de futuros estudos sobre os fatores nutricionais para a indução da frutificação “in vitro”.

Para estudos de atividade enzimática, o MB para o crescimento micelial do cogumelo deve ser acrescido de 0,01% de extrato de levedura.

Os resultados de atividade enzimática de exo e endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase indicaram que alguns dos isolados estudados são de origens diferentes, apresentando um comportamento diferenciado.

Para se determinar a atividade enzimática de xilanase, o tempo de cultivo deverá ser superior a 21 dias. Além disso, maiores concentrações de extrato de levedura deverão ser testadas.

Diferentes atividades enzimáticas entre os isolados de *Agaricus blazei* podem se refletir na produção de cogumelos. Através dessas informações, poderá ser possível adotar um programa de seleção de linhagens, correlacionando as atividades enzimáticas de cada isolado com a capacidade de utilização do composto e a produção de cogumelos, permitindo estabelecer o potencial de cada isolado como inoculante comercial.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEECHER, T. M.; MAGAN, N.; BURTON, K. S. Water potenciales and soluble carbohydrate concentration in tissues of freshly harvested and stored mushrooms (*Agaricus bisporus*). **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 22, n. 2, p. 121-131, May 2001.

BEYER, D. M.; WUEST, P. J.; ANTON, L.; SZMIDT, R. A. K. Nutritional factors relating to the formation of calcium oxalate crystals on *Agaricus Bisporus* mycelium and source reduction of spent mushroom substrate. **Acta Horticulture**, Amsterdam, n. 469, p. 435-447, 1998.

BIELY, P.; MISLOVICOVÁ, D.; TOMAN, R. Remazol Brilliant Blue – Xylan: A soluble Chromogenic Substrate for Xylanases. In: WOOD, W. A.; KELLOGG, S. T. (Ed.). **Methods in Enzymology. Cellulose and Hemicelulose**. San Diego: Academic Press, 1988. v. 160, p. 536-541.

BOHUS, G. Investigations concerning the nitrogen nutrition of macrofungi 1. The role of pH in the utilization of inorganic N sources in the case of some Ascomycetes and Basidiomycetes. **Mikologiai-Kozlmenyek**, Moscow, v. 37, n. 1-3, p. 55-70, 1998.

BONNEN, A. M.; ANTON, L. H.; ORTH, A. B. Lignin-Degrading Enzymes of the comercial Button Mushroom, *Agaricus bisporus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 3, p. 960-965, Mar. 1994.

BRODA, P.; BIRCH, P. R.; BROKS, P. R.; SIMS, P. F. Lignocellulose degradation by *Phanerochaete chrysosporium*: gene families and gene expression for a complex process. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 19, n. 5, p. 923-932, Mar. 1996.

BOYLE, D. Nutritional factors limiting the growth of *Lentinula edodes* and other white-rot fungi in wood. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v. 30, n. 6, p. 817-823, June 1998.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of the protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, n. 1/2, p. 248-54, 1976.

CAGLARLRMAK, N.; UNAL, K.; OTLES, S. Determination of nutritive change of canned mushrooms (*Agaricus bisporus*) during storage period. *Micologia Aplicada Internacional*, v. 13, n. 2, p. 97-101, 2001.

CAI, Y. J.; CHAPMAN, S. J.; BUSWELL, J. A.; CHANG, S. T. Production and distribution of endoglucanase, cellobiohydrolase, and  $\beta$ -glucosidase components of cellulolytic system of *Volvariella volvacea*, the edible straw mushroom. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 65, n. 2, p. 553-559, Feb. 1999.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C. *The fungi*. London: Academic Press, 1994. 482 p.

CHANG, H. L.; CHAO, G. R.; CHEN, C. C. ; MAU, J. L. Non-volatile taste components of *Agaricus blazei*, *Antrodia camphorata* and *Cordyceps militaris* mycelia. *Food Chemistry*, Oxford, v. 74, n. 2, p. 203-207, Aug. 2001.

CHANTARAJ, N.; CHANTARAJ, N.; AUMATRE, A.; LEE, B. D.; HA, J. K. Substrates obtained from mushroom cultivation as an alternative feed ingredient. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, v. 13, p. 27-34, 2000. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM RECENT ADVANCES IN ANIMAL NUTRITION, 2000, Seoul, Korea.

DELMANTO, R. D.; LIMA, P. L. A.; SUGUI, M. M.; EIRA, A. F.; SALVADORI, D. M. F. , SPEIT, G.; RIBEIRO, L. R. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murril mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphemide. *Mutation Research- Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Amsterdam, v. 496, n. 1/2, p. 15-21, Sept. 2001.

DEMIRBAS, A. Concentrations of 21 metals in 18 species of mushrooms growing the East Black Sea region. *Food Chemistry*, Oxford, v. 75, n. 4, p. 453-457, Dec. 2001.

DEHSPANDE, V.; ERIKSSON, K. E. 1,4- $\beta$ -glucosidases of *Sporotrichum pulverulentum*. In: WOOD, W. A.; KELLOGG, S. T. (Ed.). *Methods in Enzymology*. San Diego:Academic Press, 1988. v. 160, p. 415-24.

EGGERT, C.; TEMP, U.; ERIKSSON, K. E. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of

the laccase. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 4, p. 1151-1158, Apr. 1996.

EGUCHI, F.; YOSHIMOTO, H.; HIGAKI, M. Regeneration and fruiting-body formation from protoplasts in *Agaricus blazei*. **Journal of the Japan Wood Research Society**, Tokyo, v. 41, n. 6, p. 603-609, 1995.

ELISASHVILI, V. I.; KHardZIANI, T. Sh.; TSIKLAURI, N. D. and KACHLISHVILI, E. T. Cellulase and xylanase activities in higher basidiomycetes. **Biochemistry**, Mosow, v. 64, n. 6, p. 718-722, June 1999.

GIELKENS, M. M. C.; DEKKERS, E.; VISSER, J.; GRAAFF, L. H. de. Two cellobiohydrolase-encoding gene from *Aspergillus niger* require D-xylose and the xylanolytic transcriptional activator XlnR for their expression. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 10, p. 4340-4345, Oct. 1999.

GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology**. 2. ed New York: Wiley-Liss, 1994. 425 p.

GOYAL, A.; GHOSH, B.; EVELEIGH, D. Characteristics of fungal cellulases. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 36, n. 1, p. 37-50, 1991.

GROOT, P. W. J. de, VISSER, J., GRIENSVEN, L. J. L. D. V.; SCHAAP, P. J. Biochemical and molecular aspects of growth and fruiting of the edible mushroom *Agaricus bisporus*. **Mycology Research**, New York, v. 102, n. 11, p. 1297-1308, Nov. 1998.

GRUBE-BAIBA, J.; ENG-ELIZABETH, T.; KAO-YED, C.; KWON, A.; SHIUAN, C. White button mushroom phytochemicals inhibit aromatase activity and breast cancer cell proliferation. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 131, n. 12, p. 3288-3293, Dec. 2001.

HAN, J. Solid-state fermentation of cornmeal with the basidiomycete *Hericiu erinaceum* for degrading starch and upgrading nutritional value. **International Journal Food Microbiology**, Oxford, v. 80, n. 1, p. 61-66, Jan. 2003.

ILMEN, A. N.; SALOHEIMO, A.; PENTTILA, M. ACEI of *Trichoderma reesei* is a repressor of cellulase and xylanase expression. **Applied and Environment Microbiology**, Washington, v. 69, n. 1, p. 56-65, Jan. 2003.

INBAR, J.; CHET, I. The role of recognition in the induction of specific chitinases during mycoparasitism by *Trichoderma harzianum*. **Microbiology**, Reading, v. 141, pt. 11, p. 2823-2829, Nov. 1995.

INGLIS, G. D.; POPP, A. P.; SELINGER, L. B.; KAWCHUK, L. M.; GAUDET, D. A.; McALLISTER, T. A. Production of cellulases and xylanases by low-temperature basidiomycetes. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 46, n. 9, p. 860-865, Sept. 2000.

IVANOVA, I. I. Growth and Biosynthesis of Cellulases. **Mikrobiology**, New York, v. 53, n. 4, p. 615-620, July/Aug. 1984.

KAWAGISHI, H.; KANAO T.; INAGAKI, R.; MIZUNO, T. Formolysis of a Potent Antitumor (1,6) -  $\beta$ -D-Glucan-Protein Complex from *Agaricus blazei* Fruiting Bodies and Antitumor Activity of the Resulting Products. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 393-403, 1990.

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

KHUSH, R. S.; BECKER, E.; WACH, M. DNA amplification polymorphisms of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 9, p. 2971-2977, Sept. 1992.

KULMINSKAYA, A. A.; THOMSEN, K. K.; SHABALIN, K. A.; SIDORENKO, I. A.; ENEYSKAVA, E. V.; SAVEL'EV, A. N.; NEUSTROEV, K. N. Isolation, enzymatic properties, and mode of action an exo-1,3- $\beta$ -glucase from *Trichoderma viride*. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 268, n. 23, p. 6123-6131, Dec. 2001.

KUPPER, C. Nutritional properties and possible health-promoting effects of edible fungi. **Champignon**, Bonn, n. 414, p. 80-91, 2000.

LANDECKER, E. M. **Fundamentals of the fungi**. 4. ed. New Jersey: Prentice Hall, Upper Saddle River, 1996. 574 p.

LATIFF, L. A.; DARAN, A. B. M.; MOHAMED, A. B. Relative distribution of minerals in the pileus and stalk of some selected edible mushrooms. *Food Chemistry*, Oxford, v. 56, n. 2, p. 115-121, June 1995.

LEHNINGER, A.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Principles of biochemistry. New York: Worth Publishers, 1993. 1013 p.

LEMOS, J. L.; FONTES, M. C.; PEREIRA, N. Jr. Xylanase production by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation and influence of different nitrogen sources. *Applied Biochemistry Biotechnology*, Tokyo, v. 91-93, p. 681-689, 2001.

LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination for carbohydrates. *Analytical Biochemistry*, v. 47, p. 273-79, 1972.

LEVY, I.; SHANI, Z. A.; SHOSEYOV, O. Modification of polysaccharides and plant cell wall by endo-1,4-  $\beta$ -glucanase and cellulose-binding domains. *Biomolecular Engineering*, Amsterdam, v. 19, n. 1, p. 17-30, June 2002.

LINDER, M.; MATTINEN, M. L.; KONTTTELI, M.; LINDEBERG, G.; STAHLBERG, J.; DRAKENBERG, T.; REINIKAINEN, T.; PETTERSSON, G.; ANNILA, A. Identification of functionally important amino acid in the cellulose-binding domain of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase I. *Protein Science*, New York, v. 4, n. 6, p. 1056-1064, June 1995

LINDER, M.; SALOVUORI, I.; RUOHONEN, L.; TEERI, T. T. Characterization of a double Cellulose-binding domain. *Journal of Biology Chemistry*, Bethesda, v. 271, n. 35, p. 21268-21272, Aug. 1996.

LJUNGDAHL, L. G.; ERIKSSON, K. E. Ecology of microbial cellulose degradation. In: MARSHALL, K. C. (Ed.). *Advances in microbial ecology*, New York: Plenum Press, 1985. v. 8, p. 115

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; ZYL, W. H. V.; PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology Molecular Biology*, Washington, v. 66, n. 3, p. 506-577, Sept. 2002.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiology Molecular Biology*, Washington, v. 64, n. 3, p. 461-488, Sept. 2000.

MANZI, P.; GAMBELLI, L.; MARCONI, S.; VIVANTI, V.; PIZZOFRERATO, L. Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. *Food chemistry*, Oxford, v. 65, n. 4, p. 477-482, Dec. 1999.

MATTILA, P.; KONKO, K.; EUROLA, M.; PIHLAVA, J. M.; ASTOLA, J.; VAHTERISTO, L.; HIETANIEMI, V.; KUMPULAINEN, J.; VALTONEM, M.; PIIRONEN, V. Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. *Journal Agricultural Food Chemistry*, Washington, v. 49, n. 5, p. 2343-2348, May 2001.

MATTILA, P.; LAMPI, A-M.; RONKAINEN, R.; TOIVO, J.; PIIRONEN, V. Sterol and vitamin D<sub>2</sub> contents in some wild and cultivated mushrooms. *Food Chemistry*, Oxford, v. 76, n. 3, p. 293-298, May 2002.

MEDVE, J.; KARLSSON, J.; LEE, D.; TJERNELD, F. Hydrolysis of microcrystalline cellulose by cellobiohydrolase I and endoglucanase II from *Trichoderma reesei*: adsorption, sugar production pattern, and synergism of the enzymes. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, v. 59, n. 5, p. 621-634, Sept. 1998.

MEINKE, A.; DAMUDE, H. G.; TOMME, P., KWAN, E.; KILBURN, D. G.; Jr. MILLER, R. C.; WARREN, R. A. J.; GILKES, N. R. Enhancement of endo- $\beta$ -1,4-glucanase activity of an exocellobiohydrolase by deletion of a surface loop. *Journal of Biology Chemistry*, Bethesda, v. 270, n. 9, p. 4383-4386, Mar. 1995.

MENOLI, R. C. R. N.; MANTOVANI, M. S.; RIBEIRO, L. R.; SPEIT, G.; JORDÃO, B. Q. Antimutagenic effects of the mushroom *Agaricus blazei* Murril extracts on V79 cells. *Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Amsterdam, v. 496, n. 1/2, p. 5-13, Sept. 2001.

MILES, P. G.; BUSWELL, J. A. *Genetics and breeding of edible mushrooms*. Hardcover: Gordon and Breach Publishing Group, 1993. 329 p

MIZUNO, T.; HAGIWARA, T.; NAKAMURA, T.; ITO, H.; SHIMURA, S.; SUMIYA, T.; ASAKURA, A. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from "himematsutake" the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. *Agricultural Biology Chemistry*, Tokyo, v. 54, n. 11, p. 2889-2896, Nov. 1990.

NAFFAA, W.; RAVEL, C.; GUILLAUMIN, J. J. Nutritional requirements for growth of fungal endophytes of grasses. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, n. 4, p. 321-237, Apr. 1998.

NAKAJIMA, A.; ISHIDA, T.; KOGA, M.; TAKEUCHI, M. Effect of hot water extract from *Agaricus blazei* Murill on antibody-producing cells in mice. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 2, n. 8, p. 1205-1211, July, 2002.

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

PALONEN, H.; TENKANEN, M.; LINDER, M. Dynamic interaction of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolases Cel6a and Cel7a and cellulose at equilibrium and during hydrolysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 12, p. 5229-5233, Dec. 1999.

PASCHOLATI, S. F.; DEISING, H.; LEITE, B.; ANDERSON, D.; NICHOLSON, R. L. Cutinase and non-specific esterase activities in the conidial mucilage of *Colletotricum graminicola*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 42, n. 1, p. 37-51, Jan. 1993.

SAITO, K.; KASE, T.; TAKAHASHI, E.; TAKAHASHI, E.; HORINOUCI, S. Purification and characterization of a trehalose synthase from the basidiomycete *Grifola frondosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 11, p. 4340-4345, Nov. 1998.

STRYER, L. **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. p. 273-288.

STUBBS, H. J.; BRASCH, D. J.; EMERSON, G. W.; SULLIVAN, P. A. Hydrolase and transferase activities of the  $\beta$ -1,3-exoglucanase of *Candida albicans*. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 263, n. 3, p. 889-895, Aug. 1999.

TAKAKU, T.; KIMURA, Y.; OKUDA, H. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 131, n. 5, p. 1409-1413, May 2001.



TANAKA, Y.; MURATAN, N.; KATO, H. Behavior of nuclei and chromosomes during ascus development in the mating between either rice-strain or weeping lovegrass-strain and ragi-strain of *Pyricularia*. **Annual Phytopathology society of Japan, Tokyo**, v, 45, p. 182-191, 1979.

THORMANN, M. N.; CURRAH, R. S.; BAYLEY, S. E. The relative ability of fungi from *Sphagnum fuscum* to decompose selected carbon substrates. **Canadian Journal of Microbiology, Ottawa**, v. 48, n. 3, p. 204-211, Mar. 2002.

WANNET, W. J. B.; DRIFT, C. van-der; CAMP, H. J. M. O. Den; GRIENSVEN, L. J. L. D. V. Trehalose and mannitol metabolism in *Agaricus bisporus*. Science and cultivation of edible fungi. In: **INTERNATIONAL CONGRESS ON THE SCIENCE AND CULTIVATION OF EDIBLE FUNGI**, 15., 2000, Maastricht, Netherlands. p. 63-67.

YAGUE, E.; ZUNIC-MEHAK, M.; MORGAN, L.; WOOD, D. A.; THURSTON, C. F. Expression of Cel 2 and Cel 4, two proteins from *Agaricus bisporus* with similarity to fungal cellobiohydrolase I and  $\beta$ -mannanase, respectively, is regulated by the carbon source. **Microbiology, San Diego**, v. 143, n. 1, p. 239-244, Jan. 1997.

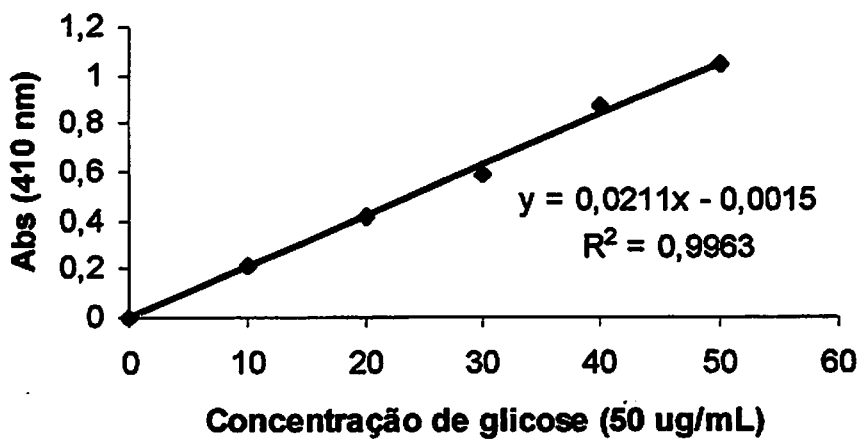
ZHAO, J.; CHEN, Y. H.; Kwan, H. S. Molecular cloning, characterization, and differential expression of a glucoamylase gene from the basidiomycetous Fungus *Lentinula edodes*. **Applied and Environmental Microbiology, Washington**, v. 66, n. 6, p. 2531-2535, June 2000.

ZHAO, J.; KWAN, S. Characterization, molecular cloning, and differential expression analysis of laccase genes from the edible mushroom *Lentinula edodes*. **Applied and Environmental Microbiology, Washington**, v. 65, n. 11, p. 4908-4913, Nov. 1999.

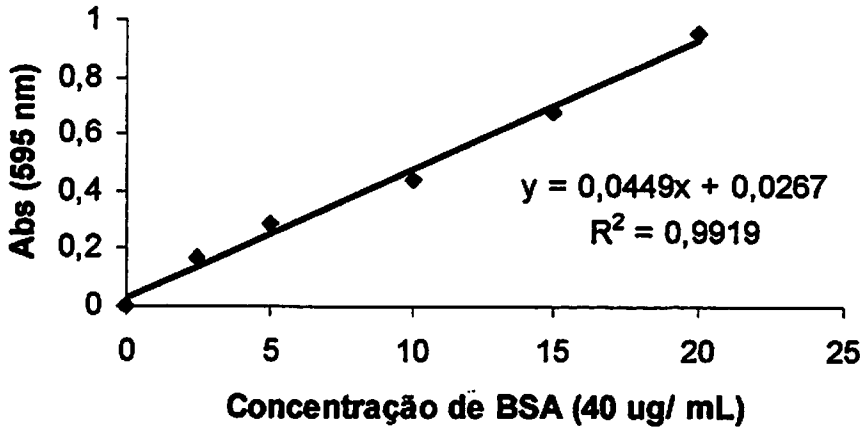
ZHENG, Z. X.; SHETTY, K. Solid state production of polygalacturonase by *Lentinus edodes* using fruit processing wastes. **Process Biochemistry, Oxford**, v. 35, n. 8, p. 825-830, Mar. 2000.

## ANEXOS

ANEXO	Página
FIGURA 1A .....	67
FIGURA 2A .....	68
FIGURA 3A.....	69



**FIGURA 1A** Curva padrão de glicose



**FIGURA 2A** Curva padrão de Albumina de Soro Bovino (BSA)

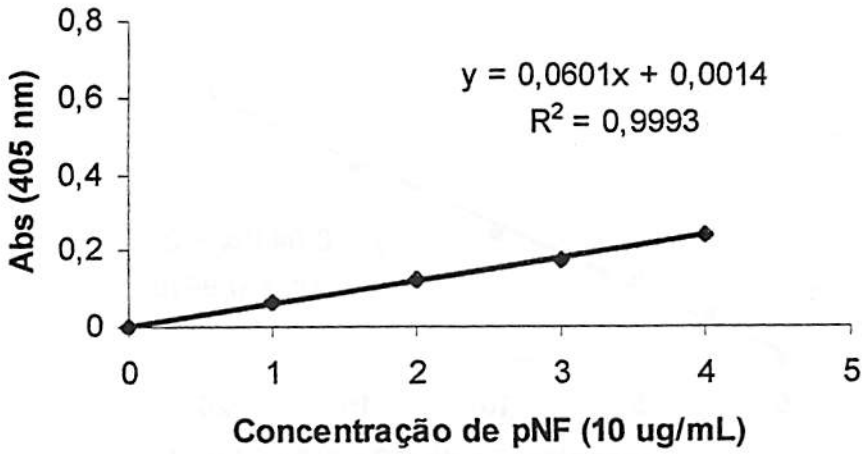


FIGURA 3A Curva padrão de p-nitrofenol (pNP).