

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

ALEXANDRE ANTUNES BRUM

**Perfil enzimático e degradação lignocelulósica
durante o crescimento vegetativo de *Agaricus
brasiliensis* em diferentes substratos**

Florianópolis
2005

ALEXANDRE ANTUNES BRUM

**Perfil enzimático e degradação lignocelulósica
durante o crescimento vegetativo de *Agaricus
brasiliensis* em diferentes substratos**

Dissertação apresentada ao
programa de pós-graduação
em Biotecnologia como parte
dos requisitos para obtenção
do título de mestre em
Biotecnologia (área de
concentração ambiental)

Orientadora: Prof^a Ph.D Margarida Matos de Mendonça
Co-orientador: Prof. Dr. Carlos H. L. Soares

Florianópolis
2005

Brum, Alexandre Antunes

Perfil enzimático e degradação lignocelulósica durante o crescimento vegetativo de *Agaricus brasiliensis* em diferentes substratos / Alexandre Antunes Brum – Florianópolis, 2005.

Dissertação (Mestrado) – Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

1. Enzimas. 2. *Agaricus brasiliensis* 3. FTIR.

112 p.

DEDICATÓRIA

Dedico o presente trabalho aos meus pais, João e Vera, a minha irmã Fernanda, ao meu tio “Xirú”, a minha sempre amiga “Cris” e especialmente ao nosso filho Gabriel, que é a principal fonte de inspiração para que eu siga na caminhada da vida. Dedico também a Patrícia e a Alana pelos momentos que compartilhamos durante a finalização deste trabalho, aos meus familiares mais distantes que sempre me deram força, acreditando e torcendo por mim e aos produtores de cogumelo, que fazem nossos resultados acadêmicos se tornarem realidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Leonardo e ao César pela hospedagem primeira em Florianópolis. À professora Margarida pela orientação, dedicação e paciência durante a realização deste trabalho bem como por receber meus familiares maravilhosamente quando precisei de auxílio médico. Ao Tito e ao Bennie pelo fornecimento dos substratos para o experimento. Ao professor Carlos Soares pelo auxílio fundamental na execução deste trabalho, bem como ao pessoal de seu laboratório, especialmente a Sabrina pela ajuda nas análises. Agradeço aos meus colegas de laboratório, Jean, Carla, Renata, Melissa, Liz, Rogério, Suzana e Max, pelos momentos de trabalho e descontração diária. Ao pessoal dos laboratórios vizinhos, o Luiz, o Márcio, o Pedro, a Elsa, a Leiza, o Luciano e especialmente ao professor Germano e a professora Vetúria por ajudas valiosas e papos descontraídos. Agradeço ao Ângelo pelas discussões de estatística entre outras, ao meu amigo Jairo, com o qual convivi boa parte do período de realização deste trabalho. Agradeço ao meu pai por toda a confiança em mim depositada, a minha mãe maravilhosa que eu tanto amo. A Cristiane por ser esta pessoa incrível, amiga e que gerou nosso filho e aos meus protetores que me guiam e iluminam meu caminho, fazendo com que a minha vida seja repleta de bons momentos e cercada de pessoas maravilhosas, a todos vocês não existem palavras para expressar o que sinto.

Muito obrigado.

“Quando o homem aprender a respeitar até mesmo o menor ser da criação, seja ele animal ou vegetal, ninguém precisará lhe ensinar a amar seu semelhante”.

Albert Schweitzer (Nobel da Paz em 1952)

Perfil enzimático e degradação lignocelulósica durante o crescimento vegetativo de *Agaricus brasiliensis* em diferentes substratos

Resumo

Fungos como os basidiomicetes podem crescer e frutificar em substratos lignocelulósicos em função de sua capacidade de produzir enzimas hidrolíticas e oxidativas e as liberar para o meio extracelular. Resultado disso é a degradação da lignocelulose e correspondente produção de biomassa vegetativa. O monitoramento da degradação pode fornecer importantes informações sobre a eficiência na conversão da lignocelulose. No presente trabalho definiu-se o perfil enzimático de *Agaricus brasiliensis* em cultivo tradicional (Substrato compostado) e axênico (Substrato não compostado), assim como monitorou-se a produção de massa miceliana e a degradação da lignocelulose através de análises da lignina Klason, espectroscopia de infravermelho (FTIR), pH e relação C/N. *A. brasiliensis* produziu enzimas como lacase, manganês peroxidase, β -glicosidase e xilanase em ambos substratos. A atividade de lacase foi elevada quando comparada a Mn peroxidase, principalmente em cultivo axênico. A xilanase apresentou níveis mais elevados de atividade enzimática em cultivo tradicional. Houve a formação de maior massa miceliana em cultivo tradicional. A atividade de lacase e a biossíntese de proteínas apresentaram correlação significativa com a biomassa vegetativa produzida em cultivo tradicional. No cultivo tradicional houve aumento na concentração relativa de lignina, em cultivo axênico houve redução. Os espectros de infravermelho evidenciaram consumo mais acentuado dos polissacarídeos (1110cm^{-1}) no cultivo tradicional. As variações de pH evidenciaram uma tendência para acidificação em ambos substratos. A relação C/N reduziu-se no tradicional e elevou-se no axênico. Os resultados obtidos indicam que o fungo tem maior facilidade de crescimento em substratos degradados, no entanto, pode crescer nos dois tipos de substratos, utilizando os componentes lignocelulósicos de forma diferenciada.

Palavras-chave: Enzimas, lignocelulose, ergosterol, FTIR, lignina, *Agaricus brasiliensis*, cogumelo-do-sol, himematsutake

Lignocellulosic enzymes profile and lignocellulose degradation during vegetative growth of *Agaricus brasiliensis* in different substrates

Abstract

Basidiomycetes are fungus able to grow and produce fruiting bodies on lignocellulose substrates due to their ability to produce hydrolytic and oxidative enzymes, which are excreted to the extracellular environment. As a result they degrade lignocellulose and produce mycelial biomass. Monitoring degradation and biomass production may provide important information on the efficiency of lignocellulose bioconversion into fungal biomass. Our objectives were the identification of the lignocellulosic enzymes of *Agaricus brasiliensis* on different substrate conditions of a traditional (Composted) and axenic systems (Non-composted). The dynamic of enzymatic activity, biomass production and lignocellulose degradation were evaluated as well as the analysis of Klason lignin, infrared spectroscopy (FTIR), pH and C/N ratio. *A. brasiliensis* produced as lignocellulolytic enzymes, laccase, manganese peroxidase, β -glycosidase and xylanase, in both substrates. Laccase activity was higher when compared to Mn peroxidase, particularly in the non-composted substrate. Xylanase was mostly active on the composted substrate. The traditional system, composted substrate yielded higher fungal biomass. Laccase and protein were correlated to biomass on the traditional cultivation system. In relation to the changes in the substrate an increase on relative lignin concentration occurred on the axenic system whereas the value was reduced on the traditional system. The FTIR spectra evidenced a higher consumption of polysaccharides (1110cm^{-1}) in the traditional system. pH changes showed a decrease in both substrates. C/N ratio was reduced in the traditional system but increased in the axenic substrate suggesting that the species has higher ability to produce higher biomass on prefermented substrates nevertheless growth is possible in both substrates. Strategy of lignocellulosic degradation is different depending on the type of substrate produced.

Key-words: Enzyme, lignocellulose, ergosterol, FTIR, lignin, *Agaricus brasiliensis*, Himematsutake, Almond Portobello

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Configuração estrutural da molécula de ergosterol.....	09
Figura 2:	Alterações ocorridas durante o processo de compostagem.....	13
Figura 3:	Atividade de lacase durante crescimento vegetativo.....	44
Figura 4:	Consumo e concentração inicial de carboidratos nos substratos.....	46
Figura 5:	Atividade de xilanase durante crescimento vegetativo.....	48
Figura 6:	Atividade de α -glicosidase durante crescimento vegetativo.....	49
Figura 7:	Perfil de MnP durante crescimento vegetativo.....	51
Figura 8:	Conteúdo de ergosterol durante crescimento vegetativo.....	54
Figura 9:	Biossíntese de proteínas durante crescimento vegetativo.....	56
Figura 10:	Variações no conteúdo relativo de lignina	69
Figura 11:	Diferenças espectrais iniciais nos substratos.....	72
Figura 12:	Espectros de FTIR de substrato compostado.....	74
Figura 13:	Espectros de FTIR de substrato não compostado.....	77
Figura 14:	Variações no pH durante o crescimento vegetativo nos substratos.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Formulações dos substratos compostado e não compostado usado para crescimento de <i>A. brasiliensis</i> durante 35 dias.....	38
Tabela 2:	Quocientes entre as absorvâncias das principais bandas observadas nos espectros FTIR	74
Tabela 3:	Alterações na composição elementar dos substratos	81

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	04
2.1 Objetivo geral	04
2.2 Objetivos específicos	04
3. CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	05
3.1. <i>Agaricus brasiliensis</i> ou <i>Agaricus blazei</i> (Murrill) ss.Heinemann.....	05
3.2 Crescimento vegetativo.....	05
3.3 Substratos para cultivo – seleção e tratamentos	10
3.4 Alternativas para o cultivo de cogumelos em Santa Catarina.....	18
3.5 Capacidade degradativa dos basidiomicetos.....	21
3.5.1 Utilização dos polissacarídeos	24
3.5.2 Dinâmica de degradação do substrato	26
4. CAPÍTULO II – Perfil enzimático, atividade lignocelulolítica e produção de biomassa vegetativa durante o crescimento de <i>Agaricus brasiliensis</i> em substratos esterilizados compostado e não compostado	30
Resumo	30
4.1 Introdução	31
4.2 Materiais e métodos.....	37
4.2.1 Avaliação do perfil e da atividade enzimática	39
4.2.2 Avaliação da biomassa vegetativa	41
4.3 Resultados e discussão	43
4.3.1 Perfil e dinâmica enzimática em cultivo tradicional e axênico de <i>A. brasiliensis</i>	43
4.3.2 Avaliação da biomassa vegetativa.....	53
4.4 Conclusões	59

5. CAPITULO III – Alterações nos componentes lignocelulósicos e acidificação durante o crescimento vegetativo de <i>Agaricus brasiliensis</i> em diferentes substratos	60
.....	60
Resumo	60
5.1 Introdução	61
5.2 Materiais e métodos.....	67
5.2.1 Avaliação da lignina Klason	67
5.2.2 Análises em espectroscopia de infravermelho – FTIR	68
5.2.3 Análise de pH	68
5.2.4 Análises elementares	68
5.3 Resultados e discussão	69
5.3.1 Determinação da concentração de lignina	69
5.3.2 Espectroscopia de infravermelho	72
5.3.2.1 Diferenças espectrais entre os substratos previamente ao crescimento fúngico.....	73
5.3.2.2 Modificações estruturais no substrato compostado submetido a 35 dias de degradação por <i>A. brasiliensis</i>	74
5.3.2.3 Modificações estruturais no substrato não compostado submetido a 35 dias de degradação por <i>A. brasiliensis</i>	77
5.3.3 Acidificação dos substratos	79
5.3.4 Análises elementares	80
5.4 Conclusões	83
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
ANEXO A – Curvas padrão e protocolos das avaliações enzimáticas.....	96

1. INTRODUÇÃO

Os fungos constituem um dos grupos de microrganismos mais importantes na atividade de decomposição da matéria orgânica em função de sua capacidade especializada de degradação. Esta atividade ocorre, sobretudo, através de sua fase vegetativa ou miceliana.

Nas fases vegetativa e reprodutiva, a formação de biomassa depende da produção de enzimas extracelulares, que são fundamentais na degradação dos componentes dos substratos, principalmente lignocelulose (VELÁZQUEZ-CEDEÑO et al. 2002).

Basicamente, são encontrados dois grupos de enzimas responsáveis pela degradação da lignocelulose, as enzimas oxidativas e as hidrolíticas. As enzimas oxidativas, como lacase, manganês peroxidase e lignina peroxidase, atuam na degradação da lignina e detoxificam o meio de crescimento dos metabólitos gerados durante a degradação. A degradação e/ou biotransformação da lignina permite que as enzimas hidrolíticas como a celulase, α -glicosidase, xilanase entre outras, atuem nas fontes de carbono, possibilitando a absorção de polissacarídeos pelo micélio, os quais constituem fonte de carbono principalmente para formação das frutificações (DURRANT et al. 1991).

Em alguns grupos de fungos, durante a fase reprodutiva, formam-se as estruturas de frutificação, denominadas cogumelos, que dependem da biomassa miceliana para supri-las de água e nutrientes (MOL, 1989). Os requisitos nutricionais e ambientais da fase reprodutiva diferem daqueles que são ótimos para o crescimento miceliano e, portanto, o estudo da ecologia e fisiologia de um fungo deve considerar ambas as fases do ciclo, no entanto, estudos durante a fase

vegetativa podem evidenciar a capacidade degradativa, competitiva, entre outras, que refletem diretamente na produtividade.

Considerando que a produtividade de um cultivo depende de três fatores básicos que envolvem, a estirpe do fungo utilizada, as condições ambientais propiciadas nas diferentes fases do cultivo e a qualidade do substrato, é fundamental otimizar cada um destes fatores. Por outro lado, um número cada vez maior de produtores vem se estabelecendo no estado de Santa Catarina em cultivos não sazonais, em casas de cultivo, usando diversos níveis de tecnologia para controle ambiental. Já os estudos sobre aspectos do substrato encontram-se bastante restritos e pouca informação está disponível, principalmente sobre o uso de novos resíduos na formulação de composto e tecnologias de preparação deste substrato.

O composto usado para o cultivo de *A. brasiliensis* é um substrato submetido a um processo de degradação, essencialmente aeróbico, e posteriormente pasteurizado, inicialmente baseado na tecnologia desenvolvida para o cultivo do champignon, *Agaricus brunnescens* Peck. [= *Agaricus bisporus* Lange (Imbach)], quer no que se refere aos insumos para formulações, metodologias de manejo dos pátios de compostagem e dos túneis de pasteurização. Porém, os requisitos ecológicos e nutricionais de *A. brasiliensis* são distintos daqueles requeridos por *A. brunnescens*, tanto na fase vegetativa quanto reprodutiva, o que implica na ocorrência de doenças e baixas produtividades, como relatadas por Nascimento & Eira (2003) onde a incidência de falsa-trufa (*Diehliomyces microsporus* Gilkey) nos estados de São Paulo e Paraná, passou a ocorrer em função de inadequadas condições de pasteurização do composto.

Para a produção de um composto seletivo para *A. brasiliensis* é importante conhecer as características fisiológicas da espécie, particularmente sua capacidade degradativa em relação aos componentes principais do substrato, os materiais lignocelulósicos.

Não existem informações científicas sobre o perfil enzimático, sua capacidade degradativa, assim como sobre a dinâmica de degradação da lignocelulose por *A. brasiliensis*, e sua versatilidade para crescer e frutificar em diferentes resíduos agroindustriais.

O estudo de tecnologias alternativas de cultivo, que otimizem, sobretudo o tratamento térmico do substrato, pode ser uma estratégia importante no aumento da produtividade de cultivos de *A. brasiliensis*. Adicionalmente, a inclusão de novos ingredientes nas formulações, com embasamento nos estudos da capacidade degradativa de *A. brasiliensis*, também é importante em função da predominância regional de resíduos.

A produção em substratos esterilizados e não compostados é uma alternativa que pode viabilizar a utilização de resíduos com predominância regional, além de permitir o uso de infra-estrutura idêntica aquela de outras espécies tal como o shiitake [*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler] (CAMPBELL & SLEE, 1987).

Portanto, previamente ao desenvolvimento de tecnologias de cultivo, sobretudo aquelas que se referem à preparação de substratos de cultivo, é fundamental o estudo das características fisiológicas de *A. brasiliensis* particularmente seu perfil enzimático e a dinâmica da atividade enzimática, durante o crescimento em resíduos lignocelulósicos, bem como o estudo da dinâmica do processo de degradação.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Estudar a dinâmica de degradação lignocelulósica por *Agaricus brasiliensis*, usando-se métodos bioquímicos e espectroscópicos, durante o crescimento vegetativo de *Agaricus brasiliensis* em dois sistemas de cultivo, axênico e tradicional;

2.2 Objetivos específicos

- Determinar o perfil enzimático lignocelulolítico de *A. brasiliensis*;
- Monitorar a dinâmica da atividade enzimática de *A. brasiliensis*;
- Avaliar a produção de biomassa vegetativa e identificar possíveis marcadores indiretos de crescimento vegetativo;
- Detectar modificações químicas ocorridas nos diferentes substratos;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Agaricus brasiliensis* ou *Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinemann

Agaricus brasiliensis S. Wasser & Didukh (Agaricomycetidae), é a atual denominação do fungo coloquialmente denominado cogumelo do sol[®], cogumelo piedade, “almond portobello”, “kawahiratake”, “himematsutake”, champignon do Brasil entre outros. Até recentemente, denominava-se *Agaricus blazei* (Murrill) ss. Heinemann, um fungo nativo das Américas que teve sua popularidade baseada nas β -glucanas presentes na sua parede celular, polissacarídeos com bioatividade, principalmente imunomoduladora (TAKATU, 2001; WASSER et al. 2002). Em 1993, a partir de espécimes nativos do Brasil de *A. blazei* (Murrill), o pesquisador Heinemann constatou diferenças químico-morfológicas nas frutificações deste fungo, em relação aos espécimes da América do Norte, e passou a denominá-los *A. blazei* (Murrill) ss. Heinemann. Em 2002, Wasser et al. propuseram para os espécimes brasileiros a denominação de *A. brasiliensis*.

3.2 Crescimento vegetativo

O estudo do crescimento vegetativo ou miceliano dos fungos, cujo interesse reside na formação de corpos de frutificação, os cogumelos, é fundamental, já que o desenvolvimento destas frutificações está intimamente ligado ao micélio (MOL, 1989).

A capacidade de um fungo produzir substâncias fungistáticas e bacteriostáticas, assim como tolerá-las; dispor de elevadas velocidades de crescimento quando estimulado por nutrientes solúveis; produzir enzimas

apropriadas e eficientes na degradação de constituintes recalcitrantes (GARRET, 1970 *apud* SAVOIE et al. 1996), pode determinar a eficiente colonização de um substrato por uma determinada espécie ou estirpe (SAVOIE et al. 1996).

A utilização do carbono é fundamental na construção e desenvolvimento das hifas, que crescem apicalmente em função da deposição de novos materiais, principalmente durante a fase vegetativa. Sob adequadas condições ambientais, como baixos níveis de CO₂ e adequadas temperaturas, as hifas iniciam a formação dos primórdios através de sua modificação, o que caracteriza a fase reprodutiva. A deposição de novos materiais no agregado de hifas ocorre até que o cogumelo atinja cinco mm, quando o primórdio está morfogeneticamente completo, sendo que a partir desta fase ocorre, sobretudo, a alongação e o intumescimento do cogumelo, até a liberação dos esporos (MOL, 1989).

O crescimento e desenvolvimento de fungos lignocelulolíticos nas diferentes fases, depende da liberação de enzimas hidrolíticas e oxidativas que atuam na despolimerização dos constituintes do substrato, tornando-os passíveis de absorção pelas hifas (OKEKE et al. 1994).

A absorção de materiais extracelulares permite a formação de novas células a partir da deposição uniforme de quitina, formada pela incorporação de moléculas de N-acetil-D-glicosamina, com ligações (1-4)- β -glicosídeas entre si, depositadas nas paredes laterais e septos das hifas, de forma a organizar uma célula rígida que resista a pressão de turgor. As moléculas de glicosamina são associadas as glucanas da membrana plasmática, através de ligações covalentes que determinam o grau de rigidez e ou plasticidade da célula (MOL, 1989).

Como o desenvolvimento do micélio vegetativo tem características diferentes do micélio reprodutivo, as glicosaminoglucanas das células vegetativas diferem na

sua constituição química e estrutural daquelas das células das frutificações, em função da estrutura necessitar ou não de expansão celular, ou seja, as células componentes das hifas do substrato possuem paredes mais rígidas, diferentemente das hifas das frutificações, que requerem certo grau de plasticidade (MOL, 1989).

As condições ambientais, proporcionadas nas diferentes fases do ciclo de vida dos fungos, podem alterar a composição estrutural e conseqüentemente a plasticidade das células, principalmente as formadoras de cogumelos, pois na presença de elevadas concentrações de CO₂, ocorrem mudanças nas ligações entre as β -glucanas da parede celular e a elongação do estipe é prejudicada formando cogumelos com estipe reduzido (MOL, 1989).

Já que a passagem da fase vegetativa para a reprodutiva depende da modificação das condições ambientais, necessárias para a formação dos cogumelos nas hifas vegetativas, verifica-se nestas condições uma re-orientação estrutural entre glicosaminoglucanas e β -glucanas. Especificamente, as glucanas adquirem arranjo longitudinal e a glicosaminoglucanas arranjo transversal, condição que restringe o diâmetro da hifa propiciando o crescimento do cogumelo verticalmente em determinadas regiões do micélio (MOL, 1989).

Durante a fase reprodutiva, principalmente, os fungos utilizam os açúcares disponíveis no substrato na forma de celulose, glicose entre outros, para a formação dos cogumelos e durante a fase vegetativa, em muitos casos, há oxidação da lignina preferencialmente a outros polímeros (DURRANT et al. 1991).

A quantidade de biomassa formada, tanto vegetativa como reprodutiva, depende, entre outras coisas, da forma de processamento do substrato e de sua composição física, química e microbiológica.

A biomassa vegetativa pode ser monitorada “*in vitro*” através de medições do crescimento radial em placas de Petri e linear em tubos de corrida miceliana (NOBLE et al. 1995; SAVOIE et al. 1996). No entanto, a biomassa formada pode não apresentar relação direta com o crescimento linear, em casos tal como o de *A. brasiliensis* que forma micélio aéreo em meio de cultura (NEVES, 2000).

Os métodos indiretos para avaliação da biomassa vegetativa, são recomendados em função da dificuldade de separar o micélio dos substratos (SEITZ, 1979). Essas técnicas podem utilizar componentes químicos estruturais ou metabólicos dos fungos, como por exemplo, a quantificação da glicosamina, advinda da acetilação da quitina, DNA, RNA entre outras proteínas. Em muitos casos, são utilizadas proteínas de atividade extracelular, como a enzima lacase. O consumo de oxigênio ou a liberação de dióxido de carbono, bem como a produção de calor, resultantes da atividade metabólica também são utilizados (KEREM et al. 1992; MATCHAM et al. 1985; MUDGETT, 1986).

Técnicas com maior reprodutibilidade e sensibilidade, como HPLC (“high performance liquid chromatography” ou cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE), vem sendo utilizadas para monitorar o crescimento vegetativo de diversos grupos de fungos (BARAJAS-ACEVES et al. 2002). Esta metodologia de avaliação da biomassa vegetativa em fungos é possível em função da especificidade do marcador utilizado, que possibilita a eliminação de interferências de outras substâncias. No caso de substratos lignocelulósicos processados, utilizados tradicionalmente para o cultivo de *Agaricus*, existem microrganismos que podem interferir nos resultados. Para que isso não ocorra, uma avaliação do substrato na ausência de crescimento micelial deve ser realizada a fim de se eliminar efeito da microbiota presente (NEVES, 2000).

O ergosterol é o esterol predominante nos fungos e o principal componente das membranas, e vem sendo usado no monitoramento do crescimento vegetativo de diversos fungos em substratos sólidos (NYLUND & WALLANDER, 1992; WANG et al. 1995). Este esterol é o mais sensível marcador, mesmo com reduzidas quantidades de biomassa, podendo ser detectado após sete dias de incubação (MATCHAM et al. 1985). Em *A. blazei* (Murrill), o ergosterol (Figura 1) foi predominante após duas semanas de crescimento micelial (HIROTANI et al. 2002).

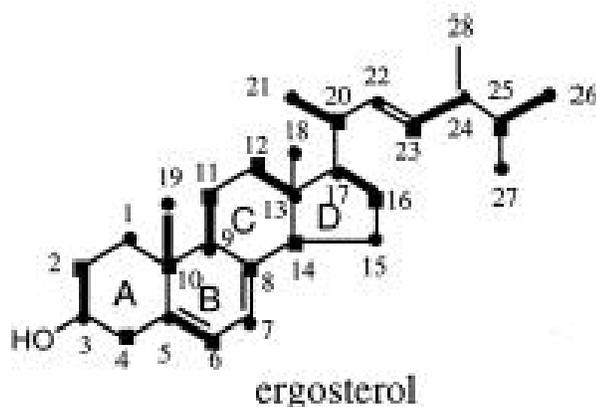


Figura 1. Configuração estrutural da molécula de ergosterol (HIROTANI et al. 2002).

Neves (2000) durante crescimento vegetativo de *A. brasiliensis* encontrou valores entre 163,62 e 187,80 µg de ergosterol por grama de substrato compostado seco, semelhantes aos valores encontrados por Macauley e Bethel (1990) para *A. brunnescens*.

3.3 Substratos para cultivo – seleção e tratamentos

O uso dos resíduos lignocelulósicos como substrato para o cultivo de cogumelos requer que estes sejam disponíveis na região, a fim de reduzir o custo de produção facilitando ainda a repetibilidade da formulação entre as produções. É importante ressaltar que a formulação, em função do material volumoso adotado, interfere diretamente na produtividade (EIRA, 2003). Características físico-químicas e degradativas dos materiais bem como a adaptabilidade ao processo de produção também devem ser consideradas.

A característica composicional e degradativa desses materiais bem como os processos de preparação de substratos podem interferir na velocidade de crescimento do fungo. Substratos compostados são tradicionalmente usados para o cultivo de *Agaricus*, entretanto, outras alternativas podem ser usadas. Em função disso, a disponibilidade de nutrientes, principalmente fontes de carbono, podem ser diversas e assim promover diferentes taxas de crescimento tanto vegetativo quanto reprodutivo.

Já o nitrogênio, necessário à síntese de proteínas entre outros, no caso de substratos compostados, provêm da reação entre substâncias húmicas com compostos nitrogenados durante a compostagem, resultando em fontes disponíveis para absorção. Estas reações são, em parte, responsáveis pela seletividade do composto, fato que não acontece na preparação de substratos para cultivo axênico (SCHISLER, 1982).

Os fungos decompositores secundários, tal como os *Agaricus*, são cultivados em materiais previamente degradados, onde ocorreu o consumo dos componentes de pronta assimilação, como carboidratos e açúcares, assimiláveis

pela maioria dos microrganismos mesófilos presentes na fase inicial da compostagem. Ao final da fase mesofílica há a substituição por microrganismos termo-tolerantes que fazem a fixação do nitrogênio e promovem a seletividade do composto, restando constituintes recalcitrantes e formas complexadas de carbono, que somente são acessíveis aos organismos com capacidade de produzir enzimas específicas.

Neste contexto, a compostagem é importante para a produção de *Agaricus*, pois além de fornecer um substrato mais seletivo, desfavorece o crescimento de organismos contaminantes e/ou competidores (SCHISLER, 1982). O composto para cultivo de *Agaricus* tem como regra geral um componente lignocelulósico volumoso à base de palhas, capim ou outros materiais fibrosos, geralmente com elevado teor de carbono (C) e com inferior teor de nitrogênio (N) e fósforo (P), além de componentes concentrados (normalmente farelos e tortas), que são incorporados em quantidades adequadas para atingir relações C:N:P de 30 a 37:1:0,2, 30:1 no caso de *A. brunnescens* e 37:1 para *A. brasiliensis* (EIRA, 2003).

Kopytowski Filho (2002) concluiu que o composto para obtenção de maior produtividade de *A. brasiliensis* deve ter uma relação C/N de cerca de 37:1, contrariamente à relação utilizada pela maioria dos produtores de composto, que usam a relação recomendada para *A. brunnescens*, mais estreita (cerca de 17:1).

Os micronutrientes (mg.kg^{-1}) K, S, Ca e alguns elementos traço como Mg, Mn, Zn, Bo, Co, Mo entre outros, já se encontram presentes nas palhas, estercos e farelos, em quantidades suficientes para suportar o metabolismo da microbiota envolvida no processo de compostagem, nas fases I e II e durante a colonização do composto pelo fungo (EIRA, 2003).

De forma geral, os substratos para crescimento fúngico em estado sólido requerem pré-tratamentos, a fim de tornar os constituintes químicos mais acessíveis e sua estrutura física mais suscetível à colonização pelo micélio (MUDGETT, 1986). Este pré-tratamento envolve geralmente uma “fermentação” a temperatura ambiente, provocada pela hidratação do material volumoso a fim de promover a atividade microbiana.

A compostagem com fins de cultivo de cogumelos é um processo de biodegradação envolvendo a microbiota nativa, acelerado pela oxigenação forçada e que resulta na humificação das fontes lignocelulósicas e caramelização dos carboidratos. No decorrer deste processo há um incremento na atividade de bactérias, principalmente do tipo actinomicetos, além de fungos, que requerem basicamente oxigênio e umidade para utilização dos açúcares, transformando o ambiente de crescimento. Este crescimento acelerado resulta no aumento da temperatura pela atividade dos microrganismos, que utilizam açúcares e substâncias prontamente assimiláveis no composto. Ao final do processo, é gerado um ambiente seletivo ao fungo de interesse, com teores de umidade adequados ao crescimento de organismos filamentosos, que sintetizam uma variedade de enzimas extracelulares (MUDGETT, 1986; SCHISLER, 1982). A intensa atividade microbiana implica a redução da relação C/N, advinda do aumento no nível protéico e do consumo de carbono, alterações no pH do meio, entre outros fatores ilustrados na figura 2 (SAVOIE et al. 1996; SCHISLER, 1982).

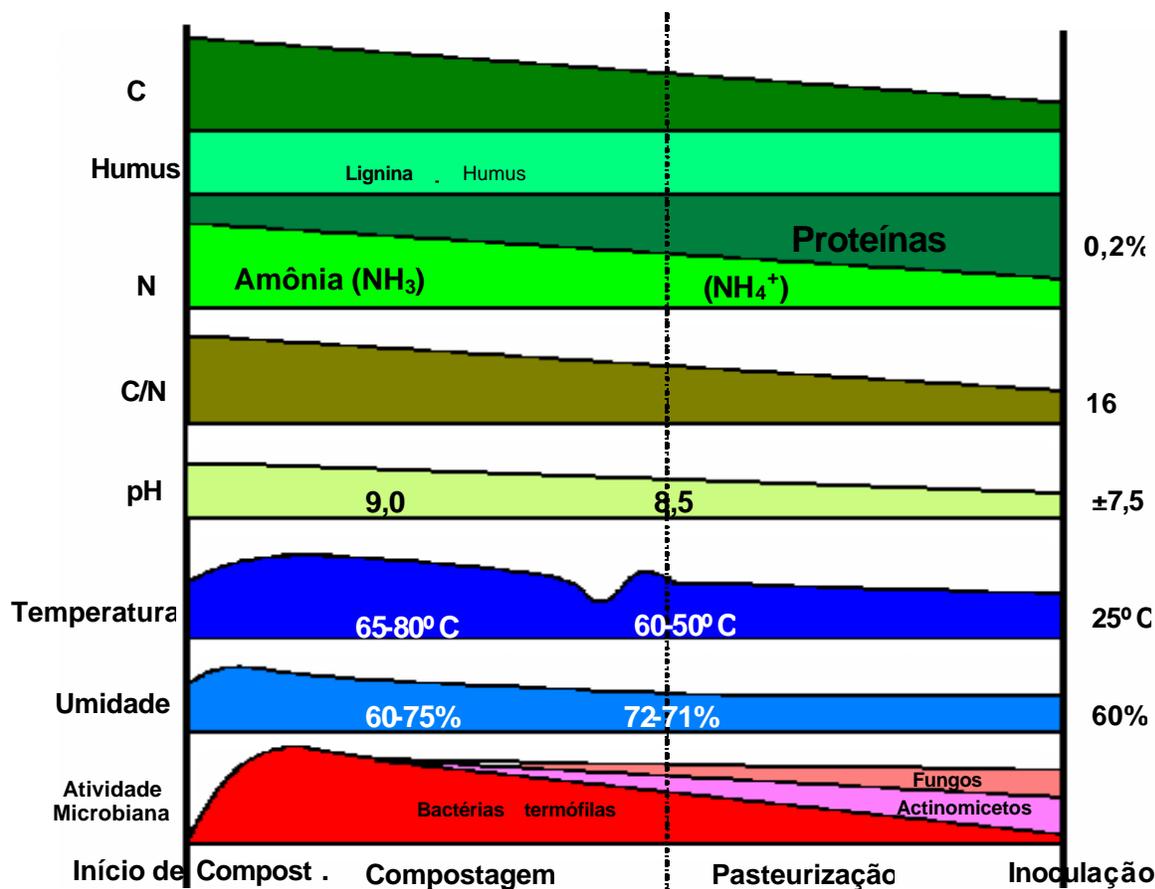


Figura 2: Modificações ocorridas em diversos fatores durante o processo de compostagem (FERREIRA, 1998).

Independente das características dos materiais utilizados para a formulação e suas proporções na mistura, o preparo de um composto envolve duas etapas e pode apresentar tempo variável:

Na etapa I, também denominada de Fase I, ocorre o empilhamento dos ingredientes em camadas, até que se atinjam dimensões máximas de 1,80m x 1,80m podendo ser o comprimento variável. Ocorre o umedecimento dos materiais e adição dos suplementos devendo-se monitorar a temperatura, que varia entre 45 C e 80 C nos diferentes locais da pilha de compostagem, também denominada meda. A meda deve ser periodicamente revirada para promover um ambiente homogêneo e

biodegradação uniforme dos ingredientes, bem como reduzir a possibilidade para formação de ambientes anaeróbios (BRAGA et al. 1998).

Temperaturas em torno de 80°C contribuem para a caramelização dos carboidratos, um dos processos responsáveis pela seletividade do composto e pelo escurecimento característico do substrato. Este processo reduz o teor de água dos carboidratos, concentrando carbono para posterior utilização pelo micélio (SCHISLER, 1982).

O encurtamento da Fase I é estimulado pela frequência das reviradas, que promovem aeração, fracionamento das fibras e aceleram a atividade microbiana durante a decomposição. A umidade deve ser rigorosamente controlada para que não cesse a atividade microbiana nem promova ambientes de anaerobiose. Quanto mais cedo for atingida a uniformidade no substrato, mais curta será a fase I que pode apresentar tempo variável em função da formulação e das características dos materiais utilizados. Ao final desta fase, o composto dispõe das características químico-físicas próximas ao ideal (BRAGA et al. 1998).

Na Fase II, tratamento térmico compreendida por pasteurização e condicionamento, o substrato é transportado para instalações fechadas denominadas túneis, ou câmaras de pasteurização, com o objetivo de proceder-se a erradicação de ovos e/ou larvas de insetos, nematóides, entre outros, trazidos do pátio de compostagem, promover temperaturas a 60-64°C / 4-6 horas (Pasteurização) e entre 45-50 C por aproximadamente 7 dias (Condicionamento) de forma homogênea em toda a massa de composto. Esse processo dará condições de eliminação dos fungos competidores promovendo o crescimento de organismos termófilos benéficos ao crescimento, principalmente na fase vegetativa, do fungo de interesse (EIRA, 2003; STRAATSMA et al. 1993).

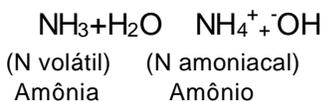
Ao final destes processos, o composto para *A. brasiliensis* deve apresentar umidade em torno de 65%, pH entre 6,5-7,5, relação C/N de 37/1, nitrogênio total cerca de 1,8 a 2 % e as palhas devem apresentar-se menos rígidas com coloração enegrecida, matizes branco-acinzentado devem ser mais evidentes e uniformes, indicando uma correta pasteurização e condicionamento adequado (BRAGA et al. 1998).

Durante a Fase II o nitrogênio é fixado por bactérias como *Proteus*, *Micrococcus* e *Aerobacter* e actinomicetos, organismos termotolerantes que transformam o nitrogênio volátil (NH_3 - amônia) gerado pela decomposição das proteínas, para a forma amoniacal (NH_4^+ - amônio). Este processo é conhecido como amonificação e acarreta redução da relação entre C e N pelo consumo destes elementos simultaneamente. Desta forma, quando adequadas concentrações de carbono e nitrogênio estão presentes na composição inicial do substrato, a liberação de amoníaco acontece paralelamente com a decomposição dos carboidratos, caso contrário, pode haver resíduos desses elementos no substrato final e, assim, comprometer o crescimento miceliano e conseqüentemente a produtividade (SCHISLER, 1982).

O nitrogênio volátil (NH_3) deve ser completamente eliminado durante a fase de condicionamento do composto, quando a temperatura é mantida em torno de 45 C por 6 a 8 dias, já que a volatilização é favorecida a partir de 35°C. Esta volatilização é fundamental, por que caso o N volátil se encontrar em níveis acima de 5ppm ocorrerá a inibição no crescimento micelial do fungo de interesse (GERRITS, 1988). Entretanto, o acondicionamento e o transporte do composto, após sua retirada do túnel de pasteurização, deve ser rigorosamente monitorado, pois há possibilidade de reversão das formas de nitrogênio (NH_4^+ para NH_3 conforme

ilustrado abaixo), prejudicando o crescimento vegetativo e a produção de cogumelos bem como possibilitando o desenvolvimento de outros fungos competidores, como por exemplo, *Coprinus comatus*.

A equação de transformação do nitrogênio durante a compostagem ocorre da seguinte forma:



Gerrits (1988) relata que os níveis de NH_4^+ (nitrogênio amoniacal) interferem diretamente na produtividade de *Agaricus brunnescens* e estão diretamente relacionados com a porcentagem de nitrogênio total no início da compostagem (Fase I). Maiores produtividades foram obtidas com NH_4^+ em torno de 0,4% ao final da fase II, e para que esses níveis fossem atingidos, o nitrogênio total se encontrava em torno de 1,5% para composto clássico e 2,0% para composto sintético, no início da fase I.

As referências bibliográficas sobre a sensibilidade de *A. brasiliensis* ao NH_3 bem como sobre os adequados níveis de NH_4^+ para produtividades satisfatórias não foram encontradas, no entanto, assim como o champignon, *A. brasiliensis*, é um decompositor secundário apto a degradar substratos compostados e ricos em nitrogênio (STAMETS, 2000). Por outro lado, maiores produtividades foram obtidas em substratos submetidos à esterilização e não compostados, sistema de cultivo axênico, sugerindo versatilidade de crescimento em substratos sem decomposição prévia, indicando possibilidades para a produção em novas tecnologias de cultivo (SÀNCHEZ VÁSQUEZ, 1999).

O pesquisador alemão Till (1962) foi o precursor de sistemas alternativos para produção de cogumelos do gênero *Agaricus*, que desvinculam o produtor dos

riscos da compostagem e da pasteurização, através do desenvolvimento de sistemas de produção em substrato esterilizado. Basicamente, o cultivo de cogumelos, em geral, pode ser realizado em condições axênicas, isto é, o substrato deve ser submetido à esterilização e as técnicas de cultivo são assépticas até à colonização completa do substrato (EIRA, 2000).

Em substratos esterilizados não compostados, o cultivo de cogumelos foi inicialmente desenvolvido no Instituto Max Planck de Hamburgo, Alemanha no ano de 1970. O principal objetivo destas pesquisas foi reduzir no cultivo de cogumelo, as incertezas e riscos do processo de compostagem, proporcionando um substrato nutritivo e que ao mesmo tempo impedisse a ação dos microrganismos competidores, já que termófilos haviam sido inoculados na busca de obter a seletividade do substrato de crescimento com uso de tecnologias alternativas (MOLENA, 1986).

A produção em substratos esterilizados e não compostados, como alternativa aos sistemas tradicionais, requer maiores investimentos iniciais, mas em médio prazo, a tecnologia torna-se mais compensadora economicamente, pois exige menos mão-de-obra, o produtor verticaliza sua produção e pode aumentar a produtividade pela possibilidade de suplementação do substrato. Além dessas vantagens, esta técnica de produção pode ser usada para cultivo de outras espécies de fungos (SÀNCHEZ-VÁSQUEZ, 1999).

Eira (2003) relata que em sistemas axênicos, existe o potencial para o uso de uma relação C/N entre 15 e 25/1, visando obter-se maior produtividade, fato que permite a diminuição dos custos elevados, resultantes do processo de esterilização. Sánchez-Vásquez (1999) obteve 48,64% de eficiência biológica (EB=peso fresco de cogumelos/peso seco de substrato) para *A. blazei* Murrill em substrato esterilizado,

com relação C/N de 37/1, semelhante àquela obtida no sistema tradicional, onde se utiliza composto.

No entanto, sistemas axênicos não apresentam seletividade semelhante aquela proporcionada pelo processo de compostagem, pois nos substratos para cultivo axênico, existem nutrientes de pronta assimilação disponíveis no substrato, podendo assim favorecer o crescimento de organismos competidores.

A fim de minimizar riscos, a mão-de-obra a ser utilizada em sistemas axênicos deve ser especializada, uma vez que a manipulação deverá ser realizada em condições axênicas. Esses procedimentos demandam conhecimentos especializados, principalmente na área de microbiologia, onerando ainda mais o processo.

3.4 Alternativas para o cultivo de cogumelos em Santa Catarina

Os substratos e as formulações utilizados para o cultivo de cogumelos variam em função do local onde o cultivo está estabelecido. Santa Catarina tem potencial para a produção de cogumelos, pois apresenta uma atividade agrícola diversificada, cujos resíduos podem ser aplicáveis tanto em cultivo tradicional quanto axênico, bem como dispõe de condições climáticas adequadas, possibilitando a diversificação de espécies cultivadas e opções de investimento, que são estimuladas através de parcerias inter-institucionais, que dão suporte técnico aos produtores e promovem a atividade no estado.

A utilização de resíduos da produção de palmito a partir da espécie exótica popularmente conhecida como palmeira-real-australiana (*Archontophoenix alexandrae* Mart.), é uma opção promissora, já que mais de 60% do palmito

produzido em Santa Catarina é desta espécie e 80% da planta colhida é descartada, tornando-se um resíduo abundante (<http://www.an.com.br>).

O interesse na produção de palmeira-real surgiu pela rápida velocidade de crescimento desta planta em relação à espécie nativa (*Euterpe edulis* Mart.), e visando ainda a redução do extrativismo no estado. Enquanto a palmeira-real demora de dois a três anos para produzir um quilo de palmito, o palmito nativo requer de sete a oito anos para estar apto ao corte (<http://www.an.com.br>).

A palmeira-real (*A. alexandrae*) vem sendo amplamente cultivada nos trópicos e subtropicais como planta ornamental. No estado, plantações de palmeira-real-da-austrália podem ser encontradas em Florianópolis, Sombrio, Praia Grande, Camboriú e na região do Vale do Itajaí.

As folhas de palmeira-real retiradas para o corte e colheita do palmito mostraram-se potencialmente utilizáveis como substrato para produção de cogumelos em sistema axênico, proporcionando principalmente boa estrutura ao substrato, além de características físico-químicas adequadas, pois em experimentos preliminares utilizando tal material durante o cultivo de *A. brasiliensis* em sistema axênico, se obteve 48% de eficiência biológica (dados não mostrados) e as bainhas medianas das folhas mostraram-se aptas para o cultivo de shiitake (*Lentinula edodes* (Beck.) Pegler) no mesmo sistema (TONINI, 2004).

Os resíduos de bananeira também apresentam características químico-físicas e estruturais adequadas à utilização para cultivo de cogumelos. Segundo Sturion (1994) esses resíduos representam uma proporção equivalente a 40% do peso do fruto e as folhas 15% da planta completa, estimando-se a quantidade de resíduo de bananeira, em Santa Catarina, em torno de 200 mil toneladas/ano.

A palha de arroz também é significativa no estado de Santa Catarina, principalmente por sua área plantada, em torno de 113.256 hectares (AGENDA 21, 1997) e pode proporcionar ao agricultor, renda nos meses de entre safra, já que após a colheita dos grãos, sua composição chega a 40-50% de celulose e hemicelulose, 10-20% de lignina e 0,5-0,7% de nitrogênio (KAKEZAWA et al. 1990). Além de ser um dos resíduos mais utilizados no mundo para a produção de *Agaricus*, pode também ser utilizado para o cultivo de diversas espécies do gênero *Pleurotus*.

Outro material disponível no estado de Santa Catarina é a serragem, principalmente de espécies de *Eucalyptus*, atualmente utilizada como parte integrante dos substratos para cultivo de *Lentinula edodes* e de espécies de *Pleurotus* (CAMPBELL & SLEE, 1987), assim como para *Agaricus* em sistema axênico (SÀNCHEZ-VÁSQUEZ, 1999). Sua disponibilidade ocorre em função de representar 8% do material processado (800.000 m³ de toras/ano em SC) e da existência de aproximadamente 4 mil indústrias madeireiras no estado, principalmente na região serrana.

Os produtores de *Agaricus*, no entanto, não consideram a questão da disponibilidade regional de resíduos utilizando formulações, substratos e tratamentos típicos de regiões temperadas, fato que ocorre devido à escassez de informações técnico-científicas sobre a possibilidade de utilização de novas fórmulas, bem como técnicas de produção alternativas para o cultivo de cogumelos, viabilizando a utilização de resíduos locais.

3.5 Capacidade degradativa dos basidiomicetos

Fungos da podridão branca, conhecidos como “White-rot”, degradam todas as estruturas das paredes celulares vegetais, diferindo a velocidade com que cada um destes constituintes é degradado, ao contrário dos fungos da podridão castanha ou “Brown-rot”, que degradam seletivamente os carboidratos, com limitada degradação da lignina, que resta em grandes quantidades nos substratos colonizados por estes fungos (PANDEY & PITMAN, 2003).

Os organismos pertencentes à classe dos basidiomicetos, como *A. brasiliensis*, de forma geral, possuem um complexo enzimático formado por celulasas, ligninases, peroxidases, proteases, fenol oxidases dentre outras enzimas, capazes de degradar os componentes recalcitrantes e utilizar as fontes de carbono destes constituintes (BUSWELL et al. 1996).

Tanto a celulose como a lignina, apresentam carbono como base de suas estruturas moleculares, tornando-os desta forma, importantes no ciclo deste elemento. A lignina, juntamente com a hemicelulose, envolve as fibras celulósicas tornando-se uma barreira física à degradação da celulose. A solubilização da lignina pode ocorrer, primariamente, para permitir acesso aos carboidratos, já que não serve como fonte de energia e exige um investimento energético substancial, em função da lignina apresentar-se associada aos polissacarídeos e provavelmente ligada covalentemente a hemicelulose (BUSWELL et al. 1996).

Em função da variabilidade estrutural destes elementos, a velocidade de degradação na natureza também varia. A hemicelulose, camada intermediária entre a lignina e celulose, é degradada em tempos menores, em torno de dois anos. Já a celulose é degradada em tempos maiores, em torno de três anos e meio. No entanto, a lignina é o componente que apresenta tempo de degradação mais

elevado, em torno de sete anos, em função de sua estrutura tridimensional, onde não ocorrem ligações repetidas na construção deste heteropolissacarídeo de fenilpropano (BUSWELL et al. 1993, 1996).

A lignina é um constituinte recalcitrante que limita os sítios de ataque da celulose, e apesar de seu elevado potencial calórico, não se conhece qualquer organismo capaz de utilizá-la como única fonte de energia, o que resulta na sua acumulação na natureza (RAJARATHNAM et al. 1992 *apud* SANTOS, 2000).

Desta forma, a utilização dos polissacarídeos presentes nos resíduos lignocelulósicos, torna-se limitada pela presença de elevadas quantidades de lignina (KEREM & HADAR, 1993). Entre as enzimas oxidativas que atuam na degradação da lignina fenólica e não fenólica estão a lacase (Lac), a lignina peroxidase (LiP) e a manganês peroxidase (MnP). Ao contrário das enzimas hidrolíticas, que atuam separando a celulose em monômeros de glicose, as enzimas oxidativas agem formando radicais que irão desestabilizar a molécula da lignina (BUSWELL et al. 1993, 1996).

As enzimas oxidativas atuam retirando os grupos metoxila da lignina e fazendo a ruptura das ligações éter, liberando substâncias mais solúveis e expondo as cadeias restantes à ação das demais enzimas (BUSWELL et al. 1996).

A produção destas enzimas pelo micélio fúngico é atividade crucial durante o processo de colonização e importante determinante no rendimento em cogumelos (BUSWELL et al. 1996).

Os basidiomicetos são os fungos mais aptos à degradação da lignina, portanto, são capazes de utilizar o carbono da lignocelulose, no entanto, para essa utilização existe certa demanda energética, que pode ser responsável pela ativação do metabolismo secundário nestes fungos, ou seja, produção de enzimas oxidativas

em função de um ambiente desfavorável ao crescimento, ou limitação de fontes de carbono (KEREM et al. 1992).

A lacase pode participar na degradação da lignina, através da oxidação de grupamentos fenólicos, no entanto, isso pode implicar em um papel limitado desta enzima nesta função, já que as subunidades fenólicas constituem uma pequena porção deste polímero (BONNEN et al. 1994).

O papel da lacase na degradação da lignina ainda é pouco conhecido. Atribui-se a lacase o papel de detoxificação de alguns monômeros fenólicos de baixo peso molecular, originados da degradação da lignina e que podem inibir o crescimento de fungos (CAI et al. 1998). Sendo assim, fungos que produzem enzimas oxidativas, como a lacase, exibem vantagens ambientais em relação aos fungos estritamente celulolíticos, como *Volvariella volvacea* (BOLLAG et al. 1988 *apud* CAI et al. 1998).

A manganês peroxidase (MnP), por sua vez, atua mediando estágios iniciais de degradação da lignina de alto peso molecular, transformando o Mn (II) em Mn (III), o qual pode atuar diretamente na oxidação de grupamentos fenólicos ou em outros compostos, já que o inespecífico (HATAKKA, 1994).

Desde a década de 80, quando foram descobertas MnP e LiP peroxidases, determinados grupos de fungos, principalmente os decompositores, puderam ser classificados de acordo com sua produção enzimática: aqueles que produzem LiP – MnP, MnP – Lac e LiP – Lac, entretanto algumas exceções ocorrem (HATAKKA, 1994).

Diversos fungos eficientes na degradação da lignina na natureza aparentemente não produzem LiP, no entanto, esta enzima é apontada como responsável pela oxidação da lignina fenólica (HATAKKA, 1994). *A. brunnescens* é

um fungo degradador de lignina, no entanto, não foi detectada atividade da LiP, quando foi utilizado o álcool veratrílico como substrato enzimático, método padrão para avaliar a atividade dessa enzima (BONNEN et al. 1994).

3.5.1 Utilização dos polissacarídeos

A eficiente utilização da celulose por fungos degradadores, requer ação cooperativa de várias enzimas hidrolíticas, que atuam na hidrólise dos polissacarídeos em monômeros passíveis de absorção. As enzimas responsáveis por esse processo são celulasas, endo e exoglucanases, β -glicosidase e celobiohidrolase, que degrada a celobiose, um dos produtos da hidrólise da celulose e inibidor da celulase (CAI et al. 1998, 1999; DING et al. 2001).

A celulose é o composto orgânico mais abundante na natureza e o polissacarídeo predominante nos resíduos vegetais, representando de 30 a 60% do seu peso seco total e, portanto, deve ser utilizada com maior eficiência, tendo em vista o aumento na demanda de alimentos, resultante do incremento populacional mundial (REID, 1989).

Os fungos decompositores utilizam eficientemente a celulose como fonte de carbono, mobilizado-a principalmente para a produção de corpos de frutificação, como no caso de *A. brunnescens* (WOOD & GOODENOUGH, 1977) e *Pleurotus* spp. (VELÁZQUEZ-CEDEÑO et al. 2002).

Análises químicas em composto para o cultivo de *A. brunnescens*, após aplicação da camada de cobertura do substrato para induzir frutificação, evidenciaram a degradação preferencial de celulose e hemicelulose para frutificação, com incremento na produção de endoglucanase e redução na atividade lignolítica.

Entretanto, a lignina foi degradada preferencialmente antes da cobertura do substrato (DURRANT et al. 1990; WOOD & GOODENOUGH, 1977).

A hemicelulose, chega a representar 40% do peso seco de resíduos lignocelulósicos e sua degradação é realizada por hemicelulases como a xilanase, que hidrolisa este heteropolissacarídeo de cadeias curtas ramificadas, compostas de hexoses, pentoses, ácido urônico e açúcares menores.

A retirada de carbono através da atividade de xilanase em *A. brunnescens* não foi relacionada com a mobilização deste para a frutificação (WOOD & GOODENOUGH, 1977), podendo, portanto, ser fonte de carbono para crescimento vegetativo.

Outras enzimas hidrolíticas como a α -glicosidase são extensivamente estudadas por seu potencial de conversão da celulose em glicose em escala industrial, bem como por sua atuação em uma grande gama de fontes de carbono (CAI et al. 1998), embora seu papel na mobilização de carbono para frutificação seja desconhecido e no que se refere ao gênero tenha sido pouco estudada.

Levando-se em conta que, a produção de cogumelos e o índice de conversão dependem primariamente da eficiente colonização do substrato e sua degradação pelo micélio, através do "pool" enzimático fúngico (SAVOIE et al. 1996), assume-se que, a expressão e a atividade enzimática variam, sobretudo em função da espécie de fungo utilizada, disponibilidade de material celulósico no substrato, presença em maior ou menor quantidade de constituintes recalcitrantes, bem como com o tratamento térmico do substrato e as condições ambientais de crescimento, fatores que influenciam diretamente no rendimento das frutificações (VELÁZQUEZ-CEDEÑO et al. 2002).

3.5.2 Estudos de dinâmica de degradação do substrato

Um dos fatores mais relevante para a degradação dos componentes de um substrato lignocelulósico é a produção de enzimas extracelulares pelo micélio, para nutrir o fungo durante as fases vegetativa e reprodutiva (VELÁZQUEZ-CEDEÑO et al. 2002) e as variações na atividade enzimática relacionadas com a presença em maiores ou menores quantidades de substâncias indutoras ou inibidoras no substrato (BUSWELL et al. 1993).

Substratos utilizados para cultivo, se estiverem nutricionalmente desbalanceados, promovem alterações metabólicas nos fungos, podendo reduzir a degradação lignocelulósica. O excesso de carbono no meio reprime a degradação da lignina pelas enzimas oxidativas, já que resultam do metabolismo secundário dos fungos. Por outro lado, elevadas concentrações de nitrogênio não decresceram a taxa de degradação da lignina em *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes* (HATAKKA, 1994), mas podem impedir o crescimento do fungo de interesse pelo surgimento de organismos competidores contaminantes.

Portanto, além de favorecer a produtividade, substratos com formulações balanceadas permitem que o fungo atue de forma a obter os nutrientes necessários no momento adequado, ou seja, a degradação da lignocelulose ocorre em função do tempo de incubação, ou seja, em cada estágio de desenvolvimento do ciclo de cultivo.

No caso de *Pleurotus* sp. o decréscimo da atividade da lacase e da Mn Peroxidase é concomitante com o desenvolvimento das frutificações e com o incremento na atividade da celulase. Adicionalmente, a relação entre as atividades de lacase e celulase inverte-se após a colheita e retorna a essa condição com o surgimento de novas frutificações (VELÁZQUEZ-CEDEÑO et al. 2002).

No cultivo de *A. brunnescens*, a atividade de lacase é elevada durante a formação dos primórdios, havendo neste período a redução no conteúdo de lignina. No entanto, sua atividade decresce rapidamente, com a formação do agregado de hifas, que se diferenciara para originar os primórdios dos cogumelos. O pico de atividade da celulase ocorre durante o desenvolvimento dos corpos de frutificação, situação característica para diversas espécies de fungos cultivados (KÜES & LIU, 2000; BONNEN et al. 1994).

Assim como definir a dinâmica da atividade enzimática, responsável pelas alterações no substrato, o estudo das próprias alterações, por diferentes metodologias, fornece informações complementares sobre o real consumo de nutrientes e sobre a atividade degradativa.

Diferentes métodos de análise tem sido utilizados para monitorar a degradação lignocelulósica por fungos. Métodos tradicionais, como dosagens químicas estão sendo complementadas e/ou substituídas por procedimentos menos onerosos, que utilizam menores quantidades de amostra e produzem resultados em um menor espaço de tempo (PANDEY & PITMAN, 2003; YANG et al. 1993). Metodologias químicas como a determinação da lignina através da metodologia Klason, são comuns para se avaliar a concentração de lignina presente no substrato (TUOMELA, 2000).

Yang et al. (1993), verificaram a utilização lignocelulósica por *Pholiota nameko* através de metodologia química, isolando a lignina e dosando carboidratos, fazendo uma relação entre a redução no peso do substrato, associado à biomassa reprodutiva e conseqüente uso na respiração. Neste estudo foi verificado que a degradação da lignina e da hemicelulose foi mais rápida do que a celulose durante o crescimento micelial ao final de 199 dias, mas durante os últimos 30 dias, entre os

200 e 230 dias, a celulose foi consumida mais rapidamente. Este pico de produção da celulase correspondeu ao período de formação e desenvolvimento dos corpos de frutificação. Neste ponto, a lignina e a hemicelulose, já haviam sido reduzidas em torno de 80%.

Metodologias alternativas, aos métodos tradicionais químicos, podem ser utilizadas na avaliação da degradação de substratos lignocelulósicos. Análises utilizando espectroscopia de infravermelho são realizadas rotineiramente para estudo da lignina (FAIX, 1986), através da utilização do espectrômetro funcionando no modo Fourier transform, conhecido por FTIR (CHEN, 2000).

A espectroscopia de infravermelho fornece informações sobre a presença ou ausência de grupos funcionais em diversos materiais orgânicos e inorgânicos, bem como sua estrutura química. As mudanças na intensidade relativa das bandas espectrais indicam alterações na estrutura química do substrato (www.micromemanalytical.com).

Utilizando FTIR, Chen et al. (2000) observaram alterações em composto durante crescimento de *Agaricus brunnescens*, encontrando uma similaridade entre os espectros do período de inoculação e cobertura do substrato. Entretanto, maiores alterações ocorreram durante a frutificação, quando houve redução nos picos de polissacarídeos ($1000 - 1100 \text{ cm}^{-1}$), incremento nos níveis de estruturas aromáticas resultantes dos processos de oxidação (1650 cm^{-1}) e íons COO^- (1325 cm^{-1}), provavelmente ligados à oxidação das cadeias laterais da lignina, comportamento clássico de degradação lignocelulósica.

Diversos trabalhos têm descrito mudanças qualitativas em espectros de FTIR em materiais expostos à degradação por longos períodos de tempo, entretanto, informações sobre mudanças relativas na composição de lignina/carboidratos de

madeira, bem como de outros materiais expostos por curtos períodos de degradação são escassos (PANDEY & PITMAN, 2003).

4. Capítulo II – Perfil e atividade enzimática lignocelulolítica e produção de biomassa durante o crescimento vegetativo de *Agaricus brasiliensis* em dois sistemas de cultivo: tradicional e axênico

Resumo

O uso de substratos lignocelulósicos por determinados grupos de fungos depende de sua capacidade em produzir enzimas hidrolíticas e oxidativas, liberá-las para o meio extracelular e utilizar os nutrientes fundamentais para o crescimento vegetativo e reprodutivo. Assim, o perfil enzimático, a dinâmica da atividade enzimática e a correspondente produção de biomassa vegetativa, podem fornecer importantes informações sobre a eficiência na utilização destes substratos. Definiu-se o perfil e avaliou-se a atividade enzimática de *Agaricus brasiliensis* em cultivo tradicional e axênico, bem como a produção de massa miceliana. *A. brasiliensis* produziu diversas enzimas como lacase, manganês peroxidase, β -glicosidase e xilanase. Não foi detectada atividade de lignina peroxidase e celulase (FPA). A atividade de lacase foi mais elevada quando comparada a Mn peroxidase, principalmente em cultivo axênico. A enzima xilanase apresentou níveis mais elevados de atividade em substrato compostado. A formação de maior massa miceliana em cultivo tradicional, do que cultivo axênico indica maior velocidade do fungo em crescer em substratos degradados, com diferenças significativas na formação de biomassa, em ambos os substratos, a partir do 16º dia de crescimento. A atividade de lacase bem como a biossíntese de proteínas apresentaram correlação com a biomassa vegetativa em substrato compostado, de acordo com *A. brunnescens*. *A. brasiliensis* pode crescer nos dois tipos de substratos, com diferenças na utilização dos componentes lignocelulósicos, em relação à degradação e bioconversão.

Palavras-chave: ergosterol, *Agaricus brasiliensis*, enzimas, lacase, crescimento vegetativo

4.1 INTRODUÇÃO

A maioria dos basidiomicetos, que são cultivados comercialmente, convertem resíduos lignocelulósicos em cogumelos, que podem ser utilizados para consumo humano, sendo que o substrato residual por sua vez, pode servir como alimento para animais e para biorremediação ambiental (LAW et al. 2003; VILLAS-BÔAS et al. 2002).

O cultivo de cogumelos é uma das estratégias mais eficientes na utilização de resíduos agro-industriais e os transforma em produtos nutracêuticos e nutricêuticos de elevado valor agregado. Porém, a eficiente utilização de um substrato lignocelulósico, está diretamente relacionada à capacidade destes organismos para metabolizar o material e produzir corpos de frutificação.

O uso de substratos lignocelulósicos como fonte de carbono para a conversão em frutificações, depende da capacidade do fungo em produzir enzimas hidrolíticas e oxidativas e as liberar no meio extracelular, assim como produzir biomassa vegetativa competitiva, pois o sucesso da colonização de um substrato, pode ser determinado pela capacidade competitiva e pelo potencial de inóculo em relação ao potencial de inóculo dos competidores (BUSWELL et al. 1996; SAVOIE et al. 1996).

O rápido crescimento vegetativo reduz a incidência de doenças no cultivo, tornando o fungo mais apto à competição e à alocação de recursos, através de enzimas apropriadas, principalmente em composto, onde através da pasteurização, ocorre apenas uma redução parcial da microbiota total. Esta estratégia de produção do composto é atualmente usada no cultivo de *Agaricus brunnescens* Peck [=

Agaricus bisporus (Lange) Imbach] e também no cultivo de *A. brasiliensis* S. Wasser et al. (2002) = (*A. blazei* Murrill ss. Heinemann).

Tanto o crescimento vegetativo quanto o reprodutivo dependem primariamente da degradação dos componentes principais do material lignocelulósico, ou seja, lignina, celulose e hemicelulose. Entretanto, a utilização das fontes de carbono destes materiais (celulose e hemicelulose) depende da degradação e ou modificação do material recalcitrante externo, a lignina.

Alguns basidiomicetos como os *Agaricus* possuem enzimas oxidativas que atuam na biodegradação ou biotransformação da lignina, no entanto, a regulação da produção enzimática bem como o exato papel destas enzimas durante o ciclo de cultivo dos fungos encontra-se ainda não esclarecido. Fungos como *Ceriporiopsis subvermispora* produzem Lacase e MnP (manganês peroxidase) e apresentam genes para produção de LiP (lignina peroxidase), no entanto, a atividade desta enzima ainda não foi detectada (RÜTTIMANN et al. 1993).

Com base nos tipos de enzimas oxidativas produzidas, os fungos podem ser classificados em três grupos: a) produtores de LiP e MnP como *Phanerochaete chrysosporium*, b) produtores de MnP e Lac (lacase) como *A. brunnescens* e c) produtores de LiP e Lac como *Phlebia ochraceofulva* entretanto, exceções ocorrem. Recentemente um novo grupo representado por espécies de *Pleurotus* spp. foi identificado como produtor de lacase e AAO (aryl alcohol oxidase) (HATAKKA, 1994).

Em experimento usando lignina sintética como substrato, Hatakka (1994) verificou que os fungos pertencentes ao grupo a) produtores de LiP e MnP, foram os mais eficientes na degradação. Por outro lado, fungos que produzem Lacase e MnP, como no caso dos *Agaricus*, apresentaram de moderados a bons níveis de

degradação de lignina sintética através dessas enzimas. No caso de *Rigidiporus lignosus* essas enzimas atuam de forma sinérgica durante a degradação da lignina (GALLIANO et al. 1991; HATAKKA, 1994).

Elevados níveis de atividade de lacase, seguido de MnP foram observados durante o crescimento vegetativo de *A. brunnescens* em composto comercial, sendo que a lignina foi degradada preferencialmente durante esta fase (DURRANT et al. 1991). Entretanto, quando a cobertura do substrato foi adicionada para indução das frutificações, foram observadas mudanças no nível de atividade destas enzimas, sendo que ocorreu uma redução na atividade lignolítica seguido de um aumento subsequente na atividade celulolítica (WOOD & GOODENOUGH, 1977).

A lacase é a proteína extracelular predominantemente produzida por *A. brunnescens*, e tem sido utilizada como marcador indireto de biomassa, sendo que quando níveis baixos de atividade são detectados, baixa quantidade de biomassa é produzida (BONNEN et al. 1994; MATCHAM et al. 1985; WOOD & GOODENOUGH, 1977).

A quantidade de biomassa total produzida reflete a capacidade do fungo em utilizar as fontes de carbono, bem como o gasto energético para acessá-lo. Para monitoramento do crescimento vegetativo de fungos que crescem em substratos sólidos, podem ser utilizados outros marcadores específicos como elementos estruturais ou indiretos como as proteínas extracelulares (MATCHAM et al. 1985). Entre os marcadores constituintes, o ergosterol é considerado o mais sensível, uma vez que é o esteroide predominante após duas semanas de cultivo de *A. blazei* (HIROTANI et al. 2002).

A atividade enzimática e a produção de biomassa podem variar em função do substrato de crescimento e também em função do tratamento que este material

recebeu antes do crescimento do fungo. Substratos lignocelulósicos compostados são pré-degradados e sofrem uma série de reações de transformação que afetam a forma e a disponibilidade de recursos nutricionais (GERRITS, 1988). Por outro lado, substratos axênicos não são submetidos a tratamentos prévios de degradação, e por isso, a lignocelulose mantém sua estrutura íntegra, o que pode acarretar alterações na dinâmica da produção enzimática do fungo nessas condições.

Em função de seu perfil enzimático pode-se estabelecer uma relação com a capacidade do fungo para crescer nesses substratos. Por exemplo, fungos que não produzem enzimas oxidativas podem ter desvantagens ambientais em relação aos que produzem essas enzimas, pois o incremento na biomassa vegetativa, indica o aumento na taxa de degradação e conseqüentemente acarreta na produção de subprodutos auto-inibitórios, como os fenóis, que também são substratos para as oxidases, principalmente para a lacase (BOLLAG et al. 1984).

Durante o ciclo de vida destes fungos, não só as enzimas oxidativas são fundamentais, mas também as enzimas hidrolíticas, que são responsáveis pela mobilização do carbono, são reguladas em função do estágio de desenvolvimento do fungo. Estirpes de *A. brunnescens* modificadas geneticamente para não frutificarem não demonstraram incremento na produção das enzimas hidrolíticas ao longo de 60 dias, sob condições de cultivo. Entretanto, nas estirpes não modificadas, o incremento da atividade de celulase e endoglucanase indicou que as fontes de carbono foram mobilizadas por ação destas enzimas. Sendo assim, as hidrolases são necessárias para a mobilização do carbono requerido para a formação dos corpos de frutificação, que ocorrem após aplicação da camada de cobertura do substrato. Por outro lado, a enzima xilanase, que atua sobre a hemicelulose, não apresentou correspondência com a frutificação, podendo ser responsável pela

mobilização do carbono durante o crescimento vegetativo (WOOD & GOODENOUGH, 1977).

A atividade enzimática pode ser variável em função da composição do substrato de crescimento, pois a presença de substâncias indutoras ou inibitórias, bem como o estágio de degradação inicial, podem ser fatores determinantes em seu nível de atividade. Substratos compostados têm sido usados nas últimas décadas para o cultivo de *Agaricus*, no entanto, o preparo deste tipo de substrato, apesar de amplamente utilizado, é uma atividade complexa e algumas de suas etapas ainda não estão completamente compreendidas. No Brasil, substratos comerciais, compostados e pasteurizados, usados para cultivo de *Agaricus* apresentam formulações diferentes, de acordo com a região, sendo que, aqueles produzidos para o cultivo de champignon e utilizados para *A. brasiliensis*, muitas vezes não tem qualidade. Neste contexto, a produtividade de *A. brasiliensis* que freqüentemente partilha do mesmo tipo de substrato, raramente excede 15% (de cogumelos frescos/ substrato úmido) em substratos compostados com relação C/N de 20/1 e N total de 1,8%, ao contrário de *A. brunnescens* que comumente atinge 25% de produtividade (cogumelo fresco / substrato úmido) (FERREIRA, 1998).

Se for comparado o conteúdo de nitrogênio nos corpos de frutificação de *A. brunnescens* e *A. brasiliensis*, verifica-se que este valor é marcadamente diferente e, portanto, torna-se importante prover, em cada substrato, a quantidade correta de nitrogênio requerida para cada espécie, devendo-se desvincular a preparação de seus substratos de cultivo, definindo-se, portanto, substratos e formulações específicas e capazes de promover maiores produtividades de *A. brasiliensis*.

A diferença na composição química das frutificações desses fungos, nos substratos para produção e nas condições ambientais requeridas, levam a investigar

o potencial de *A. brasiliensis* para produzir enzimas e biomassa vegetativa em substrato compostado tradicional e em substrato axênico como alternativa para se obterem frutificações. *A. blazei* Murrill quando cultivado em substrato axênico não compostado produziu frutificações com 43,6% de eficiência biológica (SÀNCHEZ-VÁSQUEZ, 1999), em metodologia adaptada de Till (1962). Substratos não compostados, são uma alternativa para uso de resíduos lignocelulósicos, na busca de eliminar a complexidade do processo de compostagem, sendo ainda uma tecnologia de produção comum a outras espécies, como no caso de *Pleurotus* spp. e *Lentinula edodes*. Este aspecto poderá viabilizar o cultivo axênico de *A. brasiliensis* no caso de empresas que disponham de infra-estrutura adequada para este cultivo e o de outras espécies.

Foram os objetivos deste trabalho:

- Avaliar a produção de algumas enzimas lignocelulósicas e a dinâmica enzimática na degradação de substratos compostados e não compostados;
- Avaliar a produção de biomassa vegetativa produzida por *A. brasiliensis* em substrato compostado e não compostado, durante 35 dias de crescimento;
- Identificar possíveis marcadores indiretos (lacase e proteínas totais) para monitoramento da biomassa vegetativa;

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Fungo: A estirpe usada foi depositada na coleção de fungos do Laboratório de Cogumelos Comestíveis e Medicinais da UFSC, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, sob código UFSC-51 e identificada como *Agaricus brasiliensis* = (*Agaricus blazei* Murrill ss. Heinemann), após estudos taxonômicos, genéticos e ecológicos por Neves (2000). Essa estirpe vem sendo utilizada em cultivo comercial por diversos produtores nos estados do sul do Brasil.

Semente-inóculo: A estirpe UFSC-51 foi cultivada em placas de Petri em meio MLA (30g extrato de Malte, 5g extrato de Levedura e 20g Ágar/L) a $26\pm 1^\circ\text{C}$. Após 10 dias, $\frac{1}{2}$ de cada placa de ágar colonizada pelo fungo foi transferida para vidros com tampa de rosca de 1000mL contendo 350 g de grãos de trigo cozidos e esterilizados em autoclave a 121°C sob pressão de $1,3\text{Kg/cm}^2$, durante 1 hora, e incubados para crescimento miceliano durante 20 dias a $21\pm 2^\circ\text{C}$. Ao final deste período, a semente apresentou-se completamente colonizada pelo fungo sendo utilizada para inoculação dos substratos.

Preparação do substrato e inoculação: O substrato compostado foi produzido em usina de compostagem comercial, em São José dos Pinhais, PR - Brasil e sua formulação baseou-se em palha e sabugo de milho, palha de diversas gramíneas, esterco de galinha, uréia e gesso, com C/N final (relação carbono / nitrogênio) cerca de 20/1 e pH inicial de 7,3. O substrato não compostado foi preparado usando a formulação seguinte (p/p): 50% de folha de palmeira-real (*Archontophoenix alexandrae* Mart.), 25% de serragem de *Eucalyptus sp.*, 12% de farelo de trigo, 8% CaCO_3 , 5% CaSO_4 , com relação C/N de 25/1 e pH inicial de 6,9 (tabela 1). Os substratos foram acondicionados em sacos transparentes de

polipropileno medindo 45x20 cm, específicos para cultivo de cogumelos, com filtros para permitir trocas de ar. Foram preparados 20 sacos para cada um dos dois tratamentos, contendo 2 kg de substrato com 67% de umidade (avaliada pela diferença entre o peso inicial e peso final a 65°C, até peso constante). Ambos os substratos foram esterilizados simultaneamente em autoclave a 121°C, sob pressão de 1,3Kg/cm², durante 1 hora a fim de eliminar microrganismos celulolíticos, que pudessem causar interferências nas avaliações enzimáticas, particularmente no substrato compostado. Os substratos foram inoculados, em mistura, sob condições assépticas em cabine de fluxo laminar com 1,5% (p/p) de semente-inóculo. Os vinte sacos (unidades amostrais) por tratamento foram dispostos sobre bancadas em casa de cultivo. O delineamento foi casualizado e os sacos foram incubados a 25±4°C com umidade relativa de 73±5% durante 35 dias.

Tabela 1- Formulações dos substratos compostado e não compostado utilizado para o crescimento vegetativo de *A. brasiliensis* durante 35 dias

Ingredientes (A) Compostado	Quantidades	Ingredientes (B) Não compostado	Quantidades % (Kg)
Palha e sabugo de milho	2,000 ton.	Folha de palmeira	50 (7)
Capins diversos	4,000 ton.	Serragem	25 (3,5)
Esterco de Frango	2,900 ton.	Farelo de trigo	12 (1,7)
Farelo de Soja	250 kg	CaCo ₃	8 (1,4)
Nitrato de Amônia	50 kg	Gesso	5 (0,7)
Uréia	50 kg		
Gesso	400 kg		

Amostragem: A cada 7 dias foram sorteados 3 sacos de cada tratamento (análise em triplicata). Quatro subamostras foram retiradas longitudinalmente de cada saco de cultivo (unidade amostral), usando-se um tubo com extremidade cortante, de dimensões 30x3,5 cm que em seguida foram misturadas. As amostras foram pesadas e 3g de cada unidade amostral destinaram-se ao estudo enzimático imediatamente após a amostragem; o restante foi seco a 55°C por 72 horas. Deste

restante, 1g de cada unidade amostral, previamente homogeneizada, foi destinado às análises de biomassa (ergosterol) nos tempos 1, 3 e 6 (dias zero, quatorze e trinta e cinco, respectivamente).

4.2.1. Avaliação do perfil e da atividade enzimática

A cada 3g de substrato fresco por unidade amostral, foram adicionados 30 μ L de triton X100 e 30mL de água ultrapura. O material foi macerado, filtrado e centrifugado a 9.000g durante 15 minutos a 4°C, sendo que o sobrenadante foi usado imediatamente para os ensaios enzimáticos. Os procedimentos de avaliação da atividade enzimática foram os seguintes para cada enzima:

Manganês peroxidase: a atividade de manganês peroxidase (MnP, EC 1.11.1.13) foi medida usando-se vermelho de fenol como substrato a 610 μ m ($\epsilon_{610} = 4460 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), de acordo com metodologia de Kuwahara et al. (1984). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 mmol (milimolar) de substrato por minuto. Uma amostra sem manganês foi efetuada para demonstrar a dependência deste elemento.

Lignina peroxidase: a atividade de lignina peroxidase (LiP, EC 1.11.1.14) foi determinada monitorando-se a oxidação do álcool veratrílico para veratraldeído a 37°C, indicado por um aumento na absorvância a 310 μ m ($\epsilon_{310} = 9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) segundo a metodologia de Tien e Kirk (1984). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 mmol de substrato por minuto.

Lacase: A atividade da lacase (EC 1.10.3.2) foi monitorada em 525 μ m ($\epsilon_{525} = 65000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) através da oxidação da siringaldazina. Uma unidade de

atividade enzimática foi definida como a quantidade da enzima que oxidou 1 mmol de substrato por minuto.

Celulase: A atividade da celulase em fibra de papel (FPase) (EC 3.2.1.4) foi determinada pela hidrólise de papel Whatman N°1, segundo a metodologia de Mandels et al. (1976). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade da enzima capaz de catalisar a liberação de 1 mmol de glicose por minuto a 50°C. A curva padrão foi obtida com o uso de glicose em diferentes concentrações.

β -glicosidase: A atividade de β -glicosidase foi efetuada monitorando-se a liberação de p-nitrofenil a partir de p-nitrophenil- β -D-glucopiranosídeo a 410 nm ($\epsilon_{410} = 18,5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Xilanase: a atividade da xilanase (EC 3.2.1.8/EC 3.2.1.32/EC 3.2.1.136) foi determinada medindo-se a quantidade de açúcares reduzidos, liberados a partir de xilana em tampão acetato 2%, usando-se o método descrito por Bailey et al. (1992). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a liberação de 1 mmol de xilose por minuto a 50°C. A curva padrão foi obtida usando-se xilose em diferentes concentrações.

Os açúcares totais reduzidos através da ação enzimática foram determinados usando-se o método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (MILLER, 1959).

4.2.2 Avaliação da biomassa vegetativa (Ergosterol e proteínas totais)

O conteúdo de ergosterol foi avaliado usando-se o método descrito por Barajas-Aceves et al. (2002) com modificações. Os substratos secos foram pesados (1,0g) em tubos de centrífuga, adicionado metanol (10mL), misturado em vórtex durante 1 min e ultrassonicado por 3 min em água gelada. Os tubos foram mantidos no gelo durante 15 min e finalmente centrifugados a 12000 rpm, durante 15 minutos, a 4°C.

O precipitado de biomassa foi lavado três vezes com 10mL de metanol. Os sobrenadantes foram transferidos para frascos de 200mL com tampa de rosca. Em seguida foi adicionado etanol absoluto (5mL) juntamente com 2g de KOH como saponificante. Os extratos em metanol foram saponificados sob refluxo, em banho-maria a 80°C, durante 1 hora. Após resfriamento, hexano (10mL) foi acrescentado à mistura sendo os frascos em seguida fechados e agitados vigorosamente.

Duas fases foram obtidas e separadas em um funil de separação. A fase alcoólica foi lavada duas vezes com 10mL de hexano e descartada. As duas fases de hexano de cada frasco foram combinadas e evaporadas durante a noite. O ergosterol extraído foi redissolvido em 1mL de metanol para HPLC (high performance liquid chromatography – CLAE cromatografia líquida de alta eficiência), utilizando-se imediatamente para injeção no sistema, na quantidade de 100µL de suspensão. Os extratos foram analisados em aparelho Shimadzu (LC-10AS), equipado com uma coluna de fase reversa (C18 Supersil ODS 150 x 4,4 mm). As amostras foram eluídas com fase móvel de metanol-água (95:5), com taxa de fluxo de 0,6mL min⁻¹, monitorando-se a 282 nm em detector UV-VIS (modelo Shimadzu SPD-10A).

A eficiência da extração do ergosterol foi determinada adicionando-se uma quantidade conhecida de ergosterol recristalizado (Sigma) em substrato não colonizado, assim como para a curva padrão (Anexo A).

O conteúdo de proteínas totais solúveis nos extratos foi determinado de acordo com o método colorimétrico descrito por Bradford (1953), tendo sido a albumina soro bovina (BSA) usada como padrão (Anexo A).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Perfil e dinâmica enzimática em cultivo tradicional e axênico de *A. brasiliensis*

No perfil enzimático de *Agaricus brasiliensis* cultivado em substratos compostados e não compostados, não houve diferença, produzindo as seguintes enzimas: lacase (Lac), manganês peroxidase (MnP) (oxidativas), xilanase (Xil) e ânglicosidase (hidrolíticas). A atividade de celulase-FPA (FPA-Cel) e de lignina peroxidase (LiP) não foi detectada. No entanto, Bonnen et al. (1994) indicaram que no caso de *Phanerochaete chrysosporium* a não detecção da atividade de LiP foi devido à presença de fator inibitório no extrato. Usando técnicas imunológicas, esses autores verificaram a presença de isoenzima LiP, fato que sugere a necessidade de utilização de outros métodos, tais como imunológicos e/ou genéticos para verificar o potencial do fungo para produzir esta enzima.

Segundo Hatakka (1994), *Agaricus brasiliensis* pode ser incluído no grupo B em função do tipo de enzimas lignolíticas produzidas, sendo que a autora indica que, no caso dos fungos da podridão branca da madeira (“White-rot fungi”), apenas duas das três enzimas oxidativas conhecidas são geralmente produzidas. A presença de lacase isoladamente ou associada à outra peroxidase tem sido demonstrada em uma variedade de fungos da podridão branca (MAYER & STAPLES, 2002).

O fato da atividade de LiP não ter sido detectada, não implica que não ocorra degradação da lignina, pois Durrant et al. (1991) demonstraram que no cultivo de *A. brunnescens* não foi detectada atividade desta enzima, no entanto, houve degradação deste polímero, principalmente durante a fase vegetativa, quando predominou a produção da proteína extracelular lacase. Embora não esteja claramente definido o papel desta enzima na degradação da lignina, as lacases

produzidas por *P. chrysosporium* e por *Coriolus versicolor* estão envolvidas no processo de degradação do polímero (ANDER & ERIKSSON, 1976; KAWAI et al. 1988 *apud* DURRANT et al. 1991), e, em outras espécies de fungos, também relacionada à regulação da morfologia, controle de virulências e nutrição (MAYER & STAPLES, 2002).

A atividade da lacase (Figura 3) foi predominante entre as enzimas oxidativas na fase vegetativa, tal como ocorre com *A. brunnescens*, que se estima, produza 2% do total de proteínas na forma desta enzima (WOOD & GOODENOUGH, 1980). Após o sétimo dia de inoculação, esta enzima apresentou maior atividade no substrato não compostado, atingindo valor máximo de atividade (138,66 U = unidades de atividade enzimática) ao final de 14 dias, mantendo-se elevada (132,21 U) até 21 dias de incubação. Após este período, a atividade enzimática decresceu gradativamente até 52,42 unidades de atividade (U).

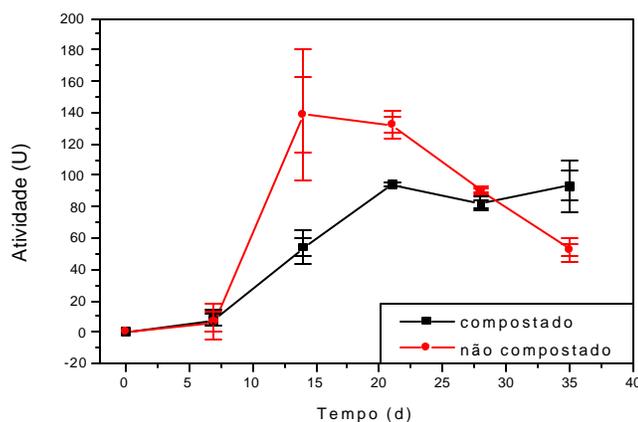


Figura 3. Atividades de lacase durante 35 dias de crescimento vegetativo de *A. brasiliensis* em substrato compostado e não compostado

Por outro lado, em substrato compostado, a atividade máxima, ocorreu mais tarde, no período entre 21 e 35 dias, estando de acordo com o perfil verificado por Wood & Goodenough (1977), que detectaram maiores níveis de atividade de lacase

em *A. brunnescens* cultivado em composto comercial entre 20 e 30 dias de cultivo, quando o fungo iniciou a formação dos primórdios. Ainda neste estudo, a mesma estirpe sob idênticas condições de cultivo, quando não foi adicionada a camada de cobertura manteve níveis máximos de atividade durante o período estudado, tal como se verificou sobre a atividade de lacase em *A. brasiliensis* em substrato compostado (WOOD & GOODENOUGH, 1977) (Figura 3).

O monitoramento da atividade de lacase e a detecção de elevados níveis, principalmente entre 20 e 30 dias de crescimento, em substrato compostado, podem ser utilizados pelos produtores de cogumelos como indicação do momento mais adequado para a colocação da camada de cobertura, procedimento que induz à frutificação e que atualmente não dispõe de um cronograma definido com base científica.

A diferença de atividade desta enzima nos dois tipos de substratos pode indicar uma estratégia de degradação e crescimento diferenciada. Tal comportamento indica que o fungo necessitou de níveis mais elevados de lacase em substrato não compostado, pelo fato de ter encontrado a lignocelulose sem nenhum processo prévio de degradação. Isso demonstra que o processo de preparo do substrato, a formulação e o estágio inicial de degradação, nos diferentes substratos, podem ser fatores determinantes nos níveis de atividade enzimática. Em substratos não compostados, pode ter ocorrido à limitação de acesso às fontes de carbono da lignocelulose, daí a necessidade de produção de maiores níveis de lacase.

Embora o papel individual das enzimas no processo de degradação da lignocelulose ainda seja controverso, a ação das enzimas lignolíticas, na biotransformação e/ou biodegradação da lignina durante o crescimento vegetativo, é importante para que os fungos tenham acesso às fontes de carbono e promovam

uma eficiente colonização dos substratos. No entanto, o excesso de carbono no meio, para alguns fungos, tende a reprimir a indução da produção de enzimas oxidativas, já que a produção destas é resultado do metabolismo secundário desses fungos.

Poderá ter ocorrido, no período de menor atividade de lacase em substrato não compostado, após o pico de atividade ao 15º dia, a inibição da produção desta enzima, pois já haviam sido solubilizados certa quantidade de carboidratos (Figura 4), ou seja, após o pico de atividade de lacase, ocorreu acesso aos carboidratos, que foram solubilizados e proporcionaram o aumento na concentração destes no substrato (Figuras 3 e 4), e desta forma ocorreu uma redução nos níveis de atividade de lacase até o final do estudo.

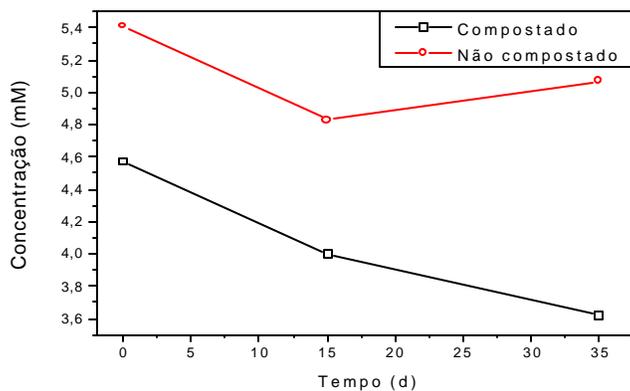


Figura 4. Consumo e concentração inicial de carboidratos totais nos substratos durante 35 dias de crescimento vegetativo de *A. brasiliensis*

Os carboidratos totais foram consumidos de forma diferenciada (Figura 4) a partir do 15º dia, e sua concentração inicial nos substratos também foi diferenciada nos substratos não compostado e compostado, 5,4 mM e 4,6 mM, respectivamente. Em substrato compostado foi constatada menor concentração inicial de açúcares solúveis, provavelmente devido ao consumo durante o processo de compostagem.

Durante as diferentes fases do processo de compostagem, ocorre o consumo de açúcares solúveis pelos microrganismos decompositores, e também a caramelização dos carboidratos, um processo que elimina a água, concentrando o carbono e adequando o substrato para o consumo pelo fungo. A caramelização torna o substrato escurecido e seletivo (GERRITS, 1988). Este processo pode ser responsável pela alteração na forma de disponibilidade do carbono no composto.

Em função de não ser biodegradado previamente durante o processo de preparação, o substrato não compostado mantém quantitativamente, durante a esterilização, a integridade de sua composição e estrutura das fibras, embora a esterilização possa alterar quimicamente alguns componentes.

Os resultados obtidos indicam que no substrato compostado houve utilização mais efetiva e constante de carbono por *A. brasiliensis*, como apresentado na figura 5, provavelmente em função da disponibilidade e da forma como o carbono se encontrava no substrato.

A partir do 15° dia, ocorreu o incremento na concentração de açúcares no substrato não compostado. Tal fato coincide com o pico de atividade de lacase (Figura 3), evidenciando que neste período, o substrato não compostado foi desfavorável ao crescimento vegetativo de *A. brasiliensis*, pois houve certa restrição no consumo. É importante ressaltar que as enzimas oxidativas, tal como lacase, são parte do metabolismo secundário de um grupo de fungos decompositores (KÜES & LIU, 2000).

Esta dinâmica de atividade enzimática demonstrou que, durante os primeiros 15 dias de crescimento no substrato não compostado, o fungo utilizou carboidratos disponíveis, os quais não necessitaram de gasto energético significativo pelo fungo para obtenção, sendo necessário posteriormente, após o 15 dia, mobilização de

lacase a fim de acessar carbono para ser solubilizado, como evidenciado no perfil de carboidratos solúveis (Figura 4).

Já em substrato compostado, a fim de suprir a demanda de carbono durante o crescimento vegetativo, o fungo poderá ter recorrido à obtenção deste através da mobilização da enzima xilanase, que apresentou níveis elevados de atividade neste substrato durante todo o período de crescimento (Figura 5).

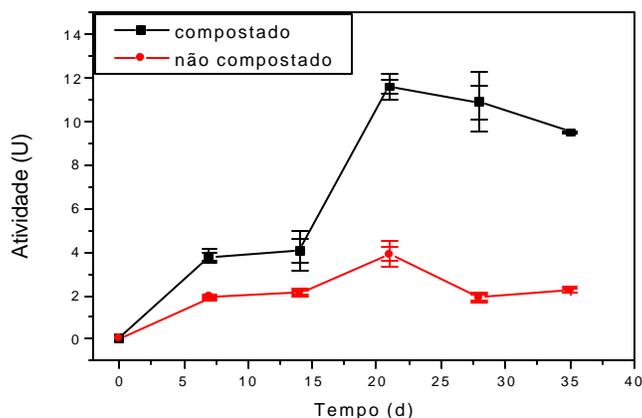


Figura 5. Atividades de xilanase durante crescimento vegetativo de *A. brasiliensis* em diferentes substratos

A diferença de atividade da xilanase observada entre os substratos (Figura 5), também pode ser decorrente da indução do respectivo gene por substâncias presentes no substrato compostado, como verificado durante o crescimento de *A. brunnescens* em meio de cultura contendo composto e ágar, onde foi detectado níveis elevados de mRNA correspondente ao gene *xlnA*, demonstrando o efeito de indução por componentes do substrato compostado na expressão desse gene. Nestes estudos, foi adicionalmente demonstrada a maior produção de biomassa pelo fungo em substratos compostados, utilizados como fonte de carbono para crescimento. Este estudo demonstrou que o gene poderá ser reprimido pela presença de monossacarídeos no meio de crescimento (PIET et al. 1998), os quais,

se encontram presentes em maior concentração no substrato não compostado (Figura 4).

Outra hipótese que poderá explicar a atividade elevada da enzima foi apresentada por Iiyama et al. (1994) durante experimento com *A. brunnescens* em substrato compostado. O autor verificou um maior consumo de xilose em relação a outros açúcares, provavelmente em função da xilose, derivado de xilana, ter sido encontrado em maior quantidade na formação estrutural das células dos materiais componentes do substrato usado, no caso a base de palha de trigo.

A atividade da xilanase pode ter contribuído para a mobilização de carbono na fase vegetativa quando o fungo crescer em composto. Já em substrato não compostado, a enzima α -glicosidase pode ter sido responsável pela mobilização de carbono, já que atua em uma gama de polissacarídeos (CAI et al. 1998).

A atividade foi mais elevada em substrato não compostado durante todo o período estudado, entretanto, aos 21 dias de crescimento observaram-se atividades com níveis similares, de 1297 unidades de atividade (U) em substrato compostado e 1340,5 U em não compostado (Figura 6).

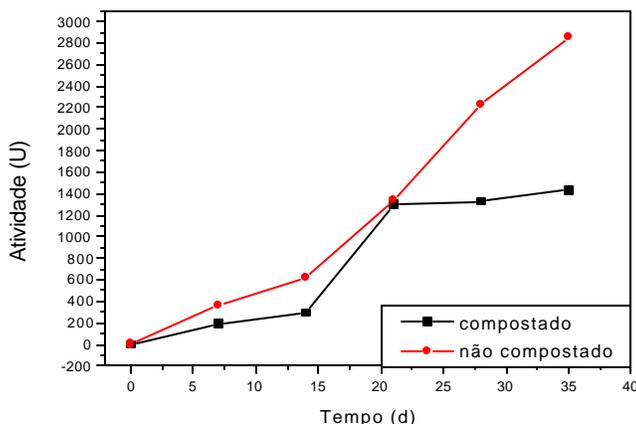


Figura 6. Atividades de α -glicosidase durante 35 dias de crescimento vegetativo de *A. brasiliensis*

Dado ao fato que, a concentração de carboidratos solúveis no extrato do substrato não compostado ter sido maior do que no compostado (Figura 4), os resultados obtidos sugerem que quantitativamente, os carboidratos solúveis não são fatores determinantes da produção de α -glicosidase, pelo menos neste caso.

Resultados diferentes foram observados com *Volvariella volvacea*, cuja atividade de α -glicosidase foi reprimida na presença de monossacarídeos, como a glicose, no substrato de cultivo (CAI et al. 1998). No entanto, a função da enzima ainda é desconhecida e raros são os estudos com este gênero, sendo que para algumas espécies de fungos foi dispensável para o crescimento miceliano.

A outra enzima oxidativa detectada durante o crescimento vegetativo de *A. brasiliensis* foi a manganês peroxidase (MnP), que apresentou idênticos perfis de atividade, tanto em substrato compostado como em não compostado. Em substrato compostado a atividade desta enzima foi ligeiramente superior a partir do sétimo dia (Figura 7), mantendo-se mais elevada até o 35º dia do crescimento vegetativo quando atingiu 59,8 unidades de atividade, sendo 8,5% superior aos níveis de atividade em substrato não compostado no mesmo período.

A MnP pode atuar nos estágios iniciais de degradação da lignina de alto peso molecular (HATAKKA, 1994). Entretanto, a similaridade entre os perfis detectados pode indicar a versatilidade ou inespecificidade desta enzima, desde que o Mn^{+III} reativo que é formado, propicia a ação inespecífica desta enzima nos substratos.

O perfil similar desta enzima em ambos substratos não permitiu indicar qual o seu papel em cada substrato, considerando suas diferenças.

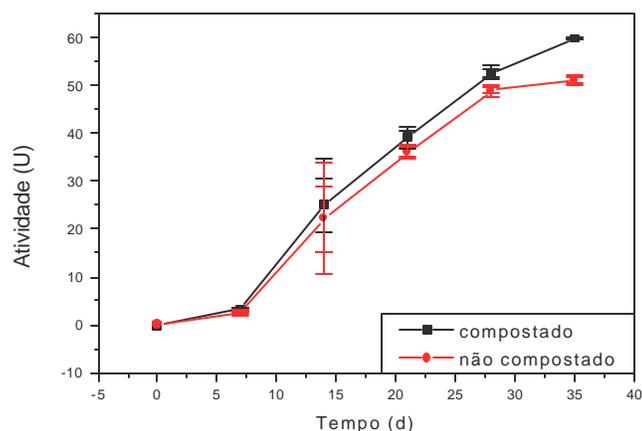


Figura 7. Atividades de MnP durante 35 dias de crescimento de *A. brasiliensis* em substrato compostado e não compostado

Estes perfis podem estar relacionados aos resultados obtidos por Bonnen et al. (1994), que detectaram no cultivo de *A. brunnescens* atividades estatisticamente iguais de MnP quando a espécie foi cultivada em um substrato com a mesma formulação, submetida a diferentes tratamentos, pasteurizado e esterilizado. No entanto, no presente estudo não foi possível efetuar tais comparações uma vez que os substratos dispunham de diferentes formulações.

Como citado por diversos autores, a redução na atividade das enzimas oxidativas, como a lacase principalmente, durante o crescimento vegetativo, coincide com o aumento da atividade de enzimas hidrolíticas requeridas no processo de frutificação. Este modelo de dinâmica enzimática é o mais aceito para explicar a utilização da lignocelulose por diversas espécies de fungos (KÜES & LIU, 2000; VELÁZQUEZ-CEDEÑO et al. 2002; WOOD & GOODENOUGH, 1977).

Para que ocorra a produção de cogumelos com elevados índices de bioconversão da biomassa lignocelulósica em biomassa fúngica é necessário primariamente uma eficiente colonização do substrato e sua degradação pelo micélio, pois a fase vegetativa do fungo é responsável pelo suporte nutricional da

fase reprodutiva (SAVOIE et al. 1996). A degradação do substrato fornece ao fungo os nutrientes necessários durante o ciclo de produção, embora de forma diferenciada quantitativa e qualitativamente, ou seja, em função de seu modelo de dinâmica enzimática e da necessidade de utilização da lignocelulose, principalmente como fonte de carbono.

Mesmo que neste estudo não se tenha monitorado a atividade enzimática durante a frutificação, quando ocorrem elevados níveis de atividade das enzimas hidrolíticas, é importante registrar a atividade celulolítica do fungo, principalmente através das enzimas β -glicosidase e xilanase, já que não foi detectada a atividade de celulase (FPA).

A não detecção da atividade de celulase (FPA) pode ter ocorrido em função do estágio de desenvolvimento que o fungo se encontrava e/ou por não se ter efetuado a cobertura do substrato, um dos fatores que induzem o início de produção destas enzimas (hidrolíticas) (DURRANT et al. 1991; WOOD E GOODENOUGH, 1977).

Considerando-se os diferentes sistemas de produção, os resultados obtidos indicam a adaptabilidade de *A. brasiliensis* para produzir biomassa miceliana mesmo sob condições desfavoráveis, demonstrando capacidade competitiva determinada pela produção das enzimas oxidativas para a degradação de constituintes recalcitrantes e acessar o carbono (SAVOIE et al. 1996).

4.3.2. Avaliação da biomassa vegetativa (Ergosterol e proteínas totais)

Foram detectadas diferenças no conteúdo de ergosterol entre os substratos antes da inoculação, valores entre 0,746 e 183,3 $\mu\text{g/g}$ de substrato seco – não compostado e compostado, respectivamente (Figura 8), devido à presença de microbiota característica do composto, que são promotores do crescimento miceliano de *A. brunnescens* (STRAATSMA et al. 1993). Este papel de promoção do crescimento miceliano não foi comprovado no caso de *A. brasiliensis*. Entretanto, neste trabalho qualquer interação entre os microrganismos promotores e o micélio de *A. brasiliensis* foi eliminada, pois ambos substratos passaram pelo processo de esterilização previamente à inoculação.

A quantidade de ergosterol produzido pelo micélio é variável, sendo dependente e/ou influenciado pela concentração de nutrientes e pela fase de desenvolvimento do fungo (BARAJAS-ACEVES et al. 2002). No presente estudo, a concentração de ergosterol entre o cultivo tradicional e axênico variou entre 183,3 a 501,1 e 0,746 a 217 $\mu\text{g/g}$ de substratos secos, respectivamente, durante o crescimento vegetativo de *A. brasiliensis*. Esses resultados foram superiores àqueles relatados por Neves (2000), que encontrou valores variáveis entre 163,62 e 187,80 $\mu\text{g/g}$ de composto seco. No entanto, a autora relata o conteúdo de ergosterol em torno de 618 $\mu\text{g/g}$ de substrato compostado antes da inoculação, diferentemente dos valores encontrados no presente estudo.

O conteúdo de carboidratos totais de cada substrato foi diferente no início do crescimento, tendo-se detectado maiores valores no substrato não compostado. No entanto, esta disponibilidade aparente de carbono, não foi suficiente para promover um crescimento vegetativo constante nestas condições durante o período monitorado. É importante ressaltar que durante os 15 dias iniciais de crescimento vegetativo de *A. brasiliensis* houve uma velocidade na produção de biomassa similar entre os substratos (Figura 8). Por outro lado, a presença de maiores concentrações de carboidratos solúveis no substrato não compostado poderá ter reprimido a degradação lignocelulósica como sugerido por Hatakka (1994).

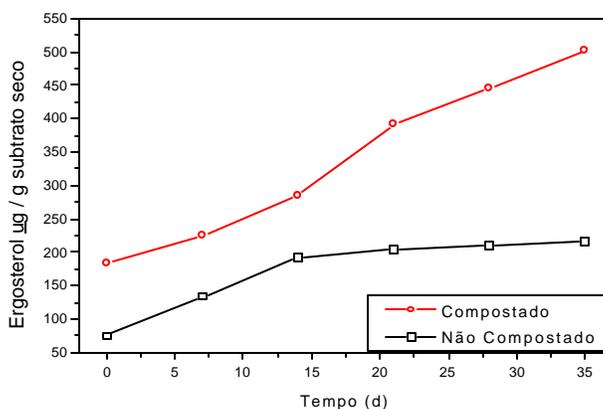


Figura 8. Conteúdo de ergosterol no micélio de *A. brasiliensis*, avaliado durante 35 dias de crescimento vegetativo em substrato compostado e não compostado

Os carboidratos solúveis disponíveis foram consumidos e promoveram um aumento similar no crescimento até o 15º dia, em ambos os substratos, entretanto, no substrato não compostado, a partir do 15º dia, o fungo poderá ter recorrido à degradação da lignocelulose como fonte de carbono, uma vez que o carbono solúvel havia sido consumido. A ativação do metabolismo secundário pela produção de enzimas oxidativas, responsáveis pela degradação da lignina evidenciou que as fontes de carbono não se encontravam adequadamente disponíveis neste substrato,

já que fungos decompositores secundários têm preferência por fontes de carbono submetidas à “fermentação” tal como sucede nos substratos compostados (PIET et al. 1998). Nestes substratos, o consumo de carboidratos e a produção de biomassa foram, portanto, mais eficientes.

A necessidade de consumo energético, através da síntese de proteínas extracelulares, principalmente lacase, para mobilização de carbono em substrato não compostado acarretou na redução do crescimento vegetativo, acompanhado pelo conteúdo de ergosterol em relação ao substrato compostado (Figura 8), embora os perfis de síntese protéica tenham sido similares durante o período estudado (Figura 9).

A similaridade entre os perfis de biossíntese protéica, observados entre os substratos, embora em diferentes níveis, indica que, mesmo em condições menos favoráveis ao crescimento, como constatado através do perfil de atividade de lacase em substrato não compostado, *A. brasiliensis* não alterou o metabolismo de síntese de proteínas, fato que sugere sua versatilidade para cultivo em condições diferentes daquelas utilizadas no cultivo tradicional, baseado em substratos compostados e pasteurizados.

Alguns métodos indiretos de avaliação de biomassa miceliana fúngica tal como a dosagem de proteínas solúveis ou a avaliação da atividade extracelular de lacase têm sido correlacionados com a biomassa vegetativa, avaliada pela determinação do peso seco e conteúdo de ergosterol. No caso do fungo comestível *Lentinula edodes*, o shiitake, cultivado em meio sólido, verificou-se uma correlação entre a produção de biomassa, medida pela concentração de ergosterol e a concentração de proteínas totais solúveis (OKEKE et al. 1994).

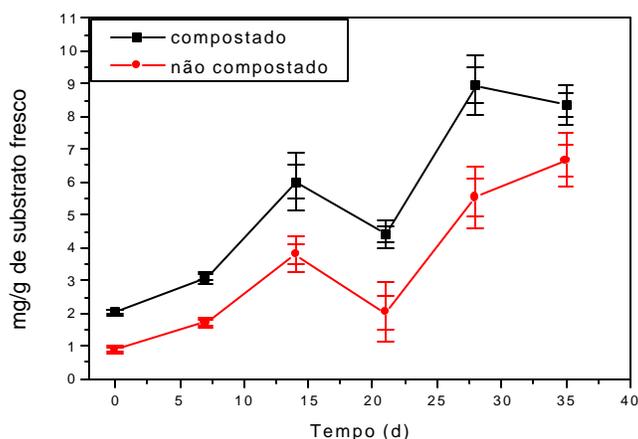


Figura 9. Conteúdo de proteínas totais de *A. brasiliensis* durante crescimento vegetativo em cultivo tradicional (compostado) e axênico (não compostado)

Durante o crescimento vegetativo de *A. brasiliensis*, a atividade de lacase em substrato compostado bem como o teor de proteínas totais, apresentaram correlação significativa em relação à biomassa vegetativa avaliada pela determinação da concentração de ergosterol, sendo $r = 0,93 (<0,01)$ e $r = 0,87 (<0,05)$, respectivamente. Esses resultados indicam que principalmente a enzima lacase poderá ser utilizada para avaliação da produção de biomassa miceliana de *A. brasiliensis* em substrato compostado. Esta conclusão também foi obtida para *A. brunnescens* quando cultivado em composto comercial (MATCHAM et al. 1985).

Já no substrato não compostado o fungo apresentou diferenças no metabolismo, provavelmente devido à disponibilidade diferenciada de nutrientes. Essas alterações influenciaram os dois parâmetros, de tal forma que no substrato não compostado não ocorreram correlações significativas entre lacase e síntese de proteínas totais e lacase e ergosterol, sendo $r = 0,74 (< 0,10)$ e $r = 0,77 (< 0,10)$, respectivamente.

Estudos realizados com *A. brunnescens*, em meio sólido, demonstraram a correlação significativa entre a atividade da fenol oxidase lacase e biomassa, avaliada tanto pela determinação do peso seco quanto pela concentração de ergosterol. No entanto, a correlação foi limitada a um período de 30 dias. Também foi observado correlação significativa destes parâmetros com a concentração de proteínas totais (MATCHAM et al. 1985).

Os resultados obtidos no substrato não compostado evidenciaram uma resposta à condição desfavorável para *A. brasiliensis*, a qual teve impacto no menor crescimento miceliano, embora o substrato nos sacos de cultivo, tenha sido colonizado completamente por micélio mais denso externamente. Apesar das estratégias diferenciadas no metabolismo em função do substrato de cultivo, a estirpe UFSC-51 apresenta potencial para ser utilizada em cultivos axênicos, dependendo de experimentos futuros na fase de frutificação.

Quanto à concentração de proteínas, verificou-se que o substrato compostado apresentou inicialmente um nível maior do que no substrato não compostado. A biossíntese de proteínas nas duas condições (Figura 9) apresentou idênticos perfis ao longo do tempo, sugerindo que, em diferentes condições de crescimento, *A. brasiliensis* manteve um perfil semelhante de atividade biossintética.

Apesar dos resultados indicarem o substrato não compostado como um ambiente desfavorável ao crescimento do fungo, pode-se observar que *A. brasiliensis* (UFSC-51) apresentou-se versátil para crescimento em diferentes tipos de processos de cultivo, compostado e não compostado.

4.4 CONCLUSÕES

- *Agaricus brasiliensis* produziu as mesmas enzimas (lacase e Mn peroxidase – oxidativas e xilanase e âglicosidase – hidrolíticas) nos diferentes substratos, sem produção de LiP (lignina peroxidase) e celulase (Cel – FPA) nos substratos;
- O processo de preparação do substrato, e o seu estágio de degradação modificaram a disponibilidade de nutrientes e alteraram a dinâmica enzimática;
- Substratos à base de folhas de palmeira-real, suplementados apresentaram viabilidade para utilização no cultivo axênico de *A. brasiliensis*;
- *A. brasiliensis* apresentou maior crescimento vegetativo, avaliado através do ergosterol, em substrato compostado;
- O substrato compostado foi mais adequado para crescimento vegetativo;
- O substrato axênico propiciou menor crescimento miceliano nas condições formuladas;
- O fungo manteve idêntico perfil de biossíntese protéica mesmo quando cultivado sob diferentes condições;
- Métodos indiretos tradicionalmente usados para monitorar o crescimento vegetativo (Lacase e proteínas totais) podem ser usados para *A. brasiliensis* quando cultivado em substrato compostado;

5. Capítulo III – Alterações nos componentes lignocelulósicos e acidificação durante crescimento vegetativo de *Agaricus brasiliensis* em diferentes substratos

Resumo

Diversos fungos cultivados comercialmente são produzidos em resíduos agroindustriais previamente processados. Informações sobre a utilização desses resíduos para conversão em biomassa vegetativa fornecem subsídios para melhorar a eficiência na conversão em diferentes substratos. Neste capítulo, avaliou-se a capacidade degradativa de *Agaricus brasiliensis* através das alterações ocorridas em substratos esterilizados para cultivo axênico e tradicional (composto). A degradação lignocelulósica foi monitorada durante 35 dias de crescimento vegetativo através de análises da lignina Klason, espectroscopia de infravermelho (FTIR), pH e relação C/N. A concentração relativa de lignina aumentou em substrato compostado e diminuiu em substrato não compostado. Os espectros de infravermelho evidenciaram que o substrato não compostado possui elevadas concentrações iniciais de grupamentos responsáveis pela banda em 1650 cm^{-1} . Os polissacarídeos (1110 cm^{-1}) foram consumidos mais eficientemente no composto. Em substrato não compostado foi observado o surgimento da banda em 1325 cm^{-1} , relativo a atividade de lacase. As variações de pH evidenciaram uma tendência para acidificação em ambos substratos. A relação C/N reduziu no composto e elevou-se no substrato axênico. Os resultados obtidos evidenciaram o consumo mais acentuado de polissacarídeos em composto, no entanto, as principais modificações estruturais ocorreram em substratos esterilizados em função da atividade de lacase.

Palavras-chave FTIR, lignina, composto, crescimento vegetativo, *Agaricus brasiliensis*, biodegradação

5.1 INTRODUÇÃO

A fim de utilizar o carbono de substratos lignocelulósicos para crescimento, tanto na fase vegetativa quanto reprodutiva, os basidiomicetos pertencentes ao grupo da podridão branca, conhecidos como “White-rot”, degradam os componentes básicos da parede celular dos vegetais, que incluem a celulose, hemicelulose e a lignina, ao contrário dos fungos da podridão castanha ou “Brown-rot”, que degradam seletivamente os polissacarídeos (PANDEY & PITMAN, 2003). A utilização do carbono por estes fungos, tais como *Agaricus*, *Pleurotus* dentre outros, varia conforme a fase de desenvolvimento em que este se encontra, ou seja, durante o crescimento vegetativo o consumo destina-se à formação de novas hifas e durante o crescimento reprodutivo à formação das frutificações, evidenciando uma demanda nutricional diferenciada para cada fase (DURRANT et al. 1991; MOL, 1989).

Durrant et al. (1991) demonstraram que durante o ciclo de vida, em condições de cultivo, *Agaricus brunnescens* (champignon) degradou algumas frações de lignina, preferencialmente durante o crescimento vegetativo, e os polissacarídeos foram utilizados durante a formação das frutificações.

Para que ocorra uma utilização eficiente do carbono dos substratos para crescimento, nas fases vegetativa e reprodutiva, principalmente quando o fungo é produzido em nível comercial, torna-se fundamental que o substrato apresente um balanço químico e físico adequados e, no caso de substratos compostados pasteurizados, também microbiológico.

Com frequência, alguns parâmetros são utilizados no monitoramento do processo de degradação, permitindo a detecção de alterações e/ou modificações em determinados substratos, resultantes principalmente da ação de enzimas

extracelulares produzidas pelos fungos. Entre os parâmetros mais importantes e que permitem avaliar o equilíbrio nutricional do substrato, está a relação entre o teor de carbono e o de nitrogênio presentes no substrato de cultivo. A relação C/N ótima é selecionada na formulação inicial do substrato e é determinante da qualidade do produto final, tanto para substratos compostados quanto axênicos (GERRITS, 1988).

Nesses dois processos de produção, o carbono é fornecido ao fungo pelo componente volumoso do substrato, ou seja, as palhas, e o nitrogênio, pelos elementos suplementares como vários tipos de esterco e os farelos, assim como aquele presente na biomassa formada durante o processo de compostagem (EIRA, 2000; GERRITS, 1988).

No entanto, nos substratos não compostados ocorrem modificações físico-químicas, microbiológicas e particularmente nos componentes estruturais menos drásticas durante o preparo, ao contrário do que ocorre no processo de compostagem. Nestes substratos os componentes básicos não são modificados pela atividade microbiológica, enquanto nos substratos compostados esta alteração ocorre, acarretando assim, uma maior complexidade estrutural e química, tal como se verifica, por exemplo, na complexação de proteínas ao polímero de lignina (GERRITS, 1988).

Caso ocorra um desequilíbrio nutricional quantitativo dos componentes nos substratos, podem ser observadas alterações metabólicas no fungo e na sua capacidade degradativa, bem como uma promoção no desenvolvimento de organismos competidores, em ambos os sistemas de produção (KEREM et al. 1992; GERRITS, 1988).

Tratando-se de substratos compostados o equilíbrio nutricional é fundamental na seletividade, de tal forma que a sucessão microbiológica durante o

processo entre fungos e bactérias, incluindo actinomicetos, possa se estabelecer alterando quimicamente os constituintes do composto, resultando em uma série de modificações, incluindo o incremento na biomassa microbiana, que serve como fonte de nutrientes ao fungo de interesse. Em algumas situações, essa biomassa é responsável pela promoção na taxa de crescimento do micélio fúngico, conferindo a seletividade ao composto e inibindo o desenvolvimento de competidores que reduzem produtividade (FERMOR et al. 1985 *apud* IYAMA et al. 1994).

Parte dos polissacarídeos presentes na formulação inicial do composto é degradada pelos microrganismos durante a compostagem, e somente 17% é efetivamente utilizada por *A. brunnescens* durante o ciclo de produção (IYAMA et al. 1994). Já o nitrogênio, que está presente inicialmente na forma de proteínas, é metabolizado durante a compostagem gerando amônia (NH₃) no processo conhecido por amonificação. A amônia é fixada por microrganismos junto à lignina, formando o complexo lignina-húmus, que posteriormente é utilizado como fonte de nitrogênio pelo fungo. A transformação do nitrogênio, o consumo de polissacarídeos e a respiração microbiana acarretam uma redução da relação C/N final, tanto durante a compostagem quanto durante o cultivo de *Agaricus* (GERRITS, 1988).

No Brasil, a maioria do composto produzido apresenta relação C/N ao final da compostagem, em torno de 17/1, sendo que a maior parte é utilizada para o cultivo de *A. brunnescens* (BRAGA & EIRA, 1998). Por outro lado, não são conhecidos produtores que utilizam substratos axênicos como alternativa para o cultivo desta espécie, o que poderia ser uma estratégia importante na otimização da produtividade.

Recentemente, verificou-se que *A. brasiliensis* requereu substratos com relação C/N em torno de 37/1 para obtenção de maiores produtividades,

diferentemente daquelas tradicionalmente utilizada no país (KOPYTOWSKI FILHO, 2002).

As modificações químicas, físicas e microbiológicas e estruturais que ocorrem durante a produção do composto são semelhantes àquelas que ocorrem durante a fase de crescimento do fungo de interesse. A redução na relação C/N e do conteúdo de polissacarídeos durante a compostagem, também ocorre durante o crescimento dos fungos nos substratos compostados. Na hidrólise dos polissacarídeos são gerados ácidos orgânicos que promovem redução no potencial hidrogeniônico (pH) nestes substratos (SCHISLER, 1982). Durante a degradação da lignina são gerados derivados ácidos que podem também contribuir para a acidificação. Bonnen et al. (1994), durante a produção de *A. brunnescens* em composto, observaram uma ligeira redução no pH, que se manteve no final em torno de 6.0 (5.8-6.2).

O monitoramento da degradação da lignina e ou sua modificação, usando metodologias enzimáticas, químicas e espectroscópicas, encontra-se bastante representado na bibliografia (IYAMA et al. 1994; SOARES & DÚRAN, 2001; TOUMELA, 2000). Este monitoramento pode ser efetuado através de diferentes metodologias, sendo que métodos químicos tradicionais como a determinação da lignina Klason, podem ser utilizados na sua quantificação. As alterações na estrutura da molécula de lignina, determinada tanto química quanto enzimaticamente, podem ter implicações na interpretação das avaliações (IYAMA et al. 1994; TUOMELA, 2000).

Alguns autores consideram, portanto, que pode haver um incremento na proporção de lignina durante o crescimento de fungos degradadores de madeira, em função de haver o consumo preferencial de outros elementos, enquanto o conteúdo

de lignina é mantido, mesmo se modificado por oxidação, resultando assim em aumento na quantidade relativa (IYAMA et al. 1994). Por outro lado, caso ocorra à degradação ou transformação deste polímero, as metodologias analíticas clássicas como klason, apontariam para uma redução na sua concentração relativa e metodologias complementares mostrariam tais modificações.

Desta forma as metodologias clássicas estão sendo substituídas e ou complementadas por procedimentos menos onerosos, que utilizam menores quantidades de substrato e conduzem a resultados mais rapidamente (CHEN et al. 2000; PANDEY & PITMAN, 2003; TUOMELA et al. 2000).

A espectroscopia de infravermelho (FTIR) é uma das técnicas usadas para estudos de degradação química de madeira, que requer um mínimo preparo da amostra e pequenas quantidades, diferentemente dos métodos gravimétricos tradicionais, onde amostras maiores são requeridas (PANDEY & PITMAN, 2003), servindo como instrumento qualitativo para caracterizar sem destruição, grupos químicos presentes em matéria orgânica (INBAR et al. 1989). A técnica de FTIR se refere ao estudo das interações da luz infravermelha com a matéria, sendo que a frequência das ondas é inversamente proporcional à energia. Essa técnica fornece informações sobre grupos funcionais, geometria molecular e interações intra e inter molecular, onde a frequência em que a absorção ocorre pode indicar o tipo de grupo funcional presente na substância (www.nelsonlabs.com).

Análises em espectros de FTIR usando não somente a frequência dos picos, mas também as intensidades relativas, fornecem informações sobre as mudanças qualitativas, mesmo os polímeros podendo sofrer alterações químicas sem que haja destruição da morfologia celular (GIVEN et al. 1984).

Os espectros gerados em FTIR representam um complexo conjunto com ligações C-O-C de celulose que vibram centradas a 1060-1100 cm^{-1} . Os espectros de hemicelulose são muito semelhantes aos de celulose. De forma geral, pode-se utilizar a região em torno de 1110 cm^{-1} para se avaliar os polissacarídeos (GIVEN et al. 1984).

A lignina por sua vez apresenta bandas a 1460 cm^{-1} representado pela vibração de grupamentos alifáticos, todavia, a sua oxidação é acompanhada através de bandas representadas por grupamentos aromáticos a 1650 cm^{-1} e a 1325 cm^{-1} , como resultado da ação de enzimas fenoloxidasas como a lacase (GIVEN et al. 1984; SOARES & DURAN, 2001).

Chen et al. (2000), em estudo visando mapear alterações na composição do composto durante o crescimento de *A. brunnescens*, demonstraram que houve incremento na região de estruturas aromáticas representadas em 1650 cm^{-1} e na banda da região de 1325 cm^{-1} , representando grupamentos que aparecem em função de alterações na lignina. Os autores verificaram ainda notável redução nos polissacarídeos (região em torno de 1110 cm^{-1}).

Foram objetivos deste trabalho, o monitoramento dos parâmetros relacionados a biodegradação, para substratos compostados e não compostados no cultivo de *A. brasiliensis* durante a fase de crescimento vegetativo, usando-se técnicas tradicionais químicas complementadas por técnicas de espectroscopia. Estes estudos foram subsequenteiramente integrados aos estudos enzimáticos (Cap. II) a fim de se estabelecer um modelo de degradação de *A. brasiliensis* durante o crescimento vegetativo comparando o seu crescimento em dois tipos de substratos (compostado e axênico).

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

As etapas de preparação dos substratos, inoculação e amostragem, bem como a estirpe de fungo utilizada para obtenção dos resultados apresentados neste capítulo, seguem a descrição prévia dos materiais e métodos do capítulo II, acrescidas a metodologias de análises adicionais.

5.2.1 Avaliação da lignina Klason

Pesaram-se 500 mg de cada substrato previamente seco, os quais, em seguida, foram acondicionados em vidros de 250 mL com tampa de rosca. Adicionou-se 5mL de H₂SO₄ 72% ou seja, 1mL para cada 100 mg de amostra. A mistura foi colocada em banho-maria a 30±0,5°C, sendo agitada freqüentemente. Após 1 hora, a amostra foi diluída usando-se 28 mL de água destilada para cada 1mL de ácido sulfúrico e transferida para erlemeyers de 125mL. A hidrólise secundária foi efetuada em autoclave a 121°C durante 1 hora. A solução ainda quente foi filtrada em papel filtro previamente tarado, sob aspiração em bomba de vácuo e o resíduo lavado com uma quantidade conhecida de H₂O quente para a remoção do ácido. Os discos de papel filtro contendo os resíduos das amostras lavadas foram secos a 65°C durante 72 horas. Em seguida, foram pesados e a massa obtida calculada em função da diferença entre o peso inicial e final dos discos.

5.2.2 Análises em espectroscopia de infravermelho - FTIR

As análises foram realizadas por espectroscopia de infravermelho em aparelho FTLA 2000, usando-se 400 varreduras/leituras por minuto entre 400 e 4000 cm^{-1} . O espectrômetro estava equipado com software para efetuar a “Fourier Transform ou transformada de Fourier” efetuadas na Central de Análises do Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina.

Para tal, foram confeccionadas pastilhas contendo 99,9 mg de KBr e 0,1 mg de amostra de substrato previamente seca, moída e peneirada (1mm). A confecção da pastilha foi realizada após a maceração destes dois componentes com graal e pistilo. O pó resultante foi colocado em suporte apropriado sendo prensado sob uma pressão de 10 toneladas durante 1 minuto. A pastilha foi retirada do suporte e colocada diretamente no aparelho procedendo-se à leitura.

Em função da heterogeneidade dos diferentes substratos, a avaliação da reprodutibilidade do método de análise e da forma de amostragem (capítulo II), para validação da metodologia, foi efetuada através da retirada de quatro subamostras dos sacos de cultivo (unidades amostrais) segundo descrito no capítulo 2 – amostragem, e submetidas à espectroscopia FTIR individualmente.

5.2.3 Análise de pH

O pH foi determinado em triplicata, pela mistura do substrato fresco (10g) com água (50 mL) e após 30 minutos, avaliou-se no sobrenadante (TEDESCO et al. 1985).

5.2.4 Análises elementares

As análises elementares de cada substrato com relação aos parâmetros carbono, nitrogênio e matéria orgânica, ao longo do tempo, foram realizadas no laboratório da EPAGRI, Caçador, SC, sob numeração de 4140 a 4146.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. Determinação da concentração de lignina (método Klason)

A concentração inicial de lignina (dia zero), avaliada nos dois substratos, usando-se a metodologia Klason, foi mais elevada no substrato não compostado em relação ao compostado, 27,0 e 24,4 mg/g de substrato seco, respectivamente (Figura 10). Tal fato explica-se pelo processo de preparo de cada substrato e pela formulação diferenciada, levando-se em consideração as diferenças no conteúdo de lignina dos ingredientes de cada formulação. Em um dos substratos, incluiu-se palha de milho e sabugo enquanto no outro incluiu-se palha de palmeira real e serragem. No primeiro caso, substrato compostado, foi incluído cerca de 60% de ingredientes lignocelulósicos na fase de inoculação do fungo, enquanto no segundo caso, estes ingredientes envolveram cerca de 80% (Preparação do substrato – capítulo II).

Os resultados obtidos evidenciam o aumento de 9,9% no conteúdo relativo de lignina ao final de 35 dias de crescimento de *A. brasiliensis* em substrato compostado (24,4 para 26,8 mg/g substrato seco). Entretanto, com três pontos de amostragem, identificou-se ao 15º dia de crescimento um incremento no conteúdo relativo de lignina (31,7 mg/g de substrato seco) (Figura 10). O incremento no conteúdo de lignina também foi observado por Iiyama et al. (1994) durante a produção de *A. brunnescens*. Inbar et al. (1989) também relataram tal incremento durante o processo de compostagem. É importante ressaltar que o maior incremento na concentração de lignina foi detectado durante a compostagem (6,1%), portanto, superior aquele observado durante o ciclo de cultivo da espécie (0,6%).

Uma das razões apontadas por diversos autores para tal incremento, em certos substratos submetidos à degradação, pode ser a característica recalcitrante

do polímero, resultante da sua complexidade estrutural e química e conseqüente baixa biodegradabilidade. Em outras palavras, o aumento do conteúdo de lignina não é decorrente de um processo de biossíntese, mas sim da redução preferencial de outros componentes, aumentando assim a sua quantidade relativa (IYAMA et al. 1994).

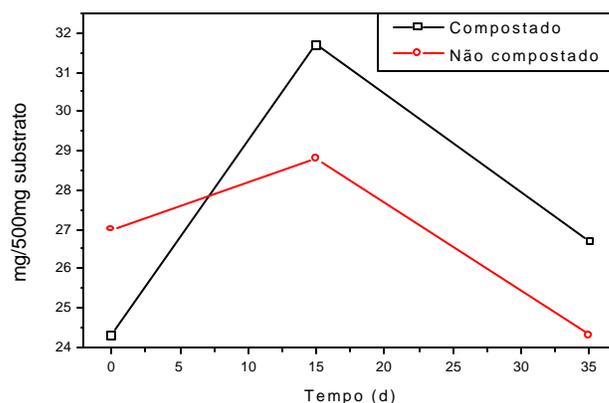


Figura 10. Variações no conteúdo relativo de lignina durante 35 dias de crescimento vegetativo de *A.brasiliensis* em substrato compostado e não compostado

Reforçando esta hipótese, o consumo de carboidratos solúveis pelo fungo ocorreu de forma mais eficiente em substrato compostado conforme apresentado na Figura 4 (capítulo II), o que pode ter acarretado no aumento do conteúdo relativo de lignina neste substrato. Adicionalmente, foi observado um menor nível de atividade de lacase em substrato compostado, durante 35 dias de crescimento vegetativo de *A. brasiliensis*, enzima que está envolvida na degradação da lignina.

A lacase, como já mencionado, pode proporcionar acesso à fonte de carbono ou participar de processos de remoção de metabólitos intermediários potencialmente tóxicos e presentes no meio, ou seja, participa tanto da degradação e ou biotransformação da lignina quanto da detoxificação do meio de crescimento dos subprodutos de tal degradação (SOARES & DÚRAN, 2001).

Níveis mais baixos de atividade de lacase em substrato compostado sugerem maior disponibilidade de carbono durante os 35 dias de crescimento vegetativo, sendo que a partir 21 dias houve um leve aumento na atividade, mas que não chegou a significar alterações no conteúdo de carboidratos solúveis. Picos de atividade de lacase entre os 20 e 30 dias também foram relatados durante o crescimento vegetativo de *A. brunnescens* (WOOD & GOODENOUGH, 1977). A presença de carbono em níveis adequados para a espécie ou em excesso no meio para o crescimento, podem ser responsáveis pela repressão na atividade lignolítica (KEREM et al. 1992).

Em substrato não compostado, constatou-se uma redução de aproximadamente 10% em relação ao conteúdo inicial de lignina, ao final de 35 dias, de 27,0 para 24,4 mg/g de substrato seco. A redução no conteúdo de lignina pode ter ocorrido em função da limitação de carbono que esse substrato apresentou, já que a lacase, apontada como interveniente na degradação da lignina, participa do metabolismo secundário dos fungos, quando em condições como limitação de carbono, mostrando elevados níveis de atividade da enzima neste substrato. Esse fato pode ser observado na figura 3 no capítulo II.

O consumo inicial de carboidratos solúveis em substrato não compostado foi similar ao substrato compostado e pode promover uma ligeira acentuação no conteúdo de biomassa vegetativa neste substrato até o 15 dias, quando supõe-se o fungo já havia consumido os carboidratos de pronta assimilação disponíveis. Para dar continuidade ao seu crescimento vegetativo, mobilizou enzimas lignolíticas oxidativas, principalmente lacase, para que fossem acessadas às fontes de carbono da lignocelulose. Por este motivo, o crescimento vegetativo, avaliado pelo teor de

ergosterol, a partir desta data foi comprometida (Figura 8 - Capítulo II), evidenciando a necessidade de gasto energético para tal processo metabólico.

Ao final de 35 dias de crescimento vegetativo, a concentração de lignina em substrato não compostado encontrava-se próxima ao verificado no substrato compostado antes do crescimento do fungo (dia zero).

5.3.2. Espectroscopia de infravermelho

Um dos problemas que poderiam ser encontrados neste tipo de análise refere-se a uma possível reprodutibilidade baixa do método de amostragem (capítulo II), devido à heterogeneidade da composição dos substratos, principalmente não compostado. Para comprovar a reprodutibilidade, quatro sub-amostras foram retiradas de uma mesma unidade amostral e submetidas à espectroscopia (FTIR). Os espectros obtidos apresentaram elevada similaridade indicando, portanto, reprodutibilidade.

O micélio, quando misturado em diferentes concentrações aos substratos não colonizados (Dados não apresentados), contribuiu proporcionalmente com as absorvâncias em 1650 cm^{-1} , 1460 cm^{-1} e 1100 cm^{-1} . Portanto, como discutido nas seções seguintes, utilizar-se á a razão entre as absorvâncias das bandas a fim de facilitar a visualização e o entendimento de tais alterações. As alterações entre as razões das intensidades relativas das absorvâncias, observadas durante o crescimento vegetativo do fungo, são resultado das alterações químicas efetivas dos diversos grupamentos funcionais dos substratos, provocadas pela ação do fungo por via enzimática. Durante o período estudado, 35 dias, foram gerados três espectros

por tratamento, no entanto, são apresentados apenas dois, para efeito de comparação entre ponto inicial, substrato não colonizado pelo fungo, e o substrato após crescimento vegetativo de 35 dias.

5.3.2.1 Diferenças espectrais entre os substratos previamente ao crescimento fúngico.

Conforme Figura 11, foram observadas diferenças espectrais entre as intensidades na região de 1460 cm^{-1} e 1650 cm^{-1} , evidenciadas pelo quociente entre as absorvâncias $1650/1460\text{ cm}^{-1}$, respectivamente de 0,68 e 1,26, para os espectros das amostras dos substratos não compostados e compostados (Tabela 2).

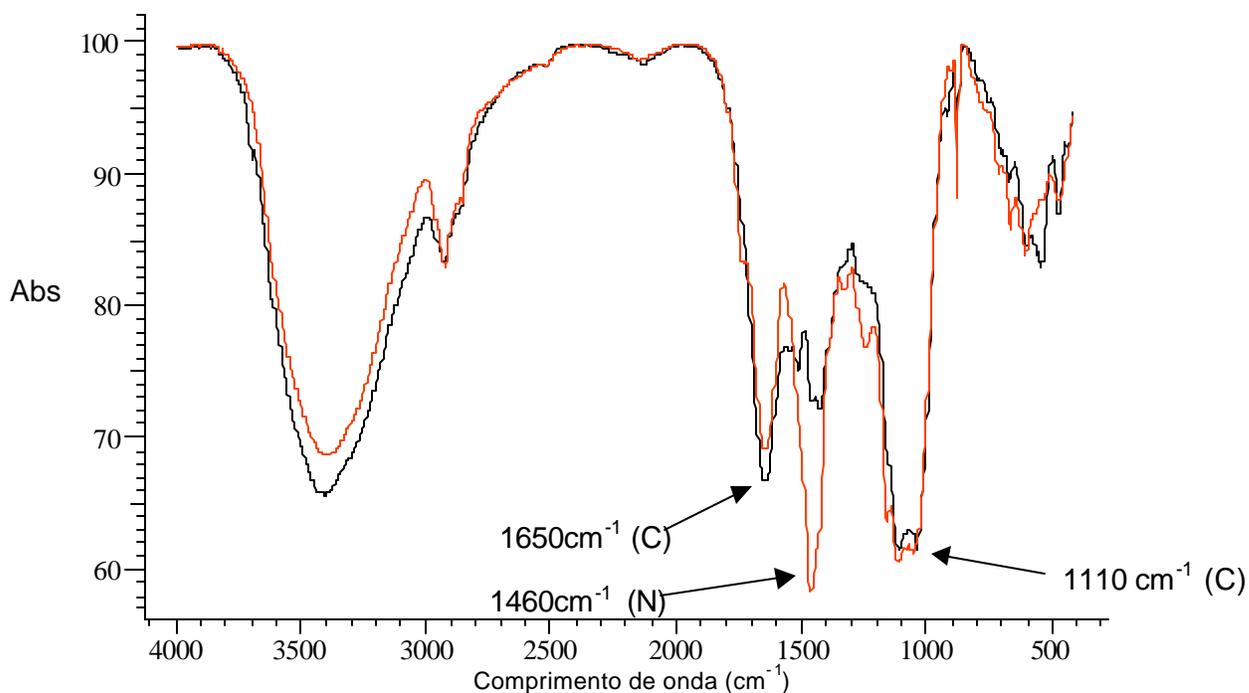


Figura 11. Espectros de FTIR mostrando diferenças iniciais entre substratos esterilizados compostado (N - preto) e não compostado (C - vermelho) previamente a colonização

O substrato compostado apresentou um conteúdo de grupamentos alifáticos, responsáveis pela absorção a 1460 cm^{-1} significativamente superior. As bandas de absorção em tal região podem ser produzidas por ação de enzimas microbianas

(SHARMA & KILPATRICK, 2000). É importante indicar que o substrato compostado demanda intensa atividade microbiológica durante sua preparação.

Tabela 2. Quocientes entre as absorvâncias das principais bandas observadas nos espectros FTIR das amostras obtidas antes (inicial) e após (35 dias) o crescimento vegetativo de *A. brasiliensis* (final) nos respectivos substratos compostado e não compostado

Quociente entre abs.	Compostado		Não compostado	
	Inicial	Final	Inicial	Final
1650/1460	1,26	2,30 (2x)	0,68	2,83 (~4x)
1650/1100	0,82	1,23 (1,5x)	0,73	1,62 (~2x)
1460/1100	0,53	0,64 (1,15x)	1,07	0,57 (~-2x)
1100/610	2,85	2,20	-	-
1100/2925	-	-	2,69	3,05

5.3.2.2. Modificações estruturais no substrato compostado submetido a 35 dias de degradação por *A. brasiliensis*.

As principais alterações espectrais em substrato compostado e pasteurizado são apresentados na Figura 12. Os valores das razões entre as intensidades das absorvâncias das várias bandas são apresentados na Tabela 2. O aumento da respectiva razão para as bandas das regiões de 1650/1460 cm^{-1} ficou claramente evidenciado pelos valores dos pontos inicial e final, 1,26 e 2,30.

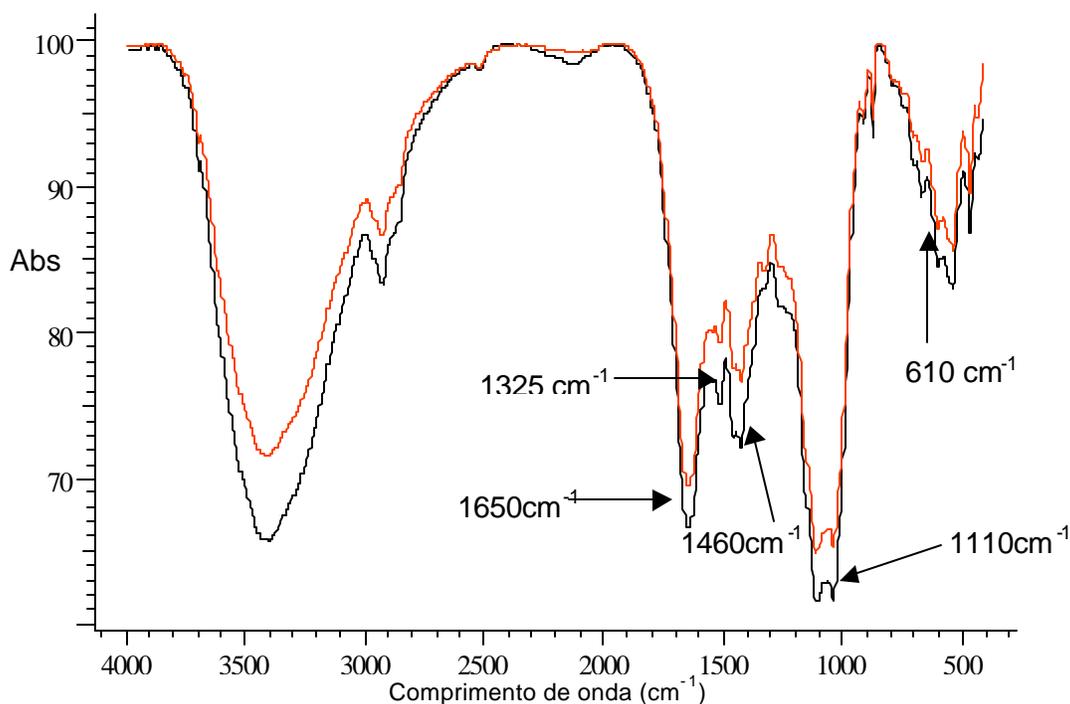


Figura 12. Espectros de FTIR de substrato compostado e pasteurizado durante crescimento vegetativo de *Agaricus brasiliensis* Inicial (Preto) e Final (Vermelho)

Em 1650 cm^{-1} , banda que pode ser referente os grupamentos carbonílicos, houve um aumento em torno de 50% (Tabela 2), durante o período de crescimento vegetativo de *A. brasiliensis* (35 dias), resultado também verificado por Chen & al. (2000) durante o crescimento de *A. brunnescens*. Adicionalmente, outros estudos com fungos basidiomicetos relativos a degradação de lignina e seus derivados, incluindo aqueles presentes em efluentes industriais, também têm demonstrado o mesmo tipo de modificação química. Nestes casos, este tipo de alteração tem sido relacionada à ação de enzimas lignolíticas, tais como lacase (SOARES & DÚRAN, 1995).

Por outro lado, o surgimento da banda na região 1325 cm^{-1} , no espectro da amostra final (após o crescimento do fungo), pode ser relativa à presença de

grupamentos siringil, típicos da estrutura de lignina. Tal evidencia, se confirmada, pode indicar um aumento do conteúdo relativo destes grupos químicos, ou seja, representa uma degradação preferencial de outros grupamentos componentes da estrutura da lignina como os grupamentos guaiacil, possivelmente através da ação da lacase (FAIX et al. 1985).

Neste ponto, é interessante ressaltar a necessidade da realização de outras análises por diferentes metodologias, como por exemplo, pirólise seguida de cromatografia gasosa/espectroscopia de massa, a fim de complementar as informações necessárias para a identificação inequívoca da presença de tais grupamentos, como realizado por Chen et al. (2000).

De outra forma, tal comportamento poderia ser explicado pela degradação preferencial de carboidratos em relação à de lignina, como também observado por Chen et al. (2000). Estes resultados estão em concordância com aqueles obtidos na dosagem química de lignina no substrato compostado, como descrito anteriormente (seção 5.3.1).

A redução na intensidade das bandas na região em 1100 cm^{-1} ocorreu em função do consumo de carboidratos (Figura 12). Tal afirmação é evidenciada pela redução na razão entre as bandas 1100 cm^{-1} e 610 cm^{-1} de 2,85 para 2,20, respectivamente. Adicionalmente, ressalta-se que a utilização da banda em 610 cm^{-1} para efetuar o cálculo de tal razão ocorreu em função desta banda não ter tido variação em ambos os espectros (Inicial e final).

5.3.2.3. Modificações estruturais no substrato não compostado submetido a 35 dias de degradação por *A. brasiliensis*

Em substrato não compostado e esterilizado, as comparações foram realizadas levando-se em consideração os espectros inicial e final (Figura 13). A partir da comparação das razões entre as intensidades das absorbâncias das respectivas bandas (Tabela 2), constatou-se um incremento na intensidade da região 1650 cm^{-1} relativo a grupos aromáticos. Para este substrato, as considerações feitas anteriormente para bandas nesta intensidade, para substrato compostado (seção anterior), também são válidas, bem como reforçam os argumentos utilizados anteriormente sobre as alterações em função da elevada atividade de lacase em substrato não compostado, uma vez que neste caso, os níveis de atividade de lacase observados são ainda mais elevados. Coerente com esta afirmação é o fato de que ocorreu um aumento acentuado nos valores da razão entre as absorbâncias para as bandas $1650/1460\text{ cm}^{-1}$, entre as amostras inicial e final do crescimento vegetativo do fungo, respectivamente de 0,68 e 2,83.

Observou-se ainda, a redução na região de 1460 cm^{-1} , devido à provável diminuição do conteúdo relativo de grupamentos alifáticos, além do aumento significativo na intensidade relativa da banda em 1325 cm^{-1} , a qual, como já mencionado, pode ser referente aos grupamentos siringil das cadeias laterais da lignina. No entanto, existe a necessidade de utilização de métodos analíticos mais eficientes para comprovar a degradação preferencial de determinadas estruturas do polímero de lignina. Por outro lado, pode-se confirmar que tais alterações que contribuíram para o surgimento da banda em 1325 cm^{-1} , foram em função da atividade de lacase (SOARES & DÚRAN, 1995).

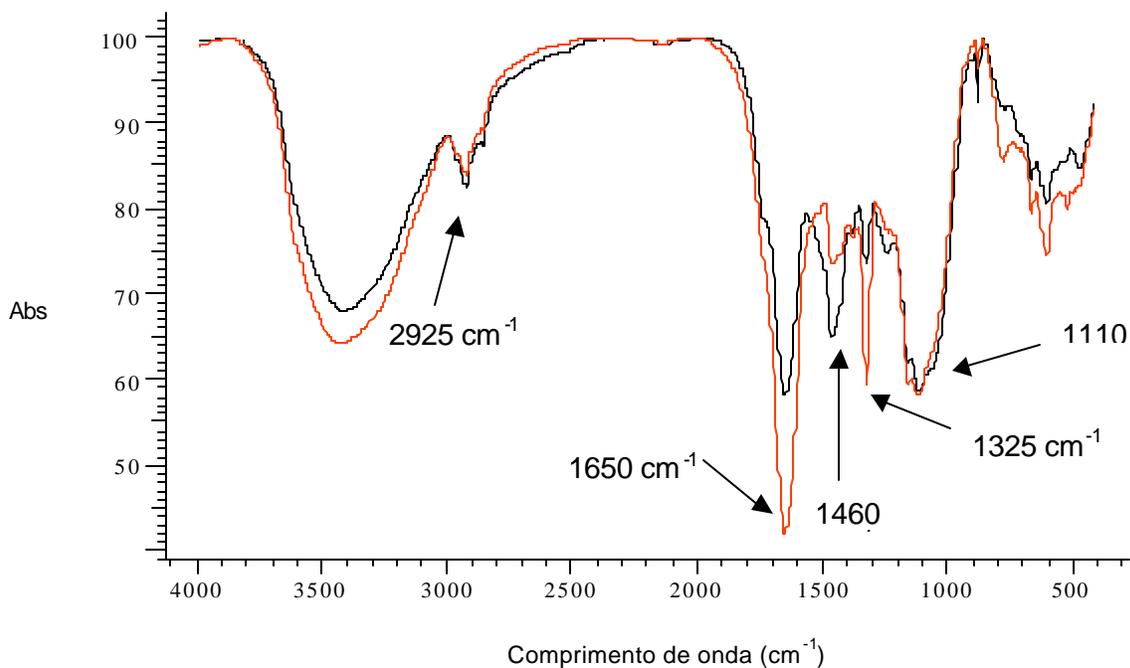


Figura 13. Espectros de FTIR de substrato não compostado e esterilizado durante crescimento vegetativo de *Agaricus brasiliensis* Inicial (preto) e Final (Vermelho)

Em relação aos carboidratos, representados pela região de 1100 cm^{-1} , notou-se que as bandas não demonstraram alterações significativas (Figura 13). Essa afirmação é evidenciada na tabela 2, onde são apresentadas as razões entre as bandas $1100/2925\text{ cm}^{-1}$ que demonstram um leve incremento (de 2,69 para 3,05 inicial e final, respectivamente) evidenciando que não houve o consumo efetivo de carboidratos e sim um leve acréscimo em suas quantidades relativas, provavelmente em função da forma que se encontravam esses polímeros, fato que acentuou o consumo energético pelo fungo. Desta forma, confirmou-se a “preferência” do fungo por substratos compostados. Deve-se ressaltar que a utilização da banda na região de 2925 cm^{-1} para fins de cálculo da razão entre $1100/2925\text{ cm}^{-1}$ ocorreu em função desta se apresentar constante nos dois espectros (inicial e final).

5.3.3. Acidificação dos substratos (Potencial Hidrogeniônico - pH)

As variações de pH nos substratos compostado e não compostado apresentaram perfis semelhantes, observando-se valores decrescentes ao longo do crescimento vegetativo. As alterações foram em valores de 6,9 para 5,4 em substrato compostado e 7,35 para 6,1 em substrato não compostado (Figura 14), ou seja, houve acidificação significativa dos substratos de cultivo.

Este comportamento foi diferente daquele observado por Bonnen et al. (1994), durante o crescimento de *A. brunnescens* em substrato compostado, onde os valores de pH permaneceram em torno de 6.0 durante o ciclo de cultivo, variando de 5.8 a 6.2, ou seja, a variação de pH foi discreta. Variações mais efetivas nos níveis de pH em relação a *A. brunnescens* podem indicar diferença na capacidade degradativa entre espécies e/ou estirpes, já que tais perfis podem ser atribuídos à geração de ácidos orgânicos, resultantes da degradação de açúcares consumidos como fonte de carbono para o crescimento vegetativo, embora não possa ser ignorada a oxidação da lignina que acarreta na formação de derivados ácidos (SCHISLER, 1982).

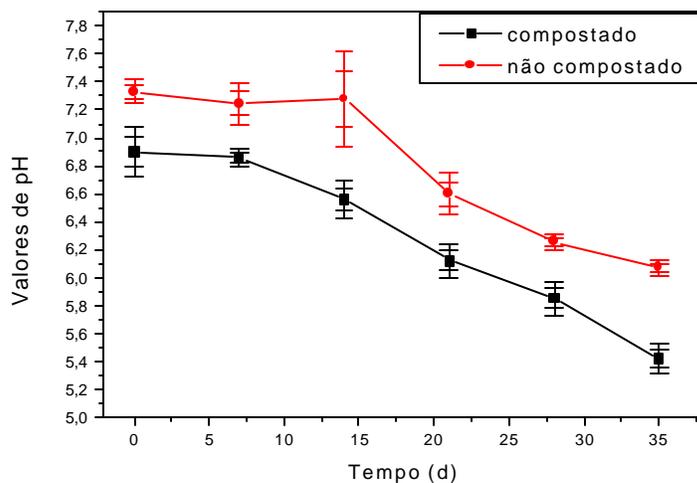


Figura 14. Valores de pH durante o crescimento vegetativo de *A. brasiliensis* em substrato compostado e não compostado durante 35 dias

Neste contexto, a adição de corretivos (gesso e CaCO_3) durante os processos de preparação de ambos substratos proporciona melhor textura, prevenindo a formação de água livre, bem como ameniza a acidificação do meio, através do papel tamponante representado pelo CaCO_3 .

5.3.4. Análises elementares

As análises realizadas sobre o conteúdo de carbono e nitrogênio em ambos os substratos durante o crescimento vegetativo de *A. brasiliensis* permitiram concluir que a relação C/N após 35 dias em substrato compostado reduziu-se de 20/1 para 17/1 e em substrato não compostado elevou-se de 25/1 para 27/1 (Tabela 3).

O consumo de carbono evidencia que a obtenção de nutrientes em substrato compostado foi mais eficiente, nesta condição (Tabela 3) e responsável pela redução da relação C/N. Tal afirmação pode ser também sustentada pela formação de maior biomassa neste substrato.

Tabela 3. Alterações na composição entre carbono, nitrogênio e matéria orgânica em substrato compostado e não compostado durante 35 dias de crescimento de *Agaricus brasiliensis*

Elementos / tempo		Inicial	15 dias	35 dias
Carbono	Compostado	37.2	35.9	35
	% Não compostado	44.7	44.2	44.3
Nitrogênio	Compostado	1.81	1.7	1.97
	% Não compostado	1.76	1.48	1.63
Mat. Orgânica	Compostado	66,96	64,62	63
	% Não compostado	80,46	79,56	79,74
Relação C/N	Compostado	20/1	-	17/1
	Não compostado	25/1	-	27/1

Com relação ao conteúdo de nitrogênio, a quantidade consumida pode ter sido utilizado efetivamente para formação de proteína extracelular, diferentemente do substrato compostado, onde houve o aumento de biomassa e redução da relação C/N, evidenciando consumo mais efetivo de carbono (Tabela 3) durante todo o período estudado.

Esses resultados esclarecem a redução na concentração relativa de lignina (Figura 10) e diminuição na relação C/N (Tabela 3), ou seja, quando há consumo mais efetivo de nitrogênio.

Notadamente em substrato compostado houve o consumo em proporções mais elevadas de matéria orgânica, fato que suporta o incremento no conteúdo relativo de lignina e maior formação de biomassa. Entretanto, outras análises, como

o conteúdo de cinzas, seriam necessárias realizar de forma a evidenciar com mais clareza a constituição de tais materiais.

5.4 CONCLUSÕES

- O cultivo de *A. brasiliensis*, durante o crescimento vegetativo, aumentou o conteúdo relativa de lignina no substrato compostado em função do consumo preferencial de outros constituintes de mais fácil degradação. Em substrato não compostado o conteúdo de lignina diminuiu possivelmente para propiciar maior acessibilidade aos polissacarídeos de fácil degradação.
- A relação C/N do substrato compostado diminuiu, ao contrário do substrato não compostado, em que a relação aumentou.
- Os polissacarídeos são mais consumidos por *A. brasiliensis* durante o cultivo no substrato compostado.
- O substrato não compostado inicialmente apresentou concentração de substâncias aromáticas maior do que no substrato compostado.
- Nos dois substratos houve um aumento no conteúdo de substâncias aromáticas (1650 cm^{-1}) e uma redução no conteúdo de alifáticos (1460 cm^{-1}).
- Em substratos compostados e não compostados o pH tendeu à acidificação.
- O consumo de matéria orgânica foi maior no substrato compostado do que naquele não compostado, implicando em maior formação de biomassa.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Agaricus brasiliensis possui o perfil enzimático característico de um fungo de podridão branca (“White rot fungi”), organismos capazes de degradar a lignina. Esta capacidade, no entanto, se mostrou facultativa em função da composição de cada substrato. Quando o fungo cresceu em substrato que disponibilizou o carbono na forma mais acessível, substratos compostados, ocorreu a degradação seletiva destes, em detrimento da degradação da lignina. A ação enzimática seletiva sobre os açúcares e sobre a matéria orgânica, em relação a outros polímeros, ocasionou um incremento no teor relativo de lignina em relação ao material total. Tal fato contribuiu para a redução da relação entre o carbono e o nitrogênio.

Por outro lado, quando o carbono não se encontrava na forma mais acessível, no caso do substrato não compostado, o fungo mobilizou enzimas lignolíticas (principalmente a lacase, sobretudo a partir do 15º dia) as quais demandaram, para sua biossíntese, um maior gasto energético. Estas enzimas, além de possibilitarem o acesso a fontes de carbono mais adequadas, ocasionaram uma redução na quantidade relativa de lignina no substrato. Como resultado, verificou-se o consumo mais efetivo de nitrogênio, um aumento da relação C/N e uma redução no crescimento miceliano. Por tais razões a produção de biomassa, neste substrato, foi inferior aquela do substrato compostado.

O substrato compostado propiciou, portanto, condições mais adequadas para o crescimento vegetativo de *A. brasiliensis*. Já no substrato não compostado, obteve-se a menor biomassa vegetativa fato que não descarta o potencial desta estratégia como alternativa para o cultivo de *A. brasiliensis*. Apenas, a formulação utilizada neste trabalho, particularmente a relação C/N e ainda a própria composição

química dos componentes de carbono, não se mostraram adequados ao crescimento vegetativo de *A. brasiliensis*.

Diversas estratégias poderão, entretanto, ser experimentadas para viabilizar o uso de formulações à base de palmeira real, em cultivo axênico. A primeira consiste em efetuar um ajuste na formulação, em função da relação C/N, com suplementos nitrogenados mais adequados, haja visto que diversas pesquisas vêm demonstrando o potencial dos substratos axênicos, altamente suplementados, para obtenção de maiores produtividades.

A segunda possibilidade envolveria o tratamento do material volumoso, principalmente, aquele com elevado conteúdo de lignina, fator de restrição às fontes de carbono, a tratamentos prévios, químicos ou biológicos, a fim de provocar uma de-lignificação parcial. No caso de se considerar a via biológica, seria viável o cultivo de *A. brasiliensis* no substrato residual de *Pleurotus*, fungo com capacidade elevada de degradação de lignina, além de ser também um fungo comestível e medicinal de interesse comercial. Por último, e como terceira alternativa, seria recomendável a realização de uma pré-fermentação do material volumoso, previamente ao processo de esterilização. Desta forma poderia ser facilitada a degradação parcial da lignina, pela microbiota nativa, submetendo-se assim este material a um processo de compostagem tradicional, porém de curta duração.

Entretanto, previamente à utilização de quaisquer tipos de substratos em nível comercial, ressalta-se a necessidade de estudos mais completos, incluindo-se a fase de produção das frutificações. É importante ressaltar que o presente trabalho disponibilizou diversas metodologias para o diagnóstico da qualidade dos substratos e da capacidade de crescimento de *A. brasiliensis*, visando à obtenção maximizada de biomassa reprodutiva.

Finalmente, os resultados obtidos forneceram ferramentas técnicas e científicas para efetuar o monitoramento do crescimento de *A. brasiliensis*, atualmente em evidência pelo interesse comercial, tanto em substratos de cultivo tradicional como usando-se estratégias alternativas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGENDA 21, Secretaria da Agricultura e Meio Ambiente – SAMA. Governo de Joinvile - SC. 266p. 1997.

AN Jaraguá. Disponível em <http://www.an.com.br>. Acesso em: 01 jun 2003.

Attenuated Total Reflectance Fourier Spectroscopy (ATR/ FTIR) Disponível em www.micromem analytical.com. Acesso em: 07 set 2004.

ANDER, P. & ERIKSSON, K. E. The importance of phenol oxidase activity in lignin degradation by the white rot fungus *Sporotrichum pulverulentum*. **Archives of Microbiology**, 109, 1-8, 1976.

BAIYLEY, M. J., BYELI, P., POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for xylanase activity, **Journal of Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 257-270, 1992.

BARAJAS-ACEVES, M.; HASSAN, M.; TINOCO, R. & VAZQUEZDUHALT, R. Effect of pollutants on the ergosterol content as indicator of fungal biomass. **Journal Microbiology Methods**, 50, 227 – 236, 2002.

BOLLAG, J.-M. & LEONOWICZ, A. Comparative studies of extracellular fungal laccases. **Applied Environmental Microbiology**. 48, 849-854, 1984.

BRAGA, G. C.; EIRA, A. F.; CELSO, P. G. & COLAUTO, N. B. **Manual do cultivo de *Agaricus blazei* Murril “Cogumelo-do-Sol”**. FEPAF – Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais, Botucatu, SP. 44p. 1998.

BRAGA, G. C. & EIRA, A. F. Manual de cultivo de “champignon”. Unesp. Fundação de estudos e pesquisas agrícolas e florestais. Botucatu-SP.1998.45p.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal. Biochemistry**.p. 248-254, 1976.

BUSWELL, J. A.; CAI, Y. J.; CHANG, S. T.; PEBERDY, J. F.; FU, S. Y. e YU, H. -S. Lignocellulolytic enzyme profiles of edible mushroom fungi. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.12, p. 537-542, 1996.

BONNEN, A.M. ANTON, L.H. & ORTH, A.B. Lignin-degrading enzymes of the commercial button mushroom, *Agaricus bisporus*. **Applied and Environmental Microbiology**, 60. 960-965, 1994.

BUSWELL, J. A.; CAI, Y.J.; CHANG, S.T. Fungal- and substrate-associated factors affecting the ability of individual mushroom species to utilize different lignocellulosic growth substrates. Chapter 15 in: CHANG, S.T.; BUSWELL, J.A.; CHIU, S. **Mushroom Biology and Mushroom Products**. The Chinese university press. Hong Kong. 370p. 1993.

CAI, Y. J.; CHAPMAN, S.J.; BUSWELL, J.A.; CHANG, S.T. Production and distribution of endoglucanase, cellobiohydrolase, and α -glucosidase components of the cellulolytic system of *Volvariella volvacea*, the edible straw mushroom. **Applied and Environmental Microbiology**, 553-559, 1999.

CAI, J. Y.; BUSWELL, J. A. & CHANG, S. T. α -glucosidase components of the cellulolytic system of the edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. **Enzyme and Microbial Technology**, 22: 122-129, 1998.

CAMPBELL, A. C. & SLEE, R. W. Commercial cultivation of Shiitake in Taiwan and in Japan. **Mushroom & Tropics**, 7, 127-137, 1987.

CHANG, S.T.; BUSWELL, J.A.; CHIU, S. Mushroom biology and mushroom products. The Chinese university press. Hong Kong. 370p. 1993.

CHEN, Y.; CHEFETZ, B.; ROSARIO, R.; VAN HEEMST, J.D.H.; ROMAINE, C.P. & HATCHER, P.G. Chemical nature and composition of compost during mushroom growth. **Compost and Science & Utilization**, v. 8, No. 4, p. 347-359, 2000.

DING, S.; GE, W.; BUSWELL, J.A.; Endoglucanase I from edible straw mushroom, *Volvariella volvacea*. Purification, characterization, cloning and expression. **Euro Journal Biochemistry**, 268. 5687-5695, 2001.

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

EIRA, A. F. Cultivo do cogumelo medicinal. Ed. Aprenda fácil. São Paulo. 395p. 2003.

- EIRA, A. F. Cultivo de cogumelos (compostagem, condução e ambiente). Anais da **III Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico**, Mogi das Cruzes, SP. 83-95 p. 2000.
- FAIX, O. Investigation of lignin polymer models (DHP's) by FTIR spectroscopy. **Holzforschung**, (5) 40. 273-280, 1986.
- FAIX, O.; MOZUCH, M. D. & KIRK, T. K. Degradation of gymnosperm (Guaiacyl) vs. Angiosperm (Syringyl/Guaiacyl) lignins by *Phanerochaete chrysosporium*. **Holzforschung**, 39: 203-208, 1985.
- FERREIRA, J. E. F. Produção de cogumelos. Livraria e editora agropecuária Ltda, Guaíba – RS. 136p. 1998.
- FTIR Spectroscopy. Disponível em www.nelsonlabs.com, Acesso em: 20 dez 2004.
- GALLIANO, H.; GAS, G.; SERIS, J.L. & BOUDET, A.M. Lignin degradation by *Rigidoporus lignosus* involves synergistic action of two oxidizing enzymes: Mn peroxidase and laccase. **Enzyme and Microbial Technology**, 13, 478-482, 1991.
- GIVEN, P. H.; SPACKMAN, W.; PAINTER, P.C.; RHOADS, C.A.; RYAN, N. J.; ALEMANY, L. & PUGMIRE, R. J. The fate of cellulose and lignin in peats: an exploratory study of the input to coalification. **Organic Geochemistry**, 6: 399-407, 1984.
- GERRITS, J.P.G. Nutrition and compost. In: **The cultivation of mushrooms**. First English edition, 1988, 29-72.
- HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected White-rot fungi: production and role in lignin degradation. **FEMS Microbiol Rev.**, 13, 125-135, 1994.
- HIROTANI, M.; SAI, K.; ASAMI, K.; YOSHIHISA, A.; AND TAKAFUMI, Y. Biosynthetic studies on blazeispirane and protoblazeispirane derivatives from the cultured mycelia of the fungus *Agaricus blazei*. **Tetrahedron**, 58: 10251-10257, 2002.
- IYAMA, K.; STONE, B.A. & MACAULEY, B.J. Compositional changes in compost during composting and growth of *Agaricus bisporus*. **Applied Environmental Microbiology**, 60, 1538-1546, 1994.

- INBAR, Y.; CHEN, Y. & HADAR, Y. Solid-state Carbon-13 Nuclear magnetic resonance and infrared spectroscopy of composted organic matter. **Soil Science Society American Journal**, 53, 1695-1701, 1989.
- KAKEZAWA, M.; MINURA, A.; TAKAHARA, Y. Application of two-step composting process to rice straw compost. **Soil Science and Plant Nutrition**, 38(1), 43-50, 1990.
- KEREM, Z. & HADAR, Y. Effect of manganese on lignin degradation by *Pleurotus ostreatus* during solid-state fermentation. 59:12, 4115-4120, 1993.
- KEREM, Z.; FRIESEM, D. & HADAR, Y. Lignocellulose degradation during solid-state fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and environmental microbiology**, 58 (4): 1121-1127, 1992.
- KOPYTOWSKI FILHO, J. Relação C/N e proporção de fontes nitrogenadas na produtividade de *Agaricus blazei* Murrill e poder calorífico do composto. 2002. 96p. (Dissertação de Mestrado). UNESP, Botucatu, SP.
- KÜES.V & LIU. Y. Fruiting body production in basidiomycetes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 54: 141-156, 2000.
- KUWAHARA, M.; GLENN, J. K.; MORGAN, M. A.; GOLD, M. H. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**, v. 169, n. 2, p.247-250, 1984.
- LAW, W.M ;LAU, W.N.; LO, K.L.; WAI, L.M. & CHIU, S.W. Removal of biocide pentachlorophenol in water system by the spent mushroom compost of *Pleurotus pulmonarios*. **Chemosphere**, 52. 1531-1537, 2003.
- MACAULEY, B. J. & BETHEL, M. Ergosterol as an indicator of biomass of *Agaricus brunnescens* mycelium grown under varying cultural conditions. **Fourth International Mycological Congress**. Regenburg, Germany. Abstracts: 331.1990
- MANDELS, M.; ANDREOTTI, R.; ROCHE, C. Measurement of saccharifying cellulase. **Biotechnology Bioengineering**, v. 6, p. 21-33, 1976.

- MATCHAM, S.E; JORDAN, B.R. & WOOD, D.A. Estimation of fungal biomass in a solid substrate by tree independent methods. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 21: 108-112, 1985.
- MAYER, A.M. & STAPLES, R.C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**. 60, 551-565, 2002.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of sugar reducing. **Analytical Chemistry**, 31, 424-426, 1959.
- MOL, P. C. Hyphal wall elongation during expansion growth of the common mushroom (*Agaricus bisporus*). **Rijksuniversiteit Groningen**, 117p, 1989.
- MOLENA, O. O moderno cultivo de cogumelos. Ed. Nobel. 170p. 1986.
- MOLIN, P.; P. GERVAIS, J. P. LEMIÄRE AND T. DAVET. Direction of hyphal growth: a relevant parameter in the development of filamentous fungi. **Research in Microbiology** v. 143,8. 777-784, 1992.
- MUDGETT, R. E. Solid-state fermentation. Chapter 7 in: DEMAIN. A. L. & SOLOMON, N. A. **Manual of industrial microbiology and biotechnology**, Washington. 486p. 1986.
- NASCIMENTO, J. S & EIRA, A. F. Occurrence of the False Truffle (*Diehliomyces microsporus* Gilkey) and damage on the Himematsutake Medicinal Mushroom (*Agaricus brasiliensis* S. Wasser et al.). **International Journal of Medicinal Mushroom**, 5, 87-94, 2003.
- NEVES, M. A. Caracterização ecológica, fisiológica e genética de *Agaricus blazei* Murrill através de estirpes provenientes de diferentes empresas de produção de cogumelos. 2000. 69p. (Dissertação de Mestrado). UFSC, Florianópolis, SC.
- NOBLE, R.; GROGAN, H.M. & ELLIOT, T. Variation in morphology, growth and frutification of isolates in the *Agaricus subfloccosus* complex. **Mycological Research**, 99 (12): 1453-1461, 1995.
- OKEKE, B.C.; PATERSON, A.; SMITH, J.E. & WATSON-CRAIK, I.A. The relationship between phenol oxidase activity, soluble protein and ergosterol with growth of *Lentinus* species in oak sawdust logs. **Applied Microbiology and Biotechnology** 41, 28-31, 1994.

- PANDEY, K. K. & PITMAN, A. J. FTIR studies of the changes in wood chemistry following decay by brown-rot and white-rot fungi. **International Biodeterioration & Biodegradation**. 52, 151-160, 2003.
- PIET, W.J; DE GROOT; BASTEN, D.E.J.W; SONNEMBERG, A.S.M; VAN GRIENSVEN L.J.L.D; VISSER, J. & SCHAAP, P.J. An Endo-1,4- α -xylanase-encoding gene from *Agaricus bisporus* is regulated by compost- specific factors. **Journal Molecular Biology**, 277, 273-284, 1998.
- REID, I. D. Solid state fermentation for biological delignification. **Enzyme and Microbial Technology**, 11: 786-803, 1989.
- RÜTTIMANN, C.; SCHWEMBER, L.; SALAS, D.; CULLEN, D. & VICUÑA. Lignolytic enzymes of the white-rot basidiomycetes *Phlebia brevispora* and *Ceriporiopsis subvermispora*. **Biotechnology Applied Biochemistry**, 16, 64-76, 1993.
- SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, J. E. Research update on growing Portobello and *A. blazei* on non-composted substrates. **IX Annual Specialty Mushroom Workshop**, Pennsylvania State University, PA. 1999.
- SANTOS, V. M. C. S. Contribuição ao estudo da produção de *Pleurotus* spp. Dissertação de Mestrado. UFSC. Florianópolis, SC. 128p. 2000.
- SAVOIE, J-M; BRUNEAU, D. & MAMOUN, M. Resource allocation ability of wild isolates of *Agaricus bisporus* on conventional mushroom compost. **FEMS Microbiol ecology**. 21: 285-292, 1996.
- SEITZ, M. L.; SUER, D.B.; BURROUGHS, H.E; HUBBARD, J.D. Ergosterol as a measure of fungal growth. **Phytopathology**, 69: 1202-1203, 1979.
- SHARMA, H. S. S. & KILPATRICK, M. Use of Near-Infrared Spectroscopy to predict potential mushroom (*Agaricus bisporus*) yield of phase II compost. **Applied Spectroscopy**, v 54: 1, 44-47, 2000.
- SCHISLER, L.C.; Biochemical and mycological aspects of mushroom composting. **Penn State Handbook for Commercial Mushroom Growers**, p. 3-14, 1982.
- SOARES, C. H. L. & DÚRAN, N. Biodegradation of chorolignin and lignin-like compounds contained in E-Pulp bleaching effluent by fungal treatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 95, 135-149, 2001.

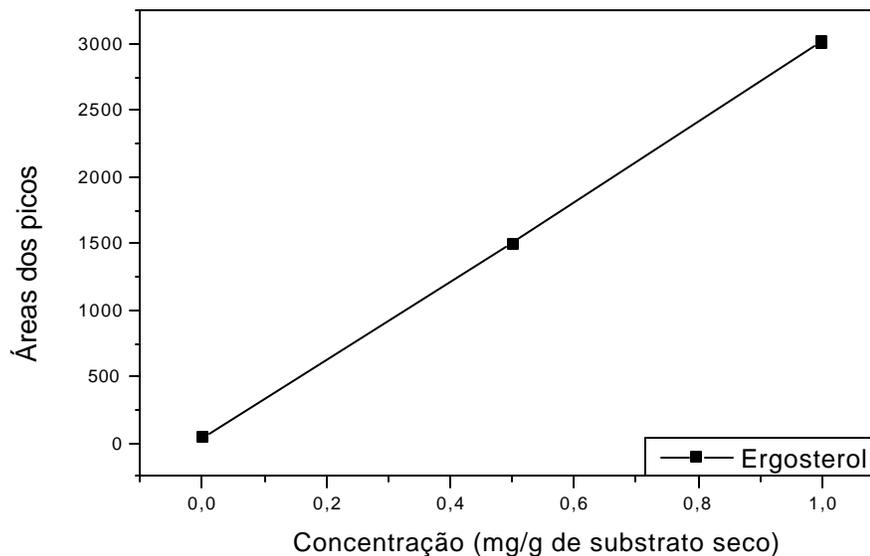
- SOARES, C. H. L. & DÚRAN, N. FT-IR spectroscopy of E₁-pulp blanching effluent degraded by basidiomycete fungi. In: Proceedings of Fourth Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components. 1-4, V.5, 1995.
- STAMETS, P. Growing gourmet and medicinal mushrooms. 3^a ed. Ten Speed Press. Berkeley, California. 592p. 2000.
- STRAATSMA, G.; DI LENA, G.; OLIJNSMA, T.W.; OP THE CAMP, H. J. M.; & VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. Laboratory media for measuring growth parameters of *Agaricus bisporus* mycelium as influenced by *Scytalidium thermophilum*. **Cultivated Mushroom Research**, 1: 1-6, 1993.
- STURION, G. L. Utilização de folha de bananeira como substrato para o cultivo de cogumelos *Pleurotus* spp. Dissertação de mestrado. USP. Piracicaba, SP. 147p. 1994.
- TAKATU, T.; KIMURA, Y; OKUDA, H. Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action. **Journal Nutrition**, 131(5): 1409-1413, 2001.
- TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNGN, H. & VOLKWEISS, S.J. Análise de solo, plantas e outros materiais. 2^o ed. Departamento de solos da faculdade de Agronomia do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 174p. 1985.
- TIEN, M. & KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium* purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. **Proc. Natl. Acadademy Science**, v.81, p.2280-2284, 1984.
- TILL, O. Champignonkultur auf sterilisiertm naehrsubstrat und die wiederverwendung von adgetragenen compost. **Mushroom Science**, 5: 127 -133, 1962.
- TONINI, R. C. G. Estudo da viabilidade de utilização da bainha mediana de palmito (*Euterpe edulis*) como substrato para cultivo de *Lentinula edodes* (Beck.) Pegler. Dissertação de mestrado. FURB. Blumenau. Santa Catarina. 153p. 2004.
- TOUMELA, M.; VILKMAN, M.; HATAKKA, A. & ITÄVAARA. Biodegradation of lignin ina a compost environment: a review. **Bioresource Technology**. 72, 169-183, 2000.

- VÁLAZQUEZ-CEDEÑO, M.A.; MATA, G.; SAVOIE, J.M. Waste reducing cultivation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus pulmonarius* on coffee pulpe changes in the production of some lignocellulolytic enzymes. **Word Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.18, n.3. 201-207 (7), 2002.
- VILLAS-BÔAS, S.G., ESPOSITO, E. AND MITCHELL, D.A. Microbial conversion of lignocellulosic residues for production of animal feeds. **Animal Feed Science Technology**, 98:1-12, 2002.
- YANG et al. Lignocellulose degradation during growth of fungus *Pholiota nameko* in: CHANG, S.T.; BUSWELL, J.A.; CHIU, S. Mushroom biology and mushroom products. The Chinese university press. Hong Kong. 370p. 1993.
- WANG, Z.; CHEN, T.; GAO, Y.; BREUIL, C. & HIRATSUKA, Y. Biological degradation of resin acids in wood chips by wood-inhabiting fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, 61(1): 222-225, 1995.
- WASSER, S. P.; DIDUKH, M.Y.; AMAZONAS, M. A. L.; NEVO, E.; STAMETS. P.; EIRA, A. F. Is a Widely Cultivated Culinary-Medicinal Royal Sun Agaricus (the Himematsutake Mushroom) Indeed *Agaricus blazei* Murrill? **International Journal of Medicinal Mushroom**, v.4, p.297-90, 2002.
- WOOD, D. A. & GOODENOUGH, P. W. Fruiting of *Agaricus bisporus*: changes in extracellular enzyme activities during growth and fruiting. **Arch. Microbiology**, 114, 161-165, 1977.
- WOOD, D. A. Inactivation of extracellular laccase during fruiting of *Agaricus bisporus*. **Journal of General Microbiology**, 117, 339-345, 1980.

ANEXO A

Curvas padrão e protocolos das avaliações enzimáticas

ANEXO A



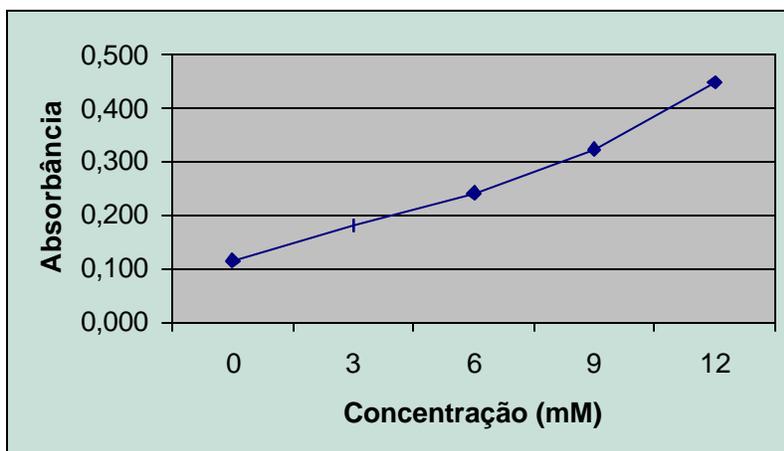
A1. Curva padrão em função da concentração de ergosterol e área dos picos em cromatograma de HPLC

CURVA-PADRÃO DE GLICOSE (Concentrações)

- Preparar solução - mãe de glicose (30 μ M ou 5,4g/L)

Tubo	Conc. final glicose (μ M)	Volume sol. - mãe (mL)	Volume tampão (mL)	Volume DNS (mL)
0	0	0	1,0	1,0
1	0,3	0,01	0,99	1,0
2	0,6	0,02	0,98	1,0
3	1,5	0,05	0,95	1,0
4	3,0	0,10	0,90	1,0
5	4,5	0,15	0,85	1,0
6	6,0	0,20	0,80	1,0
7	7,5	0,25	0,75	1,0
8	9,0	0,30	0,70	1,0
9	10,5	0,35	0,65	1,0
10	12,0	0,40	0,60	1,0

- Misturar os compostos nas concentrações preparadas e ferver a mistura por 5 minutos;
- adicionar 8,0mL de água destilada aos tubos para completar 10mL;
- ler a 540nm



Curva padrão da Glicose

ENSAIO DE CELULASE

Mandels, M.; Andreotti, R.; Roche, C. Measurement of saccharifying cellulase. **Biotechnol Bioeng**, v. 6, p. 21-33, 1976.

Procedimento:

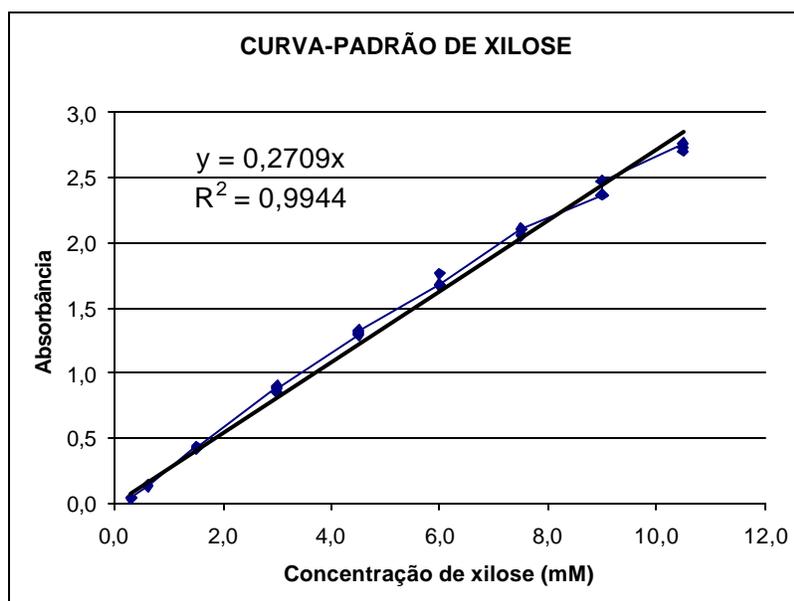
- Zerar o aparelho com água destilada;
- Cortar tiras de papel whatman número 1 (1x6cm), enrolar e colocar no fundo dos tubos de ensaio;
- PREPARO DO EXTRATO FÚNGICO:
- Em um erlenmeyer colocar 20mL de tampão citrato e 4g do substrato colonizado pelo fungo;
- Agitar por uma hora e filtrar.
- MISTURA DE REAÇÃO:
- Adicionar 2,5mL de extrato fúngico;
- Adicionar 2,5mL de tampão citrato Na 50mM pH4,8 e agitar;
- Transferir imediatamente após a agitação 1mL da mistura para um tubo de ensaio contendo 1mL de DNS (esse tubo será o branco);
- Incubar a 50°C por 4h;
- Após a incubação, transferir 1mL da mistura para três tubos de ensaio contendo 1mL de DNS e ferver por 5 minutos;
- Adicionar 8mL de água para completar 10mL;
- Ler em 540nm.

CURVA-PADRÃO DE XILOSE (Concentrações)

- Preparar solução - mãe de xilose (30 μ M)

Tubo	Conc. final xilose (μ M)	Volume sol. - mãe (mL)	Volume tampão (mL)	Volume DNS (mL)
0	0	-	1,0	1,0
2	0,6	0,02	0,98	1,0
3	1,5	0,05	0,95	1,0
5	4,5	0,15	0,85	1,0
6	6,0	0,20	0,80	1,0
7	7,5	0,25	0,75	1,0

- Misturar os compostos nas concentrações preparadas e ferver a mistura por 5 minutos;
- adicionar 18mL de água destilada aos tubos;
- ler a 540nm.



ENSAIO DE XILANASE

Bailey, M. J., Biely, P., Poutanen, K. Interlaboratory testing of methods for xylanase activity, **Journal of Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 257-270, 1992.

Procedimento:

- Zerar o aparelho com água destilada;
- PREPARO DO EXTRATO FÚNGICO:
 - Em um erlenmeyer colocar 20mL de tampão citrato e 4g do substrato colonizado pelo fungo;
 - Agitar por uma hora e filtrar.
- MISTURA DE REAÇÃO:
 - Adicionar 2,5mL de extrato fúngico;
 - Adicionar 2,5mL de tampão acetato Na 50mM pH5,3 e agitar;
 - Transferir imediatamente, após a agitação, 1mL da mistura para um tubo de ensaio contendo 1mL de DNS (esse tubo será o branco);
 - Incubar a 50°C por 20 minutos;
 - Após a incubação, transferir 1mL da mistura para três tubos de ensaio contendo 1mL de DNS e ferver por 5 minutos;
 - Adicionar 8mL de água;
 - Ler em 540nm.

ENSAIO DA LACASE (E.C. 1.10.3.2)

A atividade de lacase é determinada utilizando-se siringaldazina em misturas de reação (1mL) contendo 0,5mL de tampão acetato de sódio 0,1M (pH 5,0), 0,025mL de siringaldazina em metanol e 0,5mL de extrato fúngico. A oxidação da siringaldazina é medida pelo aumento na absorbância a 525nm. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μ mol de substrato por minuto. O branco para zerar o espectrofotômetro deve conter todos os reagentes exceto o substrato.

MANGANÊS PEROXIDASE - MnP (E.C. 1.11.1.13)

Kuwahara, M.; Glenn, J. K.; Morgan, M. A.; Gold, M. H. Separation and characterization of two extracellular H_2O_2 -dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**, v. 169, n. 2, p. 247-250, 1984.

A atividade de peroxidase dependente do íon Mn(II) é medida usando vermelho de fenol ($1,0 \text{ g.L}^{-1}$) como substrato ($\epsilon = 4.460 \text{ mol}^{-1}.\text{L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) de acordo com a metodologia descrita por Kuwahara *et al.* (1984). É adicionado em 500 μL do caldo enzimático, 100 μL de solução estoque de vermelho de fenol ($1,0 \text{ g.L}^{-1}$), 100 μL de lactato de sódio pH 4,5 (250 mmol.L^{-1}), 200 μL de albumina bovina (0,5%), 50 μL de sulfato de manganês (2 mmol.L^{-1}) e 50 μL de H_2O_2 (2 mmol.L^{-1}) em tampão succinato de sódio (20 mmol.L^{-1}) pH 4,5. A solução resultante será incubada por 15 minutos a 37°C e a reação será interrompida pela adição de 40 μL de NaOH (2 mol.L^{-1}). A absorvância é medida a 610 nm e uma unidade de MnP é definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μmol de vermelho de fenol/mL/minuto. Uma análise sem adição de sulfato de manganês deve ser realizada para garantir a dependência do manganês pela atividade peroxidase observada. O sulfato deve ser trocado por lactato de sódio.

LIGNINA PEROXIDASE - LiP (E.C. 1.11.1.14)

Tien, M. & Kirk, T. K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium* purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.81, p.2280-2284, 1984.

A lignina peroxidase é determinada pelo monitoramento em A₃₁₀ da formação de veratraldeído ($\epsilon = 9300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) através da oxidação de álcool veratrílico, de acordo com Tien & Kirk (1984). O caldo enzimático (0,5mL) será incubado com 0,5mL de H₂O₂ 2mM e 0,5mL de álcool veratrílico (D = 1,157g/mL) 10mM em 1mL de tartarato de sódio 0,125 M pH 3,0 a 37°C. Uma unidade enzimática será definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar de 1 μmol de álcool veratrílico a veratraldeído por minuto.

MÉTODO BRADFORD PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS SOLÚVEIS

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

Concentrações para a curva padrão:

Tubo	Vol. Sol. BSA (μ L)	Quantidade de proteína (μ g)	Volume de sol. NaCl (μ L)	Conc. de proteína (μ g/100mL)
0	0	0	1000	0
1	50	25	950	2,5
2	100	50	900	5,0
3	200	100	800	10,0
4	300	150	700	15,0
5	400	200	600	20,0
6	500	250	500	25,0

- Retirar 100 μ L e adicionar 1 mL de **azul de comassie** ;
- Os tubos devem ser lidos em A_{595} em no máximo 1 hora, por causa da instabilidade da ligação;
- Caso a concentração de proteína no ensaio exceda o limite superior da curva, deve-se diluir a amostra.

PROCEDIMENTO:

- Preparar extrato fúngico: 4g de substrato em 20mL de solução NaCl 0,15M;
- Em um ependorf colocar 0,1mL de extrato e 1mL de Azul de Comassie;
- Agitar em vórtex e esperar 5 minutos;
- Ler em A_{595} .

Preparo de soluções para ensaio com LACASE

1. Tampão acetato de sódio (pH 5,0) 0,1M

Utiliza-se:

Acetato de Na anidro (CH_3COONa) PM = 82,09

Ácido acético ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$) PM = 60,05

Prepara-se 300mL de solução 0,1M de acetato de sódio e 200mL de solução de ácido acético 0,1M. Coloca-se 250mL de acetato de sódio em um béquer e adiciona-se ácido acético até que o pH atinja 5,0.

→ Preparo de 300mL de solução de acetato de sódio anidro 0,1M

- Para solução 1M dissolve-se 82,09g em 1L;
- Para solução 0,1M dissolve-se 8,209g em 1L;
- Para 300mL de solução 0,1M dissolve-se 2,463g.

→ Preparo de 200mL de solução de ácido acético 0,1M

- Ácido acético glacial (100%) Dens = 1,05g/mL PM = 60,05
- Utiliza-se a fórmula: $M = (\text{dens} \times \% \times 10) / \text{PM}$
- Dessa forma, em 1L de solução tenho 17,485M ou 1050g;
- Para solução 1M precisa-se de 60,05g;
- Para 200mL de solução 0,1M precisa-se de 1,144mL.

Preparo de soluções para ensaio com Mn PEROXIDASE

1. Sulfato de Mn 2mM

PM = 169,02 → 169,02g/L = 1M

Em solução 2mM precisa-se de 0,33804g/L

2. Vermelho de fenol 5,0g/L

Dissolver 1g em 200mL de água.

3. Albumina bovina 0,5%

Dissolver 1g em 200mL de água.

4. Hidróxido de sódio 2M

NaOH PM = 40

Em 200mL deve-se dissolver 16g.

5. Lactato de sódio 250mM pH 4,5

$C_3H_5O_3Na$ PM = 112,1

D = 1,232mg/mL Solução 50%

- A solução pura tem concentração de 5,5M;
- Para solução 1M dissolver 181,8mL em 1L;
- Para solução 250mM dissolver 45,5mL em 1L;
- Para 200mL de solução 250mM dissolver 9,1mL;
- Ajustar o pH para 4,5.

6. Solução de H_2O_2 2mm

PM = 34,01 D = 1,11mg/mL

- Se a solução de H_2O_2 for 30%, a molaridade será:

$$M = (1,11 \cdot 30\% \cdot 10) / 34,01 = \mathbf{9,8M}$$

- Dessa forma, em 1L tem-se 333g;
- Para uma solução 2mM necessita-se 0,06802g;
- Dessa forma, são necessários 0,2043mL de H_2O_2 em 1L.

Preparo de soluções para ensaio com LIGNINA PEROXIDASE

1. Solução H₂O₂ 0,54mM

Seguindo os cálculos do ítem 6 da página anterior, necessita-se de 0,05516mL de H₂O₂ em 1L.

2. Solução de tartarato de sódio 0,1M pH 3,0

C₄H₄O₆Na₂ PM = 194,0 → caso seja dihidratado o PM = 230,0.

- Para 1L de solução 0,1M dissolver 19,4g;
- Para 200mL de solução 0,1M dissolver 3,88g;
- Caso seja dihidratado, em 230g do produto tem-se 194g de tartarato, então precisa-se de 4,6g do produto para a obtenção de 3,88g de tartarato puro;
- Ajustar o pH para 3,0.

3. Solução de álcool veratrílico 10mM

PM = 168,19

Dens. = 1,157mg/mL

Conc. = 96%

$M = (1,157 \cdot 96 \cdot 10) / 168,19 = 6,6M$

Na solução original tem-se 6,6 mol/L, e precisa-se de 0,01 mol/L. Em 1L de solução 6,6M existem 1110g de álcool e em 1L de solução 0,01M tem-se 1,6819. Em 200mL de solução 0,01M tem-se 0,336g de álcool. Dessa forma, necessita-se de 0,291mL da solução original para preparar 200mL de solução 0,01M de álcool veratrílico.

Preparo de soluções para ensaio com CELULASE

1. Tampão citrato de sódio 50mM pH 4,8

Utiliza-se:

Ácido cítrico: $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ PM = 210,14 ou

Ácido cítrico anidro: $C_6H_8O_7$ PM = 192,10

Citrato de sódio: $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$ PM = 294,12

Prepara-se 200mL de solução 50mM de cada um dos compostos acima. Depois coloca-se 150mL de citrato de sódio e adiciona-se o ácido cítrico até o pH atingir 4,8. A proporção é mais ou menos de 1 parte de citrato de Na para 1 parte de ácido cítrico.

Preparo de 200mL de solução de ácido cítrico:

- Para solução 1M precisa-se de 210,14g/L;
- Para solução 50mM precisa-se de 10,507g/L;
- Para 200mL de solução 50mM precisa-se de 2,10g.

Caso o ácido cítrico seja ANIDRO:

- Para solução 1M precisa-se de 192,1g/L;
- Para solução 50mM precisa-se de 9,61g/L;
- Para 200mL de solução 50mM precisa-se de 1,92g.

Preparo de 200mL de solução de citrato de sódio:

- Para solução 1M precisa-se de 294,12g/L;
- Para solução 50mM precisa-se de 14,71g/L;
- Para 200mL de solução 50m M precisa-se de 2,94g.

2. Preparo de solução de DNS

Reagentes necessários:

Regentes	Quantidade
DNS	10g
NaOH 2M	300mL
Tartarato duplo Na/K	300g sal Rochelle
Água destilada q.s.p.	1000mL

Preparar sob agitação, na seguinte ordem:

- Colocar aproximadamente 500mL de água destilada em um béquer e adicionar lentamente o DNS sob agitação para possibilitar a sua completa dissolução;
- Adicionar a solução de NaOH (300mL) lentamente na solução de DNS;
- Adicionar lentamente os 300g de tartarato de Na/K na solução de DNS e NaOH;
- Obs.: o tartarato de Na/K somente deverá ser adicionado quando o DNS e o NaOH estiverem totalmente dissolvidos;
- Completar o volume para 1000mL com água destilada;
- Obs.: armazenar em frascos escuros ou recobertos com papel alumínio. Não é necessário guardar na geladeira. Antes de utilizar o reagente DNS para dosar as atividades das enzimas, deve-se adicionar metabissulfito e fenol nas seguintes proporções:
 - Metabissulfito de sódio (sol. estoque a 35%): 70µL em 50mL de DNS;
 - Fenol (solução estoque a 50%): 200µL em 50mL de DNS;
 - Obs.: o metabissulfito e o fenol deverão ser adicionados SOMENTE no volume e momento de se utilizar o DNS.

3. Solução de fenol 50% (v/v)

Fenol → 25mL

Água destilada → 25mL

- Utilizar luvas;
- Não pipetar com a boca;
- Enxaguar bem as vidrarias;
- Guardar em frasco escuro;
- Agitar antes de usar.

4. Solução de metabissulfito de Na (35% p/v)

Metabissulfito de Na 17,5g

Água destilada q.s.p. 50mL

Proporções entre os volumes de DNS, metabissulfito e fenol.

DNS (mL)	Metabissulfito (l)	Fenol (l)
20	28	80
25	35	100
30	42	120
35	49	140

Preparo de soluções para ensaio com XILANASE

1. Solução de Xilana 1%

- 1g de xilana Brich;
- 50mL de tampão acetato de Na 50mM pH 5,3;
- agitar com calor e uma vez dissolvida agitar sem calor;
- completar o volume para 100mL.

2. Solução de DNS

Ver protocolo à página 116.

3. Tampão acetato de Na 50mM pH 5,3

Utiliza-se:

Acetato de sódio $3H_2O$ ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$): PM = 136,09

Ácido acético ($C_2H_4O_2$): PM = 60,05

Prepara-se 300mL de solução 50mM de cada um dos compostos acima. Depois coloca-se 200mL de solução de acetato e adiciona-se o ácido até o pH atingir 5,3.

Preparo de 300mL de solução de acetato de sódio 50mM:

- Para solução 1M precisa-se de 136,09g/L;
- Para solução 50mM precisa-se de 6,8045g/L;
- Para 300mL de solução 50mM precisa-se de 2,04g.

Caso o acetato de sódio seja ANIDRO:

- Para solução 1M precisa-se de 82,03g/L;
- Para solução 50mM precisa-se de 4,102g/L;
- Para 300mL de solução 50mM precisa-se de 1,23g.

Preparo de 200mL de solução de ácido acético:

- Para solução 1M precisa-se de 60,05g/L;
- Em 1L tenho 17,485M;
- Para 200mL de solução 50mM precisa-se de 0,572mL de ácido.