

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Produção de cogumelos comestíveis e fenol-oxidases de
Pleurotus sajor-caju e *Lentinula edodes* em resíduos
lignocelulósicos

JANE MARIA FINIMUNDI

Caxias do Sul

2011

JANE MARIA FINIMUNDI

Produção de cogumelos comestíveis e fenol-oxidases de
Pleurotus sajor-caju e *Lentinula edodes* em resíduos
lignocelulósicos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

Caxias do Sul

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

F498p Finimundi, Jane Maria, 1982-
Produção de cogumelos comestíveis e fenol-oxidases de *Pleurotus sajor-caju* e *Lentinula edodes* em resíduos lignocelulósicos / Jane Maria Finimundi. – 2011.
112 f. : il. ; 30 cm

Apresenta bibliografia.
Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2011.
Orientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon.

1. Cogumelos comestíveis. 2. Cogumelos – Cultivo. 3. Biotecnologia.
I. Título.

CDU 2. ed.: 635.8

Índice para o catálogo sistemático:

1. Cogumelos comestíveis	635.8
2. Cogumelos – Cultivo	635.8
3. Biotecnologia	60

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Carolina Machado Quadros – CRB 10/2236.

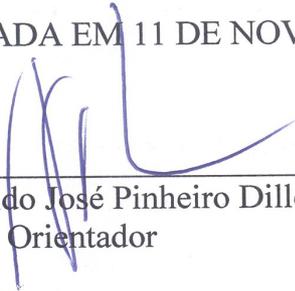
JANE MARIA FINIMUNDI

**Produção de cogumelos comestíveis e fenol-oxidases de
Pleurotus sajor-caju e *Lentinula edodes* em resíduos
lignocelulósicos**

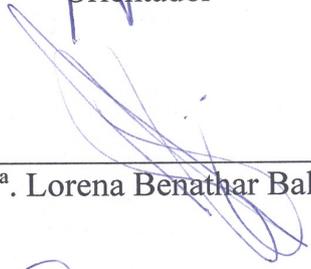
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 11 DE NOVEMBRO DE 2011.



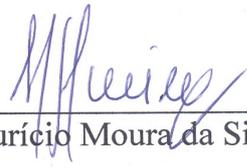
Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon
Orientador



Prof. Dr. Lorena Benathar Ballod Tavares



Prof. Dr. Sandra Aparecida Furlan



Prof. Dr. Maurício Moura da Silveira

Dedico este trabalho aos meus pais
Waldacir e Cícera.

AGRADECIMENTOS

À Força Superior, responsável por tudo.

Ao Clayton Ferri, pelo incentivo.

À UCS, pela estrutura física.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À FAPERGS, pelo apoio financeiro.

Ao Profº Drº Aldo José Pinheiro Dillon, pelo carinho e conhecimentos.

Aos Profº. Mauricio Moura da Silveira e Miriam Salvador, pelo acompanhamento.

À Letícia Osório da Rosa, pelos ensinamentos.

À Denise Zampieri, pelo coleguismo e amizade.

À Fernanda Bettin, pelo auxílio sempre que necessário.

À Marli Camassola, pelas adaptações tecnológicas.

À Carla Todedo Ritter, pela inesquecível recepção.

Aos estagiários: Manuela Deon, Renan Alexandre Sagin e Emanuele Barbieri pela colaboração.

Aos funcionários e vigilantes, pela cooperação.

À todos os colegas de laboratório, pela amizade e conhecimento.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE QUADROS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
NOMENCLATURA.....	x
RESUMO.....	xi
PALAVRAS-CHAVE.....	xi
ABSTRACT.....	xii
KEYWORDS.....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Resíduos lignocelulósicos.....	4
2.1.1 Bagaços de <i>Vitis labrusca</i> e <i>Malus domestica</i>	4
2.1.2 Serragem de <i>Pinus</i> sp. e <i>Eucalyptus</i> sp.....	6
2.2 <i>Pleurotus sajor-caju</i> (Fr.) Singer e <i>Lentinula edodes</i> (Berk.) Pegler.....	8
2.3 Cultivo axênico de <i>Pleurotus sajor-caju</i> e <i>Lentinula edodes</i> em resíduos lignocelulósicos	11
2.4 Biodegradação de lignocelulose por basidiomicetes	15
2.5 Enzimas ligninolíticas de basidiomicetes	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Fungos	23
3.2 Resíduos lignocelulósicos.....	23
3.3 Preparo de inóculos.....	23
3.4 Meios de cultivo.....	24

3.4.1 Meio de cultivo para manutenção das linhagens.....	24
3.4.2 Meio de cultivo para produção de corpos de frutificação.....	24
3.5 Sistemas para produção de corpos de frutificação.....	25
3.6 Estudo da produção enzimática.....	26
3.7 Extrato enzimático.....	26
3.8 Determinação da umidade dos resíduos e substratos.....	27
3.9 Determinação de pH dos resíduos e extratos enzimáticos.....	27
3.10 Cálculos da produção de corpos de frutificação.....	27
3.10.1 Rendimento.....	27
3.10.2 Eficiência biológica.....	28
3.10.3 Produtividade.....	28
3.11 Análises enzimáticas, de proteínas totais e de biomassa fúngica	28
3.11.1 Lacases.....	28
3.11.2 Manganês peroxidases.....	29
3.11.3 Lignina peroxidases	29
3.11.4 Oxidases do álcool veratrílico	29
3.11.5 Peroxidases totais.....	30
3.11.6 Proteínas totais.....	30
3.11.7 Biomassa fúngica	30
3.12 Análises estatísticas.....	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1 Cultivos com <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001.....	32
4.1.1 Produção de cogumelos comestíveis de <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001 em bagaço de <i>Vitis labrusca</i> e serragem de <i>Pinus</i> sp.....	32

4.1.2	Produção de cogumelos comestíveis de <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001 em bagaço de <i>Malus domestica</i> e serragem de <i>Pinus</i> sp.	35
4.1.3	Comparação da produção de cogumelos comestíveis de <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001 utilizando bagaços de <i>Vitis labrusca</i> e <i>Malus domestica</i> e serragem de <i>Pinus</i> sp. em combinações.....	38
4.1.4	Atividade enzimática de <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001 cultivado em bagaço de <i>Vitis labrusca</i> e serragem de <i>Pinus</i> sp	40
4.1.5	Atividade enzimática de <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001 cultivado em bagaço de <i>Malus domestica</i> e serragem de <i>Pinus</i> sp.....	54
4.1.6	Comparação de atividade enzimática de <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001 cultivado em bagaço de <i>Vitis labrusca</i> , <i>Malus domestica</i> e serragem de <i>Pinus</i> sp.....	66
4.2	Cultivos com <i>Lentinula edodes</i> LE-01.....	67
4.2.1	Produção de cogumelos comestíveis de <i>Lentinula edodes</i> LE-01 em bagaço de <i>Vitis labrusca</i> e serragem de <i>Eucalyptus</i> sp.	67
4.2.2	Produção de cogumelos comestíveis de <i>Lentinula edodes</i> LE-01 em bagaço de <i>Malus domestica</i> e serragem de <i>Eucalyptus</i> sp.	70
4.2.3	Comparação da produção de cogumelos comestíveis de <i>Lentinula edodes</i> LE-01 utilizando bagaços de <i>Vitis labrusca</i> e <i>Malus domestica</i> e serragem de <i>Eucalyptus</i> sp.....	72
4.2.4	Atividade enzimática de <i>Lentinula edodes</i> LE-01 cultivado em bagaço de <i>Vitis labrusca</i> e serragem de <i>Eucalyptus</i> sp.....	73
4.2.5	Atividade enzimática de <i>Lentinula edodes</i> LE 01 cultivado em bagaço de <i>Malus domestica</i> e serragem de <i>Eucalyptus</i> sp.....	84
4.2.6	Comparação de atividade enzimática de <i>Lentinula edodes</i> LE 01 cultivado em bagaços de <i>Vitis labrusca</i> e <i>Malus domestica</i> e serragem de <i>Eucalyptus</i> sp.....	94

5 CONCLUSÕES	97
6 PERSPECTIVAS	99
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Rendimento, eficiência biológica e produtividade de cogumelos de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 cultivados em bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Pinus* sp. 34
- Tabela 2.** Rendimento, eficiência biológica e produtividade de cogumelos de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 cultivados em bagaço de *Malus domestica* e serragem de *Pinus* sp. 37
- Tabela 3.** Atividade de lacases, crescimento fúngico, pH e dia do pico enzimático de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 cultivado em substratos empregando bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Pinus* sp. 51
- Tabela 4.** Atividade de manganês peroxidase, oxidases do álcool veratrílico, lignina peroxidase e concentração de proteínas totais de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 cultivado em substratos empregando bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Pinus* sp. 53
- Tabela 5.** Atividade de lacases, crescimento fúngico, pH e dia do pico enzimático de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 cultivado em substratos lignocelulósicos empregando bagaços de *Malus domestica* e serragem de *Pinus* sp. 64
- Tabela 6.** Atividade de manganês peroxidase, oxidases do álcool veratrílico, lignina peroxidase e quantidade de proteínas totais de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 cultivado em substratos empregando bagaço de *Malus domestica* e serragem de *Pinus* sp. 65
- Tabela 7.** Atividade enzimática, crescimento fúngico, proteínas totais e dia do pico enzimático de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 empregando como substratos bagaços de *Vitis labrusca* e *Malus domestica* e serragem de *Pinus* sp. 67
- Tabela 8.** Atividade de lacases, crescimento fúngico, pH e dia do pico enzimático durante o cultivo *Lentinula edodes* LE-01 em substratos empregando bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Eucalyptus* sp. 83

- Tabela 9.** Atividade de oxidases do álcool veratrílico, lignina peroxidase e concentração de proteínas totais de *Lentinula edodes* LE-01 cultivado em substratos empregando bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Eucalyptus* sp. 84
- Tabela 10.** Atividade de lacases, crescimento fúngico, pH e dia do pico enzimático de *Lentinula edodes* LE-01 cultivado em substratos empregando bagaço de *Malus domestica* e serragem de *Eucalyptus* sp. 93
- Tabela 11.** Concentração de proteínas totais de *Lentinula edodes* LE-01 cultivado em substratos empregando bagaço de *Malus domestica* e serragem de *Eucalyptus* sp. 93
- Tabela 12.** Atividade enzimática, crescimento fúngico, proteínas totais e dia do pico enzimático de *Lentinula edodes* LE-01 empregando como substratos bagaços de *Vitis labrusca* e *Malus domestica* e serragem de *Eucalyptus* sp. 95

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Proporção de resíduos lignocelulósicos em base seca (m/m) utilizados em cada substrato. 25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS 2001.	9
Figura 2. <i>Lentinula edodes</i> LE-01.	9
Figura 3. Ciclo de vida de basidiomicetes.	11
Figura 4. Estrutura representativa de uma parte de um polímero de lignina.	16
Figura 5. Principais tipos de ligações encontradas na lignina, com suas respectivas proporções.	17
Figura 6. Ciclo redox da lignina peroxidase.	21
Figura 7. Ciclo de reação da manganês peroxidase.	21
Figura 8. Ciclo catalítico da lacase.	22
Figura 9. Inóculo de <i>Lentinula edodes</i> LE-01 e <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001 em diferentes tempos de colonização. (A) Inóculo de <i>L. edodes</i> , aproximadamente 15 dias de colonização. (B) Inóculo de <i>P. sajor-caju</i> após 25 dias de colonização.	24
Figura 10. Cogumelos de <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001. (A) Saco de cultivo empregando bagaço de <i>Vitis labrusca</i> . (B) Saco de cultivo empregando serragem de <i>Pinus</i> sp. (C) Cogumelos coletados de substrato empregando somente bagaço de <i>Vitis labrusca</i> . (D) Cogumelo coletado de cultivo empregando serragem de <i>Pinus</i> sp.	33
Figura 11. Cogumelos de <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001. (A) Cultivados em bagaço de <i>Malus domestica</i> . (B) Primórdios em saco de cultivo. (C) Vista inferior de saco de cultivo em serragem de <i>Pinus</i> sp. (D) Cogumelo produzido em S4 com <i>Malus domestica</i> .	36
Figura 12. Rendimento dos cultivos de <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001 utilizando bagaços de <i>Vitis labrusca</i> e <i>Malus domestica</i> e serragem de <i>Pinus</i> sp.	39

- Figura 13.** Eficiência biológica dos cultivos de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 39
utilizando bagaços de *Vitis labrusca* e *Malus domestica* e serragem de *Pinus* sp.
- Figura 14.** Produtividade dos cultivos de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 utilizando 40
bagaços de *Vitis labrusca* e *Malus domestica* e serragem de *Pinus* sp.
- Figura 15.** Atividade enzimática de lacases de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 cultivado 41
em substratos compostos por resíduos lignocelulósicos.
- Figura 16.** Valores de pH durante o cultivo com *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em 42
resíduos lignocelulósicos.
- Figura 17.** Atividade enzimática de lacases por *Pleurotus sajor-caju* e pH em 43
substrato composto por bagaço de *Vitis labrusca*.
- Figura 18.** Atividade enzimática de lacases e biomassa de *Pleurotus sajor-caju* PS- 44
2001 em substrato composto por bagaço de *Vitis labrusca*.
- Figura 19.** Atividade enzimática de lacases de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 e pH em 45
substrato composto por bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Pinus* sp. (3:1).
- Figura 20.** Atividade enzimática de lacases e biomassa de *Pleurotus sajor-caju* PS- 46
2001 em substrato composto por bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Pinus* sp.
(3:1).
- Figura 21.** Atividade enzimática de lacases de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 e pH em 46
substrato composto por bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Pinus* sp. (1:1).
- Figura 22.** Atividade enzimática de lacases e biomassa de *Pleurotus sajor-caju* PS- 47
2001 em substrato composto por bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Pinus* sp.
(1:1).
- Figura 23.** Atividade enzimática de lacases de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 e pH em 48
substrato composto por bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Pinus* sp. (1:3).

- Figura 24.** Atividade enzimática de lacases e biomassa de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em substrato composto por bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Pinus* sp. (1:3). 49
- Figura 25.** Atividade enzimática de lacases de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 e pH em substrato composto por serragem de *Pinus* sp. em condições de cultivo com *Vitis labrusca* (1:1). 50
- Figura 26.** Atividade enzimática de lacases e biomassa fúngica de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em substrato composto serragem de *Pinus* sp. e bagaço de *Vitis labrusca* (1:1). 51
- Figura 27.** Atividade enzimática de lacases por *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 cultivado em substratos compostos por resíduos lignocelulósicos. 55
- Figura 28.** Valores de pH durante o cultivo com *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em resíduos lignocelulósicos. 56
- Figura 29.** Atividade enzimática de lacases de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 e pH em substrato composto por bagaço de *Malus domestica*. 56
- Figura 30.** Atividade enzimática de lacases e biomassa de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em substrato composto por bagaço de *Malus domestica*. 57
- Figura 31.** Atividade enzimática de lacases de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 e pH em substrato composto por bagaço de *Malus domestica* e serragem de *Pinus* sp. (3:1). 58
- Figura 32.** Atividade enzimática de lacases e biomassa de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em substrato composto por bagaço de *Malus domestica* e serragem de *Pinus* sp. (3:1). 59
- Figura 33.** Atividade enzimática de lacases de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 e pH em substrato composto por bagaço de *Malus domestica* e serragem de *Pinus* sp. (1:1). 59
- Figura 34.** Atividade enzimática de lacases e biomassa de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em substrato composto por bagaço de *Malus domestica* e serragem de *Pinus* sp. (1:1). 60

- Figura 35.** Atividade enzimática de lacases de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 e pH em substrato composto por bagaço de *Malus domestica* e serragem de *Pinus* sp. (1:3). 61
- Figura 36.** Atividade enzimática de lacases e biomassa de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em substrato composto por bagaço de *Malus domestica* e serragem de *Pinus* sp. (1:3). 62
- Figura 37.** Atividade enzimática de lacases por *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 e pH em substrato composto por serragem de *Pinus* sp. e bagaço de *Malus domestica*. 63
- Figura 38.** Atividade enzimática de lacases e biomassa fúngica de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em substrato composto serragem de *Pinus* sp. e bagaço de *Malus domestica*. 63
- Figura 39.** Aglomerados de micélio característicos do período pós-colonização de *Lentinula edodes* LE-01 (A). Cogumelos de *Lentinula edodes* LE-01 produzidos em S4 com resíduos de *Vitis labrusca* e serragem de *Eucalyptus* sp. (B). Cogumelos aderidos ao S4 com *Vitis labrusca* e serragem de *Eucalyptus* sp. (C). Vista inferior do píleo do cogumelo *Lentinula edodes* LE-01 (D). 69
- Figura 40.** Cogumelos de *Lentinula edodes* LE-01 (A) produzidos em substrato constituído de serragem de *Eucalyptus* sp., (B) produzido em S4 com bagaço de *Malus domestica*, (C) produzido em S3 com bagaço de *Malus domestica*, (D) forma característica do cogumelo desta espécie produzido em S5. 70
- Figura 41.** Cogumelos de *Lentinula edodes* LE-01 (A) produzido em serragem de *Eucalyptus* sp., (B) produzido em S4 com bagaço de *Malus domestica*, (C) produzido em S3 com bagaço de *Malus domestica*, (D) S4, S5 e S3 empregando *Malus domestica*. 71
- Figura 42.** Atividade enzimática de lacases por *Lentinula edodes* LE-01 cultivado em substratos compostos por resíduos lignocelulósicos. 74
- Figura 43.** Valores de pH durante o cultivo com *Lentinula edodes* LE-01 em resíduos lignocelulósicos. 75

- Figura 44.** Atividade enzimática de lacases de *Lentinula edodes* LE-01 e pH em substrato composto por bagaço de *Vitis labrusca*. 75
- Figura 45.** Atividade enzimática de lacases e biomassa de *Lentinula edodes* LE-01 em substrato composto por bagaço de *Vitis labrusca*. 76
- Figura 46.** Atividade enzimática de lacases de *Lentinula edodes* LE-01 e pH em substrato composto por bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Eucalyptus* sp. (3:1). 77
- Figura 47.** Atividade enzimática de lacases e biomassa de *Lentinula edodes* LE-01 em substrato composto por bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Eucalyptus* sp. (3:1). 78
- Figura 48.** Atividade enzimática de lacases de *Lentinula edodes* LE-01 e pH em substrato composto por bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Eucalyptus* sp. (1:1). 78
- Figura 49.** Atividade enzimática de lacases e biomassa de *Lentinula edodes* LE-01 em substrato composto por bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Eucalyptus* sp. (1:1). 79
- Figura 50.** Atividade enzimática de lacases de *Lentinula edodes* LE-01 e pH em substrato composto por bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Eucalyptus* sp. (1:3). 80
- Figura 51.** Atividade enzimática de lacases e biomassa de *Lentinula edodes* LE-01 em substrato composto por bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Eucalyptus* sp. (1:3). 80
- Figura 52.** Atividade enzimática de lacases de *Lentinula edodes* LE-01 e pH em substrato composto por serragem de *Eucalyptus* sp. e bagaço de *Vitis labrusca*. 81
- Figura 53.** Atividade enzimática de lacases e biomassa de *Lentinula edodes* LE-01 em substrato composto serragem de *Eucalyptus* sp. e bagaço de *Vitis labrusca*. 82
- Figura 54.** Atividade enzimática de lacases de *Lentinula edodes* LE-01 cultivado em substratos compostos por resíduos lignocelulósicos. 85
- Figura 55.** Valores de pH durante o cultivo com *Lentinula edodes* LE-01 em resíduos lignocelulósicos. 86
- Figura 56.** Atividade enzimática de lacases de *Lentinula edodes* LE-01 e pH em substrato composto por bagaço de *Malus domestica*. 86

- Figura 57.** Atividade enzimática de lacases e biomassa de *Lentinula edodes* LE-01 em substrato composto por bagaço de *Malus domestica*. 87
- Figura 58.** Atividade enzimática de lacases de *Lentinula edodes* LE-01 e pH em substrato composto por bagaço de *Malus domestica* e serragem de *Eucalyptus* sp. (3:1). 88
- Figura 59.** Atividade enzimática de lacases e biomassa de *Lentinula edodes* LE-01 em substrato composto por bagaço de *Malus domestica* e serragem de *Eucalyptus* sp. (3:1). 88
- Figura 60.** Atividade enzimática de lacases de *Lentinula edodes* LE-01 e pH em substrato composto por bagaço de *Malus domestica* e serragem de *Eucalyptus* sp. (1:1). 89
- Figura 61.** Atividade enzimática de lacases e biomassa de *Lentinula edodes* LE-01 em substrato composto por bagaço de *Malus domestica* e serragem de *Eucalyptus* sp. (1:1). 89
- Figura 62.** Atividade enzimática de lacases de *Lentinula edodes* LE-01 e pH em substrato composto por bagaço de *Malus domestica* e serragem de *Eucalyptus* sp. (1:3). 90
- Figura 63.** Atividade enzimática de lacases e biomassa de *Lentinula edodes* LE-01 em substrato composto por bagaço de *Malus domestica* e serragem de *Eucalyptus* sp. (1:3). 91
- Figura 64.** Atividade enzimática de lacases de *Lentinula edodes* LE-01 e pH em substrato composto por serragem de *Eucalyptus* sp. e bagaço de *Malus domestica*. 91
- Figura 65.** Atividade enzimática de lacases e biomassa fúngica de *Lentinula edodes* LE-01 em substrato composto serragem de *Eucalyptus* sp. e bagaço de *Malus domestica*. 92

NOMENCLATURA

ABTS: 2,2' – azino – bis (3 – etilbenzotiazolina – 6 – sulfonado)

DMAB: 4 – dimetilaminobenzaldeído

EB: eficiência biológica

Lac: lacase

LiP: lignina peroxidase

MnP: manganês peroxidase

OAV: oxidases do álcool veratrílico

P: produtividade

PerT: peroxidases totais

R: rendimento

S: substrato

RESUMO

Cogumelos comestíveis de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 e *Lentinula edodes* LE-01 foram cultivados em substratos constituídos de serragem de *Pinus* sp (para *P. sajor-caju*) ou *Eucalyptus* sp (para *L. edodes*) adicionados de resíduos de bagaços de *Vitis labrusca* e *Malus domestica*. Foram avaliados os parâmetros de produção produtividade (P), eficiência biológica e rendimento (R), atividade das enzimas (lacases, VAO, MnP and LiP), proteína solúvel total e a N-acetil glicosamina liberada do micélio como uma estimativa indireta do crescimento da biomassa. Os testes foram realizados com os bagaços dos dois frutos separadamente e em serragem de *Pinus* sp. (para *P. sajor-caju*) e *Eucalyptus* sp.. Foram utilizadas três combinações de substratos (S) e um controle, sendo eles, S1: somente bagaço; S2: 75% bagaço e 25% serragem (3:1); S3: 50% bagaço e 50% serragem (1:1); S4: 25% bagaço e 75% serragem (1:3) e S5: somente serragem (controle). Os resultados mostraram que os bagaços de *V. labrusca* e *M. domestica* e serragem de *Pinus* sp. foram adequados à produção de cogumelos de *P. sajor-caju* quando utilizados isolados ou em combinações, destacando-se a combinação S4 com *V. labrusca*, onde foram obtidos os melhores resultados de produtividade (P), eficiência biológica (EB) e rendimento (R), de 0,59 g.dia⁻¹, 33% e 11%, respectivamente. O substrato que possibilitou melhor atividade de lacases (Lac) foi S1 com *M. domestica* (81.995 U.g⁻¹ no 30º dia), bem como a maior atividade de lignina peroxidase (LiP - 26 U.g⁻¹) e oxidases do álcool veratrílico (OAV - 20,9 U.g⁻¹). A maior concentração de proteínas totais (PT - 2.803 U.g⁻¹) foi obtida em S4 com *V. labrusca*. Em S3, com bagaço de *M. domestica*, *P. sajor-caju* apresentou maior atividade de manganês peroxidase (MnP - 636,4 U.g⁻¹) e a maior biomassa foi obtida em S3 com *V. labrusca* (8,47 mg de N-acetilglicosamina/g de substrato no 24º dia). Para *L. edodes* somente *V. labrusca* (S4) mostrou produção de cogumelos com R de 12,8%, EB de 38,5% e P de 0,25 g.dia⁻¹. Já o bagaço de *M. domestica* possibilitou a produção de cogumelos nas combinações S3, S4 e controle S5. S4 com *V. labrusca* possibilitou a maior atividade de Lac por *L. edodes* (2.932 U.g⁻¹ no 4º dia de cultivo) e a mais alta atividade de LiP (2.73 U g⁻¹). Como a maior biomassa foi obtida empregando o substrato S1 com *V. labrusca* no 16º dia (17,42 mg de N-acetilglicosamina/g de substrato) e em S4 ocorreu a mais alta atividade de lacases, isto mostra que o crescimento fúngico não está associado ao aumento na produção de Lac. S1 com *V. labrusca* também apresentou maiores níveis de OAV (25,94 U.g⁻¹). Mais alta concentração de proteínas solúveis PT (6.858 U.g⁻¹) foi obtida empregando S1 com *M. domestica*. MnP e peroxidases totais de *L. edodes* não foram detectadas nos substratos *V. labrusca* ou *M. domestica*. O bagaço de *V. labrusca* demonstrou ser mais adequado à atividade de Lac por *L. edodes* do que *M. domestica*.

PALAVRAS-CHAVE: resíduos lignocelulósicos, cultivo sólido, cogumelos comestíveis, lacases, *Pleurotus sajor-caju*, *Lentinula edodes*.

ABSTRACT

Edible mushrooms *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 and *Lentinula edodes* LE-01 were cultivated on substrates constituted of sawdust of *Pinus* sp. (for *P. sajor-caju*) or *Eucalyptus* sp. (for *L. edodes*) added of *Vitis labrusca* and *Malus domestica* bagasse residues. The production parameters evaluated were: productivity (P), biological efficiency (BE) and yield (Y), activities of enzymes (laccases, VAO, MnP and LiP), total soluble proteins and the N-acetyl glucosamine liberated from mycelia as a indirect estimative of biomass growth. There were three combinations of substrates (S) and a control, S1: only bagasse residues, S2: 75% bagasse residues and 25% sawdust (3:1), S3: 50% bagasse residues and 50% sawdust (1 : 1), S4: 25% bagasse residues and 75% sawdust (1:3) and S5: sawdust only (control). The results showed that bagasse residues of *V. labrusca* and *M. domestica* and sawdust of *Pinus* sp. were suitable for mushroom production of *P. sajor-caju* when used alone or in combinations, especially S4 with *V. labrusca*, which obtained the best results in productivity (P), biological efficiency (BE) and yield (Y) of 0.59 g day⁻¹, 33% and 11% respectively. The substrate which showed the highest laccase activity (Lac) was S1 with *M. domestica* (81,995 U g⁻¹) and the highest activity of lignin peroxidase (LiP - 26 U g⁻¹) and also veratryl alcohol oxidase (VAO - 20.9 U g⁻¹). The highest concentration of total protein (TP - 2803 mg g⁻¹ of dry matter) was obtained in S4 with *V. labrusca*. In S3, with bagasse residues of *M. domestica*, *P. sajor-caju* showed higher activity of manganese peroxidase (MnP - 636.4 U g⁻¹). The highest biomass was obtained in S3 with *V. labrusca* (8.47 mg N-acetyl glucosamine/g substrate on the 24 th day). To *L. edodes*, only *V. labrusca* (S4) showed mushrooms production with a R of 12.8%, EB of 38.5% and Y of 0.25 g day⁻¹. Only the bagasse *M. domestica* enabled the production of mushrooms in S3, S4 and S5. S4 with *V. labrusca* also showed the highest activity of Lac (2932 U g⁻¹ on day 4 of culture) and the highest activity of LiP (2.73 U g⁻¹). As the highest biomass was obtained in S1 with *V. labrusca* on the 16th day (17.42 mg N-acetyl glucosamine / g substrate) and S4 showed highest laccases secretion, this can show that fungal growth is not associated with increased production of Lac. S1 with *V. labrusca* also showed higher levels of VAO (25.94 U g⁻¹). Higher concentration of TP (6858 mg g⁻¹) was obtained from S1 with *M. domestica*. MnP and total peroxidases of *L. edodes* were not detected in *V. labrusca* or *M. domestica*. *V. labrusca* was more appropriate for laccase activity of *L. edodes* than *M. domestica*.

KEYWORDS: lignocellulosic wastes, solid state cultivation, edible mushrooms, laccases, *Pleurotus sajor-caju*, *Lentinula edodes*.

1 INTRODUÇÃO

A geração de resíduos é inerente às atividades humanas desde os tempos antigos, mas vem aumentando em quantidade e complexidade conforme as necessidades e anseios da sociedade moderna. A constante modernização da agricultura e a crescente industrialização de produtos modificaram o ciclo da matéria levando à produção de grandes quantidades de resíduos, os quais, na maioria das vezes, não recebem o tratamento adequado.

A atual conscientização sobre o meio ambiente busca modelos de desenvolvimento sustentáveis que, aliados à escassez de recursos naturais, faz com que o tratamento e o destino dos resíduos se tornem um assunto de grande importância nas políticas social e ambiental de vários países. Dentre os resíduos gerados estão os lignocelulósicos, provenientes da agricultura e das agroindústrias. Muitos destes resíduos podem ser utilizados na alimentação animal e para a produção de adubos orgânicos, enzimas e cogumelos comestíveis e medicinais, demonstrando a aplicabilidade desses materiais, até há pouco tempo descartados de forma indiscriminada no meio ambiente.

A Região Nordeste do Rio Grande do Sul abrange um forte setor madeireiro, responsável pela geração anual de grandes quantidades de resíduos lignocelulósicos. Somando-se a esta realidade, o desenvolvimento do setor vinícola e agroindustrial, que abrange indústrias processadoras de frutas para a produção de sucos, vinagres, espumantes e polpas, geram grande quantidade de bagaços que são descartados ou, em última instância, utilizados como adubo ou alimentação animal. A ampla disponibilidade de serragens e bagaços de frutas torna necessário o desenvolvimento de tecnologias para o aproveitamento destes resíduos.

A produção de cogumelos comestíveis e enzimas surge como uma alternativa para utilização de resíduos agroindustriais disponíveis na região. A demanda de cogumelos no mercado consumidor interno encontra-se em expansão, pois, além de serem considerados ingredientes de pratos requintados, possuem significativo valor nutricional e propriedades medicinais cada vez mais estudadas.

Os fungos de degradação branca *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 e *Lentinula edodes* LE-01 são conhecidos por produzirem corpos de frutificação comestíveis e saborosos, além de possuírem um complexo enzimático capaz de degradar os anéis aromáticos da estrutura da lignina, podendo ser cultivados em resíduos lignocelulósicos.

As lacases estão entre as enzimas mais conhecidas do complexo enzimático das fenol-oxidases. São responsáveis pela oxidação de compostos aromáticos, como os compostos fenólicos altamente tóxicos, carcinogênicos e alergênicos, provenientes de efluentes da indústria de papel e presentes também em inúmeras substâncias utilizadas em processos industriais.

A possibilidade de extrair lacases durante o processo de cultivo sólido torna estes fungos de importância tecnológica, pois as aplicações destas enzimas incluem a capacidade de degradar corantes da indústria têxtil e efluentes da indústria de papel e celulose, além de sua utilização como biossensores de poluentes ambientais, na descontaminação de solos e outras aplicações na indústria química, farmacêutica, cosmética e de alimentos e bebidas.

Serragens de *Eucalyptus* sp. e *Pinus* sp. e bagaços de *Vitis labrusca* e *Malus domestica* podem ser utilizados como matéria-prima para a obtenção de produtos com maior valor agregado. A disponibilidade destes resíduos, aliada ao aumento no consumo de cogumelos, à produção de enzimas com potencial biotecnológico e ao aproveitamento de resíduos lignocelulósicos, torna de grande interesse a realização deste estudo.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivos:

- utilizar bagaço de *Vitis labrusca* e *Malus domestica*, e serragem de *Pinus* sp. e *Eucalyptus* sp. isoladamente e em combinações, como substratos para o cultivo dos fungos *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 e *Lentinula edodes* LE-01;
- produzir cogumelos comestíveis e enzimas fenol-oxidases de *P. sajor-caju* PS-2001 e *L. edodes* LE-01 utilizando serragem de *Pinus* sp. e *Eucalyptus* sp., respectivamente, e bagaço de *V. labrusca* e *M. domestica*, isoladamente e em combinações;
- avaliar a produtividade, eficiência biológica e rendimento da produção de cogumelos comestíveis de *P. sajor-caju* PS-2001 e *L. edodes* LE-01 cultivados em serragem de *Pinus* sp. e *Eucalyptus* sp., e bagaço de *V. labrusca* e *M. domestica*, isoladamente e em combinações;
- quantificar em diferentes tempos a atividade de lacases de *P. sajor-caju* PS-2001 e *L. edodes* LE-01 cultivados nas formulações de substratos contendo serragem de *Pinus* sp. e *Eucalyptus* sp. e bagaço de *V. labrusca* e *M. domestica*, isoladamente e em combinações;
- determinar as atividades das enzimas manganês peroxidase, lignina peroxidase, oxidases do álcool veratrílico, peroxidases totais e a concentração de proteínas totais durante a maior produção de lacases;
- correlacionar o crescimento de *P. sajor-caju* PS-2001 e *L. edodes* LE-01 nos substratos testados com a produção enzimática.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Resíduos lignocelulósicos

2.1.1 Bagaços de *Vitis labrusca* e *Malus domestica*

É notável o aumento na produção de resíduos lignocelulósicos gerados por atividades da agricultura e agroindústrias nos últimos anos. A modernização dos processos industriais promoveu incrementos na produção juntamente com os resíduos produzidos. O interesse na utilização eficiente de resíduos agroindustriais proporcionou o desenvolvimento de muitos processos baseados nesses materiais como substratos para bioprocessos de produção de proteínas isoladas, ácidos orgânicos, etanol, cogumelos comestíveis, enzimas e metabólitos secundários biologicamente importantes (Pandey *et al.*, 1999; Massadeh *et al.*, 2001; Rosales *et al.*, 2002; Laufenderg *et al.*, 2003).

O setor agroindustrial e vinícola é responsável pelo processamento de frutas durante o ano todo. Como consequência desta intensa atividade, ocorre a geração de muitos resíduos lignocelulósicos, constituídos principalmente por bagaços.

O processamento de maçã pode acarretar a disponibilidade de 20 a 40% de matéria-prima sob a forma de resíduo agroindustrial, constituído de cascas e polpas (94,5%), sementes (4,4%) e centro do fruto (1%), contendo 5% de fibras (31% de celulose, 15% de lignina, 12% de hemicelulose e 9% de pectina insolúvel em água) e 14% de sólidos solúveis, correspondendo à glicose, frutose e sacarose. Este resíduo pode ser aproveitado para extração de enzimas, constituintes de aromas e pectinas, além de ser útil na formação de meios de cultura para produção de cogumelos comestíveis e de ácido cítrico em fermentação semi-sólida (Hang, 1987; Kennedy *et al.*, 1999; Endreß, 2000; Nogueira *et al.*, 2005).

O bagaço de maçã, incluindo as sementes, consiste em uma rica fonte de polifenóis, sendo que alguns destes constituintes, as pró-cianidinas e glicosídeos da quercitina, apresentam forte atividade antioxidante (Endreß, 2000), porém, ainda é descartado ou simplesmente utilizado como adubo orgânico e ração animal.

O destino de resíduos gerados pela produção e industrialização da uva constitui um problema de caráter ambiental e logístico. Somente no ano de 2006, a produção de uvas no Brasil foi superior a 534 mil toneladas (UVIBRA, 2009). Segundo Torres *et al.* (2002), 13 % de subprodutos gerados pela indústria vinícola são descartados, gerando quase 55 mil toneladas de resíduos que poderiam ser melhor aproveitados. Quando não utilizados como adubo orgânico, para produção de derivados alcoólicos ou extração de óleo de semente de uva, permanecem nos estabelecimentos processadores da uva, ocupando espaços ou, são depositados de forma inadequada, causando degradação ambiental e contaminando cursos d'água (Rizzon *et al.*, 1999).

O bagaço de uva é formado, em média, por 58% de cascas (48 a 69%), 20% de engaços (14 a 26%) e 22% de sementes (14 a 27%). Quando dessementado, o conteúdo de fibra é diminuído e, embora apresente relevantes teores de proteína bruta (11,7 a 14,4%), é de baixa digestibilidade (5 a 18%) quando utilizado como alimentação animal (Lopez, 1977).

A uva também tem sido foco de estudos por apresentar propriedades medicinais, com destaque especial para a presença de resveratrol e de quercetina, flavonoides com atividade antioxidante, antiproliferativa, hipocolesterolêmica, antiarterogênica e antiinflamatória, além de serem inibidores da agregação plaquetária (Maydata, 2002).

As evidências de que compostos fenólicos contidos na uva e derivados têm propriedades farmacológicas, seja na forma pura ou de extrato, incluindo cascas ou até mesmo a fruta ou o vinho, já foram estudadas e comprovadas por Jayaprakasha *et al.* (2003), Baydar *et al.* (2006) e Rhodes *et al.* (2006).

Estudos revelam que as sementes de uva são ricas em compostos antioxidantes, incluindo compostos fenólicos (predominantemente taninos), sendo que estes compostos reduzem o risco de doenças crônicas mediante a proteção contra radicais livres (Gorinstein *et al.*, 1994). Os taninos são substâncias fenólicas solúveis em água, com peso molecular normalmente entre 500 e 3000 Da (variando até 28000), os quais formam complexos insolúveis em água com alcaloides, gelatina e outras proteínas (Larbier & Leclercq, 1992). Também são descritos por apresentarem atividades antimutagênica, anticarcinogênica e antioxidante (Mukhtar *et al.*, 1988; Gali *et al.*, 1992).

2.1.2 Serragem de *Pinus sp.* e *Eucalyptus sp.*

A indústria de base florestal é dividida de acordo com o produto final obtido, podendo ser: lenha, postes, madeira serrada, lâminas de madeira, painéis colados, compensados, aglomerados, chapas duras de fibras, chapas de fibras de média densidade, celulose e papel. Desses produtos, a madeira serrada e os painéis de madeira são alguns insumos da cadeia produtiva madeira-móveis, os quais, por processos de usinagem, geram resíduos sólidos em várias etapas da cadeia (Roque & Valença, 1998).

Gonçalves (2000) classifica os processos de usinagem da madeira em abate, descascamento, desdobro, laminação, produção de partículas e beneficiamento. Cada um desses processos é formado por diversas operações, as quais definem o trabalho de transformação da forma da madeira num determinado processo como, por exemplo, as operações de corte, sejam com uma serra de fita na serraria ou com uma seccionadora na indústria de móveis seriados.

A maioria dos resíduos sólidos da cadeia produtiva madeira-móveis é gerada no processamento da madeira serrada. Embora a fração percentual dos resíduos varie em função de fatores como processo, máquinas utilizadas e dimensões das toras, ocorre uma significativa

perda no desdobro e nos cortes de resserra, que para madeiras de reflorestamento se situam entre 20 e 40% do volume de toras processadas (Finotti *et al.*, 2006).

O processo produtivo das indústrias que compõem a cadeia produtiva madeira - móveis gera um volume significativo de resíduos de madeira que, no Brasil, somente no ano de 2004, alcançou a ordem de 19.250.000 m³ nas indústrias de madeira serrada, lâminas e compensados. Nestes segmentos, os resíduos representaram 50,71% do volume original das toras de árvores que lhes deram origem (Hillig *et al.*, 2004).

Segundo Olandoski *et al.* (1998), a madeira de *Pinus* sp. difere das nativas, principalmente em relação à forma e às dimensões, proporcionando baixo rendimento e gerando muito resíduo, que geralmente não é aproveitado. Em relação à quantidade total de madeira que chega às serrarias, 55% são transformados em resíduos totais (Ayala *et al.*, 2002). Para Fagundes (2003), a geração de resíduos nas serrarias do Estado do Rio Grande do Sul situa-se numa faixa entre 35 e 45% para *Pinus* sp. e entre 40 e 50% para madeira de *Eucalyptus* sp.

Gerwing *et al.* (2000), estudando o rendimento médio de dez serrarias no Estado do Pará, encontraram grandes diferenças entre elas, sendo o valor mais alto igual a 55% e o mais baixo igual a 27%. Segundo os autores, indústrias que contam com equipamentos modernos e trabalham com toras de madeira de reflorestamento podem alcançar rendimentos de até 60%.

Constata-se que grande parte do resíduo de madeira é gerado no processamento da madeira serrada e que o percentual gerado em relação à madeira processada depende dos fatores: tipo de processo empregado, tipo de matéria-prima utilizada, produto final obtido e condições tecnológicas empregadas. Ainda, a abundância de matéria-prima em determinadas regiões contribui para o baixo aproveitamento. Por essas razões, os rendimentos obtidos por serrarias no desdobro da madeira variam de uma região para outra e de uma indústria para outra, sendo o diagnóstico fundamental para estabelecer as possibilidades de aproveitamento.

Os tipos florestais mais utilizados nas serrarias da Região Sul do Brasil são *Pinus* sp. e *Eucalyptus* sp., que correspondem a gêneros de plantas chamadas exóticas, pois não são de ocorrência natural no Brasil e que foram introduzidas com êxito nos reflorestamentos em 1904, estimulados pelos incentivos fiscais.

Hall & Braham (1998) explicam que os pinheiros são árvores pertencentes à divisão Pinophyta, incluída no grupo das gimnospermas. Neste grupo estão inclusas as plantas do gênero *Pinus*, da família Pinaceae, a maioria do Hemisfério Norte. Os pinheiros também são extensivamente plantados em muitas partes do Hemisfério Sul, para utilização em painéis, forros, estruturas de móveis, etc.

Eucalipto é a designação dada a várias espécies vegetais do gênero *Eucalyptus*, que inclui mais de 600 espécies. São árvores naturais da Austrália e a maioria faz parte da flora característica do continente, existindo apenas um pequeno número de espécies próprias dos territórios vizinhos da Nova Guiné e Indonésia. Nenhum continente é tão marcadamente caracterizado por um só gênero de árvore como acontece na Oceania, com os eucaliptos. Estima-se que uma serraria de porte médio destinada a produzir 2000 metros cúbicos de madeira serrada de eucalipto por mês gera, aproximadamente, 78 toneladas de serragem e 132 toneladas de casca (Wander, 2001).

2.2 *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer e *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler

Todos os fungos são decompositores de matéria orgânica, mas somente os pertencentes ao filo Basidiomycota e alguns Ascomycotas produzem cogumelos verdadeiros. A produção do cogumelo é o ápice do ciclo vital das espécies, que também pode ser chamado de corpo de frutificação, carpóforo, basidiocarpo ou basidioma. O basidiocarpo dos Agaricales, chamado vulgarmente de cogumelo, é formado pelo estipe central, ligado a um píleo no topo, o qual possui, em geral, forma de umbela ou chapéu e apresenta em sua

superfície inferior um tecido diferenciado, o himênio, formado por lamelas, poros ou tubos através dos quais liberam-se esporos quando ocorre a maturação (Krugner & Bacchi, 1995).

Pleurotus sajor-caju (Figura 1) possui corpo de frutificação em formato de ostra e seu nome vem do grego “pleuro”, que significa formado lateralmente, referindo-se a posição do estipe em relação ao píleo (Stamets & Chilton, 1983). *Lentinula edodes* (Figura 2) produz cogumelo em formato constituído por píleo e estipe, popularmente conhecido como shiitake, (shii: tipo de árvore, take: cogumelo em japonês). Ambos pertencem à classe Basidiomycetes, grupo que abrange fungos conhecidos popularmente como cogumelos, orelhas de pau, outros conhecidos como fungos gelatinosos, gasteromicetos, ferrugens e carvões. Na grande maioria, são fungos terrestres apresentando consistência frágil, morfologia bastante variável e formas curiosas (Urbem & Oliveira, 1998).



Figura 1. *Pleurotus sajor-caju* PS-2001.



Figura 2. *Lentinula edodes* LE-01.

Os fungos dependem de outros organismos para sua nutrição, pois ao contrário das plantas, não podem obter energia através da fotossíntese sendo, assim, organismos heterotróficos, ou seja, obtêm nutrientes por absorção através da ação de enzimas que são lançadas no substrato e degradam macromoléculas insolúveis em unidades monoméricas solúveis que são incorporadas (Rajaratnam *et al.*, 1998; Putzke & Putzke, 2002), o que possibilita a esses organismos um amplo espectro de colonização em resíduos orgânicos.

Uma característica desses fungos é a produção de esporos ou basidiósporos, de origem sexuada, em uma estrutura especializada denominada basídio que se encontra nos basidiomas (Chang & Miles, 1984; Rajarathnam & Bano, 1987). A grande produção de basidiósporos possibilita alta dispersão destes organismos no ambiente, podendo ocorrer por ação passiva, através do vento e da água, e ativa, através de mecanismos de dispersão específicos (Putzke & Putzke, 2002).

Qua à sua morfologia, o corpo vivo do fungo é denominado de micélio, que é constituído por uma teia fina de filamentos, as chamadas hifas (Esposito & Loguercio-Leite, 2004). Sob condições específicas, as hifas sexualmente compatíveis juntam-se e começam a formar esporos. As estruturas que produzem os esporos chamam-se de cogumelo, que é a parte mais conspícua do organismo, mas, com efeito, trata-se apenas do corpo de frutificação, enquanto que a maior parte do organismo vivo se encontra dentro do solo ou do substrato.

Quanto à reprodução, pode ser na forma sexuada ou assexuada (Figura 3). A reprodução sexuada inicia-se pela germinação do esporo originado dos basídios que se encontram nas lamelas sob o chapéu. Estes esporos são sexuais, haploides, resultado do processo de divisão meiótica do basidiocarpo. Os esporos germinados dão origem às hifas, que formam o micélio primário; a união de micélios primários compatíveis gera um micélio dicariótico ou micélio secundário, responsável pela formação dos primórdios que darão origem aos cogumelos (Chang & Miles, 1984; Rajarathnam & Bano, 1987).

A reprodução assexuada ocorre por multiplicação de um fragmento do cogumelo crescido sobre um substrato favorável e em determinadas condições ideais de temperatura e umidade. Nessa fase, o fungo ocorre como micélio vigoroso e, pela união de hifas, ocorre a formação de estruturas rizomórficas que são cordões de hifas macroscopicamente visíveis (Eira & Minhoni, 1997).

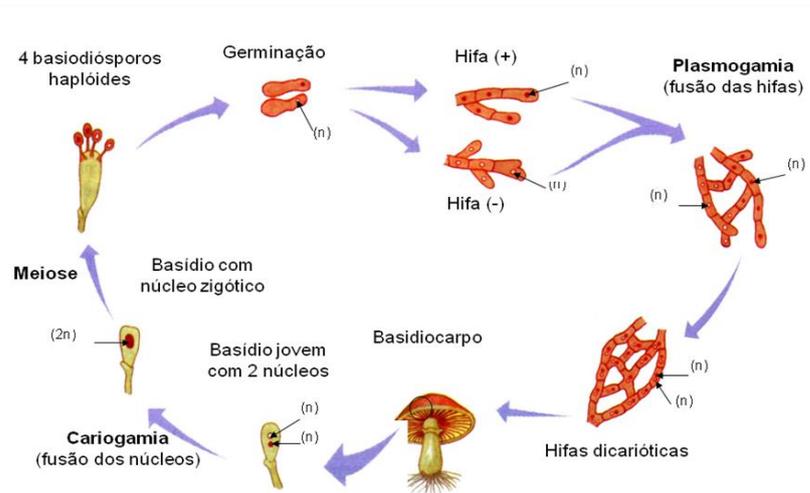


Figura 3. Ciclo de vida de basidiomicetes.

Fonte: www.biologia.blogger.com.br

2.3 Cultivo axênico de Pleurotus sajor-caju e Lentinula edodes em resíduos lignocelulósicos

Estima-se que, anualmente, são produzidos quatro milhões de toneladas de cogumelos, sendo os maiores produtores mundiais Estados Unidos, França, Alemanha, Holanda, Japão e China (Moda *et al.*, 2005). A produção anual de cogumelos tem crescido nos países da América Latina desde 1945, mas no período de 1995-2001, o aumento foi de 31%, um crescimento de aproximadamente 5% ao ano. Apesar disso a América Latina produz apenas 1,3% do total de cogumelos cultivados no mundo inteiro. Dentre os maiores produtores nesta região estão México (58,6%), Chile (17,6%) e Brasil (10,6%) (Taveira & Novaes, 2007).

No Brasil, o consumo de cogumelos comestíveis vem crescendo significativamente devido ao reconhecimento do seu alto valor nutritivo e ao aumento da oferta, tornando o produto mais popular e acessível, sendo os principais cogumelos cultivados o *Agaricus bisporus* Lange (champignon de Paris), *Lentinula edodes* Berk. (shiitake) e espécies do gênero *Pleurotus* (Eira & Minihoni, 1997).

Os fungos *P. sajor-caju* e *L. edodes*, conhecidos popularmente como cogumelo ostra e shiitake, produzem cogumelos muito apreciados por seu valor gastronômico, nutricional e

medicinal. Sua importância vem crescendo devido a um mercado em contínua expansão, pela melhora da qualidade, produtividade e custo de produção.

Considerados biodegradadores naturais, estes fungos participam do ciclo do carbono na natureza e o seu cultivo está diretamente ligado à reciclagem econômica de resíduos agrícolas e agroindustriais, produzindo alimentos de qualidade que podem ser consumidos pelo homem. Dessa maneira, os nutrientes presentes nos substratos são reciclados e retornam para a cadeia alimentar (Alexopoulos *et al.*, 1996; Anke, 1997).

Os resíduos lignocelulósicos estão entre os recursos para a nutrição destes fungos e podem ser utilizados em sua produção axênica, isto é, o substrato é submetido à esterilização, ou a técnicas de cultivo assépticas, até a colonização total do substrato pelo fungo. A utilização desses materiais decorre da habilidade do microrganismo em sintetizar enzimas hidrolíticas e oxidativas, as quais convertem os componentes individuais (celulose, hemicelulose e lignina) em compostos de menor peso molecular, que podem ser assimilados para nutrição (Buswell, 1996).

O processo natural de produção de basidiomicetes é o cultivo em meio sólido, no qual o microrganismo cresce em material sólido insolúvel umidificado com água, mas na ausência de água livre. Estas condições imitam o ambiente natural dos fungos de degradação branca e, ao mesmo tempo, apresentam grande potencial para a produção de enzimas. Este processo torna-se de especial interesse quando o extrato cru pode ser utilizado diretamente como fonte enzimática (Pandey *et al.*, 1999).

Zadrazil & Puniya (1994) referem que, embora o aumento da concentração de oxigênio favoreça a degradação da lignina, várias espécies de *Pleurotus* podem se desenvolver em materiais lignocelulósicos com baixos níveis de O₂ e suportar concentrações de dióxido de carbono de até 20%. Concentrações acima de 20% de CO₂ promovem um leve decréscimo do consumo de lignina e de matéria orgânica, fator que pode ser favorável ao

processo de cultivo, pois a maioria dos contaminantes é inibida por altas concentrações desse gás e pela redução dos valores de pH. Dióxido de carbono também é descrito como indutor da atividade de lacases e peroxidases durante a degradação do substrato por fungos do gênero *Pleurotus*.

L. edodes também é um decompositor de madeira e de resíduos vegetais, responsável pela produção de um complexo enzimático capaz de degradar compostos lignocelulósicos (Nicolini *et al.*, 1993). O sistema de degradação da lignina realizado por basidiomicetes tem aplicações potenciais no biobranqueamento (Onysko, 1993; Messner & Streböck, 1994; Reid & Paice, 1994) e na biodegradação de poluentes (Field, 1993; Barr & Aust, 1994). A biorremediação de efluentes industriais é alvo de pesquisas utilizando estes fungos, confirmando-se o potencial enzimático representado, principalmente, por lacases, manganês peroxidases e lignina peroxidases (Mayer & Staples, 2002).

Moo-Young *et al.* (1983), Tengerdy (1985) e Madamwar *et al.* (1989) afirmam que o uso correto do termo fermentação em estado sólido relaciona-se ao crescimento de microrganismos em materiais sólidos na ausência de água livre, sendo esta necessária ao crescimento sob forma absorvida ou complexada no interior da matriz sólida. Estes processos de fermentação apresentam alta produtividade volumétrica, concentração relativamente alta de produtos, menor geração de efluentes e requerem equipamentos simples para o processo quando comparados aos cultivos submersos (Pandey *et al.*, 1999).

O cultivo de cogumelos em resíduos agroindustriais resulta em corpos de frutificação comestíveis de alto valor nutricional, por serem boas fontes de proteínas e de outras substâncias minerais de interesse como cálcio, fósforo, ferro e magnésio (Breene, 1990), fibras alimentares solúveis e insolúveis, β -glucanas, quitina, compostos fenólicos (Manzi *et al.*, 2004) e ribonucleases (Ngai & Ng, 2004).

Diversos estudos relatam a produção de cogumelos em resíduos lignocelulósicos, como resíduos do processamento de palmitos, algodão e frutas, palhas de trigo e feijão e folhas de chá usadas (Chang *et al.*, 1981). Outros pesquisadores citam ainda palha de milho e casca de café (Dias *et al.*, 2003), palha de arroz (Bonatti *et al.*, 2004), polpa de café e palha de trigo (Salmones *et al.*, 2005), resíduos de algodão da indústria têxtil (Holtz *et al.*, 2008), serragem de casca de coco (Marino *et al.*, 2008), capim elefante pasteurizado (Bernardi *et al.*, 2009) e palha de bananeira (Rampinelli *et al.*, 2010). Bem como, para produção de enzimas, utilizando, resíduos de laranja (Alexandrino *et al.*, 2007) e polpa de coco (Couto & Sanromán, 2004), demonstrando a aplicabilidade desses materiais até então descartados.

Vários estudos têm mostrado que a composição de aminoácidos livres e de proteínas dos cogumelos é afetada pela quantidade e a forma como o nitrogênio é fornecido. Rajarathnam & Bano (1988) afirmam que, embora fungos do gênero *Pleurotus* tenham habilidade característica de colonizar resíduos de plantas com baixo conteúdo de nitrogênio (com relação C/N entre 50 e 100/1), ao mesmo tempo, podem produzir corpos de frutificação com alto conteúdo de nitrogênio.

Zadrazil & Puniya (1995) verificaram mudanças nos conteúdos de proteínas dos corpos de frutificação quando cogumelos foram cultivados em meios suplementados com nitrogênio e observaram, também, aumento no conteúdo de proteína dos corpos de frutificação de *P. sajor-caju* crescidos em meio suplementado com farinha de soja.

A adaptação das espécies de *Pleurotus* a novos resíduos exige maiores conhecimentos sobre a composição do meio de cultivo, principalmente levando-se em conta a variação ocasionada no teor e qualidade proteica, bem como a presença e quantidade de minerais destes cogumelos (Sturion & Ranzani, 2000).

Substratos de natureza pecto-celulósica, como polpas e bagaços de frutas, possuem menor relação C/N, com composição bastante favorável para o cultivo dessas espécies de

cogumelos, pois contém altas concentrações de açúcares simples, facilmente disponíveis para o fungo. Os fungos basidiomicetes *P. sajor-caju* e *L. edodes* possuem um complexo lignocelulítico capaz de degradar a lignocelulose encontrada em diversos resíduos agroindustriais, incluindo bagaços e serragens.

O cultivo de cogumelos através de uma adaptação da técnica JunCao, que utiliza gramíneas em sacos de polipropileno para o cultivo, possibilita o aproveitamento de diferentes resíduos agroindustriais, com aumento da velocidade de miceliação e consequente redução no tempo de frutificação (Urban, 2004). Além disso, as diferentes formulações do meio de cultivo resultam em alterações nutricionais dos cogumelos, de acordo com os substratos utilizados (Ragunathan & Swaminathan, 2003; Mendez *et al.*, 2005; Shashirekha *et al.*, 2005). Um dos fatores determinantes no cultivo de cogumelos é a seleção de substratos para produção, onde materiais adequados, tanto biologicamente como economicamente, são essenciais para o sucesso do cultivo (Tisdale *et al.*, 2006).

2.4 Biodegradação da lignocelulose por basidiomicetes

A lignocelulose é o mais abundante biopolímero do planeta, sendo sua maior parte encontrada como madeira e palhas. Aproximadamente, 50% da biomassa do planeta está sob a forma de lignocelulose que é composta predominantemente pelos polímeros celulose, hemicelulose e lignina e está distribuída amplamente em todas as plantas vasculares, onde forma o sistema de suporte estrutural (Fengel & Wegner, 1983).

A celulose é a principal estrutura que compõe a parede celular das plantas superiores, sendo circundada por hemicelulose. Consiste de um polímero linear de glicose, unidas por ligações β -(1:4)-glicosídicas, apresentando alto grau de polimerização. A molécula de celulose é insolúvel em água, apresenta alta resistência à tensão e é relativamente recalcitrante

à degradação, quando comparada a outros polímeros de glicose, como o amido (Betts *et al.*, 1991; Ghosh & Ghosh, 1992).

A hemicelulose é formada por um grupo de polissacarídeos heterogêneos encontrados nas paredes celulares de vegetais. Os principais representantes desse grupo são os xilanas, xiloglicanas, β -glicanas, calose e β -mananas. Estas moléculas apresentam estrutura não cristalina e se encontram associadas à lignina e circundando a celulose (Betts *et al.*, 1991; Ghosh & Ghosh, 1992).

A lignina, um polímero fenilpropanoide amorfo com peso molecular de aproximadamente 10^5 Da, constitui o segundo grupo de biopolímeros mais abundante na biosfera (Betts *et al.*, 1991). Os três principais monômeros que compõem a molécula de lignina são o álcool β -cumárico, o álcool coniferílico e o álcool sinapílico, originados a partir da rota metabólica do ácido chiquímico.

A estrutura tridimensional randômica da lignina (Figura 4) é resultado do ataque de peroxidases e lacases produzidas pelos vegetais a estas unidades, formando radicais fenoxílicos de curto tempo de vida e com várias estruturas de ressonância, os quais podem se polimerizar randomicamente, formando a estrutura da lignina (Betts *et al.*, 1991).

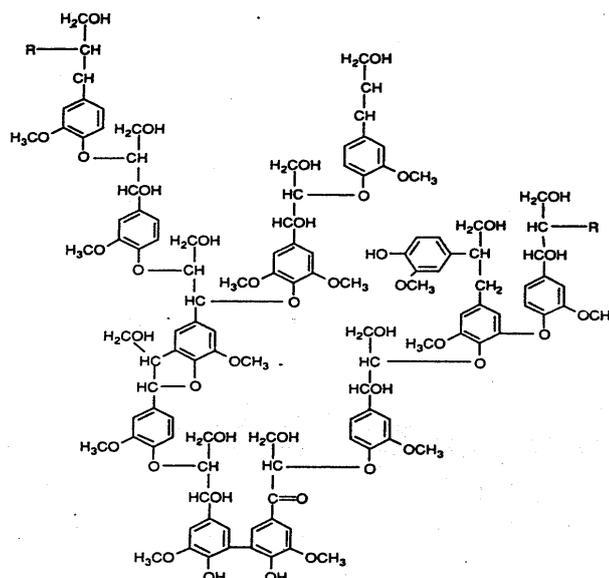


Figura 4. Estrutura representativa de parte de um polímero de lignina
(Adaptado de Barr & Aust, 1994).

Uma grande diversidade de ligações é encontrada na estrutura da lignina (Figura 5), que também forma ligações covalentes com proteínas, especialmente com glicoproteínas da parede celular. As ligações inter-monoméricas são muito estáveis, constituindo ligações C-C de difícil hidrólise ou

ligações éter (Withmore, 1978).

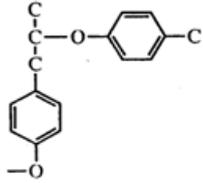
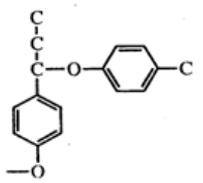
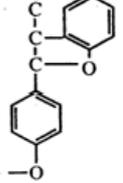
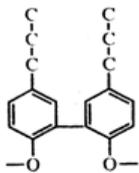
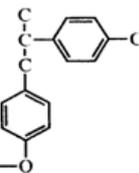
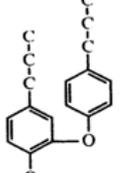
arilglicerol- β -aril éter	arilglicerol- α -aril	fenilcumarina
		
bifenil	1,2-diarilpropano	difenil éter
		

Figura 5. Principais tipos de ligações encontradas na lignina, com suas respectivas proporções (Betts *et al.*, 1991).

Existe ainda uma fração menor dos materiais lignocelulósicos, formada basicamente por compostos fenólicos e resinas, que comumente são chamados de extrativos (solúveis em solventes orgânicos e água) e compreendem cerca de 2 a 4%. Cabe ressaltar que todos esses constituintes estão ligados quimicamente, construindo todo o complexo celular vegetal.

Os fungos são classificados em três grupos conforme a sua capacidade de degradar os componentes da madeira: fungos da degradação marrom, macia e branca (Amer & Drew, 1980). Os fungos de degradação marrom estão associados ao decaimento da madeira e apenas decompõem a celulose e a hemicelulose causando pequenas mudanças na lignina. A aparência de um material lignocelulósico decomposto por fungos de decomposição marrom é coloração castanha e a facilidade de quebra em cubos no sentido transversal ao das fibras.

Os fungos de degradação macia são Actinomycetos capazes de degradar lignina e os demais materiais celulósicos, embora a degradação da lignina seja limitada e menos eficiente do que quando efetuada por fungos de podridão branca.

Por sua vez, os fungos da decomposição branca são os mais ativos degradadores de madeira sendo capazes de degradar todos os seus componentes, inclusive a lignina. Apresentam a capacidade de remover, pelo menos em parte, os taninos, levando ao branqueamento da madeira, que se rompe facilmente no sentido das fibras vegetais.

Estudos da biodegradação da lignina são de grande importância para possibilitar aplicações biotecnológicas em materiais lignocelulósicos, visto que polímeros de lignina são um dos obstáculos para a eficiente utilização destes materiais em um grande número de processos industriais. Sua degradação ocorre, primeiramente, através da ação dos fungos da degradação branca; conseqüentemente, este grupo ecológico também tem sido alvo de muitas pesquisas (Eggert *et al.*, 1996).

Durante a decomposição, os componentes dos materiais lignocelulósicos são progressivamente despolimerizados e, finalmente, transformados em dióxido de carbono e água, fechando o ciclo do carbono que se iniciou na fotossíntese realizada pelo próprio material lignocelulósico quando ainda ativo. Em geral, é possível distinguir três modos para o balanço de massas envolvido na degradação de cada componente dos materiais lignocelulósicos. Os fungos de decomposição marrom degradam principalmente os polissacarídeos e geram um resíduo enriquecido com lignina. Os fungos de decomposição branca podem degradar os materiais lignocelulósicos de duas formas distintas: uma delas, a mais típica, envolve remoção simultânea de todos os componentes; a outra, menos frequente, envolve remoção seletiva de lignina e hemiceluloses, mantendo a celulose praticamente intacta (Agosin *et al.*, 1990, Ferraz *et al.*, 2000).

Considerando que a lignocelulose representa a maior parte da biomassa da biosfera, sua degradação torna-se essencial ao funcionamento do ciclo do carbono. A capacidade de microrganismos assimilarem material orgânico, por sua vez, depende da sua capacidade de produzir as enzimas necessárias para a degradação do substrato em moléculas menores, as quais podem ser utilizadas pelas células (Tuomela *et al.*, 2000).

P. sajor-caju PS-2001 foi estudado quanto à possibilidade de cultivo em meio líquido visando à produção de biomassa (Confortin *et al.*, 2008) e também em cultivo sólido para obtenção de fenol-oxidases para a remoção de fenóis de efluente papelheiro (Munari *et al.*, 2007) e descoloração de corantes têxteis (Munari *et al.*, 2008) demonstrando o potencial biotecnológico deste microrganismo.

2.5 Enzimas ligninolíticas de basidiomicetes

Os fungos de degradação branca desempenham um importante papel na decomposição da lignina, sendo este processo catalisado por enzimas ligninolíticas que são hábeis em oxidar os anéis aromáticos da estrutura da lignina. Manganês peroxidases (MnP) e lacases (Lac) de basidiomicetes são as mais importantes dentre as enzimas ligninolíticas e também são hábeis em degradar polímeros aromáticos e xenobióticos existentes em poluentes ambientais (Scheel *et al.*, 2000).

Desde a descoberta da lignina peroxidase (LiP) em 1983 (Glenn *et al.*, 1983; Tien & Kirk, 1983) e, posteriormente, das manganês peroxidases (Kuwahara *et al.*, 1984), grande parte do que foi estabelecido sobre a biodegradação da lignina provém de experimentos realizados com o basidiomicete *Phanerochaete chrysosporium* e espécies do gênero *Pleurotus*, amplamente estudadas quanto a esta característica (Camarero *et al.*, 1996). Com base nesses estudos, as enzimas envolvidas na degradação de lignina podem ser agrupadas em duas classes distintas: fenol-oxidases e enzimas que produzem peróxido de hidrogênio.

As fenol-oxidases compreendem um grupo de enzimas característico por pertencerem às metaloproteínas. Entre as fenol-oxidases, ainda se podem descrever dois subgrupos: um contém as enzimas dependentes de peróxido ou peroxidases. As peroxidases que estão envolvidas na biodegradação da lignina são LiP e MnP. As figuras 6 e 7 apresentam de forma resumida o ciclo de reação destas enzimas. Ambas são comumente produzidas por fungos de degradação branca. No entanto, existem espécies de fungos que são eficientes degradadoras de lignina que produzem somente um ou outro subgrupo dessas enzimas; o outro grupo contém as Lac, cuproproteínas que não dependem de peróxido para atuar.

Segundo Pandey *et al.* (1999), LiP e MnP são produzidas em resposta a baixos níveis de fontes de nutrientes, como carbono e nitrogênio. Lac e MnP catalisam a formação de radicais intermediários da lignina de alto peso molecular, oxidando componentes fenólicos da lignina. A LiP é eficiente na oxidação de estruturas fenólicas e não fenólicas (Barr & Aust, 1994). Também degrada anéis aromáticos alcoxilados do tipo da lignina como também gera quebra de anéis em modelos da lignina diméricos como poliméricos e em cloroligninas. De forma geral, a LiP gera: oxidação de álcoois benzílicos, quebra de cadeias aromáticas laterais C α -C β , desmetilação, rearranjos intramoleculares e quebra de anéis em compostos não fenólicos relacionados à lignina. Álcool veratrílico tem um papel importante na catálise da LiP: é o redutor preferido pela enzima, produzida pelo fungo de degradação branca após lignólise e, aparentemente, protege a enzima contra a inativação do excesso de peróxido de hidrogênio (Durán, 2004).

MnP tem sido amplamente estudada, pois a maioria dos fungos de degradação branca produzem pouca LiP (Cohen *et al.*, 2002) e é considerada uma enzima chave na ligninólise realizada por fungos da decomposição branca (Sasaki *et al.*, 2001). Essa enzima, muito semelhante à LiP, é extracelular, glicosilada e possui um grupo prostético heme. Entretanto, é

dependente de peróxido de hidrogênio e do íon Mn^{+2} , α -cetoácidos como lactato estabilizam sua atividade oxidativa (Durán, 2004).

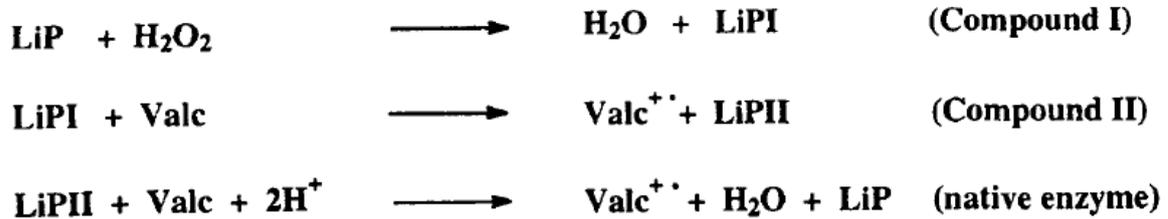


Figura 6. Ciclo redox da lignina peroxidase. (Valc⁺ corresponde ao radical cátion de álcool veratrílico. Fonte: Schoemaker & Piontek, 1996.)



Figura 7. Ciclo de reação da manganês peroxidase.

Lac são fenol-oxidases produzidas por fungos como também por plantas. Pertencem ao grupo das oxidases que complexam cobre, possuem quatro íons de cobre por molécula (Thurston, 1994) e atuam diretamente sobre estruturas fenólicas por meio da oxidação dos fenóis pela abstração de um elétron mediada pela redução de Cu^{2+} a Cu^{1+} , que, por sua vez, reduz O_2 a H_2O , permitindo que a enzima atue de forma cíclica (Figura 8). Lac podem também degradar estruturas não fenólicas por meio de mediadores, como o ABTS. Nesse caso, a enzima é capaz de oxidar alguns mediadores que possuem potenciais de ionização mais elevados que o próprio potencial de oxidação da Lac (Li *et al.*, 1999). Esses mediadores, ao serem reduzidos ao estado original podem, então, oxidar estruturas não fenólicas.

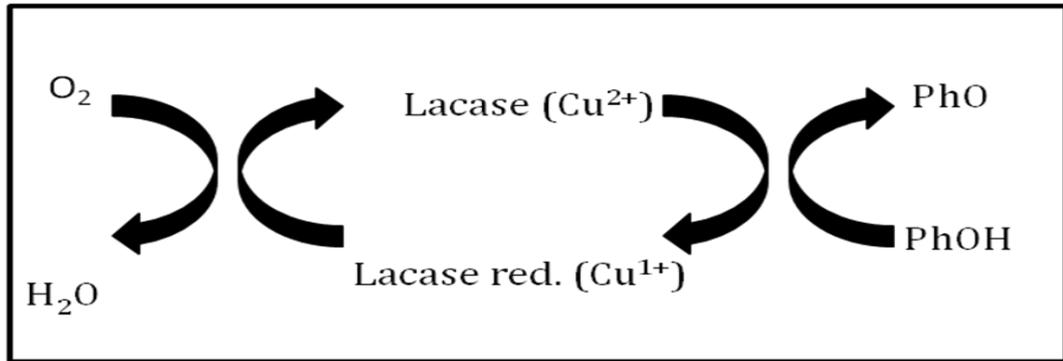


Figura 8. Ciclo catalítico da lacase.

PhOH representa um substrato fenólico. A estequiometria do ciclo envolve quatro Cu²⁺ (normalmente ligados a uma única proteína ou duas cadeias proteicas acopladas), quatro substratos fenólicos, quatro prótons e uma molécula de O₂.

As enzimas são biocatalisadores, ou seja, são proteínas produzidas pelas células com a finalidade de acelerar as reações químicas do metabolismo. São bastante específicas quanto à sua função e, sendo assim, podem ser encontrados diversos tipos de enzimas biossintetizadas para catalizar os diferentes tipos de reação bioquímica (Ângelo, 2004). As enzimas ligninolíticas apresentam um grande potencial na biotransformação de ligninas e de seus derivados como também em aspectos ambientais. Essas enzimas têm um papel importante na descontaminação de efluentes papaleiros e têxteis, também em sua utilização em biossensores para detectar fenóis em ambiente contaminado (Durán & Esposito, 2000).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Fungos

Neste trabalho, foram utilizadas as linhagens *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 e *Lentinula edodes* LE-01, pertencentes à coleção do Laboratório de Enzimas e Biomassas, Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul.

3.2 Resíduos lignocelulósicos

As serragens utilizadas neste trabalho foram fornecidas por serrarias da região consistindo de *Pinus* sp. para o cultivo de *P. sajor-caju* PS-2001 e, *Eucalyptus* sp. para *L. edodes* LE-01. Os bagaços de *Vitis labrusca* e *Malus domestica* foram oriundos de vinícolas e empresas processadoras de frutas, respectivamente, e ambos foram utilizados para o cultivo dos fungos estudados. O bagaço de *V. labrusca* foi composto pela variedade bordô e não possuía engaços. As serragens possuíam pouca umidade, entre 1 e 8%, já os resíduos de frutas apresentaram umidade entre 55 e 80%, sendo dispostos ao sol para redução do excesso de umidade ou adicionando-se água para correção da umidade até 66% no preparo dos substratos, quando necessário.

3.3 Preparo de inóculos

Gãos de trigo (*Triticum* sp.) foram imersos em água na proporção 1:2 (m/v) e autoclavados (durante 15 min a 1 atm). Após, adicionou-se 1% (m/m) de carbonato de cálcio (CaCO_3) em base seca. A umidade obtida ficou entre 55% e 60%, conforme Minhoni & Zied (2008). Os grãos foram acondicionados em frascos de vidro com 350 g cada, tampados e esterilizados em autoclave durante 2 horas. Cada frasco foi inoculado, em capela de fluxo laminar, com cinco discos de ágar de 1,5 cm de diâmetro contendo micélio fúngico, retirados

com um cilindro de vidro a partir da extremidade de placas de manutenção das linhagens. Os frascos inoculados foram mantidos em temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ em compartimento escuro para o desenvolvimento micelial durante um período de 15 a 20 dias (Figura 9).



Figura 9. Inóculo de *Lentinula edodes* LE-01 e *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em diferentes tempos de colonização. (A) Inóculo de *L. edodes* com aproximadamente 15 dias de colonização. (B) Inóculo de *P. sajor-caju* após 20 dias de colonização.

3.4 Meios de cultivo

3.4.1 Meio de cultivo para manutenção das linhagens

As linhagens foram mantidas em meio constituído de 2% (m/v) de serragem moída (*Eucalyptus* sp. para *L. edodes* LE-01 e *Pinus* sp. para *P. sajor-caju* PS-2001), 2% (m/v) de farelo de trigo moído, 2% (m/v) de ágar-ágar, 0,2% (m/v) de CaCO_3 e água destilada, sendo autoclavado por 30 min a 1 atm. As placas com as linhagens foram mantidas em estufa a 28°C até o crescimento micelial e, após, armazenadas a 4°C .

3.4.2 Meio de cultivo para produção de corpos de frutificação

Os meios de cultivo para produção de cogumelos foram elaborados utilizando cinco proporções de resíduos lignocelulósicos, visto que cada proporção consistia num substrato (S). Cada substrato foi composto de 94% (m/m) de bagaço de fruta, uva ou maçã, e/ou

serragem de *Pinus* sp. ou *Eucalyptus* sp., conforme o fungo empregado. Dentro dessa proporção (94%), cada tratamento foi composto conforme apresentado no Quadro 1.

Quadro 1. Proporção de resíduos lignocelulósicos em base seca (m/m) utilizados em cada substrato.

Substrato	Resíduo lignocelulósico (94%)	
	Bagaço de <i>Vitis labrusca</i> ou <i>Malus domestica</i> para ambos os fungos estudados (%)	Serragem de <i>Pinus</i> sp. para <i>Pleurotus sajor-caju</i> PS-2001 ou <i>Eucalyptus</i> sp. para <i>Lentinula edodes</i> LE-01 (%)
S1	100	-
S2 (3:1)	75	25
S3 (1:1)	50	50
S4 (1:3)	25	75
S5	-	100

Os resíduos lignocelulósicos (fonte de carbono) na proporção de 94% (m/m) em cada tratamento foram suplementados com 5% (m/m) de farelo de trigo (fonte de nitrogênio) e 1% (m/m) de CaCO₃ (fonte de cálcio), conforme concentração proposta por Tan & Wahab (1997). O cultivo de *P. sajor-caju* PS-2001 foi suplementado com solução mineral constituída (NH₄)₂SO₄, MnSO₄.H₂O, CuSO₄.5H₂O e fenol, segundo Silva (2004), que favorece o aumento da biomassa fúngica e conseqüentemente, a frutificação. Cada tratamento foi homogeneizado com a adição de água destilada até obtenção de cerca de 66% de umidade.

3.5 Sistemas para produção de corpos de frutificação

A produção de cogumelos foi realizada utilizando sacos de polipropileno transparentes, que facilitam a visualização do crescimento do micélio e possíveis contaminações, com dimensões 30 x 30 cm, contendo 300 g do meio de cultivo em base seca. Cada saco de cultivo foi fechado e autoclavado durante 2 h. Após os substratos esfriarem,

foram inoculados em capela de fluxo laminar com 5% (m/m) de inóculo, fechados e mantidos em câmara de crescimento em temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$ até completa colonização. Após, cada saco recebeu pequenas perfurações para que houvesse a entrada de ar (diminuindo a concentração de CO_2 e aumentando a de O_2), e umidade, o que estimula a formação de corpos de frutificação, e foram transferidos para a sala de frutificação, com temperatura entre 15 a 20°C . A coleta dos cogumelos foi realizada antes da liberação dos esporos, pois neste estágio o mesmo apresenta consistência túrgida e maior tempo de prateleira. Após a liberação dos esporos, começa a senescência do cogumelo e sua durabilidade é diminuída.

3.6 Estudo de produção enzimática

A produção enzimática foi avaliada utilizando cultivos realizados em sacos de polipropileno com dimensões 16 x 30 cm e 50 g do tratamento em base seca. Cada saco ou biorreator de cultivo sólido foi fechado e autoclavado durante 2 h. Após os substratos esfriarem, foram inoculados em capela de fluxo laminar com 5% (m/m) de inóculo, fechados e mantidos em câmara de crescimento em temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$. As amostras para as análises foram coletadas a cada 48 horas, durante 30 dias.

3.7 Extrato enzimático

O conteúdo dos sacos foi homogeneizado manualmente e alíquotas do substrato de cada fermentador foram suspensas em água destilada na concentração 1:2 (m/v), agitadas por 30 min a 200 rpm a 4°C . Os sólidos foram removidos por filtração com papel filtro e o caldo enzimático centrifugado a 3000 rpm, por 30 min. O extrato aquoso obtido foi utilizado para as determinações enzimáticas e de proteínas solúveis. Todas as atividades enzimáticas foram determinadas em unidades internacionais por mL ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$), definidas como número em μmol

de produto liberado por mL por minuto. Os resultados foram convertidos para $U.g^{-1}$ através da seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Ativ. enzimática (U.mL}^{-1}) \times (Y + 50)}{(25 - Y)} = \text{Ativ. enzimática U.g}^{-1}, \text{ onde:}$$

$$Y = \frac{(\text{umidade} \times 100 \times 25)}{100}$$

3.8 Determinação da umidade dos resíduos e substratos

A umidade dos resíduos e substratos foi determinada gravimetricamente, após secagem em estufa a 100°C até peso constante.

3.9 Determinação de pH dos resíduos e extratos enzimáticos

A determinação de pH dos resíduos e dos extratos enzimáticos foi realizada utilizando-se um pH-metro. A medição foi realizada diretamente nos extratos enzimáticos de cada tratamento. Para os resíduos, foi realizada diluição em água destilada na concentração 1:2 (m/v).

3.10 Cálculos da produção de corpos de frutificação

O rendimento, a produtividade e a eficiência biológica foram calculados conforme método proposto por Yildiz *et al.* (2002) ao final da primeira coleta, em cada tratamento.

3.10.1 Rendimento

O rendimento (R) foi determinado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$R = \frac{\text{MASSA FRESCA DOS COGUMELOS}}{\text{MASSA FRESCA DO SUBSTRATO}} \times 100$$

Os resultados foram expressos em porcentagem.

3.10.2 Eficiência biológica

A eficiência biológica (EB) foi determinada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$EB = \frac{\text{MASSA FRESCA DOS COGUMELOS}}{\text{MASSA SECA DO SUBSTRATO}^1} \times 100$$

Os resultados foram expressos em porcentagem.

3.10.3 Produtividade

A produtividade (P) foi determinada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$P = \frac{\text{EFICIÊNCIA BIOLÓGICA}}{\text{NÚMERO TOTAL DE DIAS DE CULTIVO}}$$

Os resultados foram expressos em % g.g⁻¹.dia⁻¹.

3.11 Análises enzimáticas, de proteínas totais e de biomassa fúngica

Foram determinadas as atividades enzimáticas de lacases (Lac) e a concentração de biomassa fúngica a cada dois dias durante 30 dias de cultivo. O perfil de lacases foi correlacionado com a biomassa. Na data de maior atividade de Lac, foram determinadas as atividades de: manganês peroxidase (MnP), lignina peroxidase (LiP), oxidases do álcool veratrílico (OAV), peroxidases totais (PerT) e, também, a concentração de proteínas totais (PT).

3.11.1 Lacases

A atividade de Lac foi determinada com o uso do substrato 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS). A mistura reacional continha 0,45 mM de ABTS, 90 mM de tampão acetato de sódio pH 5,0 e 1 mL de extrato enzimático. A oxidação do ABTS foi monitorada pelo aumento da absorbância em 420 nm, durante 90 s, a 25°C, utilizando-se $\epsilon = 3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Wolfenden & Wilson, 1982).

3.11.2 Manganês peroxidases

A atividade de MnP foi determinada pelo método proposto por Kuwahara *et al.* (1984). A mistura reacional consistia de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de vermelho de fenol, 50 μM de sulfato de manganês, 50 μM de H_2O_2 , 12,5 μM de lactato de sódio, 500 $\mu\text{M.mL}^{-1}$ de albumina bovina em tampão succinato de sódio pH 4,5, sendo adicionados 0,5 mL de extrato enzimático. Após 5 min a 30°C, as reações foram interrompidas pela adição de 40 μL de NaOH 2M. A formação do produto de oxidação foi quantificada pela variação da absorbância (610 nm), sendo considerado como branco uma amostra em tempo zero de reação, utilizando-se $\epsilon = 4,46 \times 10^4 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

3.11.3 Lignina peroxidases

A atividade de LiP foi determinada pela formação de veratríaldeído ($\epsilon = 9,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), numa mistura reacional contendo 1 mM de álcool veratrílico na presença de 500 μM de H_2O_2 em meio tamponado com 250 mM de tartarato de sódio pH 3,0, com volume final de 2 mL (Tien & Kirk, 1984). As reações foram iniciadas pela adição de 0,5 mL de extrato enzimático e a variação de absorbância observada durante 5 min, a 30°C.

3.11.4 Oxidases do álcool veratrílico

Para a determinação da atividade de OAV, foi observada a formação de aldeído veratrílico a partir de uma reação contendo 1 mM de álcool veratrílico, 250 mM de tampão tartarato de sódio pH 5,0 e 0,5 mL de extrato enzimático, com volume final de 2 mL, sendo a reação monitorada durante 5 min, a 30°C, utilizando-se $\epsilon = 9,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (Bourbonnais & Paice, 1988).

3.11.5 Peroxidases totais

PerT foram determinadas utilizando-se procedimentos semelhantes aos adotados para Lac (Heinzkill *et al.*, 1998), utilizando ABTS como substrato redutor, entretanto, na presença de 200 μM de H_2O_2 na reação. As atividades de peroxidases foram subtraídas das atividades detectadas para lacases.

3.11.6 Proteínas totais

Proteínas totais foram determinadas pela análise do complexo azul formado pela ligação das proteínas do extrato enzimático ao corante *Comassie Brilliant Blue* G-250 a 595 nm (Bradford, 1976). A concentração foi estimada correlacionando a absorvância das amostras a uma curva padrão de albumina bovina com concentrações entre 2 e 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

3.11.7 Biomassa fúngica

A biomassa fúngica foi medida indiretamente conforme metodologia adaptada de Bittencourt *et al.* (2002). Dessa forma, foram retirados 500 mg de substrato de cada biorreator, previamente homogeneizado manualmente. As alíquotas foram tratadas com 3 mL de tampão citrato (0,05 M) em ultra-som ($f = 40$ kHz, $P = 81$ W) por 1 hora. Após, foram acrescentados 2 mL de uma solução 5% (m/v) da enzima quitinase, Glucanex[®] (Novozymes), diluída em tampão citrato de sódio (0,05 M). As amostras, em triplicata, foram mantidas em banho agitado por 24 horas, em temperatura de 45°C a 40 rpm, sendo posteriormente retiradas para a dosagem de N-acetilglicosamina.

A hidrólise enzimática foi interrompida fervendo-se o conteúdo dos frascos a 100°C, durante 5 min. As amostras foram retiradas e centrifugadas por 30 minutos a 1000 rpm e após, 500 μL da amostra foram dispostas em tubos de ensaio para determinação de N-acetilglicosamina.

Para determinação de N-acetilglicosamina (Reissig *et al.*, 1955), a um volume de 500 μL de amostra foram acrescentados 100 μL de uma solução de tetraborato de potássio, sendo a mistura mantida em água fervente por 3 min. Após, os tubos de ensaio contendo a amostra e a solução de tetraborato de potássio foram resfriados em água corrente e a eles foram adicionados 3 mL de um solução diluída de dimetilamino-benzaldeído (DMAB). A solução de DMAB concentrada foi obtida dissolvendo-se 10 g de DMAB em 100 mL de uma solução de ácido acético-ácido clorídrico (12,5 mL de HCl 10 M completada para 100 mL com ácido acético glacial). Para uso, a solução concentrada foi diluída em uma proporção de 1/10 em ácido acético glacial. As soluções contendo DMAB foram dispostas em banho a 36-38°C por 20 min e lidas em espectrofotômetro ($\lambda = 583 \text{ nm}$).

A curva padrão foi preparada a partir de uma solução contendo 11 mg de N-acetilglicosamina, completando-se para 100 mL com água destilada. Desta solução, foram utilizados volumes de 100 a 500 μL , completando-se com água destilada até um volume final de 500 μL , para reação com 3 mL da solução de DMAB.

3.12 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA) e comparados pelo teste de Tukey, com intervalo de confiança $p \leq 0,05$, usando o programa Graph Pad Prism[®] (Graph Pad Software, San Diego, USA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cultivos com *Pleurotus sajor-caju* PS 2001

4.1.1 Produção de cogumelos comestíveis de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Pinus* sp.

Os cogumelos comestíveis do gênero *Pleurotus* apresentam adaptabilidade em diferentes resíduos lignocelulósicos, sendo facilmente cultivados nos mais diversos tipos de substratos, como madeira, serragem, palha de cereais, bagaço de cana-de-açúcar, resíduos de café (borra, casca, talos e folhas), folhas de bananeira, caroço de algodão e polpa de soja (Farias, 1999). Entretanto, o tipo de substrato utilizado é de grande importância, pois pode propiciar rápida colonização e frutificação.

Neste trabalho, foram testadas as seguintes combinações de substratos para a produção de cogumelos: substrato 1 (S1): somente bagaço de *Vitis labrusca*; substrato 2 (S2): 75% bagaço de *V. labrusca* e 25% serragem de *Pinus* sp. (3:1); substrato 3 (S3): 50% bagaço de *V. labrusca* e 50% serragem de *Pinus* sp. (1:1); substrato 4 (S4): 25% bagaço de *V. labrusca* e 75% serragem de *Pinus* sp. (1:3) e substrato 5 (S5): somente serragem de *Pinus* sp., adotado como controle.

Os cultivos realizados com *P. sajor-caju* PS-2001 empregando bagaço de *V. labrusca* e serragem de *Pinus* sp. apresentaram a primeira “frutificação” 37 dias após a inoculação nos substratos 2 e 4. As demais combinações de substratos testadas apresentaram a primeira frutificação após esta data, estendendo-se o período de coletas até 68 dias após a inoculação.

Os cogumelos obtidos neste cultivo apresentaram umidade em torno de 85%, tamanhos variados, desde cogumelos pequenos (5,5 x 4 cm) a consideravelmente grandes (12,5 x 8,5 cm), coloração acinzentada e uniforme, característica da espécie, odor agradável e textura tenra, como pode ser observado na Figura 10. Não foram observadas alterações

morfológicas nos cogumelos produzidos nestes substratos, como relatado por Leifa (1999) com cogumelos *Pleurotus* sp. produzidos em borra de café.

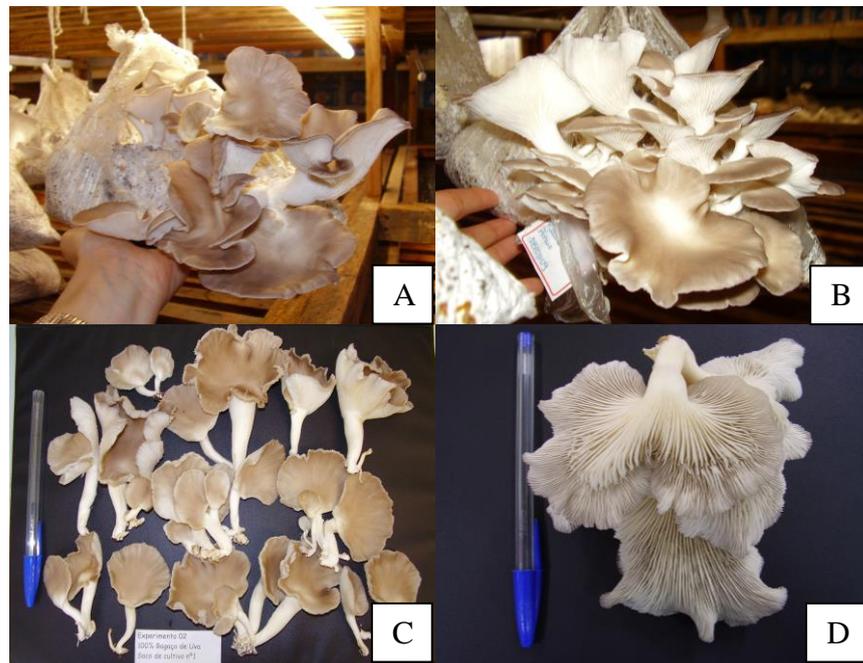


Figura 10. Cogumelos de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001.

(A) Saco de cultivo empregando bagaço de *Vitis labrusca*. (B) Saco de cultivo empregando serragem de *Pinus* sp. (C) Cogumelos coletados de substrato contendo somente bagaço de *Vitis labrusca*. (D) Cogumelo coletado de cultivo contendo serragem de *Pinus* sp.

Embora os valores médios de rendimento (R), eficiência biológica (EB) e produtividade (P) tenham sido diferentes, os tratamentos não diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) devido aos desvios padrão apresentados. Os dados de R, EB e P deste cultivo estão descritos de forma detalhada na Tabela 1. O maior valor de R de cogumelos obtido com os resíduos bagaço de *V. labrusca* e serragem de *Pinus* sp. ocorreu com o S4, que apresentou 11%, média superior ao valor de 5,6% observado no controle S5. As condições S1, S2 e S3 apresentaram valores semelhantes de R, 6,2; 7,4 e 6,8, respectivamente.

A maior média de EB, que representa o percentual de conversão do substrato em corpo de frutificação em base seca (Zhang *et al.*, 2002), foi obtida no S4, com 33%, seguido de S2, (22,3%). S3, S1 e o controle S5 apresentaram valores menores de EB, de 20,3; 18,6 e 15%,

respectivamente, mesmo assim, superiores aos obtidos em resíduos de fiação e tecelagem citados por Holtz *et al.* (2007), que obtiveram o valor de 8,5%.

S4 foi o substrato que possibilitou a maior média de produtividade, de 0,6 g.dia⁻¹, seguido dos substratos S2, S3, S1 e por último o controle S5, que apresentaram 0,47; 0,4; 0,35 e 0,23 g.dia⁻¹, respectivamente.

Tabela 1. Rendimento, eficiência biológica e produtividade de cogumelos *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 cultivados em bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Pinus* sp.

Características da produção de cogumelos de <i>Pleurotus sajor-caju</i>			
Substratos	Rendimento (%)	Eficiência Biológica (%)	Produtividade (g.dia ⁻¹)
S1	6,2 ± 2,31 ^a	18,6 ± 4,81 ^a	0,35 ± 0,13 ^a
S2 (3:1)	7,4 ± 4,8 ^a	22,3 ± 2,48 ^a	0,47 ± 0,09 ^a
S3 (1:1)	6,8 ± 2,09 ^a	20,3 ± 3,44 ^a	0,4 ± 0,05 ^a
S4 (1:3)	11 ± 1,19 ^a	33 ± 2,18 ^a	0,6 ± 0,13 ^a
S5*	5,6 ± 1,05 ^a	15 ± 1,57 ^a	0,23 ± 0,006 ^a

Dados da média da massa fresca de cogumelos obtidos em cultivos realizados em triplicata; *substrato controle; ^aAnálise estatística: grupos com a mesma letra não diferem estatisticamente em nível de 5% (p≤0,05). S1: bagaço, S2: bagaço e serragem (3:1), S3: bagaço e serragem (1:1), S4: bagaço e serragem (1:3), S5: serragem.

De acordo com os resultados obtidos nos cultivos realizados com bagaço de *V. labrusca* e serragem de *Pinus* sp., verifica-se que a maior média dos parâmetros analisados foi observada na composição 4, embora não tenham sido observadas diferenças estatisticamente significativas. Essa média pode estar refletindo a melhor proporção de bagaços e serragem para a produção de cogumelos comestíveis de *P. sajor-caju* PS-2001, sendo, entretanto, necessária a condução de mais ensaios, para verificar esta suposição.

4.1.2 Produção de cogumelos comestíveis de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em bagaço de *Malus domestica* e serragem de *Pinus* sp.

Cultivos de *P. sajor-caju* PS-2001 foram realizados empregando também bagaços de *M. domestica*, nas mesmas proporções empregadas nos estudos com *V. labrusca* e serragem de *Pinus* sp., obtendo-se dessa forma os seguintes substratos: substrato 1 (S1): somente bagaço de *M. domestica*; substrato 2 (S2): 75% bagaço de *M. domestica* e 25% serragem de *Pinus* sp. (3:1); substrato 3 (S3): 50% bagaço de *M. domestica* e 50% serragem de *Pinus* sp. (1:1); substrato 4 (S4): 25% bagaço de *M. domestica* e 75% serragem de *Pinus* sp. (1:3) e substrato 5 (S5): somente serragem de *Pinus* sp., adotado como controle.

Entre os substratos estudados, o S5, adotado como controle, apresentou a primeira frutificação de *P. sajor-caju* PS-2001 em 35 dias após a inoculação, visto que foi submetido às mesmas condições que os demais substratos. S4 foi o segundo a frutificar, 45 dias após a inoculação, e foram realizadas coletas nestes substratos até 82 dias após a inoculação.

Em todos os cultivos, vários primórdios não desenvolveram até corpo de frutificação, enquanto outros se sobressaíram formando grandes cogumelos. Os cogumelos obtidos neste cultivo apresentaram umidade em torno de 86% e tamanhos variados, como pode ser observado na Figura 11.

O rendimento, a eficiência biológica e a produtividade deste cultivo estão descritos na Tabela 2. O substrato 4, composto de bagaço *M. domestica* e serragem e *Pinus* sp. (1:3), apresentou R, EB e P com médias superiores aos outros substratos testados e ao controle, de 27%, 9% e 0,36 g.dia⁻¹, respectivamente. O rendimento em S4 é estatisticamente diferente do rendimento de S1, S2 e S5; a EB e P em S4 é estatisticamente diferente dos obtidos em S2 e S5.

A segunda maior média para os valores de EB, R e P, entre os substratos, foi verificada para S2, que foi constituído da proporção inversa da utilizada em S4. S3,

constituído da mesma proporção dos componentes, apresentou as menores médias, embora estatisticamente semelhantes, o que pode sugerir a inconveniência do uso desta condição para a produção de cogumelos.

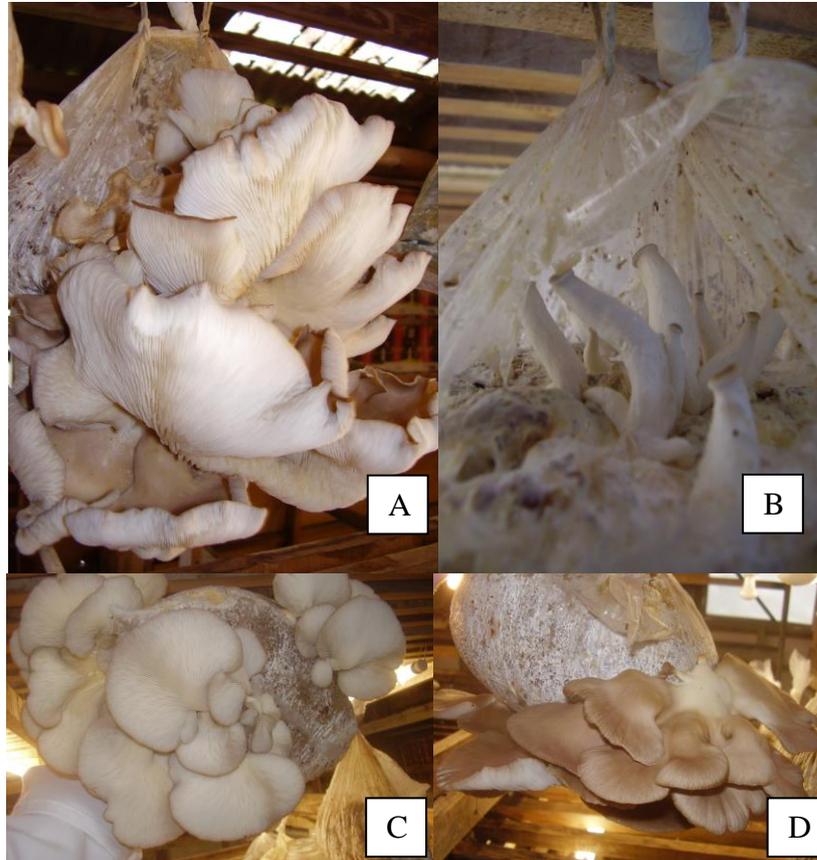


Figura 11. Cogumelos de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001.

(A) Cultivados em bagaço de *Malus domestica*. (B) Primórdios em saco de cultivo. (C) Vista inferior de saco de cultivo em serragem de *Pinus* sp. (D) Cogumelo produzido em S4 com *Malus domestica*.

EB demonstra a adequação de determinada espécie de fungo ao substrato de cultivo. Quanto maior a EB, maior a adaptação da espécie àquele substrato. Neste trabalho, ao observar valores de EB de 27 e 23,75 % para S4 e S2, respectivamente, pode-se indicar a conveniência dessas proporções de serragem de *Pinus* sp. e de bagaço de *M. domestica* para a produção de cogumelos de *P. sajor-caju*.

Ragunathan & Swaminathan (2003), trabalhando com *P. sajor-caju* em diferentes substratos lignocelulósicos, relataram valores de EB superiores, entre 37 e 41% com restos de colheita de algodão; 24 e 27% com fibra de coco e 32 e 36% com palha de sorgo moída.

Ragunathan *et al.* (1996) relataram valores de EB de 35,94 % para *P. sajor-caju* em fibra de casca de coco. Ragunathan & Swaminathan (2003), encontraram 90% de EB para *P. sajor-caju* em arroz com casca.

Comparando-se os resultados de EB obtidos com os relatados na literatura, observa-se que, dentre os substratos testados, o resíduo de *M. domestica* nas proporções S4 e S2, permitiu boa produção de *P. sajor-caju* PS-2001, apresentando resultados semelhantes aos obtidos em fibra de coco e podendo ser utilizado como substrato para o cultivo desta espécie.

Tabela 2. Rendimento, eficiência biológica e produtividade de cogumelos de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 cultivados em bagaço de *Malus domestica* e serragem de *Pinus* sp.

Substratos	Características da produção de cogumelos de <i>P. sajor-caju</i> PS-2001		
	Rendimento (%)	Eficiência Biológica (%)	Produtividade (g.dia ⁻¹)
S1	2,43 ± 2,18 ^{ab}	4,8 ± 1,65 ^b	0,07 ± 0,028 ^b
S2 (3:1)	7,91 ± 4,33 ^{ab}	23,7 ± 1,29 ^{ab}	0,32 ± 0,212 ^{ab}
S3 (1:1)	1,17 ± 1,03 ^b	2,3 ± 2,02 ^b	0,03 ± 0,006 ^b
S4 (1:3)	9,01 ± 1,73 ^a	27 ± 5,21 ^a	0,36 ± 0,081 ^a
S5*	2,73 ± 1,64 ^{ab}	8,2 ± 4,94 ^{ab}	0,11 ± 0,061 ^{ab}

Dados da média da massa fresca de cogumelos obtidos em cultivos feitos em triplicata; *substrato controle; ^{a/b/ab}Análise estatística: grupos com a mesma letra não diferem estatisticamente em nível de 5% (p≤0,05). S1: bagaço, S2: bagaço e serragem (3:1), S3: bagaço e serragem (1:1), S4: bagaço e serragem (1:3), S5: serragem.

Os resultados obtidos nos cultivos utilizando bagaço de *M. domestica* e serragem de *Pinus* sp. podem indicar que as combinações 1:3 ou 3:1 são adequadas para a produção de cogumelos comestíveis de *P. sajor-caju* PS-2001 e que ambas podem conter uma relação de carbono/nitrogênio (C/N) favorável ao desenvolvimento do microrganismo, que consegue colonizar mais rápido o substrato e, conseqüentemente, frutificar antecipadamente.

Segundo Maziero (1990), a presença de elevadas concentrações de nitrogênio reprime a degradação da lignina e, conseqüentemente, retarda ou até mesmo cessa o crescimento do micélio. O mesmo autor, ao analisar o cultivo de *Pleurotus* em diferentes resíduos agrícolas, concluiu que a baixa produtividade com alguns substratos está relacionada a uma relação C/N menor ou igual a 29/1. Por outro lado, resíduos com relação alta C/N, de 150/1, propiciaram baixa produção no cultivo de *P. ostreatus* (Dundar *et al.*, 2009). Se, por um lado, o baixo teor de N diminui a produtividade, por outro, teores elevados desse nutriente no substrato também afetam negativamente a produção de *Pleurotus* (Zanetti & Ranal, 1997). Para este gênero de cogumelos, a relação C/N ideal está entre 20 a 50:1 (Eira, 2004).

4.1.3 Comparação da produção de cogumelos comestíveis de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 utilizando bagaços de *Vitis labrusca* e *Malus domestica* e serragem de *Pinus* sp.

Com o propósito de comparar a produção de cogumelos, os dados já apresentados de R, EB e P, utilizando bagaço de *V. labrusca* e *M. domestica* e serragem de *Pinus* sp. foram dispostos em gráficos, sendo apresentados as médias e os desvios padrão.

Dos substratos testados para a produção de cogumelos comestíveis utilizando bagaços de *V. labrusca* e *M. domestica* e serragem de *Pinus* sp., baseando-se somente nas médias obtidas, a combinação de resíduos utilizada em S4 se destacou em ambos os cultivos, mostrando esta condição como a mais adequada para produção de cogumelos comestíveis de *P. sajor-caju* PS-2001. A maior média de rendimento (11%) foi obtida com S4 utilizando bagaço de *V. labrusca*, seguido de S4 utilizando *M. domestica* (9%), e após S2, empregando *M. domestica* (7,9%). Os demais substratos apresentaram valores de rendimento inferiores a S4 (Figura 12).

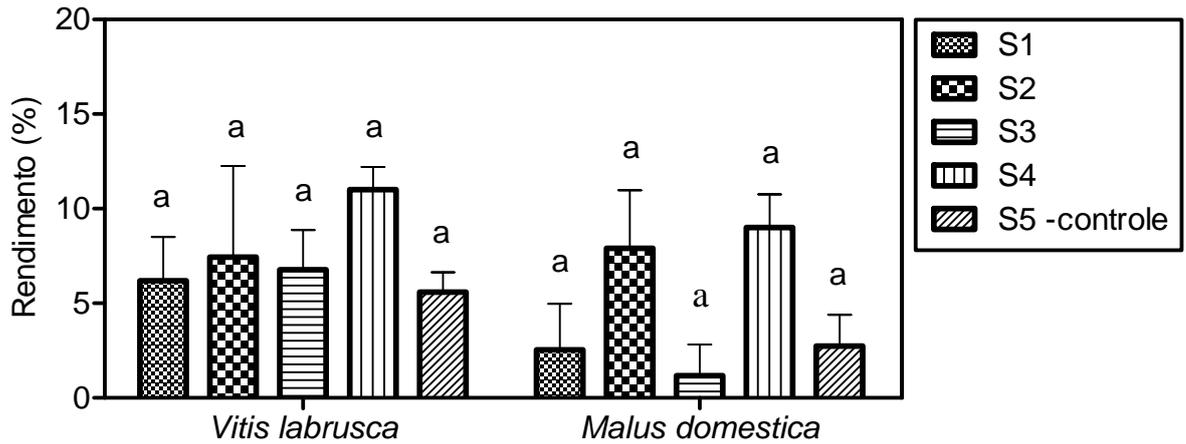


Figura 12. Rendimento dos cultivos de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 utilizando bagaços de *Vitis labrusca* e *Malus domestica* e serragem de *Pinus* sp.

O perfil similar entre os valores obtidos para R foi também obtida para EB, sendo S4 utilizando bagaço de *V. labrusca*, seguido de S4 utilizando *M. domestica*, e após S2, empregando *M. domestica*. Destaca-se que apenas o S2 utilizando o resíduo de *V. labrusca*, apresentou valor de EB semelhante ao S2 utilizando resíduo de *M. domestica* (Figura 13). A EB dos substratos empregando bagaço de *V. labrusca* mostrou-se superior a obtida nos substratos com *M. domestica*, supondo-se que o resíduo de uva é melhor assimilado para a nutrição do fungo. Esta diferença pode estar relacionada ao fato de o bagaço de uva ser formado por maior quantidade de cascas que o bagaço de maçã.

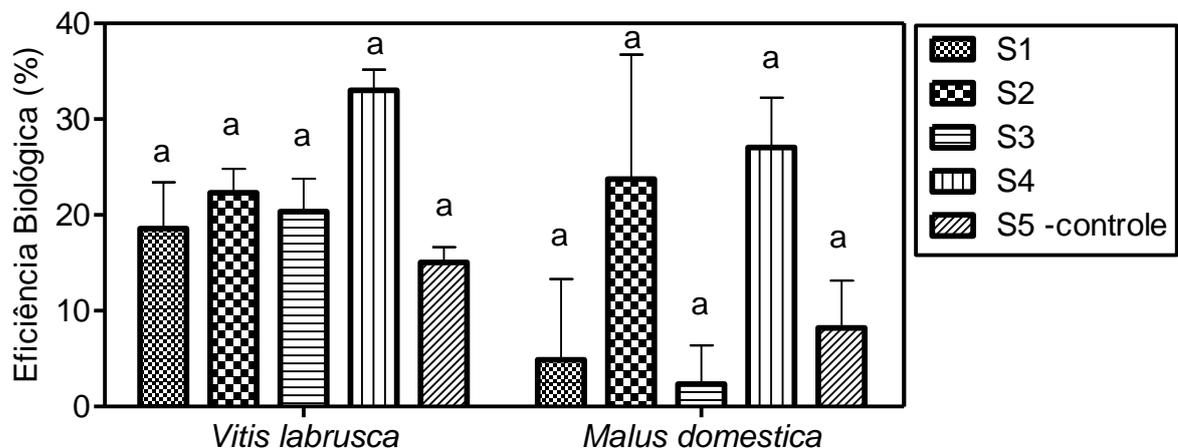


Figura 13. Eficiência biológica dos cultivos de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 utilizando bagaços de *Vitis labrusca* e *Malus domestica* e serragem de *Pinus* sp.

A média de produtividade foi superior em S4 utilizando bagaço de *V. labrusca*, dessa forma, é possível supor que esta proporção possibilita as melhores condições de desenvolvimento e frutificação do fungo *P. sajor-caju* PS-2001. Os substratos 2, 3 e 1, empregando também bagaço de *V. labrusca*, apresentaram produtividade semelhante a S4 (Figura 14).

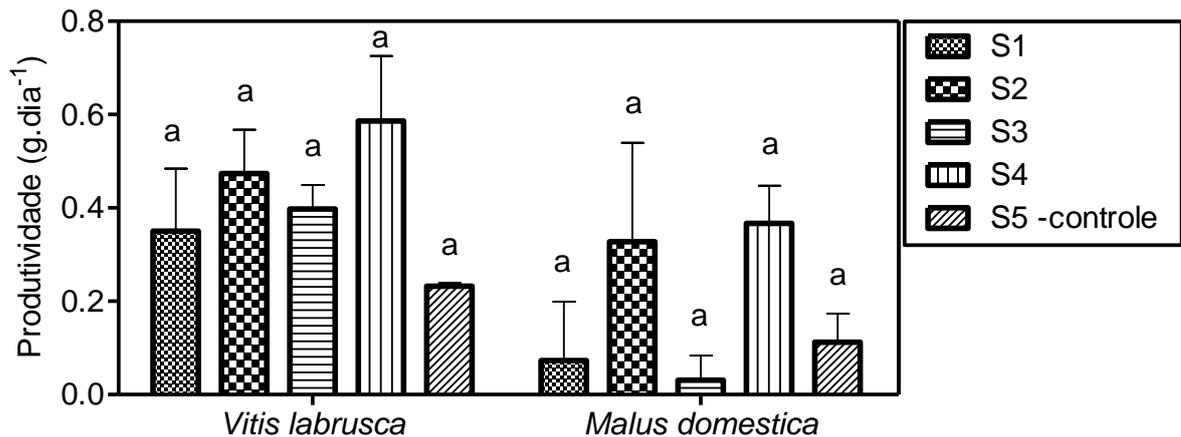


Figura 14. Produtividade dos cultivos de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 utilizando bagaços de *Vitis labrusca* e *Malus domestica* e serragem de *Pinus* sp.

Analisando-se os resultados verifica-se que as maiores médias de P, EB e R foram obtidas empregando o substrato 4, que é composto em sua maior parte por serragem e possui menor proporção de bagaços (1:3). Assim, o bagaço provavelmente possibilita melhor condição física de desenvolvimento do microrganismo, permitindo aeração suficiente a serragem, que sendo utilizada sozinha não seria tão eficiente pois, compactaria dificultando o crescimento micelial.

4.1.4 Atividade enzimática de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 cultivado em bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Pinus* sp.

Os resultados apresentados a seguir referem-se à produção enzimática de *P. sajor-caju* PS-2001 cultivado nos seguintes substratos: substrato 1 (S1), somente bagaço de *V. labrusca*; substrato 2 (S2), 75% bagaço de *V. labrusca* e 25% serragem de *Pinus* sp. (3:1); substrato 3

(S3), 50% bagaço de *V. labrusca* e 50% serragem de *Pinus* sp. (1:1); substrato 4 (S4), 25% bagaço de *V. labrusca* e 75% serragem de *Pinus* sp. (1:3) e substrato 5 (S5), somente serragem de *Pinus* sp., adotado como controle.

A atividade de lacases foi analisada em cultivo sólido, durante trinta dias, diferindo entre as cinco composições testadas. Dentre os substratos testados, S4 foi o que propiciou maior atividade enzimática, com 36.918 U.g⁻¹ no 18º dia de cultivo. Os demais substratos mostraram atividades inferiores e perfis diferentes, como pode ser observado na Figura 15.

No segundo dia de cultivo, todos os substratos apresentaram baixa atividade. A partir do quarto dia, ocorreu um aumento de lacases em S4 e S5, que se mantiveram superiores aos demais durante todo o cultivo. Entre o 10º e 22º dias, ocorreram picos de atividade de lacases em todos os substratos, seguindo-se de diminuição da atividade enzimática.

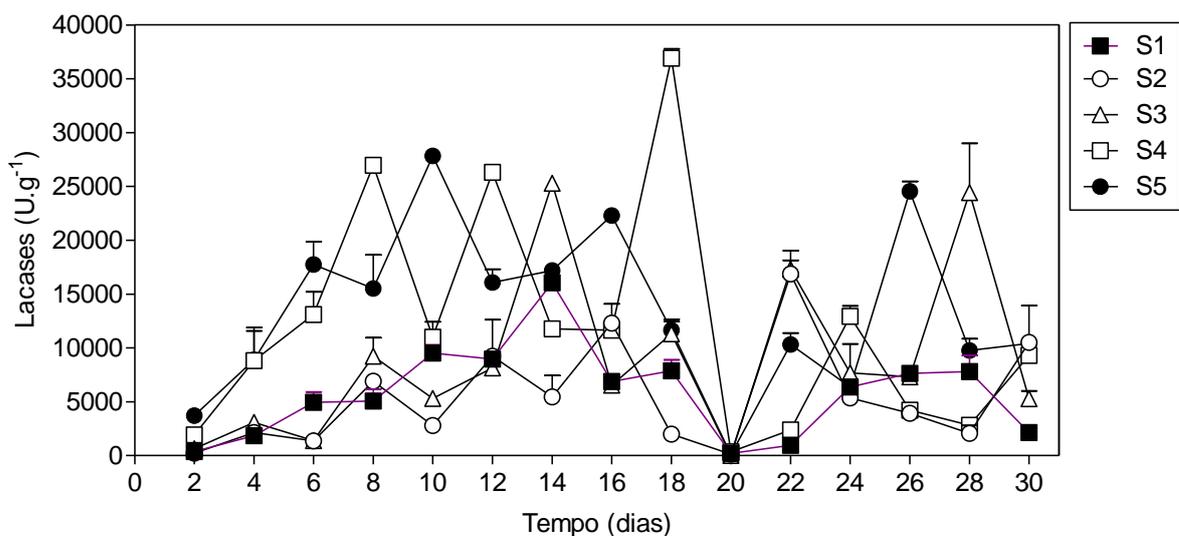


Figura 15. Atividade enzimática de lacases por *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 cultivado em substratos compostos por resíduos lignocelulósicos. S1: bagaço de *V. labrusca*. S2: bagaço de *V. labrusca* e serragem de *Pinus* sp. (3:1). S3: bagaço de *V. labrusca* e serragem de *Pinus* sp. (1:1). S4: bagaço de *V. labrusca* e serragem de *Pinus* sp. (1:3). S5: serragem de *Pinus* sp.

O substrato 5 (controle), permitiu o pico enzimático no 10º dia de cultivo com 27.839,7 U.g⁻¹, porém, com atividade enzimática inferior a S4 (36.918 U.g⁻¹ no 18º dia). Os substratos 1, 2 e 3 mostraram pico de lacases após o controle, no 14º, 22º e 14º dias, de

16.044, 16.883 e 25.294 U.g⁻¹, respectivamente. Como se observa, os perfis apresentam muitas oscilações em todos os substratos testados, pode-se perceber que as enzimas apresentam decréscimo durante o período de cultivo e variações a cada dia analisado. Este fato pode estar relacionado à vários fatores, como à ação de proteases que degradam estas enzimas; ao cultivo ser sólido, o que não permite uma total homogeneidade de amostras em todos os sacos de cultivos, bem como, ao cultivo ser conduzido por um longo período.

Na Figura 16, são apresentados os perfis de pH nos diferentes substratos. Verifica-se, ao longo do tempo, que todos os substratos apresentaram leve aumento. S5 mostrou os valores mais elevados de pH, mantendo-se mais constante durante os 30 dias. Os substratos 4, 3 e 1 foram semelhantes quanto ao aumento de pH durante o cultivo. Já S2 apresentou um decréscimo no 26º dia de cultivo, chegando a 4,92 e elevando-se após para 6,06, superior dentre todos os cultivos.

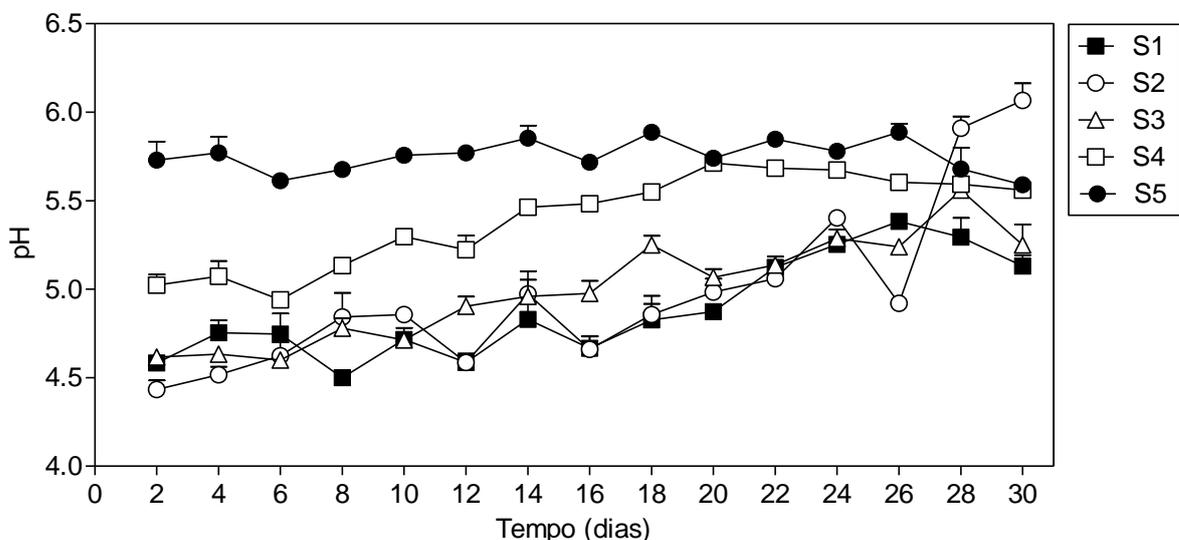


Figura 16. Valores de pH durante o cultivo com *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em resíduos lignocelulósicos. S1: bagaço de *V. labrusca*. S2: bagaço de *V. labrusca* e serragem de *Pinus* sp. (3:1). S3: bagaço de *V. labrusca* e serragem de *Pinus* sp. (1:1). S4: bagaço de *V. labrusca* e serragem de *Pinus* sp. (1:3). S5: serragem de *Pinus* sp.

A seguir o perfil de atividade de lacases está disposto juntamente com o pH. S1, composto apenas por bagaço de *V. labrusca*, possibilitou um perfil enzimático crescente até o 14º dia, quando atingiu o pico com atividade de 16.044 U.g⁻¹. Os valores de pH durante o

cultivo neste substrato oscilaram de 4,58 a 5,38, visto que, durante o pico enzimático, manteve-se em 4,8 (Figura 17). Após o pico, o microrganismo apresentou queda acentuada de produção enzimática até o 20º dia com posterior aumento, que coincide com os maiores valores de pH e os últimos dias de cultivo.

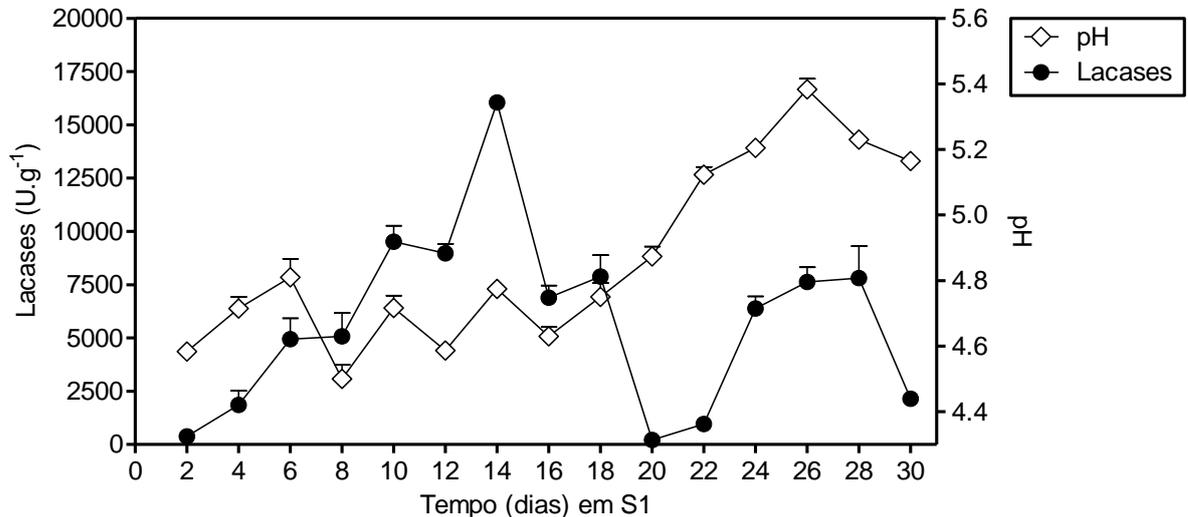


Figura 17. Atividade enzimática de lacases por *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 e pH em substrato composto por bagaço de *Vitis labrusca*.

Um dos maiores problemas da fermentação em estado sólido é a quantificação da biomassa fúngica, pois há a impossibilidade da determinação direta, devido à forte conexão entre o micélio e a matriz sólida (Scotti *et al.*, 2001). Dessa forma, utilizou-se uma medida indireta, que foi a dosagem de N-acetilglicosamina liberada enzimaticamente por hidrólise, com o emprego do produto comercial Glucanex[®] (Novozymes), como proposto anteriormente por Bittencourt *et al.* (2002). Assim, constituintes da célula forneceram dados constantes relacionados à concentração da biomassa, permitindo interpretações sobre o desenvolvimento do fungo em cada substrato.

Cultivos em estado sólido apresentam heterogeneidade de amostras, exigindo um grande número de repetições. Portanto, para fins de acompanhamento do desenvolvimento fúngico, foi considerada a maior medida de biomassa em cada substrato testado. Na Figura 18, é apresentado o perfil de lacases juntamente com a biomassa obtidos no cultivo com S1.

Verifica-se que o pico enzimático de lacases coincide com um maior valor de biomassa (6,96 mg.g⁻¹) no 14º dia de cultivo, seguido de valores consideráveis também no 24º e 30º dias.

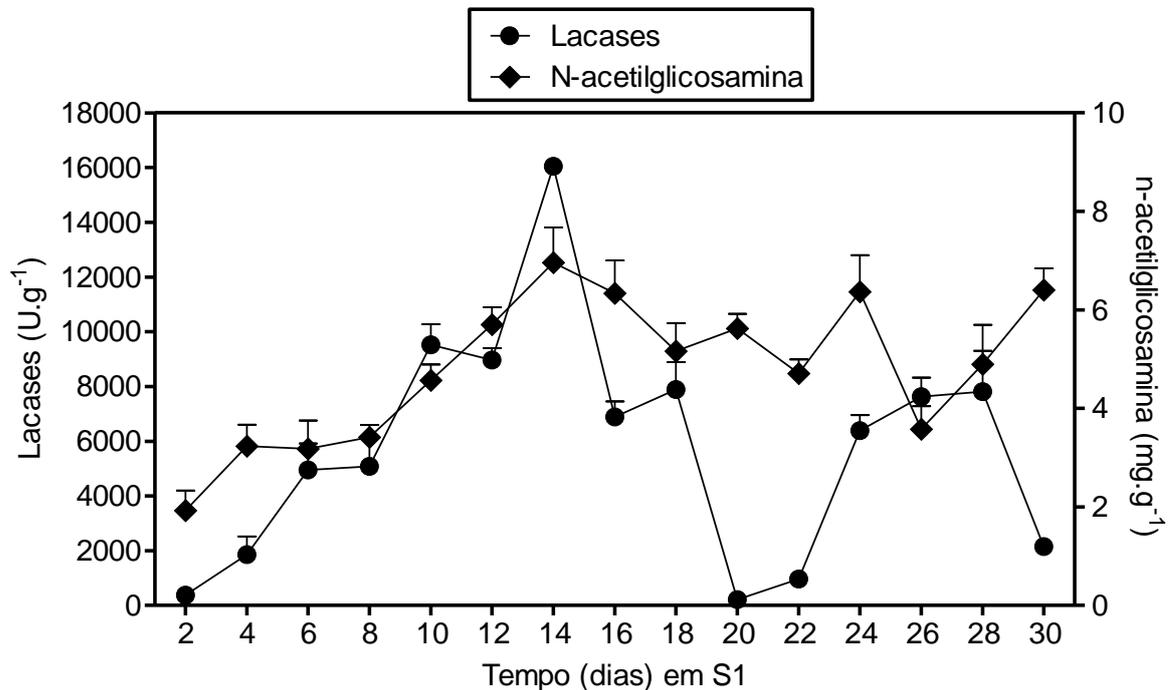


Figura 18. Atividade enzimática de lacases e biomassa de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em substrato composto por bagaço de *Vitis labrusca*.

O substrato 2, composto por 75% de bagaço de *V. labrusca* e 25% de serragem de *Pinus* sp., apresentou pico de lacases no 22º dia de cultivo, com 16.883 U.g⁻¹ (Figura 19). Os valores de pH foram crescentes ao longo do cultivo, oscilando de 4,43 a 6,06. No 22º dia, quando o pico enzimático foi obtido, o valor de pH estava em 5,06, um pouco superior ao pH encontrado no pico de S1 (4,8).

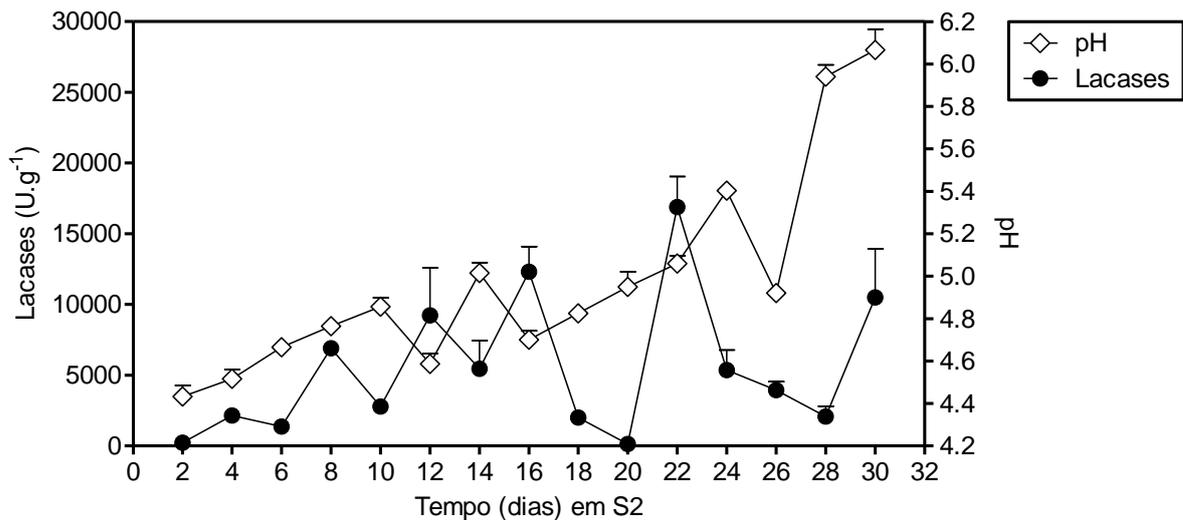


Figura 19. Atividade enzimática de lacases por *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 e pH em substrato composto por bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Pinus* sp. (3:1).

No cultivo S2, houve muitas oscilações, até uma brusca diminuição de atividade enzimática no 20º dia, seguido do pico no 22º dia, com posterior diminuição até o 28º dia e aumento inesperado no último dia de cultivo. Os valores de pH foram elevados nos últimos dias (5,94 e 6,06), muito diferentes dos obtidos nas primeiras coletas, a maioria inferior a 5. Para este substrato a maior biomassa foi obtida no 24º dia de cultivo, de 6,54 mg de N-acetilglicosamina/g de substrato (Figura 20).

O substrato 3, composto por 50% bagaço de *V. labrusca* e 50% de *Pinus* sp., apresentou pico enzimático de lacases no 14º dia, com 25.294 U.g⁻¹ (Figura 21), coincidindo com o pico encontrado também em S1. O pH foi semelhante ao dos outros substratos, com aumento ao longo do cultivo. Durante o pico enzimático, o valor de pH obtido foi 5,15.

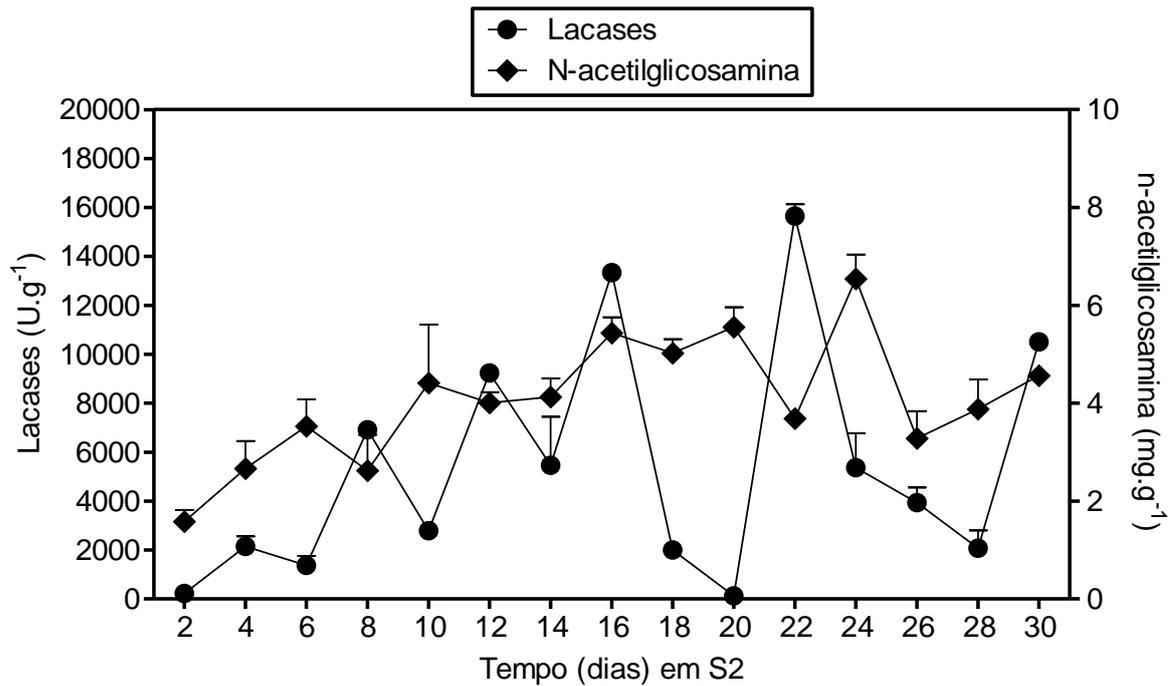


Figura 20. Atividade enzimática de lacases e biomassa de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em substrato composto por bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Pinus* sp. (3:1).

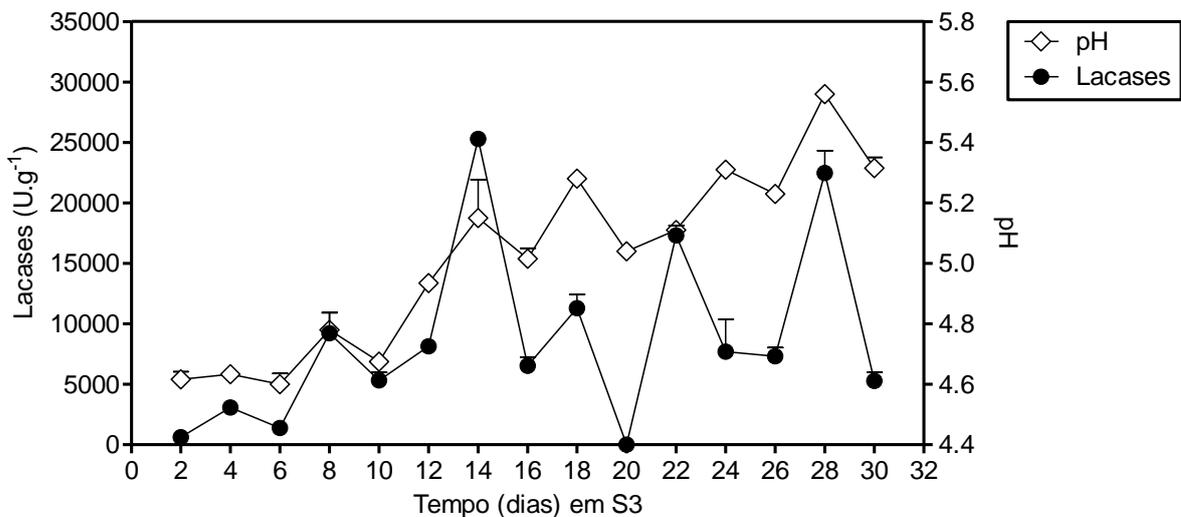


Figura 21. Atividade enzimática de lacases por *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 e pH em substrato composto por bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Pinus* sp. (1:1).

O perfil enzimático de lacases no cultivo S3 apresentou oscilações, mostrando diversos picos ao longo de todo o cultivo, com grande redução no 20º dia. O menor valor de pH (4,6) foi obtido no 6º dia e o maior (5,56) no 28º dia de cultivo.

A biomassa de *P. sajor-caju* PS-2001 cultivado no substrato 3 apresentou maior desenvolvimento no 24º dia de cultivo, com 8,47 mg de N-acetilglicosamina/g de substrato

(Figura 22). Visto que a biomassa foi quantificada através de medida indireta de N-acetilglicosamina, observa-se que os valores obtidos de biomassa apresentam-se crescentes ao longo dos cultivos e, mesmo oscilatórios, denotam crescimento fúngico. Adicionalmente, os pequenos desvios apresentados entre as amostras obtidas das diferentes repetições indicam a ocorrência de pequena variação da biomassa fúngica para um mesmo tempo de cultivo.

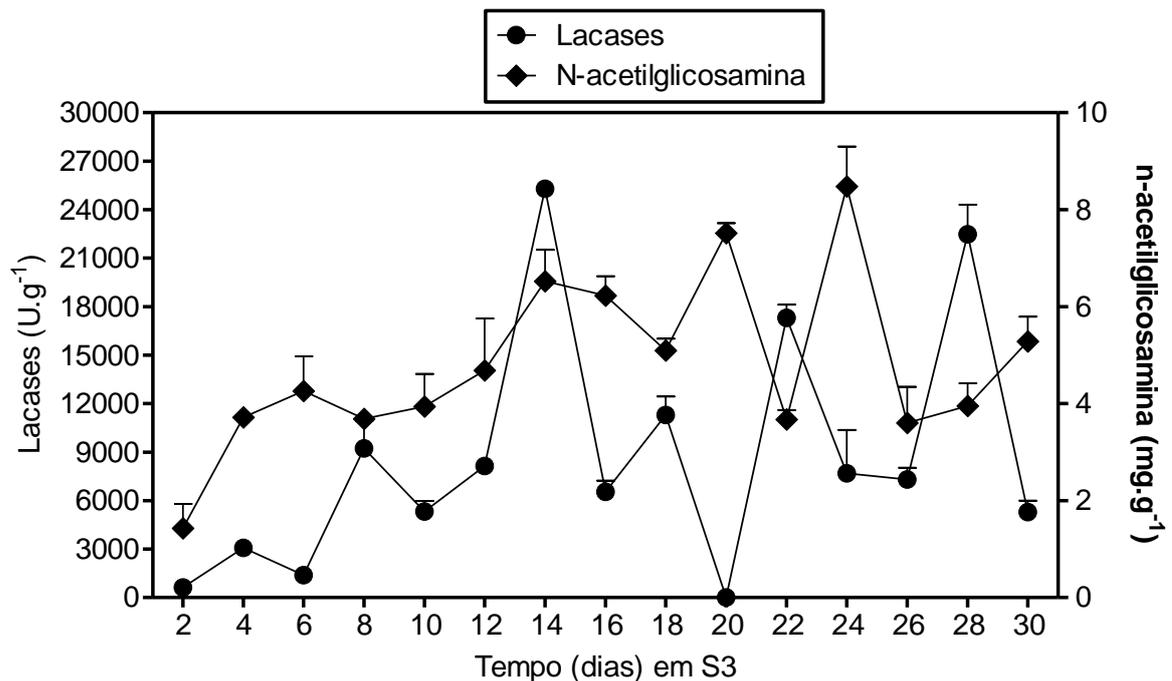


Figura 22. Atividade enzimática de lacases e biomassa de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em substrato composto por bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Pinus* sp. (1:1).

O cultivo S4, composto por 25% bagaço de *V. labrusca* e 75% de serragem de *Pinus* sp., apresentou pico de lacases no 18º dia de cultivo, com 36.918 U.g⁻¹ e pH 5,55 (Figura 23). Os valores de pH apresentaram aumento ao longo do cultivo, porém, mantendo-se restritos a uma faixa inferior, entre 4,94 e 5,91.

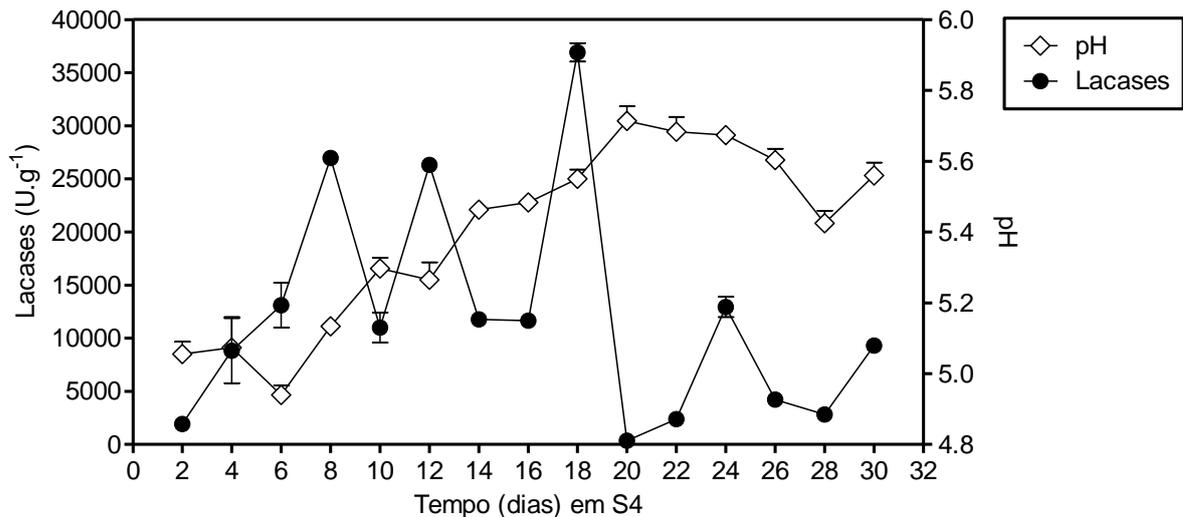


Figura 23. Atividade enzimática de lacases de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 e pH em substrato composto por bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Pinus* sp. (1:3).

O cultivo de *P. sajor-caju* PS-2001 em S4 apresentou médias de lacases no 8º e 12º dias de cultivo de 26.326 e 24.960 U.g⁻¹, respectivamente, antes de atingir o pico, no 18º dia. Estas médias são superiores aos picos dos três primeiros substratos testados e indicam a maior atividade de lacases no substrato 4, que mostrou pico de 36.918 U.g⁻¹.

Como se observa na Figura 24, a maior medida de biomassa foi obtida no 24º dia de cultivo, com 5 mg de N-acetilglicosamina/g de substrato, não havendo relação com o pico enzimático. Scotti *et al.* (2001) verificaram que o conteúdo de glicosamina permanece constante, independentemente da idade e das condições de cultivo, não sendo afetada também, pela natureza da fonte de nitrogênio, embora alguns trabalhos relatem que o teor de quitina na parede fúngica varie com a idade do micélio (Sharma *et al.*, 1977).

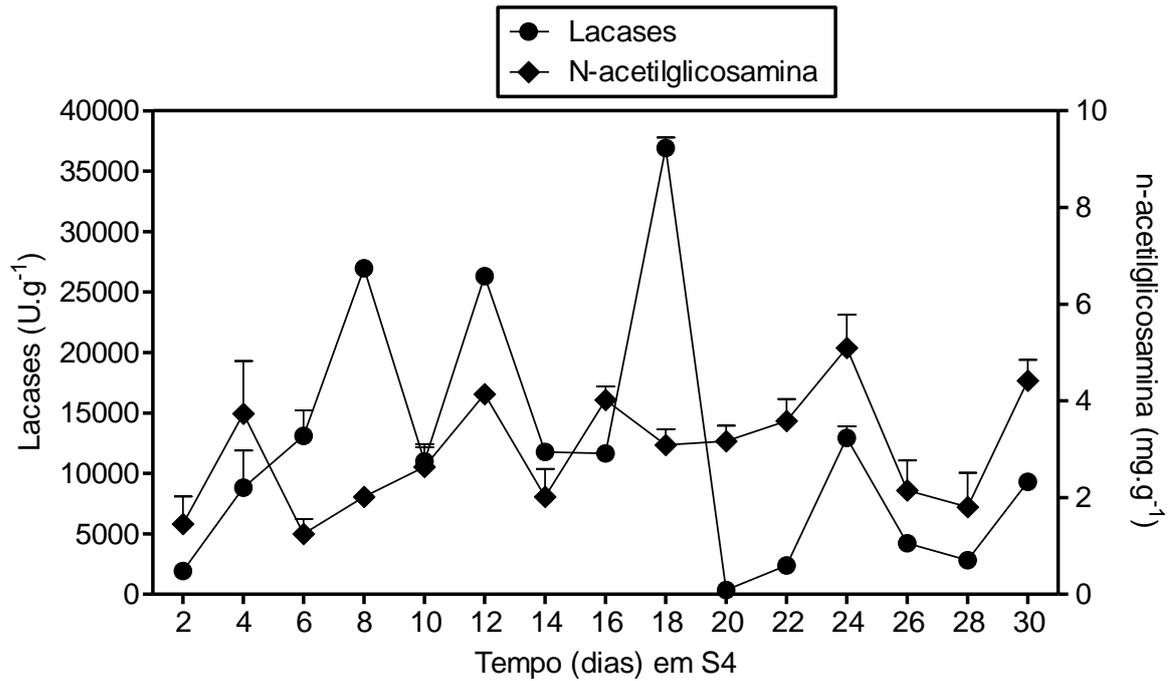


Figura 24. Atividade enzimática de lacases e biomassa de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em substrato composto por bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Pinus* sp. (1:3).

O cultivo S5, composto de 100% serragem de *Pinus* sp., foi adotado como cultivo controle. Este substrato apresentou médias de atividade enzimática no 10º dia de cultivo, com 27.840 U.g⁻¹, valor superior às médias de S1, S2 e S3, mas inferior a S4, que apresentou 36.918 U.g⁻¹ de lacases.

Os valores de pH neste cultivo foram mais estáveis, oscilando entre 5,59 e 5,88 durante 30 dias. No pico enzimático, o pH se manteve em 5,75 como pode ser observado na Figura 25. No 20º dia, assim como ocorreu em todos os outros cultivos, ocorreu diminuição acentuada de atividade de lacases, com posterior aumento, chegando a 24.551 U.g⁻¹.

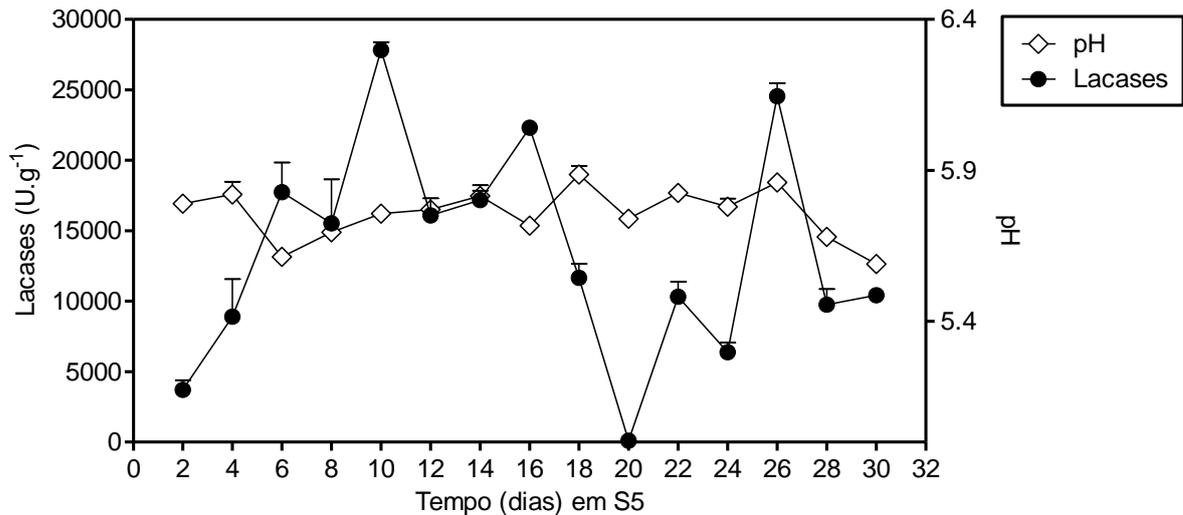


Figura 25. Atividade enzimática de lacases de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 e pH em substrato composto por serragem de *Pinus* sp. e bagaço de *Vitis labrusca*.

Estudos realizados por Desgranges *et al.* (1991) mostraram que medidas indiretas de biomassa fúngica utilizando componentes celulares como ergosterol e glicosamina, fornecem informações adequadas para o controle do processo de cultivo em estado sólido. Na Figura 26, verifica-se o desenvolvimento fúngico nas etapas iniciais de cultivo empregando S5, que foi crescente até o 16º dia e, após, apresentou comportamento oscilatório até o fim do cultivo. A maior biomassa fúngica foi obtida no 16º dia de cultivo (5,34 mg de N-acetilglicosamina/g de substrato), após o pico enzimático ter sido atingido.

Dos cinco substratos testados para o cultivo de *P. sajor-caju*, S4 foi o que apresentou maior média de atividade de lacases, de 36.918 U.g⁻¹, superior à média observada para S5 (controle), de 27.840 U.g⁻¹, e também superior a S1, S2 e S3. Na Tabela 3, estão resumidas as características obtidas no pico enzimático de lacases de cada substrato testado utilizando *P. sajor-caju*, bagaço de *V. labrusca* e serragem de *Pinus* sp.

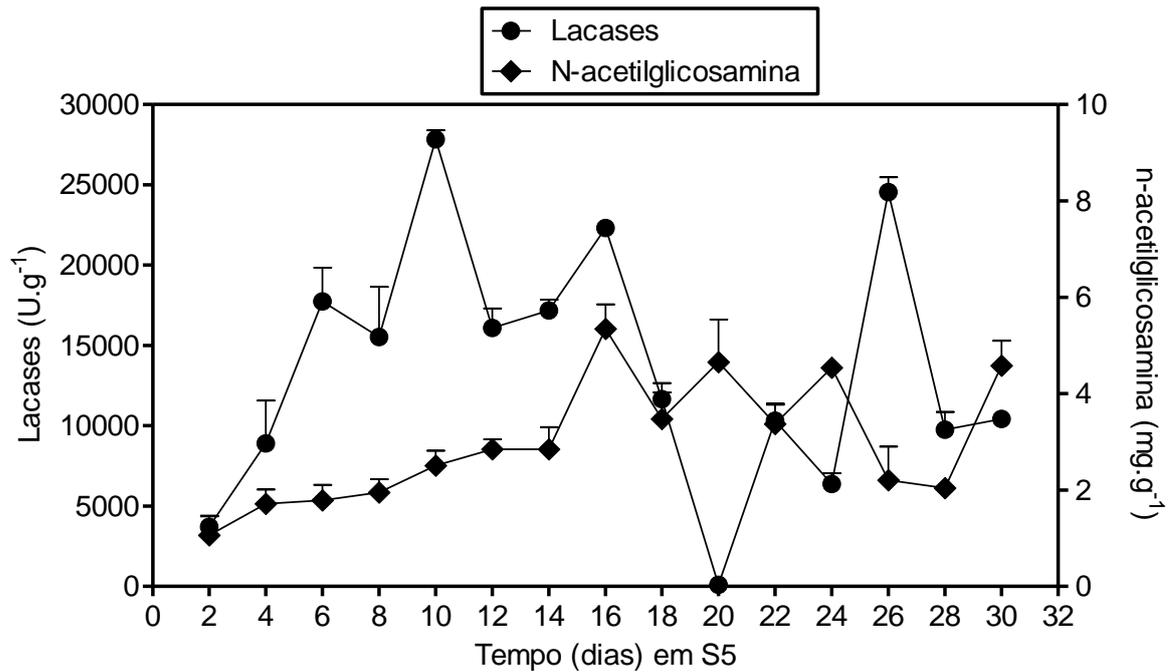


Figura 26. Atividade enzimática de lacases e biomassa fúngica de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em substrato composto serragem de *Pinus* sp.

Tabela 3. Atividade de lacases, crescimento fúngico, pH e dia do pico enzimático de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 cultivado em substratos empregando bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Pinus* sp.

Substrato	Resíduo lignocelulósico	Lacases ¹ (U.g ⁻¹)	Biomassa ² (mg.g ⁻¹)	pH	Dia do pico enzimático
S1	Bagaço de <i>V. labrusca</i>	16.044 ± 3,4 ^c	6,96	4,77	14°
S2 (3:1)	Bagaço de <i>V. labrusca</i> e serragem de <i>Pinus</i> sp.	16.883 ± 524 ^c	6,54	5,06	22°
S3 (1:1)	Bagaço de <i>V. labrusca</i> e serragem de <i>Pinus</i> sp.	25.294 ± 164 ^b	8,47	5,15	14°
S4 (1:3)	Bagaço de <i>V. labrusca</i> e serragem de <i>Pinus</i> sp.	36.918 ± 875 ^a	5	5,55	18°
S5*	Serragem de <i>Pinus</i> sp.	27.840 ± 555 ^b	5,34	5,75	10°

¹Média de atividade enzimática obtida em cultivos realizados em triplicata; ²Maior média obtida durante o cultivo, expresso em mg de N-acetilglicosamina/g de substrato úmido; *substrato controle; ^{a/b/c}Análise estatística: grupos com a mesma letra não diferem estatisticamente em nível de 5% (p≤0,05). S1: bagaço, S2: bagaço e serragem (3:1), S3: bagaço e serragem (1:1), S4: bagaço e serragem (1:3), S5: serragem.

A lacase é uma enzima associada com a morfogênese de cada espécie e, muitas vezes, com o desenvolvimento de corpos de frutificação (Leatham & Stahmann, 1981; Ross, 1982). O aumento da atividade da enzima durante a fase vegetativa até o aparecimento dos corpos de frutificação também já foi relatada para *Schizophyllum* (Leonard & Phillips, 1973), *Agaricus bisporus* (Wood, 1980), *L. edodes* (Leatham & Stahmann, 1981) e *Coprinus congregatus* (Ross, 1982).

A atividade de lacases atua como um marcador de desenvolvimento, em que o nível é mantido até o máximo crescimento micelial antes da frutificação, decaindo posteriormente. Na prática, essa característica pode ser útil para produtores no momento da abertura de sacos de produção para que ocorra a frutificação, já que o máximo crescimento vegetativo não pode ser verificado visualmente, com alto grau de precisão (Tan & Wahab, 1997).

Os valores de pH foram crescentes para os cinco substratos até os picos enzimáticos. S5 alcançou o pico enzimático de lacases antecipadamente, aos 10 dias, seguido de S1 e S3 (14º dia), S4 (18º dia) e S2 (22º dia de cultivo).

A atividade das demais fenol-oxidases também foi analisada no dia do pico de lacases em todos os substratos testados. As atividades das enzimas MnP, OAV e LiP foram muito reduzidas e PerT não foi detectada pelo método utilizado. A concentração de proteínas e as atividades enzimáticas estão detalhadas na Tabela 4. MnP apresentou valores reduzidos nos substratos 1, 2 e 3, não sendo detectada nos substratos 4 e 5. OAV foi detectada em S1, S2, S3 e S4; porém, não foi detectada em S5. LiP foi obtida em todos os substratos, destacando-se em S4, com $4,8 \text{ U.g}^{-1}$. A concentração de proteínas obedeceu à seguinte ordem $S4 > S3 > S5 > S2 > S1$.

Tabela 4. Atividade de manganês peroxidase, oxidases do álcool veratrílico, lignina peroxidase e concentração de proteínas totais de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 cultivado em substratos empregando bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Pinus* sp.

Substrato	Resíduo lignocelulósico	MnP (U.g ⁻¹)	OAV (U.g ⁻¹)	LiP (U.g ⁻¹)	Proteínas (mg.g ⁻¹)
S1	Bagaço de <i>V. labrusca</i>	2,68±0,82 ^b	9,20±0,76 ^a	0,86±0,29 ^b	904,77±156 ^c
S2 (3:1)	Bagaço de <i>V. labrusca</i> e serragem de <i>Pinus</i> sp.	6,85±0,16 ^a	1,23±0,81 ^b	0,53±0,2 ^b	1.585±59 ^b
S3 (1:1)	Bagaço de <i>V. labrusca</i> e serragem de <i>Pinus</i> sp.	2,7±0,9 ^b	7,08±1,15 ^a	0,67±0,31 ^b	1.934,85±240 ^b
S4 (1:3)	Bagaço de <i>V. labrusca</i> e serragem de <i>Pinus</i> sp.	nd	7,5±1,41 ^a	4,8±2,1 ^a	2.803,16±115 ^a
S5*	Serragem de <i>Pinus</i> sp.	nd	nd	1,88±0,5 ^b	1.824,38±321 ^b

Média de atividades enzimáticas obtidas em cultivos realizados em triplicata; *substrato controle; ^{a/b/c}Análise estatística: grupos com a mesma letra não diferem estatisticamente em nível de 5% (p≤0,05).; nd não detectada pelo método utilizado. S1: bagaço, S2: bagaço e serragem (3:1), S3: bagaço e serragem (1:1), S4: bagaço e serragem (1:3), S5: serragem.

Das combinações de resíduos lignocelulósicos testadas, a que mostrou o melhor resultado em termos de atividade de lacases foi S4, constituída de bagaço de *V. labrusca* e serragem de *Pinus* sp. (1:3). PerT não foram detectadas em nenhum substrato pelo método utilizado. Já as demais fenol-oxidases (MnP, OAV e LiP) mostraram valores estatisticamente diferentes. As proteínas totais foram quantificadas em valores elevados, sendo mais relevantes no substrato 4, com 2.803,16 mg.g⁻¹, podendo ser correlacionadas com a presença de lacases.

4.1.5 Atividade enzimática de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 cultivado em bagaço de *Malus domestica* e serragem de *Pinus* sp.

O bagaço de *M. domestica* utilizado em combinações com serragem de *Pinus* sp. para o cultivo de *P. sajor-caju* PS-2001 também foi avaliado quanto à produção enzimática. Dessa forma, de acordo com os substratos testados anteriormente, o bagaço de uva foi substituído pelo bagaço de maçã, mantendo-se as mesmas combinações, porém com o resíduo da outra fruta. A organização dos substratos foi a seguinte: substrato 1 (S1): somente bagaço de *M. domestica*; substrato 2 (S2): 75% bagaço de *M. domestica* e 25% serragem de *Pinus* sp. (3:1); substrato 3 (S3): 50% bagaço de *M. domestica* e 50% serragem de *Pinus* sp. (1:1); substrato 4 (S4): 25% bagaço de *M. domestica* e 75% serragem de *Pinus* sp. (1:3) e substrato 5 (S5): somente serragem de *Pinus* sp., adotado como controle.

Durante os trinta dias de cultivo utilizando bagaço de *M. domestica* nas combinações mencionadas, as atividades de lacases mostraram-se elevadas, distintas e variáveis ao longo do cultivo. Dos substratos testados, o S1 apresentou a maior atividade de lacases, de 81.995 U.g⁻¹ no 30º dia de cultivo. Nos demais, *P. sajor-caju* PS-2001 houve menor atividade enzimática e perfis diferenciados como pode ser observado na Figura 27.

No segundo dia de cultivo, podem ser observadas atividades enzimáticas ainda baixas, semelhantes em todos os substratos analisados. A partir do quarto dia, iniciou-se uma diferenciação nos níveis enzimáticos entre os substratos, que permaneceu até o término do cultivo. Os picos enzimáticos distribuíram-se ao longo de todo o período, sendo alcançados no 8º, 14º, 22º e 30º dias de cultivo.

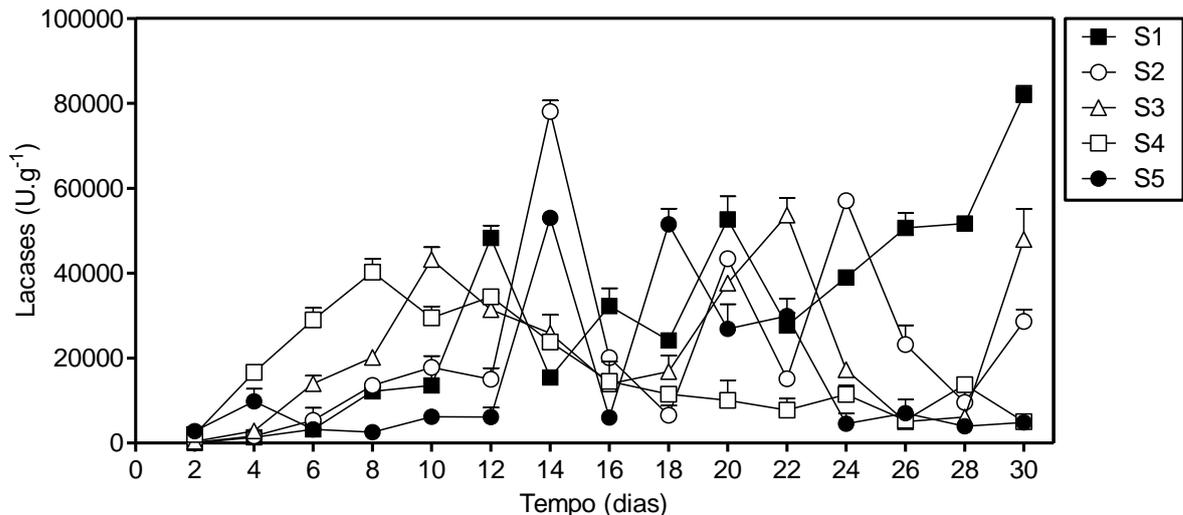


Figura 27. Atividade enzimática de lacases de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 cultivado em substratos compostos por resíduos lignocelulósicos. S1: bagaço de *M. domestica*. S2: bagaço de *M. domestica* e serragem de *Pinus* sp. (3:1). S3: bagaço de *M. domestica* e serragem de *Pinus* sp. (1:1). S4: bagaço de *M. domestica* e serragem de *Pinus* sp. (1:3). S5: serragem de *Pinus* sp.

O substrato 4 mostrou pico de lacases no 8º dia de cultivo (40.269U.g⁻¹). O controle S5 alcançou o pico enzimático no 14º dia de cultivo (35.592 U.g⁻¹) juntamente com S2, também no 14º dia (78.069 U.g⁻¹). Os substratos 3 e 1 atingiram o pico de lacases no 22º e 30º dias de cultivo, de 58.702 U.g⁻¹ e 81.995 U.g⁻¹, respectivamente.

Oscilações na atividade de lacases foram observadas ao longo dos trinta dias de cultivo em todos os substratos, mas com menor evidência em S4. Os substratos 1, 2 e 3 apresentaram valores significativos da enzima no último dia de cultivo e o pico de S1 ocorreu inesperadamente neste dia.

Os valores de pH em todos os cultivos foram crescentes do 2º ao 10º dia de cultivo, mantendo-se mais estáveis no final (Figura 28). S5 apresentou os maiores valores de pH, mantendo-se constante durante o cultivo e S1 apresentou diminuição no 14º e 24º dias.

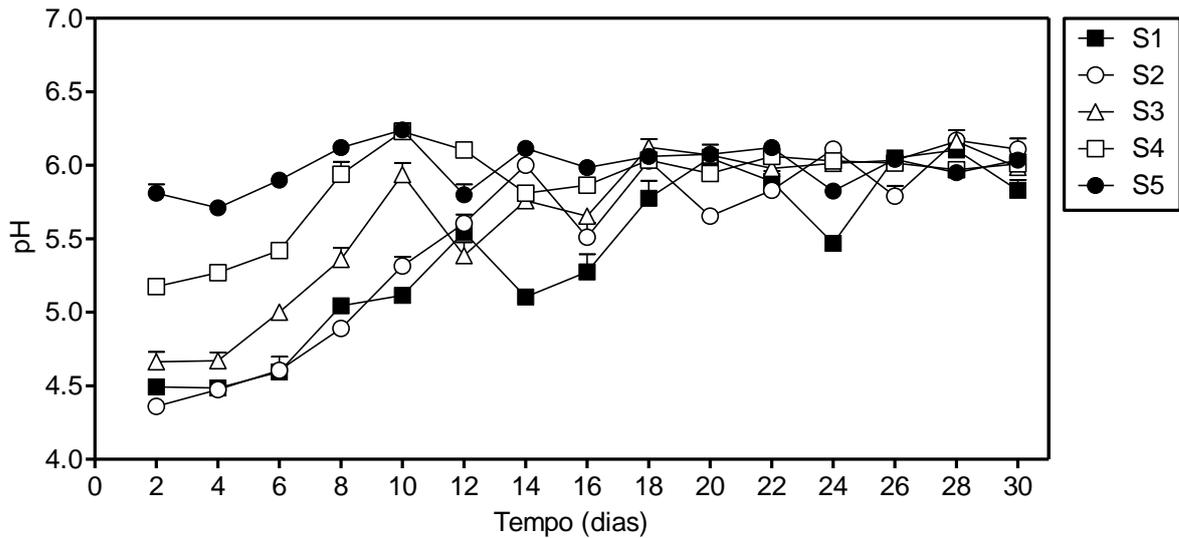


Figura 28. Valores de pH durante o cultivo com *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em resíduos lignocelulósicos. S1: bagaço de *M. domestica*. S2: bagaço de *M. domestica* e serragem de *Pinus* sp. (3:1). S3: bagaço de *M. domestica* e serragem de *Pinus* sp. (1:1). S4: bagaço de *M. domestica* e serragem de *Pinus* sp. (1:3). S5: serragem de *Pinus* sp.

O substrato 1, composto por bagaço de *M. domestica*, possibilitou um perfil enzimático de lacases crescente até o 30º dia, quando atingiu o pico, com atividade de 81.995 U.g^{-1} . Os valores de pH durante o cultivo neste substrato oscilaram de 4,5 a 6,1, visto que, durante o pico enzimático manteve-se em 5,83, conforme mostrado na Figura 29.

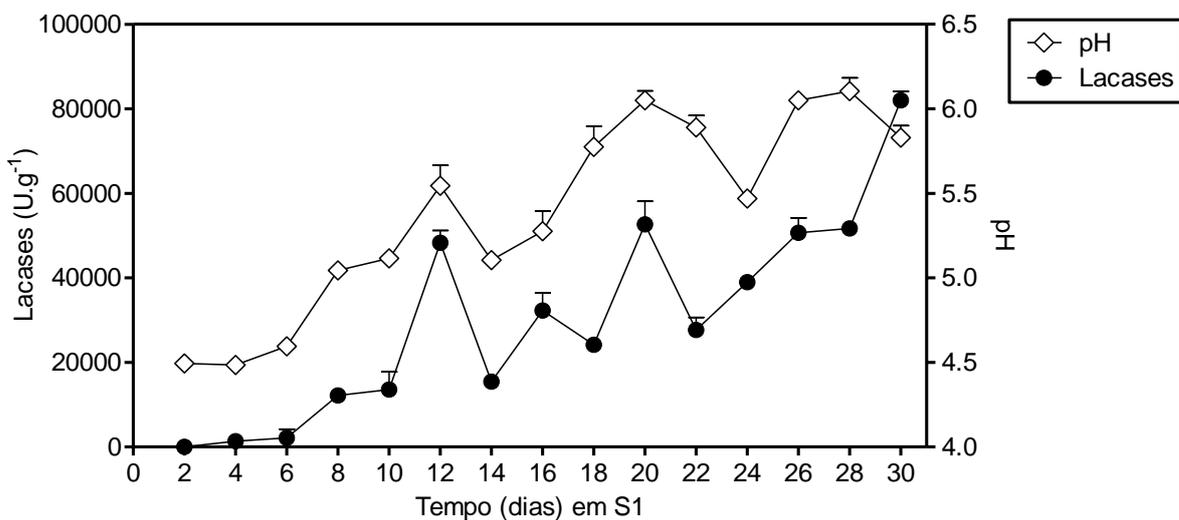


Figura 29. Atividade enzimática de lacases e pH durante o cultivo de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em substrato composto por bagaço de *Malus domestica*.

O pico de lacases empregando em S1 alcançou seu maior valor no 30º dia, o último dia de cultivo. Este comportamento difere do perfil dos demais substratos testados, os quais atingiram o pico entre o 8º e 22º dias de cultivo e apresentaram posterior decréscimo.

Na Figura 30, são apresentadas a atividade de lacases e a biomassa fúngica de *P. sajor-caju* PS-2001 cultivado com substrato 1. Observou-se aumento de biomassa no início do cultivo, atingindo um máximo valor de 6,95 mg de N-acetilglicosamina/g de substrato e posterior queda no 12º dia. Após, a biomassa manteve-se oscilatória até o fim do cultivo. A oscilação nos valores de biomassa podem ser decorrentes de erros na metodologia relacionados a amostragem, da hidrólise enzimática da quitina para liberação de n-acetilglicosamina, bem como, da dosagem deste açúcar. Possivelmente, o baixo valor de pH de S1 interferiu no crescimento do fungo, visto que esse substrato é composto somente por bagaço de *M. domestica*.

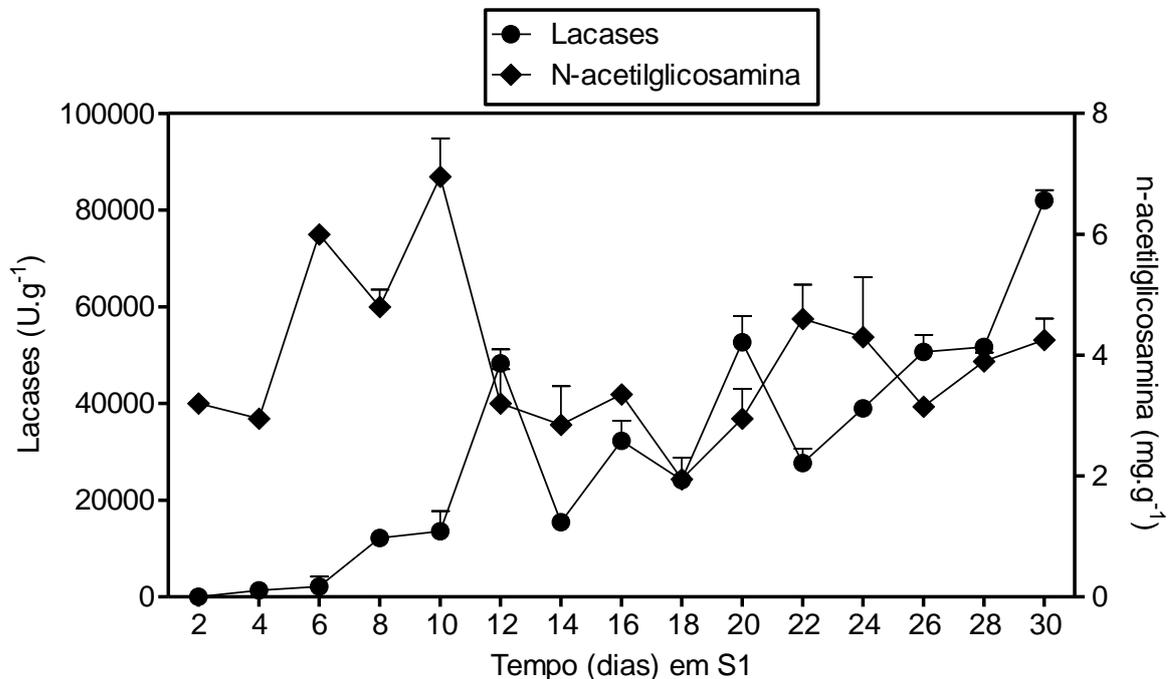


Figura 30. Atividade enzimática de lacases e biomassa de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em substrato composto por bagaço de *Malus domestica*.

O substrato 2, composto por 75% de bagaço de *M. domestica* e 25% de serragem de *Pinus* sp., apresentou pico de lacases no 14º dia de cultivo, de 78.069 U.g⁻¹ (Figura 31). Os valores de pH foram crescentes do 2º ao 14º dias, oscilando de 4,36 até 6 e mantendo-se estáveis até o término do cultivo. No 14º dia, quando ocorreu o pico enzimático, o valor de pH estava em 6, semelhante ao encontrado no pico de S1 (5,83).

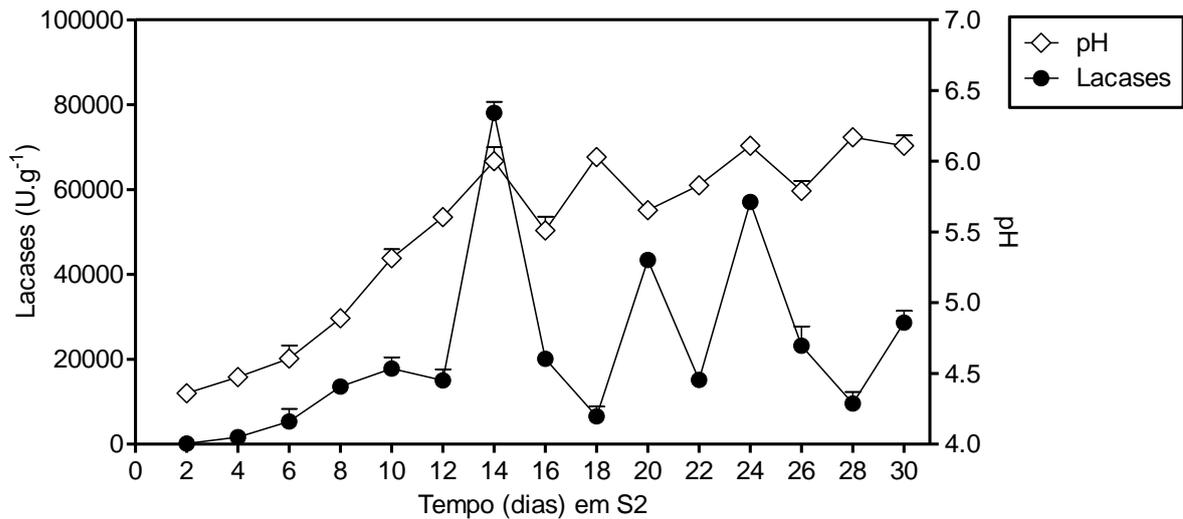


Figura 31. Atividade enzimática de lacases de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 e pH em substrato composto por bagaço de *Malus domestica* e serragem de *Pinus* sp. (3:1).

No cultivo utilizando o substrato 2, ocorreu um pequeno aumento de lacases até o 12º dia, seguido de um pico no 14º dia e bruscas oscilações até o término do cultivo. Os valores de pH continuaram semelhantes aos obtidos no pico até o fim do cultivo.

Como ocorreu com o substrato 1, o maior valor de biomassa obtido nos cultivos empregando S2 foi de 6,3 mg de N-acetilglicosamina/g de substrato, demonstrando que o crescimento fúngico ocorreu de forma semelhante em ambos substratos (Figura 32). A oscilação de biomassa apresenta-se de forma acentuada, podendo ser justificada pelo método indireto de quantificação do crescimento.

O substrato 3, composto por 50% de bagaço de *M. domestica* e 50% de serragem de *Pinus* sp., apresentou pico enzimático de lacases no 22º dia, de 58.702 U.g⁻¹ (Figura 33). Os

valores de pH foram semelhantes aos do substrato 2, com aumento ao longo do cultivo.

Durante o pico enzimático, o valor de pH obtido foi 5,98.

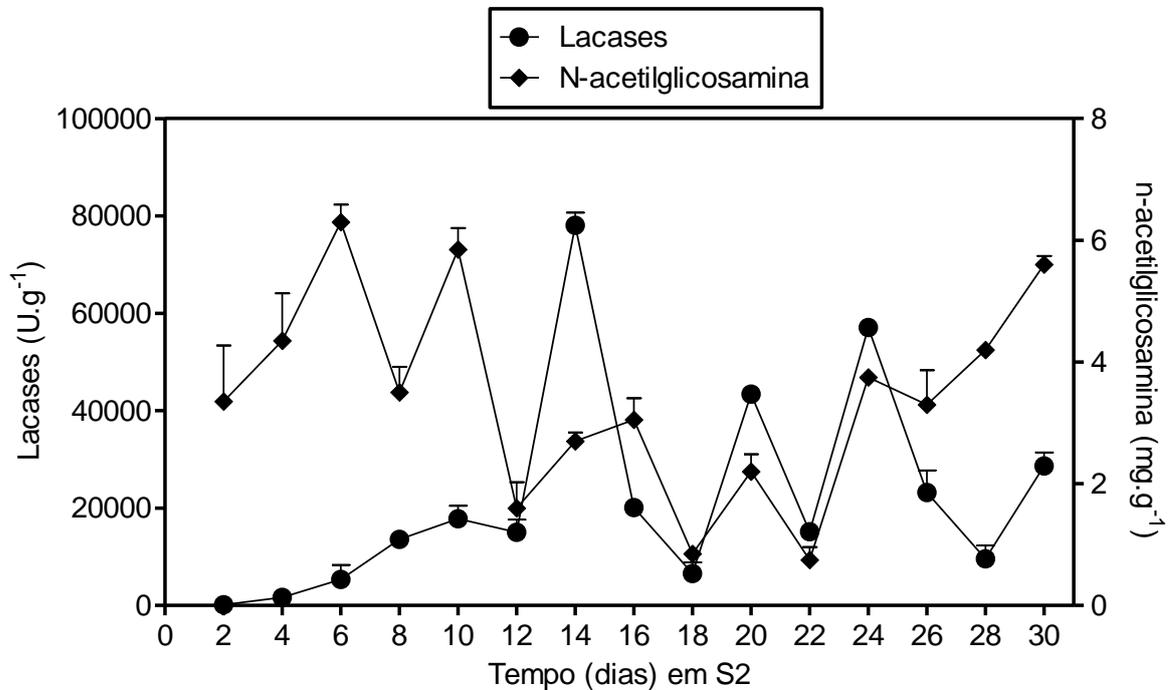


Figura 32. Atividade enzimática de lacases e biomassa de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em substrato composto por bagaço de *Malus domestica* e serragem de *Pinus* sp. (3:1).

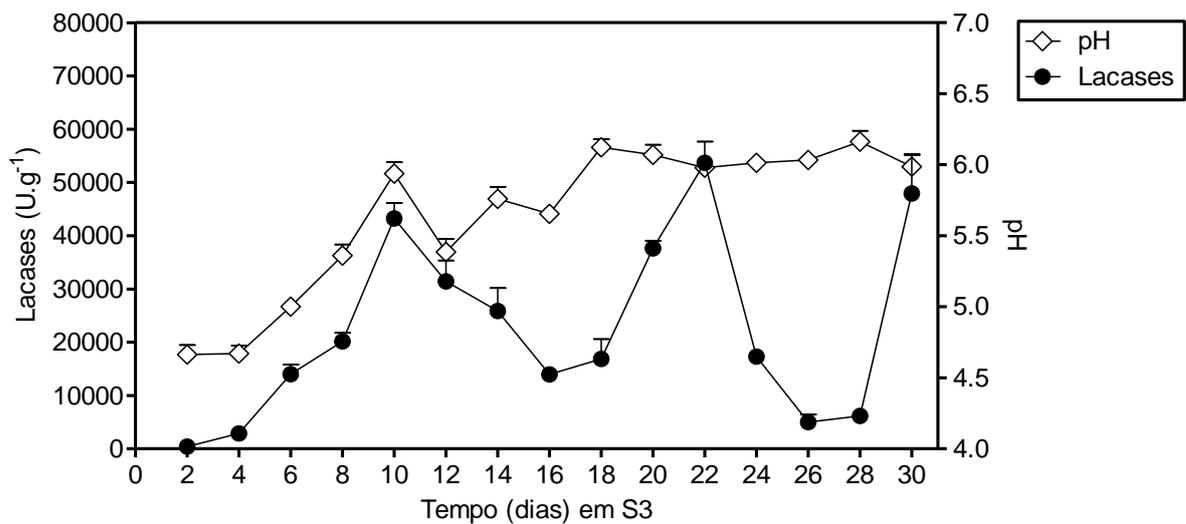


Figura 33. Atividade enzimática de lacases de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 e pH em substrato composto por bagaço de *Malus domestica* e serragem de *Pinus* sp. (1:1).

O perfil de lacases no cultivo S3 apresentou duas grandes oscilações além do pico, no 10º e 30º dias de cultivo (43.243 e 47.924 U.g⁻¹, respectivamente). Os menores valores de pH foram obtidos nos primeiros dias e o maior (6,16) no 28º dia. A combinação 1:1 de serragem e de bagaço não favoreceu o crescimento fúngico com relação à S1 e S2, pois mostrou maior valor de biomassa de apenas 4,15 mg de N-acetilglicosamina/g de substrato (Figura 34).

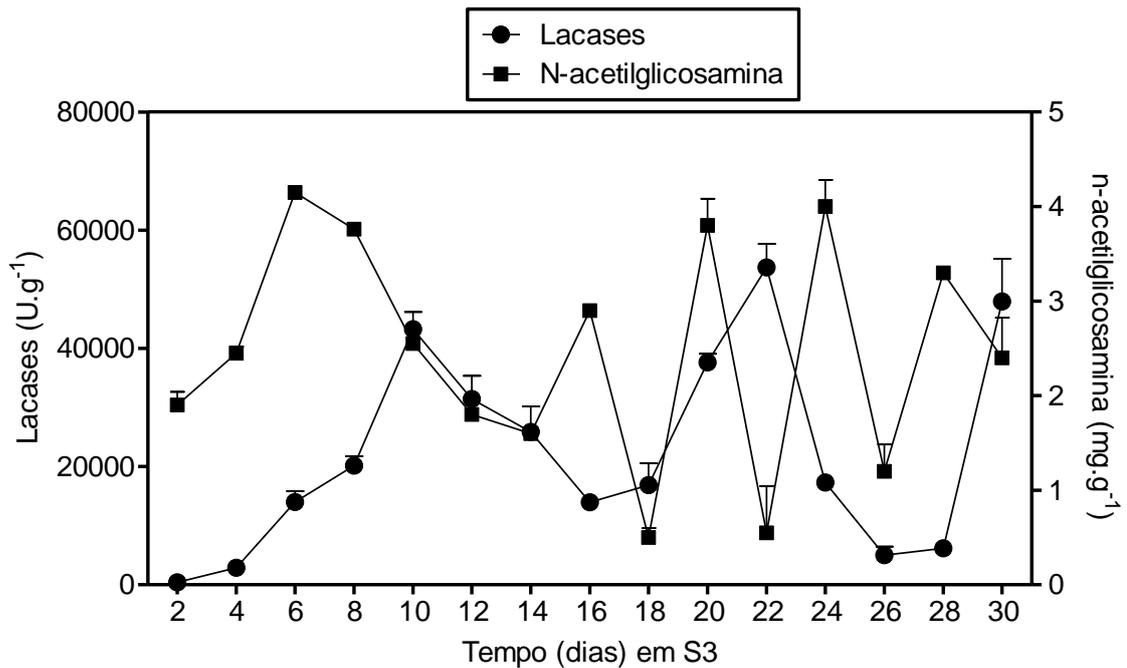


Figura 34. Atividade enzimática de lacases e biomassa de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em substrato composto por bagaço de *Malus domestica* e serragem de *Pinus* sp. (1:1).

O cultivo realizado com o substrato 4, composto por 25% de bagaço de *M. domestica* e 75% de serragem de *Pinus* sp., apresentou pico enzimático de lacases no 8º dia, de 40.269 U.g⁻¹ e pH em 5,94 (Figura 35). Os valores de pH aumentaram ao longo do cultivo, mantendo-se restritos a uma faixa inferior, entre 5,02 e 6,01.

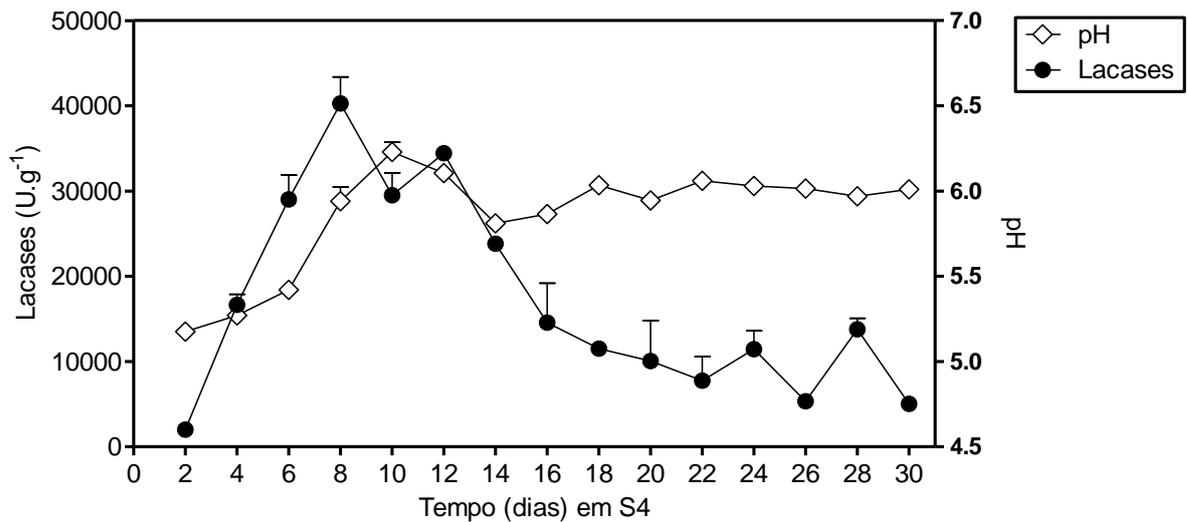


Figura 35. Atividade enzimática de lacases por *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 e pH em substrato composto por bagaço de *Malus domestica* e serragem de *Pinus* sp. (1:3).

O cultivo de *P. sajor-caju* em S4 apresentou pico enzimático de lacases no 8º e 12º dias, de 40.269 e 34.428U.g⁻¹, respectivamente. Este perfil assemelha-se ao obtido com *V. labrusca*, que também apresentou valores significativos de lacases nestes dias.

Na Figura 36, verifica-se que o crescimento fúngico foi reduzido, com apenas 4,8 mg de N-acetilglicosamina/g de substrato, semelhante a S3. Observa-se, neste perfil de biomassa, que o substrato possibilitou um grande crescimento fúngico inicial e rápida secreção de lacases, pois o pico enzimático foi alcançado no 8º dia de cultivo.

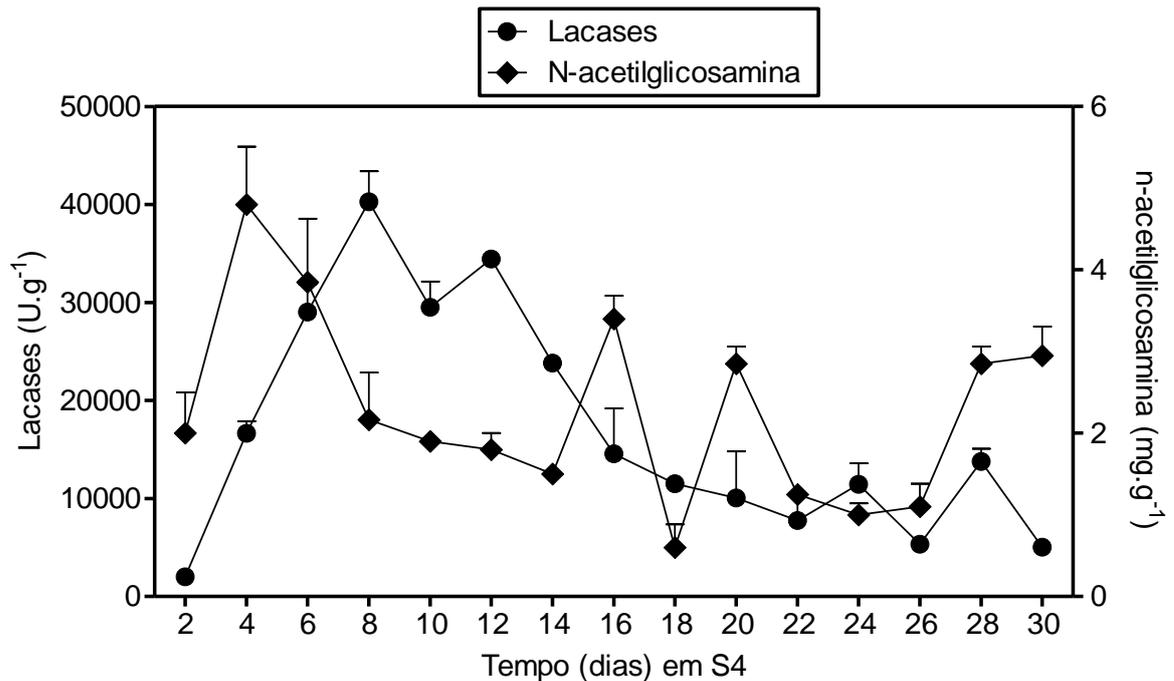


Figura 36. Atividade enzimática de lacases e biomassa de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em substrato composto por bagaço de *Malus domestica* e serragem de *Pinus* sp. (1:3).

O cultivo S5 apresentou maior atividade enzimática no 14º dia de cultivo, de 53.006 U.g⁻¹, e um valor próximo no 18º dia (51.515 U.g⁻¹). O valor do pico obtido neste substrato é menor que os obtidos nos substratos 1, 2 e 3, mas superior ao obtido em S4.

Os valores de pH neste cultivo foram estáveis ao longo do cultivo, com mínimo de 5,7 e máximo de 6,24. No pico enzimático, o pH manteve-se em 6,11, como pode ser observado na Figura 37. No 6º dia de cultivo, houve uma diminuição brusca na atividade de lacases, decaindo a 6.026 U.g⁻¹, com posterior aumento, que atingiu 51.515 U.g⁻¹.

O crescimento fúngico em S5 (controle) foi muito reduzido quando comparado aos demais substratos, atingindo o máximo de 2,9 mg de N-acetilglicosamina/g de substrato (Figura 38). Muitas oscilações de biomassa curtos intervalos de tempo foram observadas.

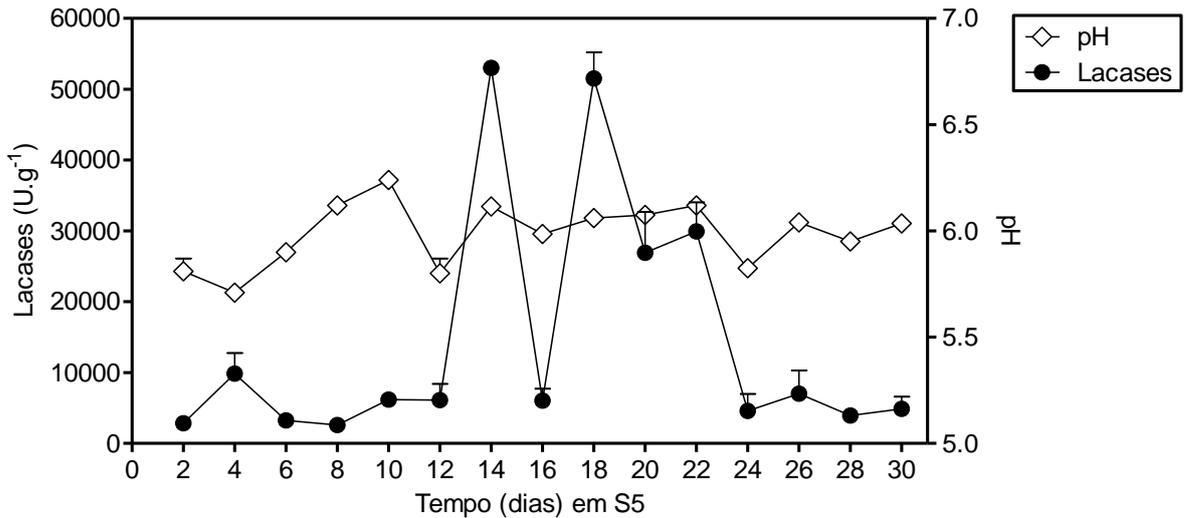


Figura 37. Atividade enzimática de lacases por *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 e pH em substrato composto por serragem de *Pinus* sp. e bagaço de *Malus domestica*.

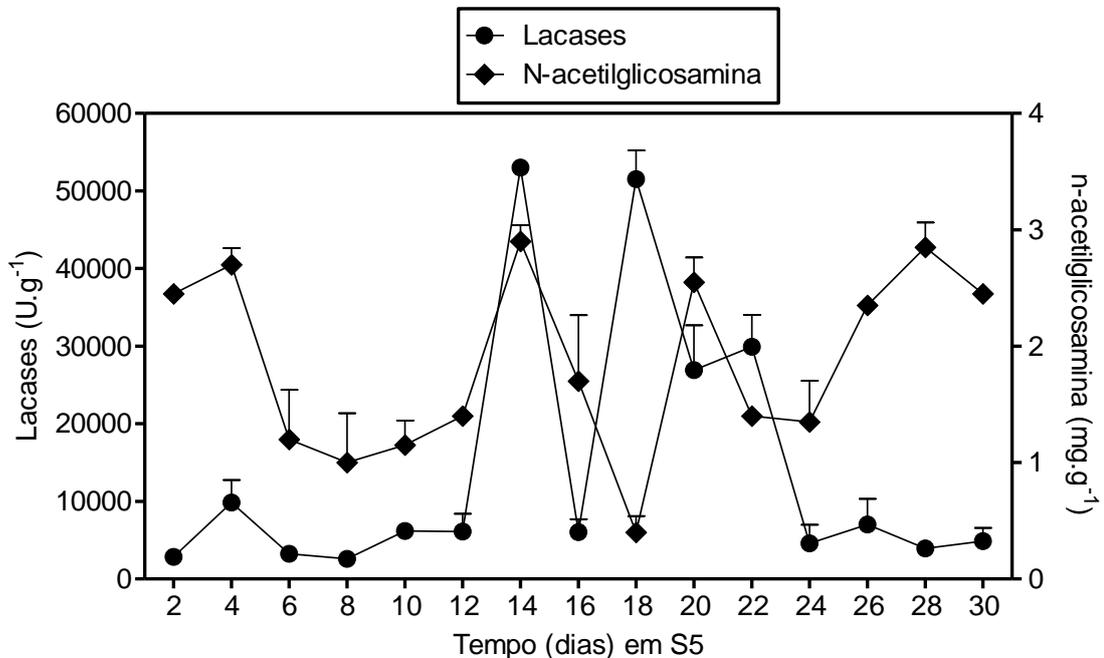


Figura 38. Atividade enzimática de lacases e biomassa fúngica de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em substrato composto serragem de *Pinus* sp. e bagaço de *Malus domestica*.

Dos substratos testados para o cultivo de *P. sajor-caju* PS-2001 utilizando *M. domestica*, o substrato 1, composto somente por bagaço, foi o que apresentou maior a atividade de lacases, com 81.995 U.g^{-1} , superior a todos os outros substratos, inclusive ao controle S5, que mostrou apenas 53.006 U.g^{-1} . Na Tabela 5, constam a atividade de lacases, o crescimento fúngico, o pH e o dia do pico enzimático de cada substrato testado empregando *P. sajor-caju* PS-2001, bagaço de *M. domestica* e serragem de *Pinus* sp.

Tabela 5. Atividade de lacases, crescimento fúngico, pH e dia do pico enzimático de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 cultivado em substratos lignocelulósicos empregando bagaço de *Malus domestica* e serragem de *Pinus* sp.

Substrato	Resíduo lignocelulósico	Lacases ¹ (U.g ⁻¹)	Biomassa ² (mg.g ⁻¹)	pH	Dia do pico enzimático
S1	Bagaço de <i>M. domestica</i>	81.995±2.106 ^a	6,95	5,83	30°
S2 (3:1)	Bagaço de <i>M. domestica</i> e serragem de <i>Pinus</i> sp.	78.068±2.598 ^a	6,3	6	14°
S3 (1:1)	Bagaço de <i>M. domestica</i> e serragem de <i>Pinus</i> sp.	58.702±3.952 ^b	4,15	5,98	22°
S4 (1:3)	Bagaço de <i>M. domestica</i> e serragem de <i>Pinus</i> sp.	40.269±3.107 ^c	4,8	5,94	8°
S5*	Serragem de <i>Pinus</i> sp.	53.006±912 ^b	2,9	6,11	14°

¹Média de atividade enzimática obtida em cultivos feitos em triplicata; ²maior média obtida durante o cultivo e expressa em mg de N-acetilglicosamina/g de substrato úmido; *substrato controle; ^{a/b/c}análise estatística: grupos com a mesma letra não diferem estatisticamente em nível de 5% (p≤0,05).S1: bagaço, S2: bagaço e serragem (3:1), S3: bagaço e serragem (1:1), S4: bagaço e serragem (1:3), S5: serragem.

O resultado de atividade de lacases no cultivo S1 foi superior aos demais substratos e estatisticamente semelhante à atividade obtida em S2. O substrato 3 mostrou 58.702 U.g⁻¹ de lacases, também semelhante ao controle S5, que apresentou 53.006 U.g⁻¹. Já o substrato 4, apresentou a menor atividade (40.269 U.g⁻¹), sendo estatisticamente diferente dos demais substratos. A produção enzimática se mostrou na seguinte ordem S1 > S2 > S3 > S5 > S4.

A atividade das demais fenol-oxidases também foi analisada no dia do pico enzimático de lacases em todos os substratos testados. MnP, OAV e LiP mostraram-se reduzidas e PerT não foi detectada pelo método utilizado em nenhum dos substratos testados. A quantidade de proteínas e a atividade de fenol-oxidases estão detalhadas na Tabela 6.

Os resultados obtidos para lacases e MnP no cultivo S3 é o que melhor representa o comportamento que fungos de degradação branca apresentam quando cultivados em resíduos

lignocelulósicos que contenham restos de trigo (Lang *et al.*, 1996; Camarero *et al.*, 1997; Hofrichter *et al.*, 1999) e de outras plantas (Pal *et al.*, 1995; Papinutti *et al.*, 2003; Couto *et al.*, 2004; Rosales *et al.*, 2005). Utilizando-se este substrato o fungo apresentou alta atividade de lacases e de manganês peroxidase.

Tabela 6. Atividade de manganês peroxidases, oxidases do álcool veratrílico, lignina peroxidases e concentração de proteínas totais de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 cultivado em substratos empregando bagaço de *Malus domestica* e serragem de *Pinus* sp.

Substrato	Resíduo lignocelulósico	MnP (U.g ⁻¹)	OAV (U.g ⁻¹)	LiP (U.g ⁻¹)	Proteínas (mg.g ⁻¹)
S1	Bagaço de <i>M. domestica</i>	296,22±28 ^{bc}	20,86±1,22 ^a	26±4,15 ^a	2.182±238 ^a
S2 (3:1)	Bagaço de <i>M. domestica</i> e serragem de <i>Pinus</i> sp.	409,54±59 ^b	nd	8,4±2,22 ^b	2.214±94 ^a
S3 (1:1)	Bagaço de <i>M. domestica</i> e serragem de <i>Pinus</i> sp.	636,4±46 ^a	nd	4,8±1,13 ^b	1.960±26,3 ^{ab}
S4 (1:3)	Bagaço de <i>M. domestica</i> e serragem de <i>Pinus</i> sp.	244,4±21 ^c	5,28±0,43 ^b	4,3±2,49 ^b	1.677±166 ^b
S5*	Serragem de <i>Pinus</i> sp.	235,2±30 ^c	2,35±91 ^c	1,9±0,43 ^b	1.854±10,6 ^a

Média de atividade enzimática obtida em cultivos feitos em triplicata; *substrato controle; ^{a/b/c} análise estatística: grupos com a mesma letra não diferem estatisticamente em nível de 5% (p≤0,05); nd não detectada pelo método utilizado. S1: bagaço, S2: bagaço e serragem (3:1), S3: bagaço e serragem (1:1), S4: bagaço e serragem (1:3), S5: serragem.

S3 mostrou 636,4 U.g⁻¹ de MnP, valor considerado significativamente superior a todos os outros substratos testados. S2 e S1 apresentaram 409,54 e 296,22 U.g⁻¹, respectivamente. Já os substratos S4 e S5 apresentaram valores reduzidos (244,4 e 235,2 U.g⁻¹, respectivamente), os quais não diferiram estatisticamente. OAV foram obtidas em S1, S4 e S5, porém, não foi detectada em S2 e S3. LiP foi detectada em maior quantidade em S1 constituído apenas de

bagaço de *M. domestica*. A concentração de proteínas foi elevada e obedeceu à seguinte ordem $S2 > S1 > S3 > S5 > S4$.

4.1.6 Comparação da atividade enzimática de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 cultivado em bagaços de *Vitis labrusca* e *Malus domestica* e serragem de *Pinus* sp.

A utilização de bagaços de *V. labrusca* e *M. domestica* e serragem de *Pinus* sp. para o cultivo de *P. sajor-caju* PS-2001, em diferentes combinações, apresentou distintas atividades enzimáticas de lacases e de outras fenol-oxidases, além de desenvolvimento micelial peculiar, sendo todos os valores médios apresentados em conjunto de forma resumida na Tabela 7, não sendo utilizados testes estatísticos para comparar os dois grupos experimentados.

As atividades de lacases obtidas em cultivos realizados com bagaço de *M. domestica* foram superiores às obtidas utilizando bagaço de *V. labrusca*. Já o desenvolvimento micelial foi maior nos cultivos realizados com *V. labrusca*, mostrando que a atividade enzimática não está diretamente relacionada ao crescimento do microrganismo, porém, é influenciada pela natureza do substrato utilizado em seu cultivo.

Observando as características de cada substrato, percebe-se que os valores de pH foram constantes e a maioria dos picos de lacases ocorreram no 14º dia, ficando dois picos no 22º dia e os demais distribuídos no 8º, 10º, 18º e 30º dias de cultivo.

A atividade de MnP foi maior nos cultivos utilizando bagaço de *M. domestica*, atingindo $636,4 \text{ U.g}^{-1}$ em S3. OAV foi obtida em valores reduzidos ou não foi detectada em determinados substratos; sua maior atividade foi de $20,86 \text{ U.g}^{-1}$, obtida em S1 contendo bagaço de *M. domestica*. LiP foi detectada em valores baixos em todos os substratos, destacando-se em S1 com *M. domestica* (26 U.g^{-1}).

A concentração de proteínas foi elevada em todos os substratos e em ambos os cultivos, com maior valor ocorrendo em S4 empregando *V. labrusca* (2.803 U.g^{-1}), considerado o melhor substrato para a produção enzimática.

Dos cultivos realizados com bagaço de *V. labrusca*, S4 apresentou a melhor atividade de lacases (36.918 U.g⁻¹), bem como a maior concentração de proteínas (2.803 U.g⁻¹). Com os substratos contendo bagaço de *M. domestica*, S1 mostrou a maior atividade de lacases (81.995 U.g⁻¹) e o valor mais representativo de OAV (com 20,86 U.g⁻¹).

Tabela 7. Atividade enzimática, crescimento fúngico, proteínas totais e dia do pico enzimático de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 empregando como substratos bagaços de *Vitis labrusca* e *Malus domestica* e serragem de *Pinus* sp.

Parâmetro avaliado	<i>Vitis labrusca</i>					<i>Malus domestica</i>				
	S1	S2	S3	S4	S5*	S1	S2	S3	S4	S5*
Lacases (U.g ⁻¹)	16.044	16.883	25.294	36.918	27.840	81.995	78.069	58.702	40.269	53.006
MnP (U.g ⁻¹)	2,68	4,57	1,81	nd	nd	296,22	409,54	636,4	244,4	235,2
OAV (U.g ⁻¹)	9,2	1,23	7,08	7,5	nd	20,86	nd	nd	5,28	2,35
LiP (U.g ⁻¹)	0,86	0,53	0,67	4,8	1,88	26	8,4	4,8	4,3	1,9
Proteínas(mg.g ⁻¹)	904,77	1.585	1.934	2.803	1.824	2.182	2.214	1.960	1.677	1.854
Biomassa ¹	6,96	6,54	8,47	5	5,34	6,95	6,3	4,15	4,8	2,9
Dia do pico enzimático	14°	22°	14°	18°	10°	30°	14°	22°	8°	14°

* Substrato controle composto por serragem de *Pinus* sp.; nd não detectada pelo método utilizado, ¹ Maior média obtida durante o cultivo e expressa em mg de N-acetilglicosamina/g de substrato. S1: bagaço, S2: bagaço e serragem (3:1), S3: bagaço e serragem (1:1), S4: bagaço e serragem (1:3), S5: serragem.

4.2 Cultivos com *Lentinula edodes* LE-01

4.2.1 Produção de cogumelos comestíveis de *Lentinula edodes* LE-01 em bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Eucalyptus* sp.

O fungo *L. edodes* se caracteriza por ser um microrganismo mais exigente quanto às condições de substrato e cultivo, possuindo crescimento micelial mais lento quando comparado a espécies do gênero *Pleurotus*. O tipo de substrato empregado em seu cultivo interfere diretamente no seu desenvolvimento, bem como no processo de frutificação. As combinações de substratos testadas para produção de cogumelos de *L. edodes* LE-01 foram: substrato 1 (S1): somente bagaço de *V. labrusca*; substrato 2 (S2): 75% bagaço de *V. labrusca*

e 25% serragem de *Eucalyptus* sp. (3:1); substrato 3 (S3): 50% bagaço de *V. labrusca* e 50% serragem de *Eucalyptus* sp. (1:1); substrato 4 (S4): 25% bagaço de *V. labrusca* e 75% serragem de *Eucalyptus* sp. (1:3) e substrato 5 (S5): somente serragem de *Eucalyptus* sp., adotado como controle.

L. edodes LE-01 não apresentou bom desenvolvimento nos substratos S1, S2 e S3, desenvolvendo-se melhor em S4 e no controle S5, que apresentaram frutificação esparsa e tardia. O crescimento micelial extremamente lento é característico desta espécie, favorecendo desenvolvimento de espécies contaminantes, provavelmente, devido ao longo período de colonização a que os substratos foram submetidos.

Outro fator a ser considerado é que a natureza do substrato empregado também pode interferir nos índices de contaminação e rendimento de corpos frutíferos. Após estas observações, fez-se necessário, nos experimentos posteriores, o uso do fungicida benomil e de fenol, em concentrações de 0,002% e 0,004%, respectivamente, para diminuir as contaminações e o tempo de colonização.

Segundo Philippoussis *et al.* (2003) e Mata & Savoie (2005), *L. edodes* tem um ciclo de vida de duas fases, crescimento do micélio e produção de corpos de frutificação, sendo que ambas são afetadas pelas proporções de celulose, hemicelulose e lignina, juntamente com o conteúdo de nitrogênio do substrato. Este microrganismo possui como característica pós-colonização a formação de aglomerados de micélio, que não constituem primórdios de cogumelos, e sim, parte de seu processo de colonização (Figura 39A).

Os corpos de frutificação foram coletados em número pequeno e em tempo de cultivo prolongado, até 150 dias após a inoculação, porém, apresentaram tamanhos relativamente grandes. Devido às características do desenvolvimento de *L. edodes*, faz-se necessária uma eficiente organização dos cultivos para se obter fluxos produtivos seguidos em produções de grande escala.

Os corpos de frutificação apresentaram tamanho grande (Figura 39B), distribuíram-se aleatoriamente pelo saco de cultivo (Figura 39C) e apresentaram morfologia característica da espécie, com lamelas bem definidas, consistência firme, coloração marrom e odor agradável (Figura 39D).

Os resultados de produção de cogumelos destes cultivos estão restritos ao substrato 4 e 5, que apresentou R de 12,8%, EB de 38,5% e P de 0,25 g.dia⁻¹, valores inferiores a S5 (30,5%; 91,5% e 0,56 g.dia⁻¹, respectivamente).

Considerando-se que entre as combinações somente S4 apresentou produção de cogumelos e que os demais substratos tiveram problemas de colonização, seja pelo desenvolvimento tardio ou pela difícil adaptação ao substrato disponível, são necessários mais estudos sobre a formulação de meios de cultivo baseados no uso de bagaços de *V. labrusca* e serragem de *Eucalyptus* sp. para a produção de cogumelos comestíveis de *L. edodes*.

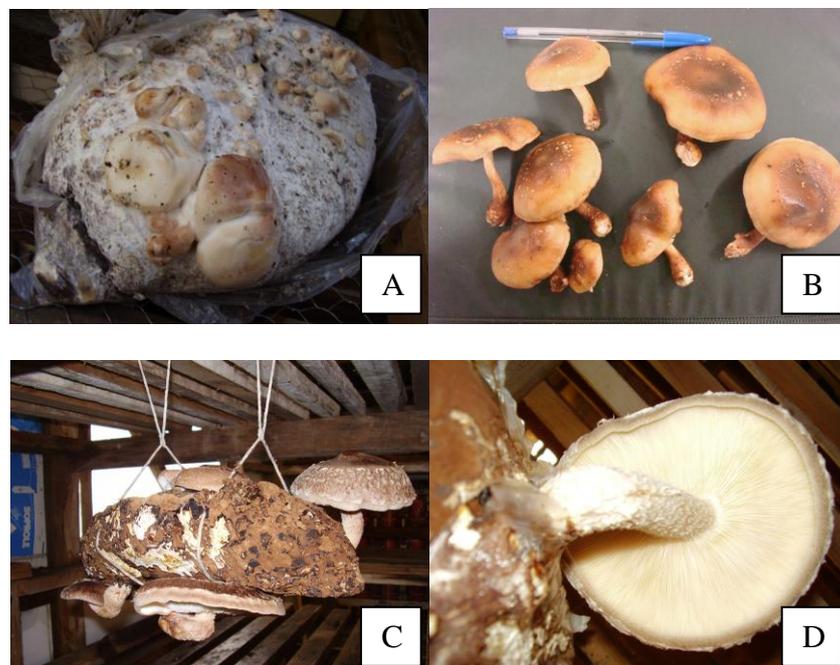


Figura 39. Aglomerados de micélio característicos do período pós-colonização de *Lentinula edodes* LE-01 (A). Cogumelos de *Lentinula edodes* LE-01 produzidos em S4 com resíduos de *Vitis labrusca* e serragem de *Eucalyptus* sp. (B). Cogumelos aderidos ao S4 com *Vitis labrusca* e serragem de *Eucalyptus* sp. (C). Vista inferior do píleo do cogumelo *Lentinula edodes* LE-01 (D).

4.2.2 Produção de cogumelos comestíveis de *Lentinula edodes* LE-01 em bagaço de *Malus domestica* e serragem de *Eucalyptus* sp.

As mesmas combinações anteriores de substratos foram testadas, empregando bagaço de *M. domestica*, obtendo-se dessa forma, as seguintes formulações para o cultivo de *L. edodes* LE-01: substrato 1 (S1): somente bagaço de *M. domestica*; substrato 2 (S2): 75% bagaço de *M. domestica* e 25% serragem de *Eucalyptus* sp. (3:1); substrato 3 (S3): 50% bagaço de *M. domestica* e 50% serragem de *Eucalyptus* sp. (1:1); substrato 4 (S4): 25% bagaço de *M. domestica* e 75% serragem de *Eucalyptus* sp. (1:3) e substrato 5 (S5): somente serragem de *Eucalyptus* sp., adotado como controle.

Os resultados obtidos empregando-se bagaço de *M. domestica* foram satisfatórios nos substratos 3 e 4 e no controle S5, onde o processo de colonização ocorreu de forma adequada para a espécie, ocorrendo frutificação, porém, de forma aleatória entre os sacos de cultivo (Figura 40). Nos demais substratos, a colonização ocorreu num período prolongado chegando a 90 dias.

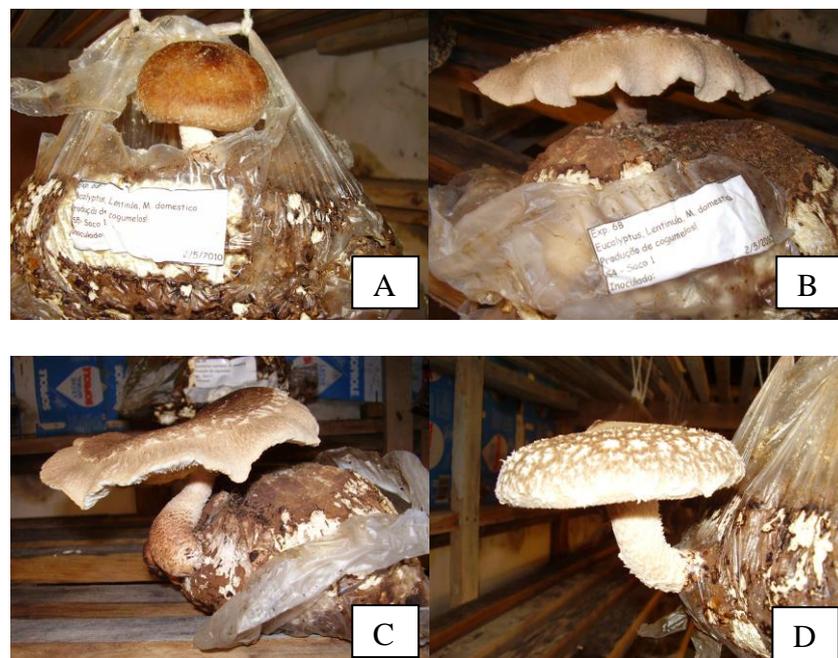


Figura 40. Cogumelos de *Lentinula edodes* LE-01 (A) produzido em substrato constituído de serragem de *Eucalyptus* sp., (B) produzido em S4 com bagaço de *Malus domestica*, (C) produzido em S3 com bagaço de *Malus domestica*, (D) forma característica do cogumelo desta espécie produzido em S5.

Os cogumelos produzidos nos substratos 3 e 4 foram maiores em relação aos produzidos no substrato controle S5 durante o mesmo período, como pode ser observado na Figura 41. Um único cogumelo coletado do substrato 4 possuía 115,07 g, já o cogumelo coletado no substrato 5, no mesmo período de cultivo apresentava a metade desta massa (57,318 g).

A principal característica almejada no uso de substratos lignocelulósicos para produção de cogumelos é a rápida colonização pelo micélio do fungo, indicando seu potencial de degradação e conversão proteica, expressos pela eficiência biológica. Esta importante característica não foi alcançada com os substratos 1 e 2, empregando *M. domestica*.

Em diversos sacos de cultivo, não ocorreu colonização total do substrato e, como consequência, não houve frutificação. O bagaço de *M. domestica* mostrou-se adequado à produção de cogumelos comestíveis de *L. edodes* LE-01 nos substratos 3 e 4, sendo necessários mais estudos com os demais substratos, visando melhor produtividade.

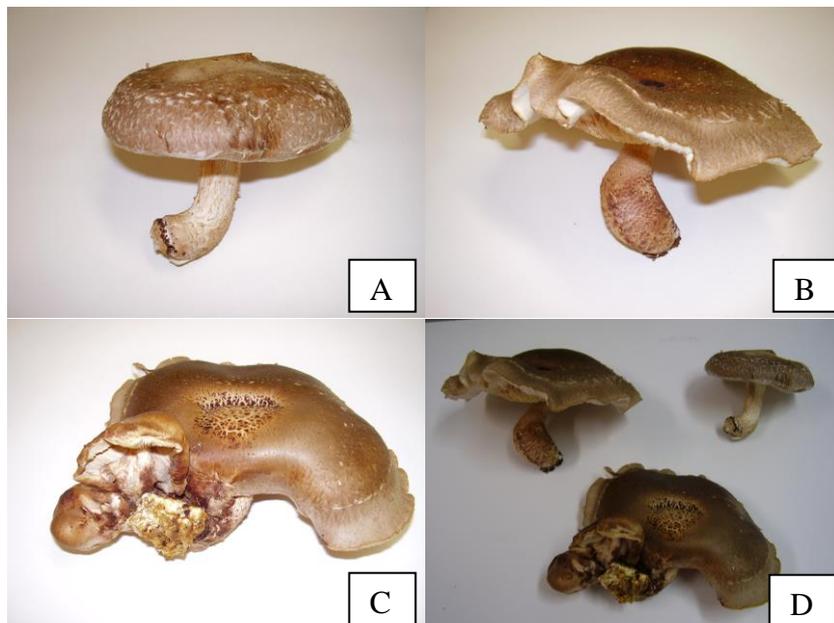


Figura 41. Cogumelos de *Lentinula edodes* LE-01 produzidos em: (A) serragem de *Eucalyptus* sp., (B) S4 com bagaço de *Malus domestica*, (C) S3 com bagaço de *Malus domestica*, (D) S4, S5 e S3 empregando *Malus domestica*.

4.2.3 Comparação da produção de cogumelos comestíveis de *Lentinula edodes* LE-01 utilizando bagaços de *Vitis labrusca* e *Malus domestica* e serragem de *Eucalyptus* sp.

Dos substratos testados para a produção de cogumelos comestíveis de *L. edodes* LE-01 empregando bagaço de *V. labrusca* e serragem de *Eucalyptus* sp., as combinações de resíduos utilizadas nos substratos 1, 2 e 3 mostraram-se pouco adequadas ao desenvolvimento fúngico. Nesses substratos, o desenvolvimento micelial foi muito lento e de forma parcial em cada saco de cultivo, não havendo a formação de primórdios de cogumelos, apenas de alguns aglomerados de micélio. Resultados diferentes foram obtidos em S4, que possibilitou bom desenvolvimento e produção de cogumelos, obtendo R de 12,8%, EB de 38,5% e P de 0,25 g.dia⁻¹; porém, estes valores foram inferiores aos obtidos no substrato controle 5, que apresentou R de 30,5%, EB de 91,5% e P de 0,56 g.dia⁻¹.

Para as combinações de substratos com bagaços de *M. domestica*, o fungo *L. edodes* LE-01 não apresentou bom desenvolvimento nos substratos 1 e 2, em que não ocorreu a produção de cogumelos, verificando-se que estas combinações não são adequadas para a produção. Os resultados de produção obtidos nas combinações de substratos 3 e 4 foram adequadas, pois o fungo se desenvolveu em todo substrato e apresentou produção de cogumelos esparsa, porém com tamanhos relativamente grandes quando comparados aos produzidos pelo controle S5, no mesmo período. Proporcionalmente, os cogumelos de *L. edodes* LE-01 coletados em S4, empregando *M. domestica*, apresentaram o dobro de tamanho dos cogumelos coletados no controle S5, composto somente por serragem de *Eucalyptus* sp.

Para os substratos testados com bagaço de *V. labrusca*, apenas S4 possibilitou a produção de cogumelos. Já o bagaço de *M. domestica* propiciou produção em duas composições de substratos, S3 e S4.

4.2.4 Atividade enzimática de *Lentinula edodes* LE-01 cultivado em bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Eucalyptus* sp.

O bagaço de *V. labrusca* foi também testado em cultivos empregando o microrganismo *L. edodes* LE-01, em combinações com serragem de *Eucalyptus* sp. Este segundo resíduo foi escolhido por ser o mais utilizado para cultivos de *L. edodes* e, por isso, foi adotado como controle. Foram utilizadas as mesmas combinações de resíduos, obtendo-se então os substratos listados: substrato 1 (S1): somente bagaço de *V. labrusca*; substrato 2 (S2): 75% bagaço de *V. labrusca* e 25% serragem de *Eucalyptus* sp. (3:1); substrato 3 (S3): 50% bagaço de *V. labrusca* e 50% serragem de *Eucalyptus* sp. (1:1); substrato 4 (S4): 25% bagaço de *V. labrusca* e 75% serragem de *Eucalyptus* sp. (1:3) e substrato 5 (S5): somente serragem de *Eucalyptus* sp., adotado como controle.

Os cultivos foram realizados durante 30 dias, dentro das condições descritas anteriormente. As atividades de lacases foram semelhantes nos substratos 1, 2, 3 e 5, que apresentaram quantidades reduzidas. S4 mostrou atividades relevantes, com pico de 2.932 U.g⁻¹ no 4º dia de cultivo (Figura 42). Com exceção de S4, os demais substratos apresentaram atividade enzimática abaixo de 500 U.g⁻¹, com valor maior em S5, que mostrou pico enzimático no 22º dia de cultivo (742 U.g⁻¹), seguido de S1 mostrou no 18º dia (314 U.g⁻¹), S2 no 14º dia (235 U.g⁻¹) e S3 no 6º dia de cultivo (385 U.g⁻¹).

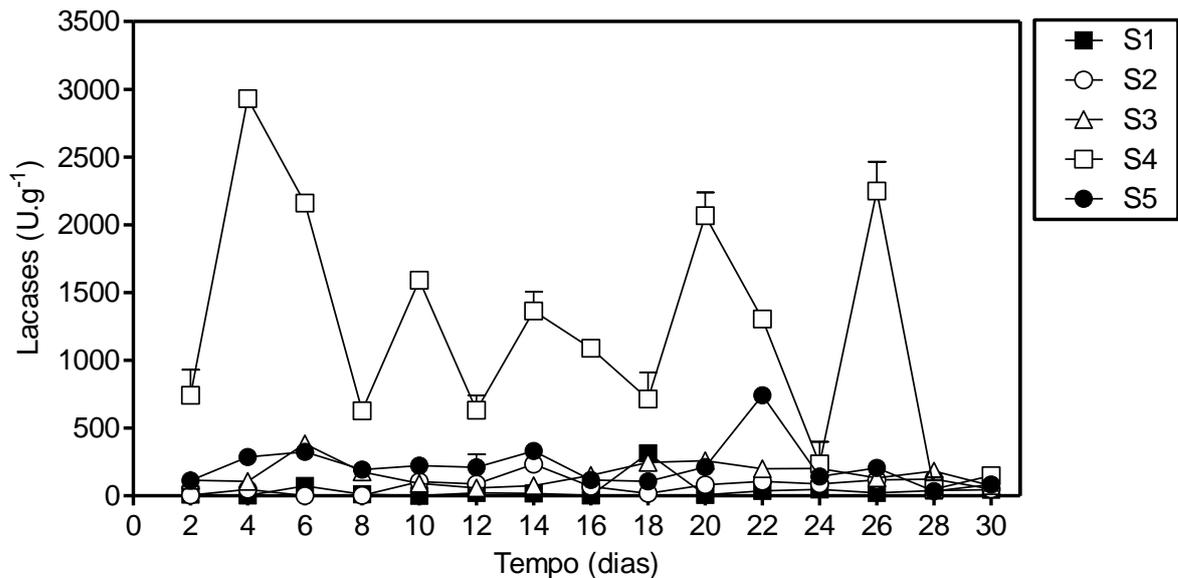


Figura 42. Atividade enzimática de lacases por *Lentinula edodes* LE-01 cultivado em substratos compostos por resíduos lignocelulósicos. S1: bagaço de *V. labrusca*. S2: bagaço de *V. labrusca* e serragem de *Eucalyptus* sp. (3:1). S3: bagaço de *V. labrusca* e serragem de *Eucalyptus* sp. (1:1). S4: bagaço de *V. labrusca* e serragem de *Eucalyptus* sp. (1:3). S5: serragem de *Eucalyptus* sp.

As enzimas ligninolíticas são produzidas em maior quantidade pelos fungos durante o período de colonização, com posterior declínio durante a frutificação (Lechner & Papinutti, 2006). Durante o cultivo com *L. edodes* LE-01, todos os substratos apresentaram atividade enzimática constante, com exceção de S4, que apresentou valores muito superiores aos demais substratos e oscilações bruscas até o término do cultivo.

Os valores de pH embora variáveis mostraram uma tendência de decréscimo nos dias iniciais do cultivo, com oscilações maiores a partir do 12º dia de cultivo (Figura 43). S4 apresentou o maior valor de pH (5,59) no 22º dia, e S5 o menor valor (3,65) no 28º dia de cultivo.

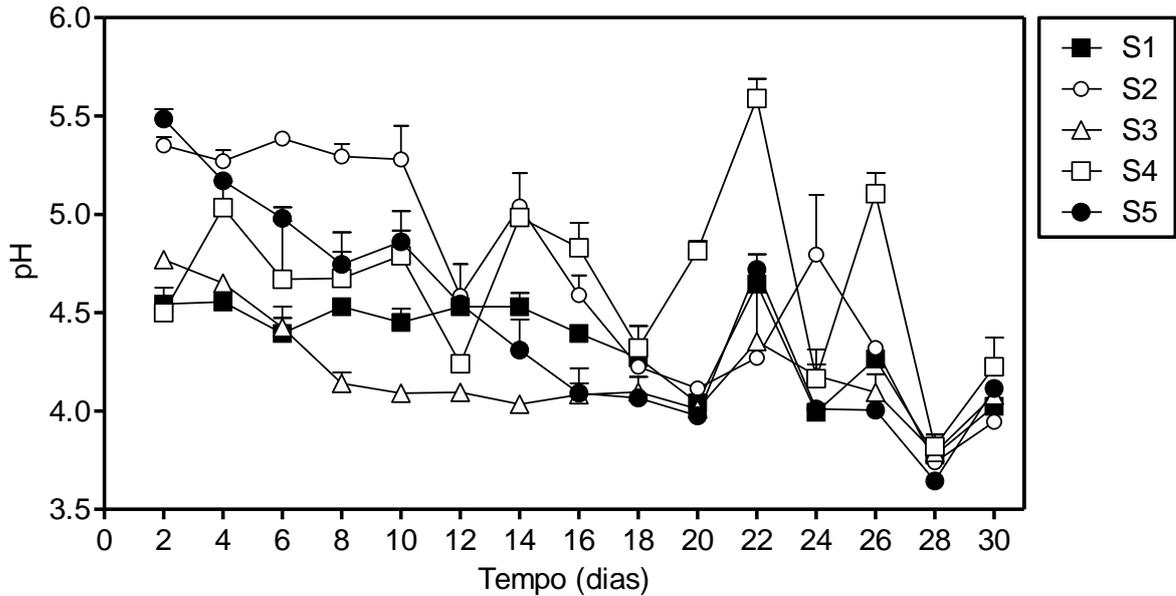


Figura 43. Valores de pH durante o cultivo de *Lentinula edodes* LE-01 em resíduos lignocelulósicos. S1: bagaço de *V. labrusca*. S2: bagaço de *V. labrusca* e serragem de *Eucalyptus* sp. (3:1). S3: bagaço de *V. labrusca* e serragem de *Eucalyptus* sp. (1:1). S4: bagaço de *V. labrusca* e serragem de *Eucalyptus* sp. (1:3). S5: serragem de *Eucalyptus* sp.

O substrato 1, constituído por bagaço de *V. labrusca*, possibilitou a *L. edodes* LE-01 um perfil de lacases constante durante os 30 dias de cultivo, com pico enzimático no 18º dia, quando atingiu 314 U.g^{-1} (Figura 44). Os valores de pH durante o cultivo neste substrato oscilaram de 3,77 a 4,65, visto que, durante o pico enzimático manteve-se em 4,27.

O pico de lacases, obtido no 18º dia em S1, difere dos demais substratos, cujos picos ocorreram de forma distribuída ao longo do cultivo, no 4º, 6º 18º e 22º dias de cultivo.

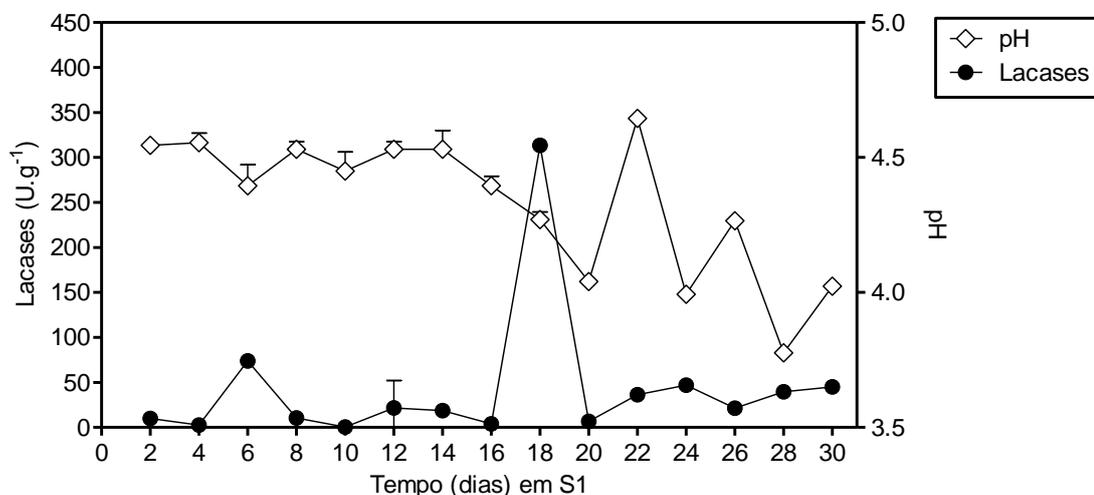


Figura 44. Atividade enzimática de lacases de *Lentinula edodes* LE-01 e pH em substrato composto por bagaço de *Vitis labrusca*.

Na Figura 45, juntamente com o perfil de lacases, são apresentados os valores de biomassa. Verifica-se que o maior crescimento fúngico ocorreu no 22º dia de cultivo (15,9 mg de N-acetilglicosamina/g de substrato). Através das medidas de biomassa, pode-se observar o crescimento fúngico durante os 30 dias de cultivo, visto que a colonização do substrato, determinada pela extensão do micélio, pela produção de biomassa e pela atividade enzimática é de grande importância para a eficiência do cultivo (Leatham, 1985; Di Lena *et al.*, 1997; Philippoussis *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2005).

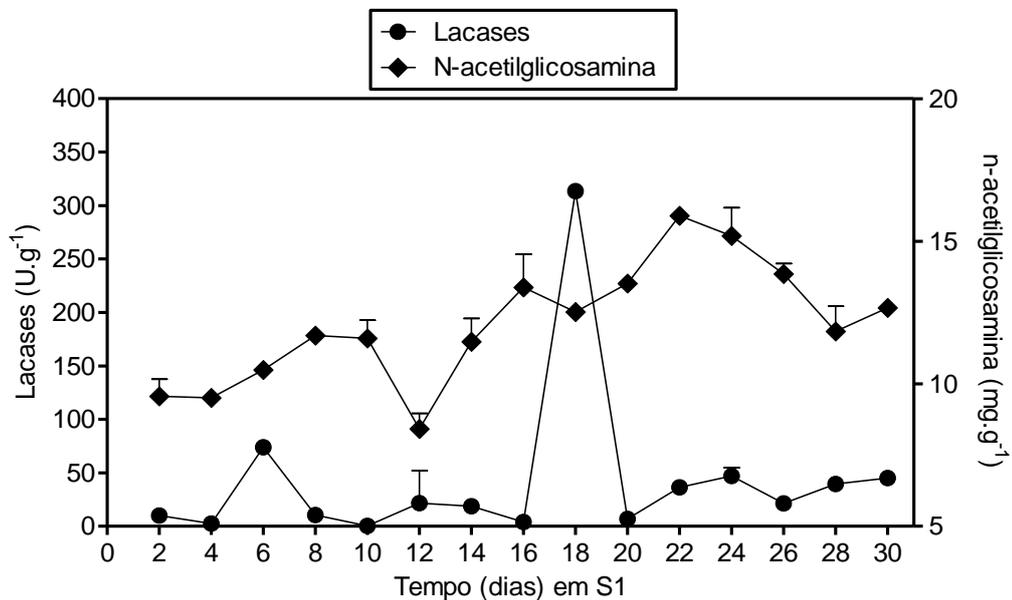


Figura 45. Atividade enzimática de lacases e biomassa de *Lentinula edodes* LE-01 em substrato composto por bagaço de *Vitis labrusca*.

O substrato 2, composto por 75% de bagaço de *V. labrusca* e 25% de serragem de *Eucalyptus* sp., apresentou pico enzimático de lacases no 14º dia de cultivo, de 234,47 U.g⁻¹ (Figura 46). Os valores de pH, ao contrário do que aconteceu nos cultivos com os outros substratos, foram decrescentes, oscilando entre 5,38 e 3,74. No 14º dia, quando o pico enzimático foi obtido, o valor de pH estava em 5,04, um pouco superior ao pH encontrado no pico de S1 (4,27).

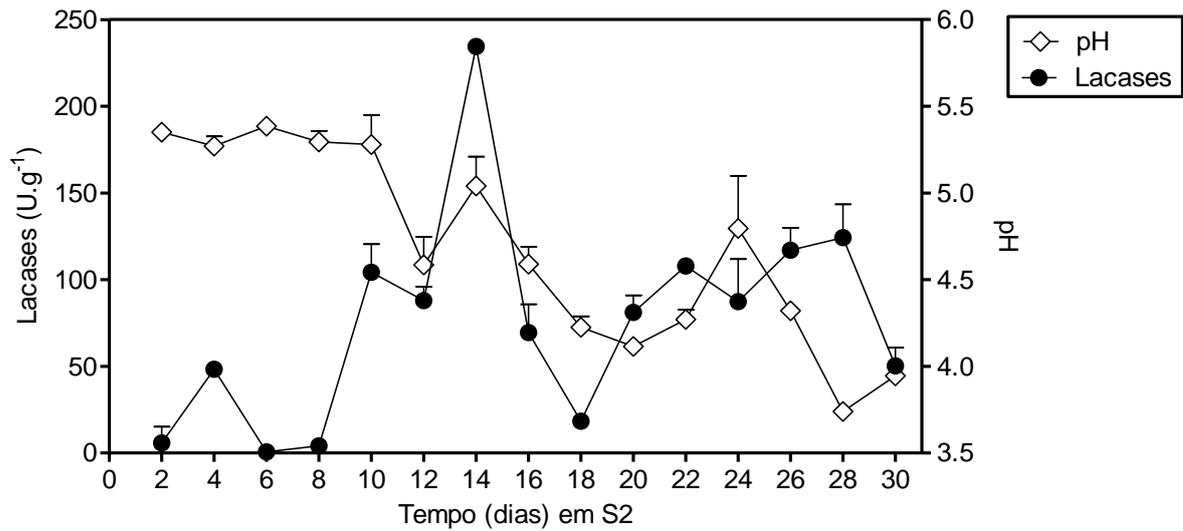


Figura 46. Atividade enzimática de lacases de *Lentinula edodes* LE-01 e pH em substrato composto por bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Eucalyptus* sp. (3:1).

No cultivo utilizando o substrato 2, ocorreu um pequeno aumento de lacases até o 10º dia, seguido de um grande pico no 14º dia e pequenas oscilações até o término do cultivo. Os valores de pH foram constantes até o 10º dia, com posterior decréscimo até o fim do cultivo. O fungo apresentou leve crescimento ao longo do cultivo, obtendo maior biomassa no 18º dia de cultivo, de 16,13 mg de N-acetilglicosamina/g de substrato (Figura 47).

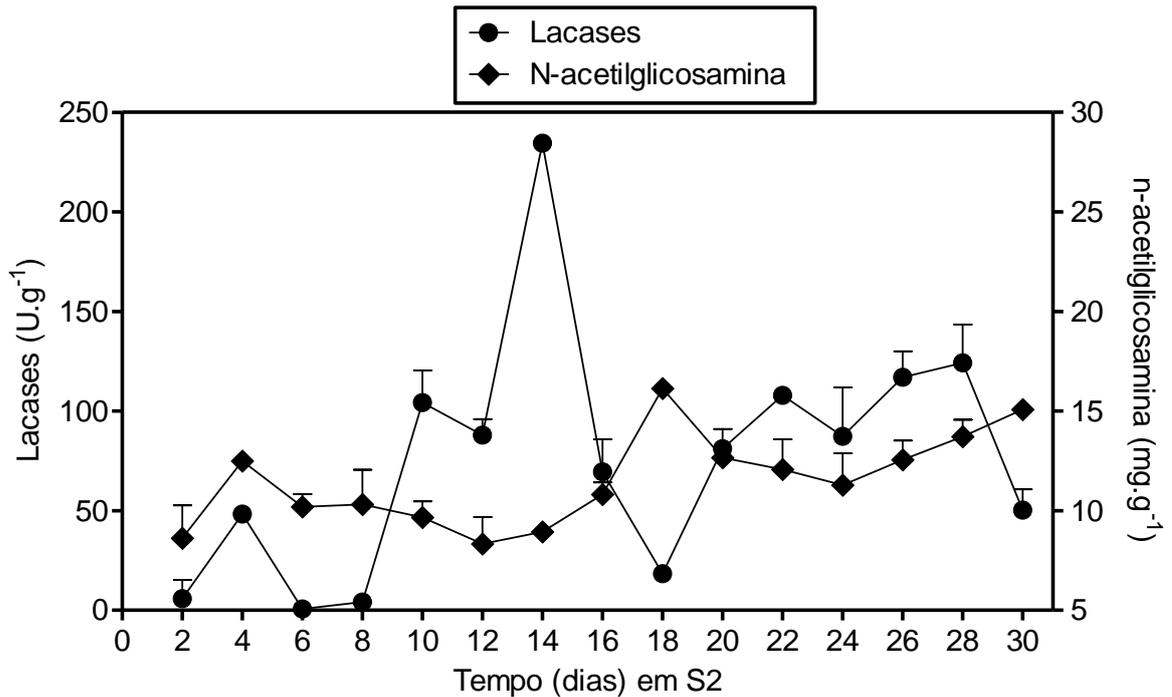


Figura 47. Atividade enzimática de lacases e biomassa de *Lentinula edodes* LE-01 em substrato composto por bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Eucalyptus* sp. (3:1).

O substrato 3, composto por 50% de bagaço de *V. labrusca* e 50% de serragem de *Eucalyptus* sp., apresentou pico de lacases na primeira semana de cultivo (6º dia), de 384,528 U.g⁻¹ (Figura 48). Os valores de pH foram decrescentes ao longo do cultivo e, durante o pico enzimático, o valor de pH foi 4,4.

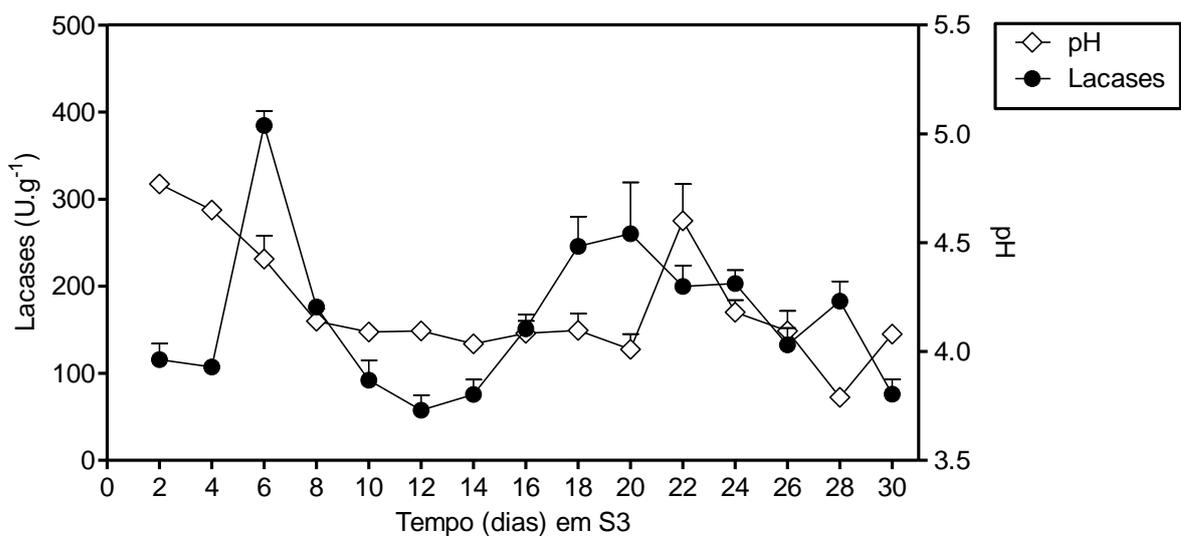


Figura 48. Atividade enzimática de lacases por *Lentinula edodes* LE-01 e pH em substrato composto por bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Eucalyptus* sp. (1:1).

O perfil de lacases no cultivo em S3 apresentou seu pico no 6º dia, seguido de queda até o 12º dia e aumento, com várias oscilações, até o término do cultivo. O menor valor de pH (3,8) foi observado no 28º dia, e o maior (4,77) no 2º dia de cultivo.

A maior biomassa de *L. edodes* LE-01, obtida em S3, ocorreu no 16º dia de cultivo, de 17,42 mg de N-acetilglicosamina/g de substrato, dez dias após o pico enzimático (Figura 49). Neste substrato, pode-se observar nitidamente o desenvolvimento fúngico ao longo do cultivo, através da oscilação dos teores de N-acetilglicosamina.

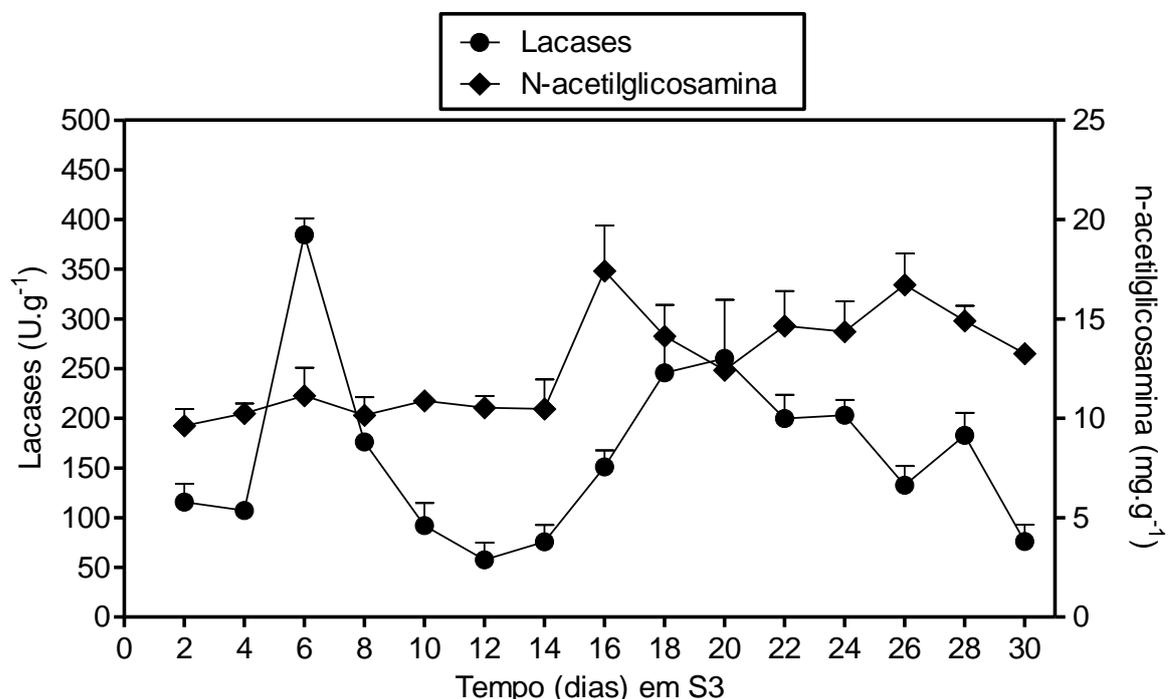


Figura 49. Atividade enzimática de lacases e biomassa de *Lentinula edodes* LE-01 em substrato composto por bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Eucalyptus* sp. (1:1).

O cultivo realizado com o substrato 4, composto por 25% de bagaço de *V. labrusca* e 75% de serragem de *Eucalyptus* sp., apresentou pico enzimático de lacases precocemente, no 4º dia de cultivo, de 2.932 U.g⁻¹ em pH 5,03 (Figura 50). Os valores de pH apresentaram muitas oscilações ao longo do cultivo, porém, mantendo-se restritos entre 3,82 e 5,59.

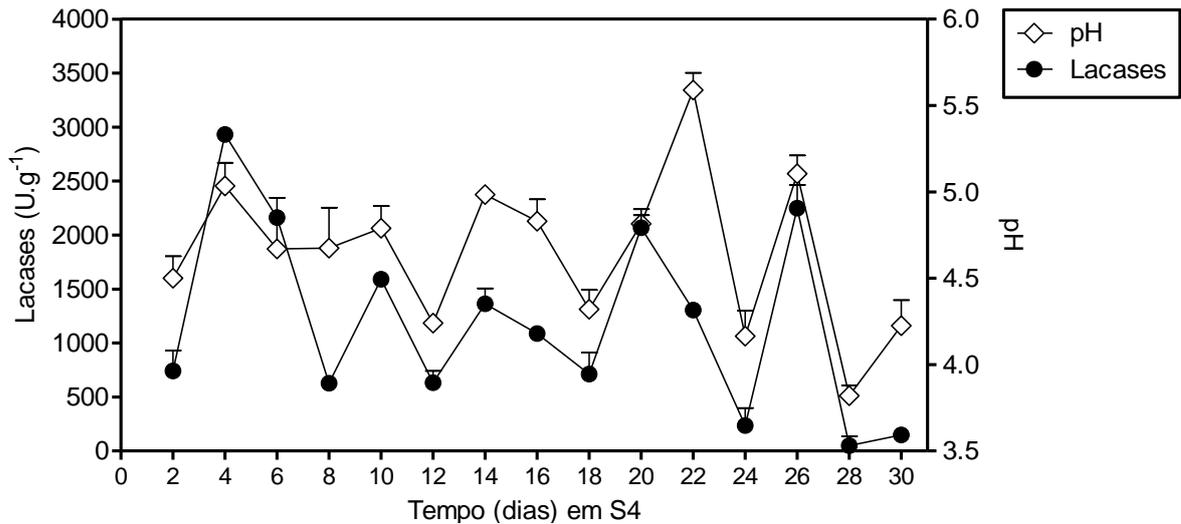


Figura 50. Atividade enzimática de lacases de *Lentinula edodes* LE-01 e pH em substrato composto por bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Eucalyptus* sp. (1:3).

O cultivo de *L. edodes* LE-01 em S4 apresentou valores expressivos de lacases em outros dias após atingir o pico no 4º dia, como no 6º, 20º e 26º dias de cultivo (2.161, 2.068 e 2.250 U.g⁻¹, respectivamente). Estes valores são superiores aos picos dos três primeiros substratos testados e confirmam a maior atividade de lacases em S4 (pico de 2.932 U.g⁻¹).

A Figura 51 mostra que a maior biomassa do cultivo S4 foi obtida no 30º dia, de 15,2 mg de N-acetilglicosamina/g de substrato.

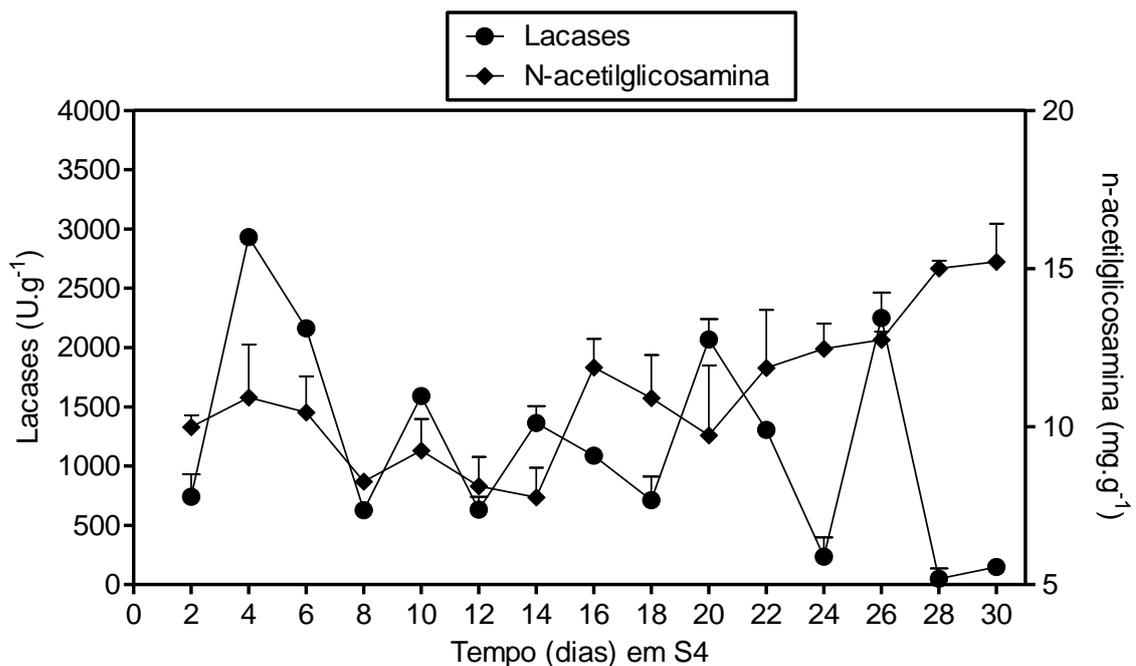


Figura 51. Atividade enzimática de lacases e biomassa de *Lentinula edodes* LE-01 em substrato composto por bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Eucalyptus* sp. (1:3).

O cultivo realizado em S5, composto de 100% serragem de *Eucalyptus* sp., foi adotado como controle por ser o substrato mais empregado no cultivo de fungos do gênero *Lentinula*. Este substrato apresentou maior atividade enzimática no 22º dia de cultivo (741.7 U.g⁻¹), valor superior ao obtido em S1, S2 e S3, porém inferior a S4, que apresentou 2.932 U.g⁻¹ de lacases.

Os valores de pH neste substrato foram decrescentes ao longo do cultivo, oscilando entre 5,5 e 3,7 durante os 30 dias. No pico enzimático, o valor de pH foi de 4,7, como pode ser observado na Figura 52.

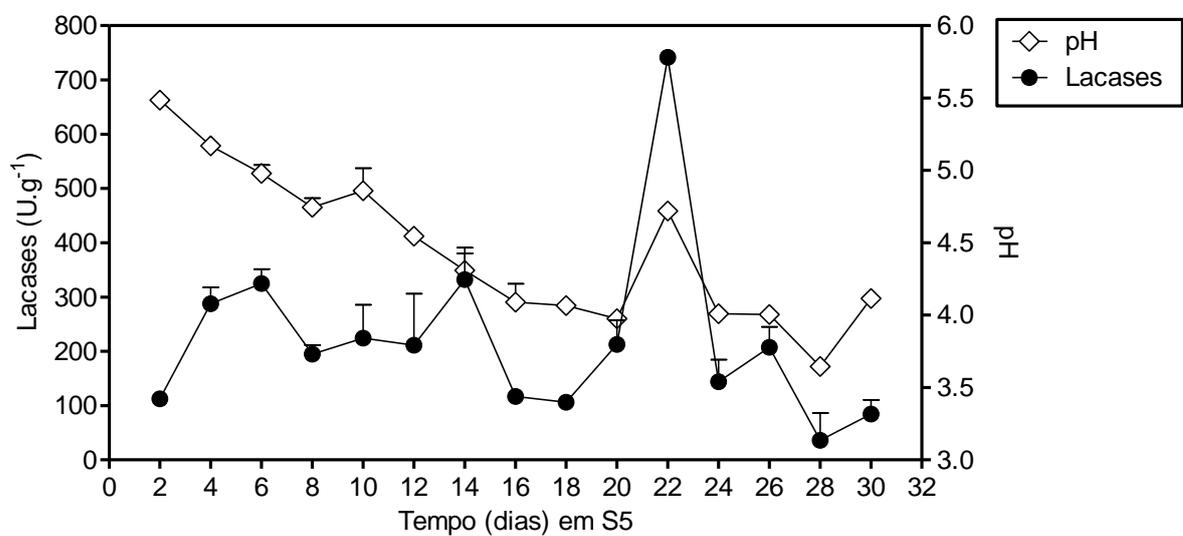


Figura 52. Atividade enzimática de lacases de *Lentinula edodes* LE-01 e pH em substrato composto por serragem de *Eucalyptus* sp. e bagaço de *Vitis labrusca*.

Tal como verificado para os demais substratos, o cultivo realizado empregando somente serragem de *Eucalyptus* sp. (S5) apresentou biomassa de 14,28 mg de N-acetilglicosamina/g de substrato no 16º dia. Observando-se a Figura 53, pode-se perceber o aumento de biomassa fúngica ao longo do cultivo.

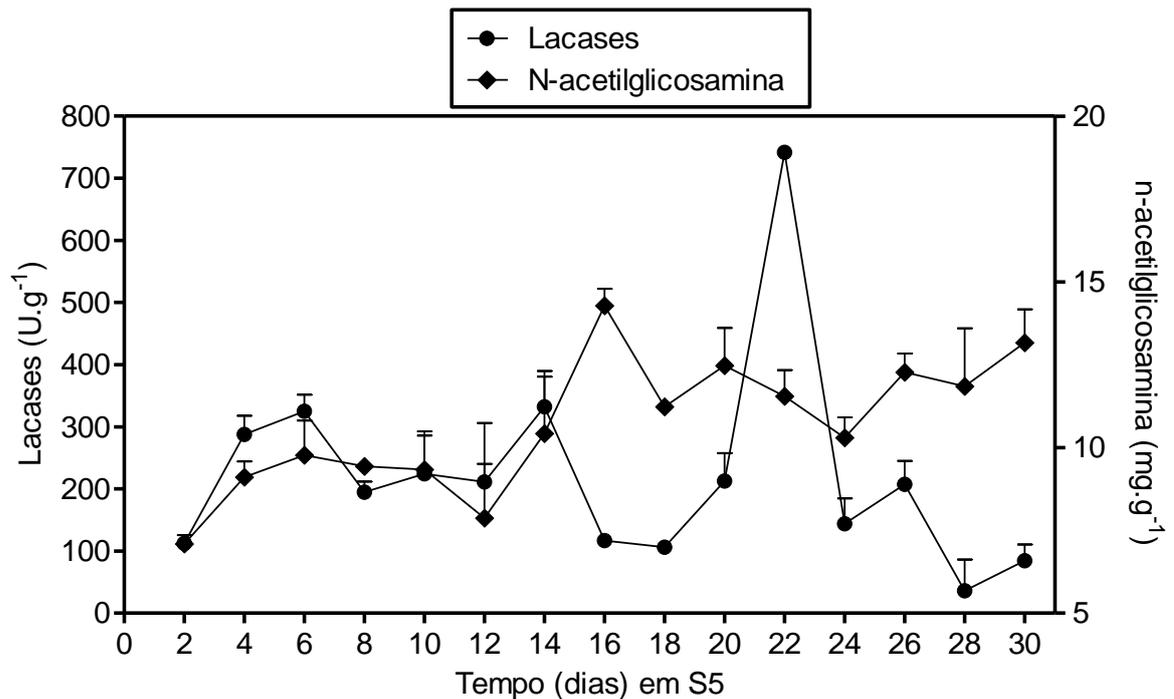


Figura 53. Atividade enzimática de lacases e biomassa de *Lentinula edodes* LE-01 em substrato composto serragem de *Eucalyptus* sp. e bagaço de *Vitis labrusca*.

Dos cinco substratos testados para o cultivo de *L. edodes* LE-01, S4 foi o que apresentou a maior atividade de lacases (2.932 U.g⁻¹), superior ao controle S5 (742 U.g⁻¹) e também a S1, S2 e S3. As atividades de lacases obtidas em todos os substratos são superiores aos obtidos em cultivos de *Lentinus tigrinus* em palha de trigo, que apresentou maior atividade no 20º dia de cultivo, de apenas 30 U.g⁻¹ (Lechner & Papinutti, 2006).

Na Tabela 8, estão resumidos os dados de atividade de lacases, crescimento fúngico, e pH para cada substrato testado no cultivo de *L. edodes* LE-01 contendo bagaço de *V. labrusca* e serragem de *Eucalyptus* sp. A atividade de lacases em S4 foi estatisticamente superior às demais. S5, tomado como controle, foi o segundo melhor substrato para a produção de lacases por *L. edodes* LE-01 (742 U.g⁻¹). Os substratos 1, 2 e 3 mostraram menor atividade enzimática (314, 235 e 385 U.g⁻¹, respectivamente), diferindo dos demais substratos e estatisticamente diferentes entre si. A maior produção enzimática em todos os substratos ocorreu na seguinte ordem S4 > S5 > S3 > S1 > S2.

Os valores de pH medidos no dia dos picos de lacases apresentaram valores pouco distintos, entre 4,27 e 5,04. O substrato 4 alcançou antecipadamente o pico enzimático, no 4º dia de cultivo, seguido de S3, S2, S1 e S5, no 6º, 14º, 18º e 22º dias, respectivamente.

Tabela 8. Atividade de lacases, crescimento fúngico, pH e dia do pico enzimático durante o cultivo *Lentinula edodes* LE-01 em substratos empregando bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Eucalyptus* sp.

Substrato	Resíduo lignocelulósico	Lacases ¹ (U.g ⁻¹)	Biomassa ² (mg.g ⁻¹)	pH	Dia do pico enzimático
S1	Bagaço de <i>V. labrusca</i>	314 ^d	15,9	4,27	18º
S2 (3:1)	Bagaço de <i>V. labrusca</i> e serragem de <i>Eucalyptus</i> sp.	235 ^e	16,13	5,04	14º
S3 (1:1)	Bagaço de <i>V. labrusca</i> e serragem de <i>Eucalyptus</i> sp.	385 ^c	17,42	4,4	6º
S4 (1:3)	Bagaço de <i>V. labrusca</i> e serragem de <i>Eucalyptus</i> sp.	2.932 ^a	15,2	5	4º
S5*	Serragem de <i>Eucalyptus</i> sp.	742 ^b	14,28	4,72	22º

¹Média de atividade enzimática obtida em cultivos feitos em triplicata; ²Maior média obtida durante o cultivo, expresso em mg de N-acetilglicosamina/g de substrato úmido; *substrato controle; ^{a/b/c} Análise estatística: grupos com a mesma letra não diferem estatisticamente em nível de 5% (p≤0,05). S1: bagaço, S2: bagaço e serragem (3:1), S3: bagaço e serragem (1:1), S4: bagaço e serragem (1:3), S5: serragem.

A atividade das demais fenol-oxidases também foi analisada no dia do pico de lacases em todos os substratos testados. OAV e LiP mostraram níveis reduzidos. PerT e MnP não foram detectadas pelo método utilizado. A atividade de fenol-oxidases e a concentração de proteínas totais estão detalhadas na Tabela 9.

A atividade de OAV foi reduzida em todos os substratos testados, sendo mais elevada em S5 (41,4 U.g⁻¹). LiP não foi detectada em S1 e obtida em baixa concentração nos demais substratos, não havendo diferenças estatísticas. As proteínas totais foram quantificadas em valores elevados, sendo mais significativa sua presença em S5 (1.375 U.g⁻¹), obedecendo à seguinte ordem S5 > S4 > S2 > S3 > S1. Dos substratos testados para o cultivo de *L. edodes*

LE-01 visando à produção enzimática, o composto por bagaço de *V. labrusca* e serragem de *Eucalyptus* sp. na proporção 1:3 (S4) foi o que apresentou maior atividade de lacases, porém, o segundo maior valor de proteínas totais (1.182 U.g⁻¹).

Tabela 9. Atividade de oxidases do álcool veratrílico, lignina peroxidase e quantidade de proteínas totais de *Lentinula edodes* LE-01 cultivado em substratos empregando bagaço de *Vitis labrusca* e serragem de *Eucalyptus* sp.

Substrato	Resíduo lignocelulósico	OAV (U.g ⁻¹)	LiP (U.g ⁻¹)	Proteínas (mg.g ⁻¹)
S1	Bagaço de <i>V. labrusca</i>	25,94±1,96 ^a	nd	872±49 ^a
S2 (3:1)	Bagaço de <i>V. labrusca</i> e serragem de <i>Eucalyptus</i> sp.	23,32±4,3 ^{ab}	0,54±0,069 ^c	1.094±21,8 ^a
S3 (1:1)	Bagaço de <i>V. labrusca</i> e serragem de <i>Eucalyptus</i> sp.	4,95±1,48 ^{bc}	1,48±0,02 ^b	1.076±194 ^a
S4 (1:3)	Bagaço de <i>V. labrusca</i> e serragem de <i>Eucalyptus</i> sp.	0,3±0,138 ^c	2,73±0,34 ^a	1.182±109 ^a
S5*	Serragem de <i>Eucalyptus</i> sp.	41,4±9,06 ^a	1,5±0,26 ^b	1.375±35 ^a

Média de atividade enzimática obtida em cultivos feitos em triplicata; *substrato controle; ^{a/b/c} Análise estatística: grupos com a mesma letra não diferem estatisticamente em nível de 5% (p≤0,05); nd não detectada pelo método utilizado. S1: bagaço, S2: bagaço e serragem (3:1), S3: bagaço e serragem (1:1), S4: bagaço e serragem (1:3), S5: serragem.

4.2.5 Atividade enzimática de *Lentinula edodes* LE-01 cultivado em bagaço de *Malus domestica* e serragem de *Eucalyptus* sp.

O bagaço de *M. domestica* foi também testado em cultivos empregando o microrganismo *L. edodes* LE-01 em combinações com serragem de *Eucalyptus* sp. Foram utilizadas as mesmas combinações de resíduos, obtendo-se: substrato 1 (S1): somente bagaço de *M. domestica*; substrato 2 (S2): 75% bagaço de *M. domestica* e 25% serragem de *Eucalyptus* sp. (3:1); substrato 3 (S3): 50% bagaço de *M. domestica* e 50% serragem de *Eucalyptus* sp. (1:1); substrato 4 (S4): 25% bagaço de *M. domestica* e 75% serragem de

Eucalyptus sp. (1:3) e substrato 5 (S5): somente serragem de *Eucalyptus* sp., adotado como controle.

Os cultivos foram realizados durante 30 dias, nas mesmas condições descritas anteriormente. As atividades de lacases foram reduzidas empregando os substratos 1 e 4, mas superiores em S2, S3 e S5. A maior atividade de lacases foi obtida empregando-se em S2, de 706 U.g⁻¹ no 16º dia de cultivo, como pode ser observado na Figura 54. A segunda maior atividade foi obtida em S3 e em S5 (controle), ambos no 22º dia de cultivo (560 U.g⁻¹).

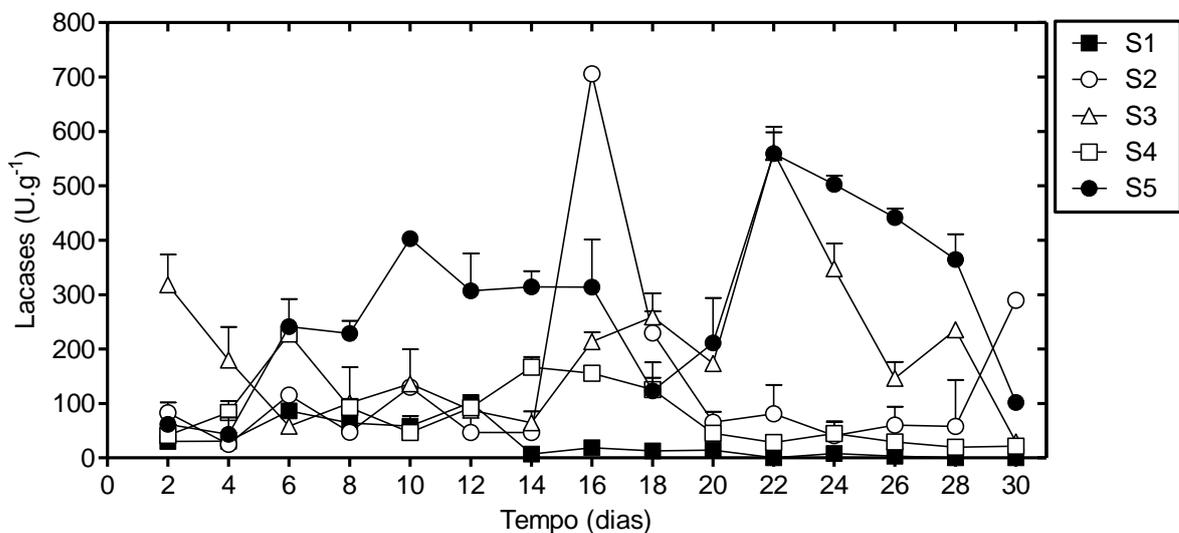


Figura 54. Atividade enzimática de lacases de *Lentinula edodes* LE-01 cultivado em substratos compostos por resíduos lignocelulósicos. S1: bagaço de *M. domestica*. S2: bagaço de *M. domestica* e serragem de *Eucalyptus* sp. (3:1). S3: bagaço de *M. domestica* e serragem de *Eucalyptus* sp. (1:1). S4: bagaço de *M. domestica* e serragem de *Eucalyptus* sp. (1:3). S5: serragem de *Eucalyptus* sp.

Os valores de pH durante todos os cultivos apresentaram leve decréscimo, exceto em S1, que apresentou valores de 6,55 no 20º e 6,44 no 26º dia de cultivo (Figura 55). O substrato 1, que apresentou os maiores valores de pH, também mostrou a maior oscilação de valores, entre 4,5 e 6,55. O pH dos demais substratos testados mantiveram-se constantes durante os 30 dias de cultivo, destacando-se o menor valor obtido em S3, no 22º dia de cultivo, de 3,8.

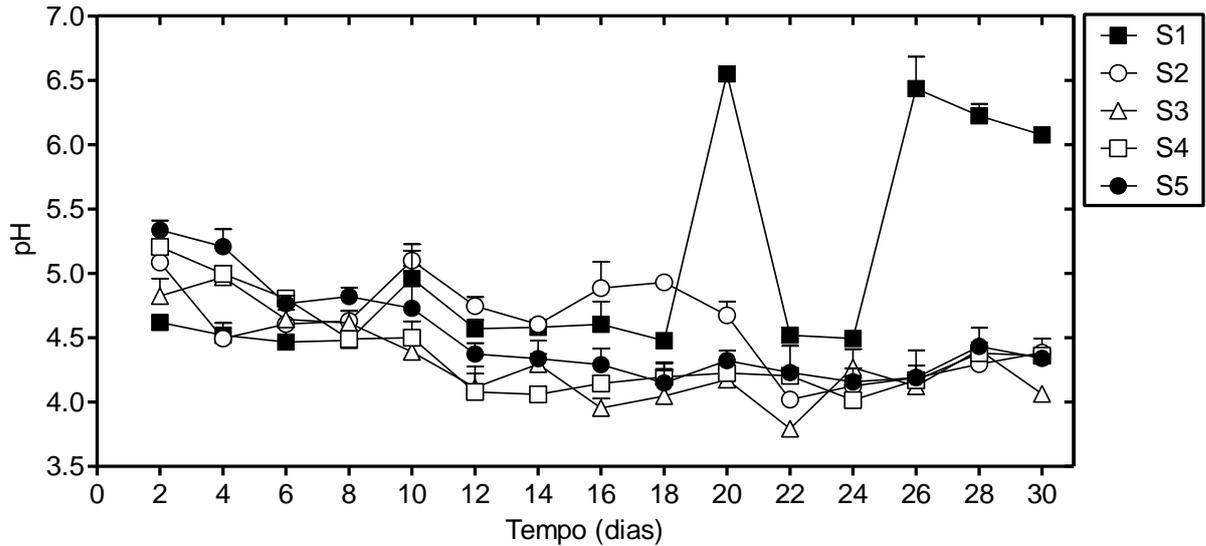


Figura 55. Valores de pH durante o cultivo de *Lentinula edodes* LE-01 em resíduos lignocelulósicos. S1: bagaço de *M. domestica*. S2: bagaço de *M. domestica* e serragem de *Eucalyptus* sp. (3:1). S3: bagaço de *M. domestica* e serragem de *Eucalyptus* sp. (1:1). S4: bagaço de *M. domestica* e serragem de *Eucalyptus* sp. (1:3). S5: serragem de *Eucalyptus* sp.

O substrato 1, que utiliza somente bagaço de *M. domestica*, apresentou atividade de lacases muito reduzida (máximo de 102 U.g^{-1} no 12º dia de cultivo). Nesta condição o pH oscilou entre 4,46 e 6,55, mantendo-se em 4,57 durante o pico enzimático, ocorrido no 12º dia. O maior valor de pH obtido empregando este substrato ocorreu no 20º dia de cultivo, onde a atividade enzimática foi de somente 14 U.g^{-1} ; já para o menor valor (4,46), observado no 6º dia de cultivo, a atividade enzimática foi de $86,5 \text{ U.g}^{-1}$ (Figura 56).

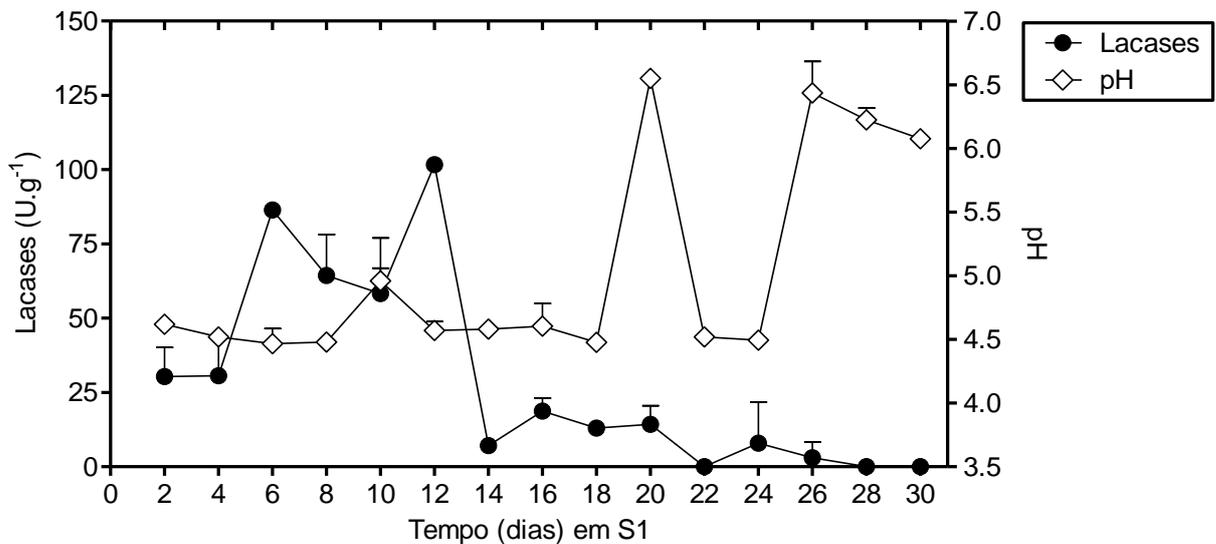


Figura 56. Atividade enzimática de lacases de *Lentinula edodes* LE-01 e pH em substrato composto por bagaço de *Malus domestica*.

L. edodes LE-01 apresentou crescimento até o 20º dia de cultivo, atingindo 1,63 mg de N-acetilglicosamina/g de substrato, com posterior diminuição de desenvolvimento. Os maiores valores de biomassa obtidos estão relacionados a uma baixa produção enzimática que, após o pico, ocorrido no 12º dia, apresentou queda brusca de atividade (Figura 57).

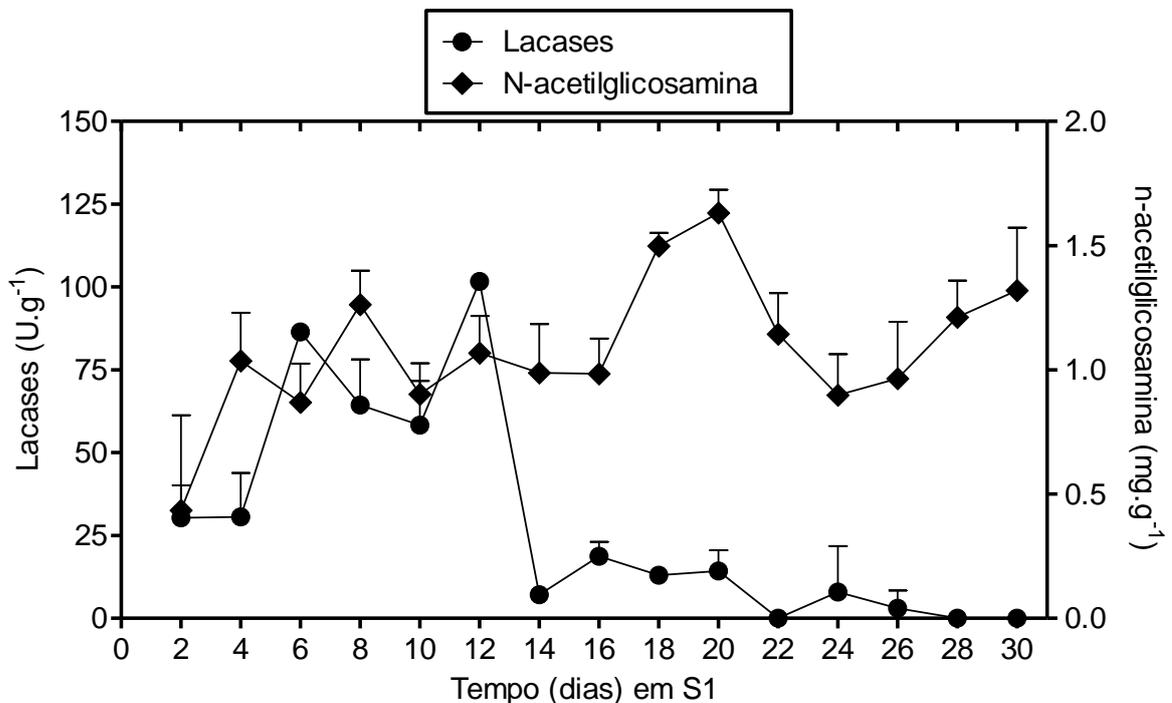


Figura 57. Atividade enzimática de lacases e biomassa de *Lentinula edodes* LE-01 em substrato composto por bagaço de *Malus domestica*.

O substrato 2, composto por 75% de bagaço de *M. domestica* e 25% de serragem de *Eucalyptus* sp., apresentou pico de lacases no 16º dia de cultivo, de 706 U.g⁻¹ (Figura 58). Os valores de pH foram decrescentes ao longo do cultivo, oscilando entre 4,02 e 5,1.

Durante o 16º dia, quando o pico enzimático foi obtido, o valor de pH estava em 4,8, pouco superior do que o pH encontrado no pico de S1 (4,57). Neste cultivo, ocorreu baixa atividade de lacases durante todo o período avaliado, apresentando pico somente no 16º dia (706 U.g⁻¹) e pequeno aumento no último dia, perto de 290 U.g⁻¹.

Na Figura 59, verifica-se que a biomassa de *L. edodes* LE-01 no substrato 2 apresentou aumento no transcorrer do cultivo e seu maior desenvolvimento foi 28º dia, com 1,62 mg de N-acetilglicosamina/g de substrato.

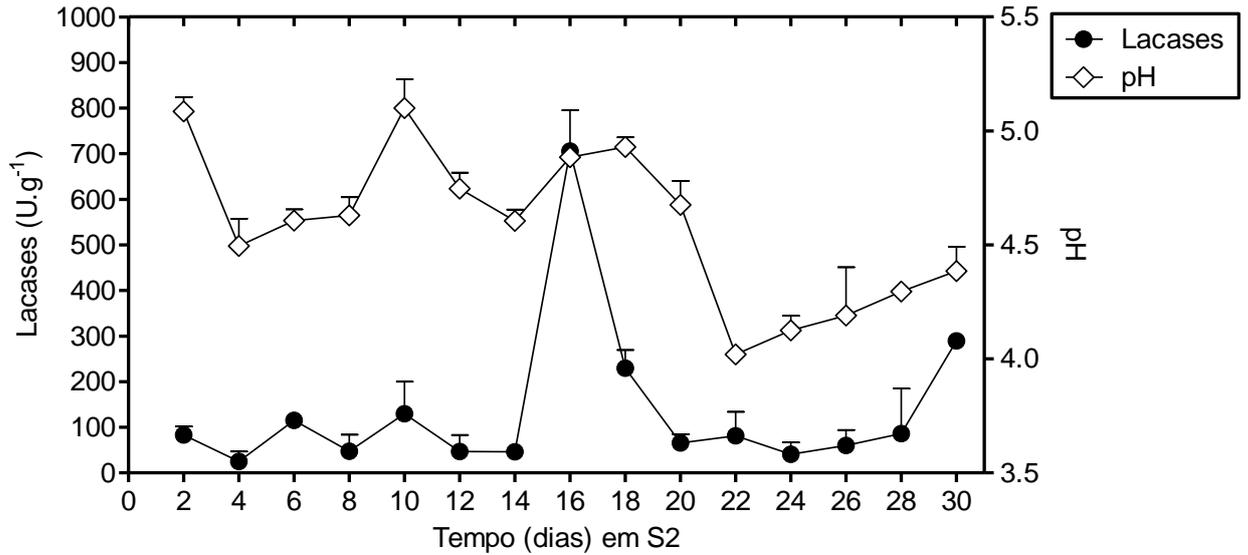


Figura 58. Atividade enzimática de lacases de *Lentinula edodes* LE-01 e pH em substrato composto por bagaço de *Malus domestica* e serragem de *Eucalyptus* sp. (3:1).

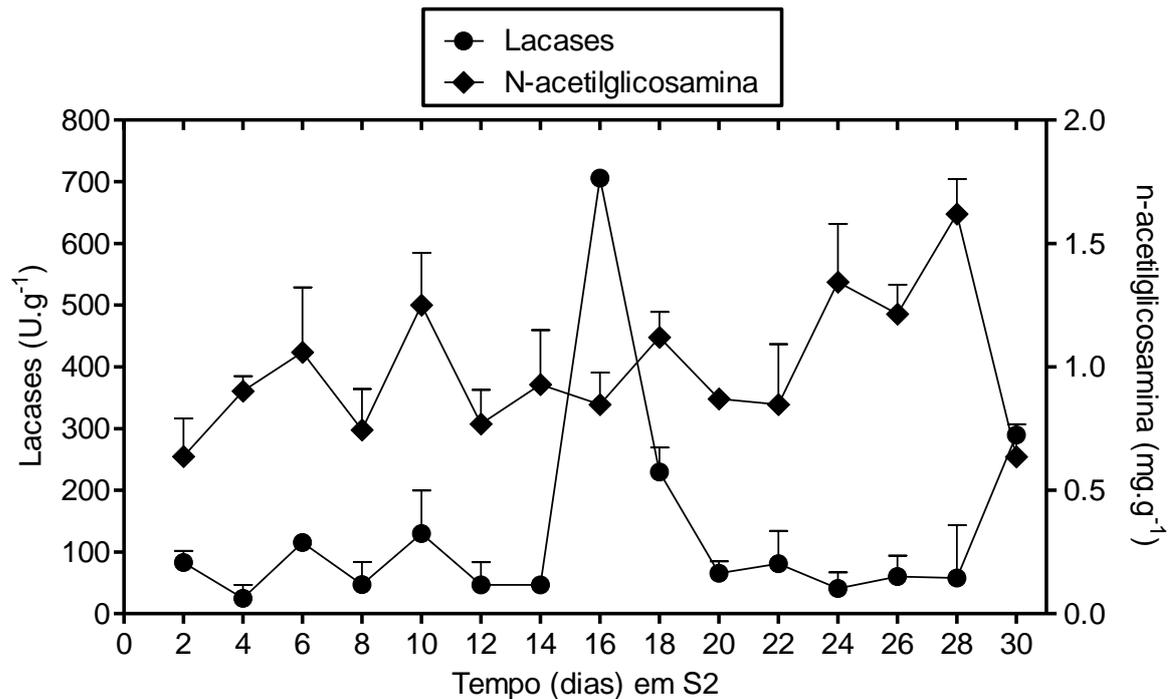


Figura 59. Atividade enzimática de lacases e biomassa de *Lentinula edodes* LE-01 em substrato composto por bagaço de *Malus domestica* e serragem de *Eucalyptus* sp. (3:1).

O substrato 3, composto por 50% de bagaço de *M. domestica* e 50% de serragem de *Eucalyptus* sp., apresentou pico de lacases no 22º dia de cultivo, de 561 U.g⁻¹ (Figura 60). Os valores de pH foram decrescentes ao longo do cultivo, visto que, durante o pico enzimático, o valor de pH foi 3,8.

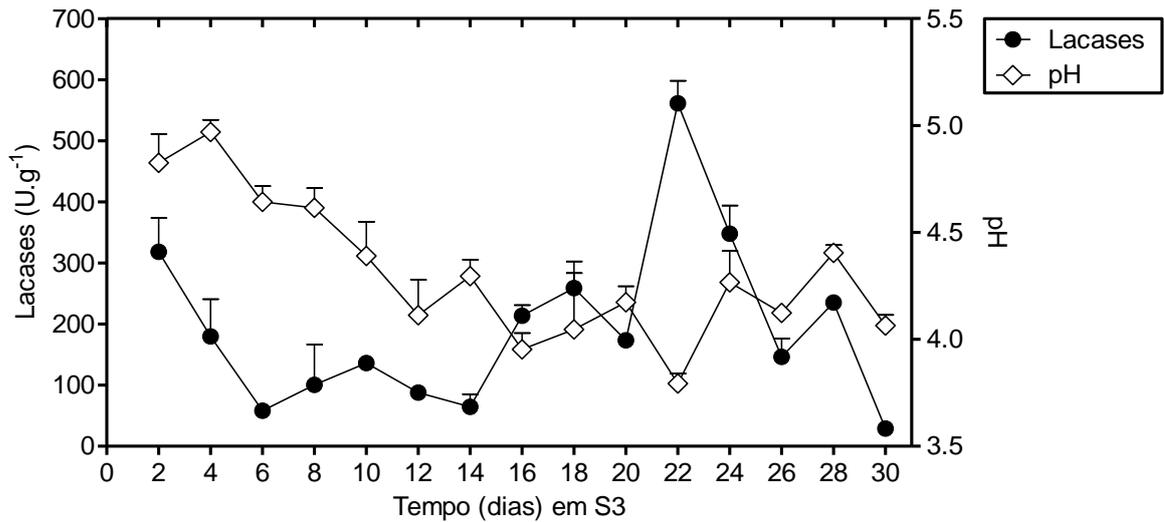


Figura 60. Atividade enzimática de lacases de *Lentinula edodes* LE-01 e pH em substrato composto por bagaço de *Malus domestica* e serragem de *Eucalyptus* sp. (1:1).

O perfil de lacases no cultivo em S3 apresentou oscilações, com pico no 22º dia e posterior queda até o término do ensaio. O menor valor de pH (3,8) foi obtido também no 22º dia, data do pico enzimático, e o maior (4,97) no 2º dia de cultivo. A biomassa de *L. edodes* LE-01 obtida com S3 apresentou-se crescente, porém, oscilatória; os valores mais expressivos foram obtido nos últimos dias de cultivo, de 2,89 mg de N-acetilglicosamina/g de substrato no 28º dia (Figura 61).

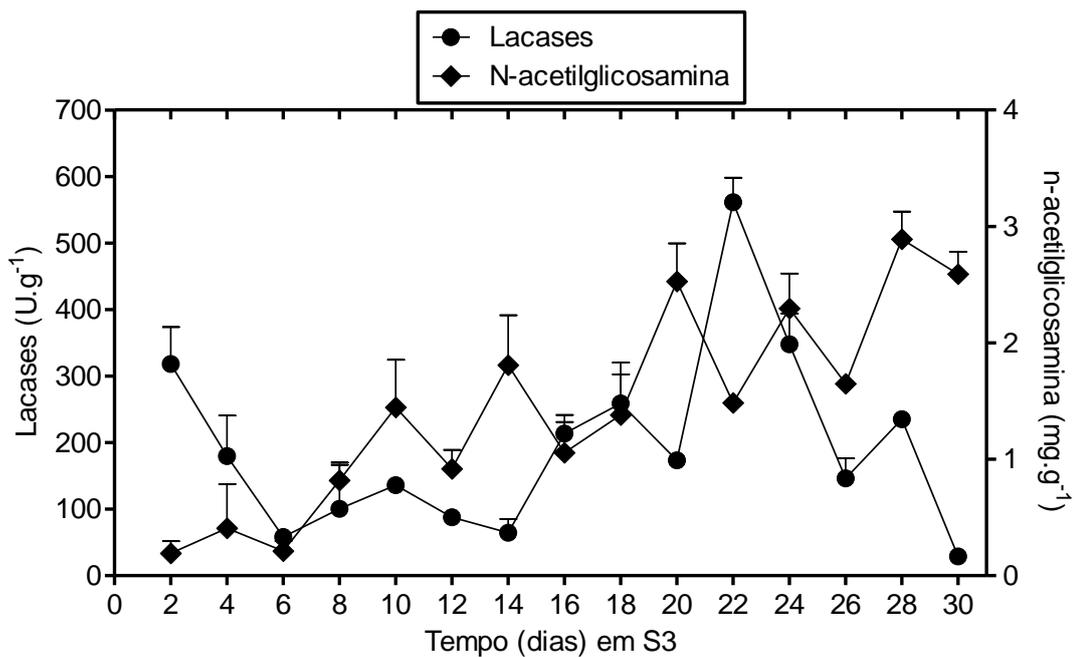


Figura 61. Atividade enzimática de lacases e biomassa de *Lentinula edodes* LE-01 em substrato composto por bagaço de *Malus domestica* e serragem de *Eucalyptus* sp. (1:1).

O cultivo realizado com S4, composto por 25% de bagaço de *M. domestica* e 75% de serragem de *Eucalyptus* sp., apresentou pico de lacases precocemente, no 6º dia de cultivo, de 228 U.g⁻¹ em pH 4,8 (Figura 62). Os valores de pH mostraram oscilações, porém, mantendo-se restritos a uma estreita faixa, entre 4 e 5,2. Como no substrato 3, a biomassa de S4 também foi baixa, de 1,65 mg de N-acetilglicosamina/g de substrato no 20º dia de cultivo (Figura 63). Verifica-se que esse substrato possibilitou maior atividade enzimática nos primeiros dias de cultivo, o que sugere que esta composição possa induzir uma rápida secreção enzimática, sendo necessários outros estudos com este substrato visando o aumento da produção em curto período de tempo.

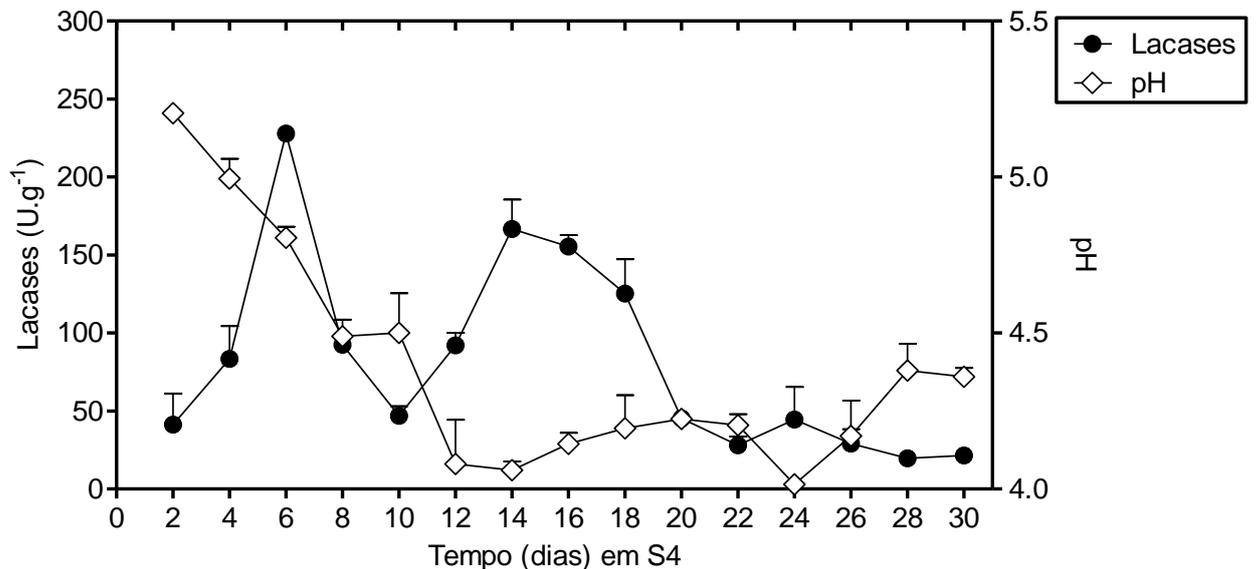


Figura 62. Atividade enzimática de lacases por *Lentinula edodes* LE-01 e pH em substrato composto por bagaço de *Malus domestica* e serragem de *Eucalyptus* sp. (1:3).

O cultivo realizado em S5, composto de 100% serragem de *Eucalyptus* sp., adotado como controle, apresentou maior atividade enzimática no 22º dia de cultivo, com 560 U.g⁻¹, valor igual ao obtido em S3, porém inferior a S2, que apresentou a maior atividade enzimática entre os cinco substratos testados, com 706 U.g⁻¹.

Os valores de pH neste substrato foram decrescentes ao longo do cultivo, oscilando entre 4,15 e 5,3 durante os 30 dias. No pico enzimático, o valor do pH foi de 4,23, como pode ser observado na Figura 64.

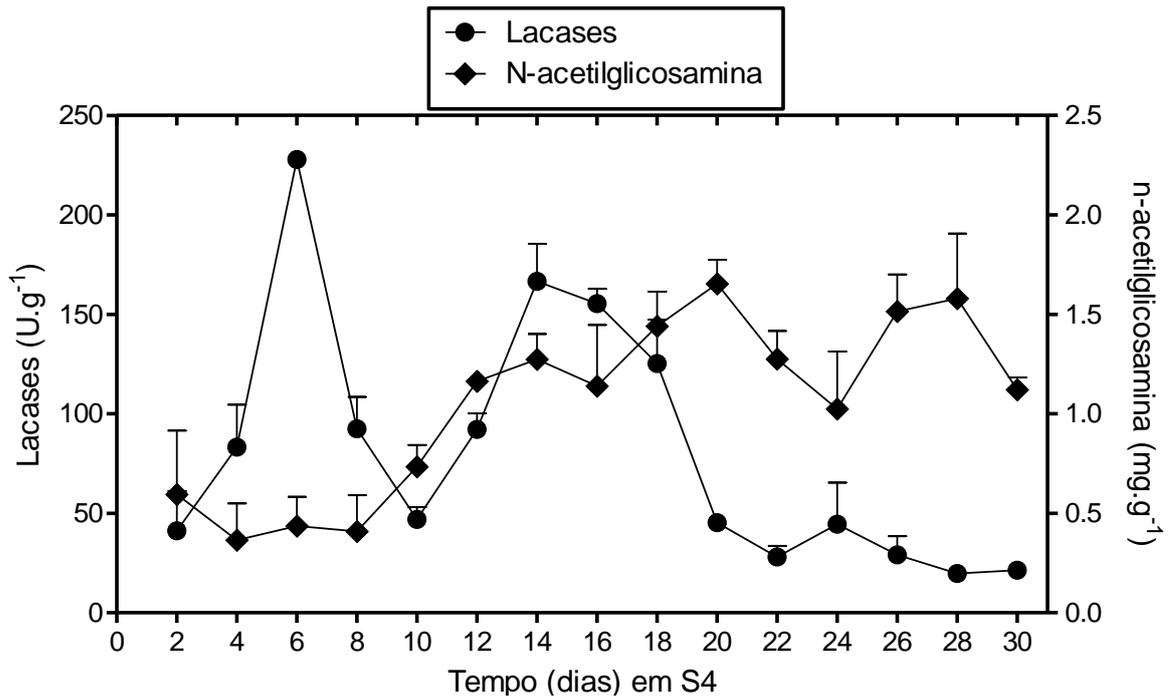


Figura 63. Atividade enzimática de lacases e biomassa de *Lentinula edodes* LE-01 em substrato composto por bagaço de *Malus domestica* e serragem de *Eucalyptus* sp. (1:3).

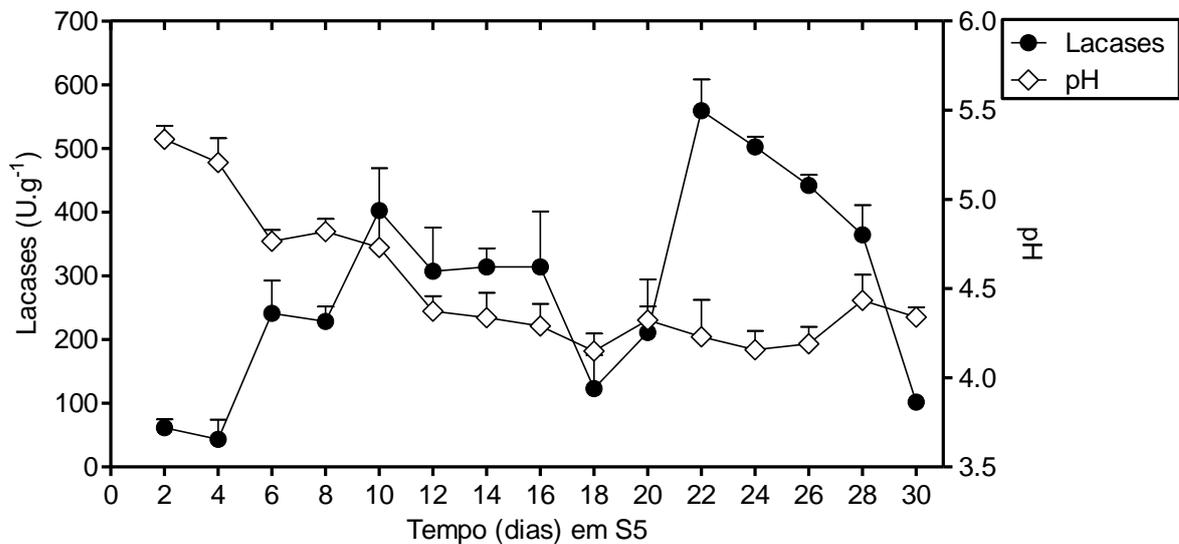


Figura 64. Atividade enzimática de lacases de *Lentinula edodes* LE-01 e pH em substrato composto por serragem de *Eucalyptus* sp. e bagaço de *Malus domestica*.

A biomassa do cultivo apenas com serragem de *Eucalyptus* sp. (S5) apresentou crescimento até o 14º dia, 1,56 mg de N-acetilglicosamina/g de substrato, com posteriores oscilações e diminuição de desenvolvimento até o término do cultivo (Figura 65).

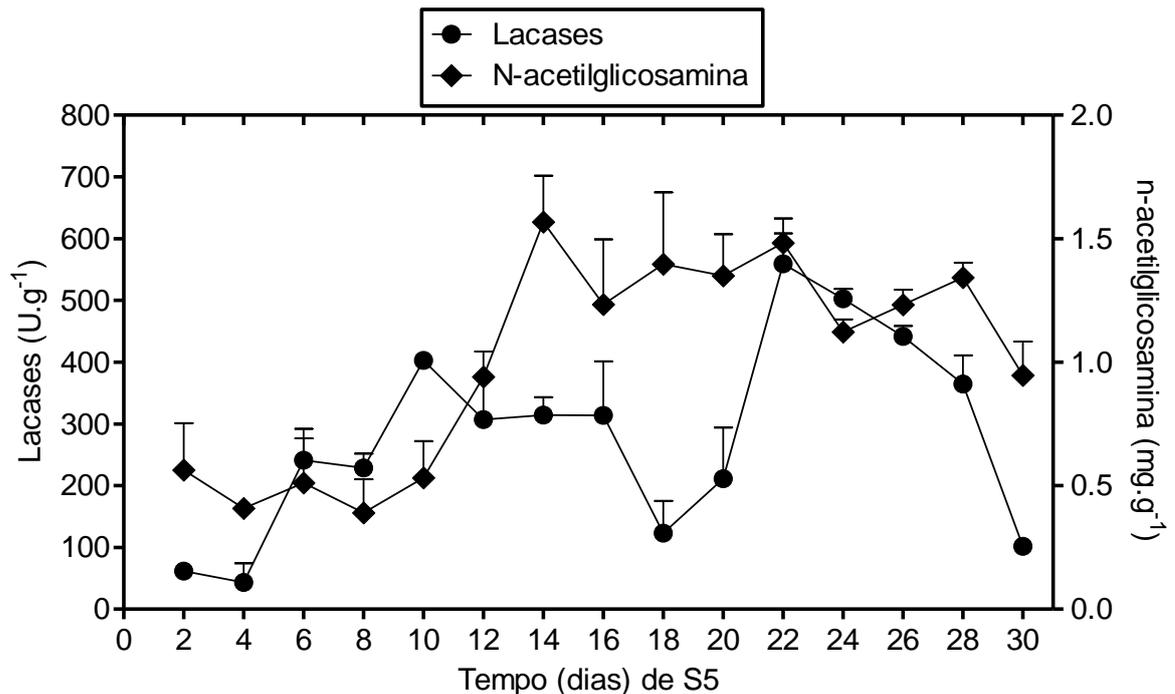


Figura 65. Atividade enzimática de lacases e biomassa fúngica de *Lentinula edodes* LE-01 em substrato composto serragem de *Eucalyptus* sp. e bagaço de *Malus domestica*.

Dos substratos testados para o cultivo de *L. edodes* LE-01, S2, composto por 75% de bagaço de *M. domestica* e 25% de serragem de *Eucalyptus* sp., foi o que apresentou a maior atividade de lacases (706 U.g^{-1}), superior ao controle S5 (560 U.g^{-1}) e também a S1, S3 e S4. Na Tabela 10, estão resumidos os dados de atividade enzimática, crescimento fúngico e pH para cada substrato testado. A atividade de lacases obtida no cultivo S2 foi estatisticamente superior aos demais substratos testados. S3 mostrou 561 U.g^{-1} de lacases, sendo o segundo melhor substrato, estatisticamente semelhante ao controle (S5), com 559 U.g^{-1} . Já os substratos 1 e 4 mostraram menor atividade, de 102 e 228 U.g^{-1} , respectivamente, diferindo estatisticamente. A produção de lacases ocorreu na ordem $S2 > S3 > S5 > S4 > S1$.

Com relação ao crescimento, verificado pela biomassa estimada, a composição S3, mostrou o maior valor, de $2,89 \text{ mg}$ de N-acetilglicosamina/g de substrato. S4 propiciou um substrato de desenvolvimento com pico enzimático já no 6º dia de cultivo.

Tabela 10. Atividade de lacases, crescimento fúngico, pH e dia do pico enzimático de *Lentinula edodes* LE-01 cultivado em substratos empregando bagaço de *Malus domestica* e serragem de *Eucalyptus* sp.

Substrato	Resíduo lignocelulósico	Lacases ¹ (U.g ⁻¹)	Biomassa ² (mg.g ⁻¹)	pH	Dia do pico enzimático
S1	Bagaço de <i>M. domestica</i>	101 ^d	1,63	4,57	12°
S2 (3:1)	Bagaço de <i>M. domestica</i> e serragem de <i>Eucalyptus</i> sp.	706 ^a	1,62	4,88	16°
S3 (1:1)	Bagaço de <i>M. domestica</i> e serragem de <i>Eucalyptus</i> sp.	561 ^b	2,89	3,79	22°
S4 (1:3)	Bagaço de <i>M. domestica</i> e serragem de <i>Eucalyptus</i> sp.	228 ^c	1,65	4,8	6°
S5*	Serragem de <i>Eucalyptus</i> sp.	559 ^b	1,56	4,23	22°

¹Média de atividade enzimática obtida em cultivos feitos em triplicata; ²Maior média obtida durante o cultivo, expresso em mg de N-acetilglicosamina/g de substrato úmido; *substrato controle; ^{a/b/c/d}Análise estatística: grupos com a mesma letra não diferem estatisticamente em nível de 5% (p≤0,05). S1: bagaço, S2: bagaço e serragem (3:1), S3: bagaço e serragem (1:1), S4: bagaço e serragem (1:3), S5: serragem.

Os valores de pH medidos no dia dos pico enzimáticos apresentaram valores pouco distintos, entre 3,79 e 4,8. S4 alcançou o pico enzimático no 6° dia de cultivo, seguido de S1 e S2, no 12° e 16° dias, respectivamente, e S3 e S5 juntos, no 22° dia.

A atividade das demais fenol-oxidases também foi analisada no dia do pico de lacases em todos os substratos testados. OAV, LiP, PerT e MnP não foram detectadas pelo método utilizado, visto que já é conhecido que o fungo *L. edodes* apresenta menor secreção destas enzimas. Os valores de proteínas totais estão descritos na Tabela 11, cuja concentração apresentou-se na seguinte ordem: S1 > S2 > S4 > S3 > S5.

Tabela 11. Concentração de proteínas totais de *Lentinula edodes* LE-01 cultivado em substratos empregando bagaço de *Malus domestica* e serragem de *Eucalyptus* sp.

Substratos	S1	S2	S3	S4	S5*
Proteínas ¹ (mg.g ⁻¹)	6.858±411 ^a	6.462±216 ^a	4.052±115 ^c	4.906±172 ^b	4.036±151 ^c

¹Média obtida em cultivos feitos em triplicata; *substrato controle; ^{a/b/c}Análise estatística: grupos com a mesma letra não diferem estatisticamente em nível de 5% (p≤0,05).

4.2.6 Comparação de atividade enzimática de *Lentinula edodes* LE-01 cultivado em bagaços de *Vitis labrusca* e *Malus domestica* e serragem de *Eucalyptus* sp.

A utilização dos bagaços de *V. labrusca* e *M. domestica* e da serragem de *Eucalyptus* sp. para o cultivo de *L. edodes* LE-01 em diferentes combinações de substratos propiciaram distintas atividades enzimáticas e desenvolvimento micelial particular para cada combinação.

As atividades de lacases obtidas em cultivos realizados com bagaço de *V. labrusca* foram superiores às obtidas utilizando bagaço de *M. domestica* em uma combinação testada (S4). Já para os substratos 2 e 3, os melhores resultados foram obtidos empregando bagaço de *M. domestica*, como pode ser observado na Tabela 12. O desenvolvimento micelial foi maior nos substratos dos cultivos realizados com bagaço de *V. labrusca*, mostrando que o tipo de resíduo utilizado no substrato interfere no desenvolvimento do micélio fúngico.

Observando as características de cada substrato percebe-se que os valores de pH em cultivos com *L. edodes* LE-01 apresentaram decréscimo ao longo dos 30 dias de cultivo e a maioria dos picos de lacases ocorreram no 22º dia, ficando dois picos no 6º dia e os demais distribuídos no 4º, 12º, 14º, 16º e 18º dias.

Atividade de MnP não foi detectada em nenhum dos substratos com ambos os resíduos de frutas testados. OAV foi obtida em valores reduzidos nos cultivos empregando *V. labrusca*, chegando ao máximo de 25,9 U.g⁻¹ no substrato 1, porém, não foi detectada nos cultivos realizados com *M. domestica*. LiP foi obtida em valores reduzidos nos cultivos com *V. labrusca*, exceto em S1, alcançando 2,73 U.g⁻¹, em S4. Já nos cultivos empregando *M. domestica*, não detectou-se atividade de LiP.

A concentração de proteínas foi elevada em todos os substratos desenvolvidos com bagaço de *M. domestica*, destacando-se S1, com 6.858 U.g⁻¹. A maior concentração de proteínas empregando *V. labrusca* foi obtida em S4, 1.182 mg.g⁻¹, mesmo assim inferior ao controle S5 (1.375 mg.g⁻¹).

Dos cultivos realizados com bagaço de *V. labrusca*, S4 apresentou a melhor atividade de lacases (2.932 U.g^{-1}), bem como a maior concentração de proteínas (1.182 mg.g^{-1}). Empregando o bagaço de *M. domestica*, S2 mostrou a maior atividade de lacases (706 U.g^{-1}) e o maior valor de proteínas totais entre os substratos testados com este resíduo.

Tabela 12. Atividade enzimática, crescimento fúngico, proteínas totais e dia do pico enzimático de *Lentinula edodes* LE-01 empregando como substratos bagaços de *Vitis labrusca* e *Malus domestica* e serragem de *Eucalyptus* sp.

Parâmetro avaliado	<i>Vitis labrusca</i>					<i>Malus domestica</i>				
	S1	S2	S3	S4	S5*	S1	S2	S3	S4	S5*
Lacases (U.g^{-1})	314	235	385	2.932	742	101,6	706	561	228	559
OAV (U.g^{-1})	25,94	23,32	4,95	0,3	41,4	nd	nd	nd	nd	nd
LiP (U.g^{-1})	nd	0,54	1,48	2,73	1,5	nd	nd	nd	nd	nd
Proteínas (mg.g^{-1})	872	1.094	1.076	1.182	1.375	6.858	6.462	4.052	4.906	4.036
Biomassa (mg.g^{-1})	15,9	16,13	17,42	15,21	14,28	1,63	1,62	2,89	1,65	1,56
pH	4,27	5,04	4,4	5	4,72	4,57	4,88	3,79	4,8	4,23
Dia do pico enzimático	18°	14°	6°	4°	22°	12°	16°	22°	6°	22°

*Substrato controle composto por serragem de *Eucalyptus* sp.; nd não detectada pelo método utilizado. S1: bagaço, S2: bagaço e serragem (3:1), S3: bagaço e serragem (1:1), S4: bagaço e serragem (1:3), S5: serragem.

O bagaço de *V. labrusca* mostrou-se mais adequado à produção de cogumelos de *P. sajor-caju* que o bagaço de *M. domestica*. Empregando-se bagaço de *V. labrusca* na composição dos meios de cultivo, o fungo apresentou os melhores resultados de produção de cogumelos quando foi utilizado o substrato 4, composto por bagaço e serragem de *Pinus* sp (1:3). O contrário ocorreu para produção enzimática, que apresentou melhores resultados quando o bagaço de *M. domestica* foi empregado. As maiores atividades de lacases de *P.*

sajor-caju foram obtidas nos cultivos com o substrato 1, composto somente por bagaço de *M. domestica*.

Dentre os substratos testados para a produção de cogumelos de *L. edodes* empregando *V. labrusca*, o substrato 4, composto por bagaço e serragem de *Eucalyptus* sp (1:3) apresentou os melhores resultados. Já para os substratos testados com bagaço de *M. domestica*, os substratos 3 e 4 produziram os maiores cogumelos coletados entre todos os cultivos. A maior produção enzimática de *L. edodes* foi obtida empregando-se o substrato 4 com *V. labrusca*, composto de bagaço e serragem de *Eucalyptus* sp (1:3). Em ambos cultivos realizados, o substrato 4 possibilitou aos microrganismos testados os melhores resultados de atividade enzimática, podendo-se sugerir que dentre as combinações testadas esta seja a mais adequada ao desenvolvimento destes fungos.

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho é possível concluir que:

- os resíduos lignocelulósicos bagaços de *Vitis labrusca* e *Malus domestica* e serragem de *Pinus* sp. são substratos adequados ao cultivo do fungo *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 e entre estes o bagaço de *V. labrusca* é mais apropriado;
- os melhores resultados de produtividade, eficiência biológica e rendimento na produção de cogumelos comestíveis de *P. sajor-caju* PS-2001 empregando bagaço de *V. labrusca* e serragem de *Pinus* sp. são obtidos utilizando o substrato 4 (1:3), e o mesmo ocorre empregando bagaço de *M. domestica* e serragem de *Pinus* sp.;
- os substratos compostos por bagaço de *M. domestica* possibilitam maior atividade de lacases de *P. sajor-caju* PS-2001 que os compostos com *V. labrusca*;
- nos cultivos realizados com *P. sajor-caju* PS-2001, o substrato 4, composto por bagaço de *V. labrusca* e serragem de *Pinus* sp. (1:3), apresenta a maior secreção de lacases, já empregando o bagaço de *M. domestica*, o substrato 1, composto somente por bagaço, apresenta a maior atividade.
- entre os substratos testados para o cultivo de *P. sajor-caju* PS-2001 com bagaço de *V. labrusca*, o substrato 4, composto por bagaço e serragem de *Pinus* sp. (1:3), possibilita maiores atividades de lignina peroxidase e oxidases do álcool veratrílico, e o substrato 2 (3:1), proporciona maior atividade de manganês peroxidase;
- entre os substratos testados nos cultivos de *P. sajor-caju* PS-2001 empregando *M. domestica*, o substrato 1, composto somente por bagaço, possibilita maior atividade de lignina peroxidase e oxidases do álcool veratrílico, e no substrato 3, composto por bagaço e serragem de *Pinus* sp. (1:1), ocorre a maior atividade de manganês peroxidase;

- o substrato 3, composto por bagaço de *V. labrusca* e serragem de *Pinus* sp. (1:1), apresenta a maior biomassa fúngica de *P. sajor-caju* PS-2001, sugerindo que o crescimento fúngico não está relacionado ao aumento na produção de lacases;
- os resíduos lignocelulósicos bagaços de *V. labrusca* e *M. domestica* e serragem de *Eucalyptus* sp., na maioria das combinações testadas, são substratos pouco adequados ao cultivo do fungo *Lentinula edodes* LE-01;
- os melhores resultados de produtividade, eficiência biológica e rendimento na produção de cogumelos comestíveis de *L. edodes* LE-01 são obtidos no substrato 4 com *V. labrusca* e serragem de *Eucalyptus* sp (1:3);
- o bagaço de *V. labrusca* é o substrato mais adequado para a atividade de lacases de *L. edodes* LE-01 que o de *M. domestica*;
- nos cultivos realizados com *L. edodes* LE-01, possibilitam maior atividade de lacases: o substrato 4, composto por bagaço de *V. labrusca* e serragem de *Eucalyptus* sp. (1:3), e entre os cultivos realizados com bagaço de *M. domestica*, o substrato 2, composto por bagaço e serragem de *Eucalyptus* sp. (3:1);
- dentre os substratos testados para o cultivo de *L. edodes* LE-01, o substrato 1, composto somente por bagaço de *V. labrusca*, apresenta a maior atividade de oxidases do álcool veratrílico, o substrato 4, composto por bagaço de *V. labrusca* e serragem de *Eucalyptus* sp. (1:3), apresenta a maior atividade de lignina peroxidase e maior concentração de proteínas totais é obtida no substrato 1 com *M. domestica*;
- atividades de manganês peroxidase e peroxidases totais não são detectadas nos substratos testados com bagaços de *V. labrusca* e *M. domestica* em cultivos de *L. edodes* LE-01;

6 PERSPECTIVAS

Como perspectivas para continuidade deste trabalho sugerem-se as seguintes:

- realizar mais estudos de produção de cogumelos de *P. sajor-caju* PS-2001 com o substrato 4 (1:3) empregando bagaços de *V. labrusca* e *M. domestica*, juntamente com serragem de *Pinus* sp., visando aumentar a produtividade, eficiência biológica e rendimento;
- aumentar a produção de lacases por *P. sajor-caju* PS-2001 empregando o substrato 4 com *M. domestica* utilizando indutores na formulação do meio de cultivo;
- realizar mais estudos com as formulações S1, S2 e S3 empregando bagaço de *V. labrusca*; e S1 e S2 empregando bagaço de *M. domestica*, juntamente com serragem de *Eucalyptus* sp., visando aumentar a produção de cogumelos comestíveis de *L. edodes* LE-01;
- verificar se somente os substratos 3 e 4 empregando bagaço de *M. domestica* e serragem de *Eucalyptus* sp. produzem cogumelos comestíveis de *L. edodes* LE-01 maiores que os demais substratos testados;
- utilizar resíduos de outras frutas nas formulações dos meios de cultivo de *P. sajor-caju* PS-2001 e *L. edodes* LE-01 para a produção de cogumelos;
- realizar a dosagem de C:N dos resíduos empregados nos substratos e a análise nutricional dos cogumelos produzidos em resíduos de frutas;
- testar as enzimas produzidas por *P. sajor-caju* PS-2001 para pré-tratamento de lignocelulósicos para obtenção de bioetanol.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agosin, E.; Blanchette, R.A.; Silva, H.; Lapierre, C.; Cease, K.R.; Ibach, E.; Rabad, A.R.; Muga, P. (1990). Characterization of *Palo poderido*, a natural process of delignification in wood. **Appl. Environ. Microbiol.** 56: 65-74.
- Alexandrino, A.M.; Faria, H.G.; Souza, C.G.M.; Peralta, R.M. (2007). Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 27:364-368.
- Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W.; Blackwell, M. (1996). **Introductory mycology**. 4.ed. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Amer, G.I.; Drew, S.W. (1980). **Microbiology of lignin degradation**. In: Tsao, G.T.; Flickinger, M.C.; Finn, R.K. (Ed.) **Annual reports on fermentation processes**. Vol. 4. New York: Academic Press. pp 67-103.
- Ângelo, R.S. (2004). **Enzimas hidrolíticas**. In: Esposito, E.; Azevedo, J.L. (2004). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 15 p.
- Anke, T. (1997). **Fungal biotechnology**. London: Chapman and Hall. 409 p.
- Ayala, K.M.; Vieira, D.V.; Dupuy, M.A.A.G. (2002). Experiencia del aprovechamiento de los residuos em um aserrio. In: Congresso Íbero-Americano de Pesquisa e Desenvolvimento de Produtos Florestais e Seminário em Tecnologia da Madeira e Produtos Florestais Não Madeiráveis. **Anais**. pp.118, Curitiba, 2002.
- Barr, D.P.; Aust, S.D. (1994). Mechanism white rot fungi use to degrade pollutants. **Environ. Sci. Technol.** 28: 78-87.
- Baydar, N.G.; Ozcan, G.; Sagdic, O.; Cetin, S. (2006). Determination of antibacterial effects and total phenolic contents of grape (*Vitis vinifera L.*) seed extracts. **Int. J. Food Sci. Technol.** 41:799-804.
- Betts, W.B.; Dart, R.K.; Ball, A.S.; Pedlar, S.L. (1991). **Biosynthesis and structure of lignocellulose**. In: Betts, W.B. (Ed). **Biodegradation: natural and synthetic materials**. Berlin: Springer-Verlag. pp 139-156.

- Eduardo Bernardi; Lorena Pastorini Donini; Elisandra Minotto; José Soares Do Nascimento Bragantia; vol.68 no.4 Campinas 2009. **Cultivo e características nutricionais de *Pleurotus* em substrato pasteurizado.**
- Bittencourt, L.R.; Silveira, M.M.; Dillon, A.J.P. (2002). Quantificação de massa celular de *Penicillium echinulatum* a partir do conteúdo de quitina hidrolisada enzimaticamente. In: VII Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassas. **Resumos.** P 209. Maringá, 2002.
- BONATTI, M.; KARNOPP, P.; SOARES, H.M., FURLAN, S.A. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. **Food Chemistry**, v.88, p.425-428, 2004.
- Bourbonnais, R.; Paice, M.G. (1988). Veratryl alcohol oxidase from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. **Biochem. J.** 255: 445-450.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248-254.
- Brenne, W.N. (1990). Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. **J. Food Protection.** 53: 883-894.
- Buswell, J.A.; Cai, Y.J.; Chang, S.T.; Peberdy, J.F.; Fu, S.Y.; Yu, H.S. (1996). Lignocellulolytic enzyme profiles of edible mushroom fungi. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 12: 537-542.
- Camarero, S.; Bockle, B.; Martínez, M.J.; Martínez, A.T. (1996). Manganese-mediated lignin degradation by *Pleurotus pulmonarius*. **Appl. Environ. Microbiol.** 62:1070-1072.
- Camarero, S.; Martínez, M.J.; Martínez, A.T. (1997). **Lignin-degrading enzymes produced by *Pleurotus* species during solid state fermentation of wheat straw.** In: Sevastianos, R. (Ed.) **Advances in solid state fermentation proceedings of the Second International Symposium on Solid State Fermentation.** Montpellier, pp. 335–345.
- Chang, S.T.; Lau, O.W.; Cho, K.Y. (1981). The cultivation and nutritional value of *Pleurotus sajor-caju*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 12: 58-62.
- Chang, S.T.; Miles, P.G. (1984). A new look at cultivated mushrooms. **Biosci.** 34: 358-362.

- Cohen, R.; Persky, L.; Hadar, Y. (2002). Biotechnological applications and potencial of wood-dregading mushrooms of the genus *Pleurotus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 58: 582-594.
- Confortin, F.G.; Marchetto, R.; Bettin, F.; Camassola, M.; Salvador, M.; Dillon, A.J.P. (2008). Production of *Pleurotus sajor-caju* strain PS-2001 biomass in submerged culture. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 35: 1149-1155.
- Couto, S.R.; Rosales, E.; Gundin, M.; Sanromán, M.A. (2004). Exploitation of a waste from the brewing industry for laccase production by two *Trametes* species. **J. Food Eng.** 64: 423-428.
- Couto, S.R.; Sanromán, M.A. (2004). Coconut flesh: a novel raw for laccase production by *Trametes hirsuta* under solid-state condition. Application to Lissamine Green B decolourization. **J. Food Eng.** 71: 208-213.
- Desgranges, C.; Georges, M.; Vergoignan, C.; Durand, A. (1991). Biomass estimation in solid state fermentation. **Appl. Biotechnol Microbiol.** 35: 206-209.
- Di Lena, G.; Vivanti, V.; Quaglia, G.B. (1997). Amino acid composition of wheat milling by-products after bioconversion by edible mycelia. **Nahrung.** 41: 285-288.
- Dias, E.S.; Koshikumo, E.M.S.; Schwan, R.F.; Silva, R. (2003). Cultivo do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* em diferentes resíduos agrícolas. **Ciênc. Agrotec.** 27: 1363-1369.
- Dundar, A.; Acay, H.; Yildiz, A. (2009). Effect of using different lignocellulosic wastes for cultivation of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. On mushroom yield, chemical composition and nutritional value. **African J. Biotechnol.** 8: 662-666.
- Durán, N.; Esposito, E. (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoxidases-like compounds in wastewater and soil treatment: A Review. **Appl. Catalysis B. Environ.** 28, 83-99.
- Durán, N. (2004). **Enzimas ligninolíticas.** In: Esposito, E.; Azevedo, J.L. (2004). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia.** Caxias do Sul: EDUCS, 250 p.
- Eggert, C.; Temp, U.; Eriksson, K.E. (1996). The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. **Appl. Environ. Microbiol.** 62: 1151-1158.

- Eira, A.F. (2004). **Fungos comestíveis**. In: Espósito, E.; Azevedo, J.L. (Ed.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS. 379 p.
- Eira, A.F.; Minihoni, M.T.A. (1997). **Manual teórico-prático do cultivo de cogumelos comestíveis: Módulo de cogumelos**. 2 ed. Botucatu: FEPAF-Unesp. 115 p.
- Endreß, H.U. (2000). High quality resulting from product integrated environment protection – PIUS. **Fruit Processing**. 7: 273-276.
- Esposito, E. & Loguercio-Leite (2004). **Fungos: estrutura e ultra-estrutura**. In: Esposito, E.; Azevedo, J.L. (2004). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 15 p.
- Fagundes, H.A.V. (2003). Diagnóstico da produção de madeira serrada e geração de resíduos do processamento de madeira de florestas plantadas no Rio Grande do Sul: identificação e possibilidades de aproveitamento na indústria de chapas e painéis de madeira reconstituída empregadas na indústria da construção civil. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. Brasil.
- Farias, J.E. (1999). **Produção de cogumelos**. Guaíba: Agropecuária, 135 p.
- Fengel, D.; Wegner, G. (1983). **Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions**. New York: W. de Gruyter.
- Ferraz, A.; Parra, C.; Freer, J.; Baeza, J.; Rodríguez, J. (2000). Characterization of White zones produced on *Pinus radiata* Wood chips by *Ganoderma australe* and *Ceriporiopsis subvertmispora*. **World. J. Microbiol. Biotecnol.** 16: 641-645.
- Field, J.A. (1993). Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. **Trends Biotechnol.** 11: 44-49.
- Finotti, A.R.; Schneider, V.E.; Wander, P.R.; Hillig, E.; Silva, M. (2006). **Uso energético de resíduos de madeira na cadeia produtiva de madeira/móveis e possibilidades de geração de créditos de carbono**. In: Schneider, V.E.; Nehme, M.C.; Ben. F. (Org.) **Pólo Moveleiro da Serra Gaúcha - Sistemas de gerenciamento ambiental na indústria moveleira**. Caxias do Sul: EDUCS, pp 191-230.
- Gali, H.U.; Perchellet, E.M.; Klish, D.S.; Johnson, J.M.; Perchellet, J.P. (1992). Hydrolyzable tannins: potent inhibitors of hydroperoxide production and tumor promotion in mouse skin treated with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in vivo. **Int. J. Cancer.** 51: 425-432.

- Gerwing, J.; Vidal, E.; Veríssimo, A.; Uhl, C. (2000) **Rendimento no processamento de madeira no Estado do Pará**. Série Amazônia N° 18 - Belém: Imazon, 38 p.
- Ghosh, B.K.; Ghosh, A. (1992). **Degradation of cellulose by fungal cellulase**. In: Winkelmann, G. (Ed). **Biodegradation: natural and synthetic materials**. Berlin: Springer-Verlag. pp 83-126.
- Glenn, J.K.; Morgan, M.A.; Mayfield, M.B.; Kuwahara, M.; Gold, M.H. (1983). An extracellular H₂O₂ requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white-hot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 114: 1077-1083.
- Gonçalves, M.T.T. (2000). **Processamento da madeira**. Bauru: SP, 242 p.
- Gorinstein, S.; Zemser, M.; Weisz, M.; Halevy, S.; Deutsch, J.; Tilus, K.; Feintuch, D.; Guerra, N.; Fishman, M.; Bartnikowska, E. (1994). Fluorometric analysis of phenolics in persimmons. **Biosic. Biotech. Biochem.** 58: 1087-1092.
- Hall, K.R.; Braham, R.R. (1998). Native pines eastern of North América. North Carolina State University. **Disponível (online)** www2.ncsu.edu/unity/lockers/project/dendrology/ (junho de 2006).
- Hang, Y.D. (1987). Production of fuels and chemical from apple pomace. **Food Technol.** 41: 115-117.
- Heinzkill, M.; Bech, L.; Halkier, T.; Scheider, P.; Anke, T. (1998). Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (*Family Coprinaceae*) **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 1040-1045.
- Hillig, E.; Schneider, V.E.; Pavoni, E.T. (2004). **Pólo moveleiro da serra gaúcha – Geração de resíduos e perspectivas para sistemas de gerenciamento ambiental**. Caxias do Sul: EDUCS. 165 p.
- Hofrichter, M.; Vares, T.; Kalsi, M.; Galkin, S.; Scheibner, K.; Fritsche, W.; Hatakka, A. (1999). Production of manganese peroxidase and organic acids and mineralization of ¹⁴C-labelled lignin (¹⁴C-DPH) during solid-state fermentation of wheat straw with the white-rot fungus *Nematoloma frowardii*. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 1864-1870.
- Holtz, M. (2008). Utilização do resíduo de algodão da indústria têxtil para produção de corpos frutíferos de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade da Região de Joinville, 88 f. Joinville.

- Jayaprakasha, G.K.; Selvi, T.; Sakariah, K.K. (2003). Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. **Food Res. Int.** 36:117-122.
- Kennedy, M.; List, D.L.Y.; Foo, L.Y.; Newman, R.H.; Sims, I.M.; Bain, P.J.S.; Hamilton, B.; Fenton, G. (1999). Apple pomace and products derived from apple pomace: Uses, composition and analysis. **Modern Methods Plant Anal.** 20: 75-119.
- Kirk, T.K.; Cullen, D. (1998). Enzimology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. In: John Wiley & Sons. **Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry.** New York, pp 273-308.
- Krugner, T.L.; Bacchi, M.A. (1995). **Fungos.** In: Bergamin Filho, A.; Kimati, H.; Amorim, L. (Ed.) **Manual de fitopatologia.** 3 ed. São Paulo. pp 87-88.
- Kuwahara, M.; Glenn, J.K.; Morgan, M.A.; Gold, M.H. (1984). Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ – dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Lett.** 169-247:250.
- Lang, E.; Nerud, F.; Novotná, E.; Zadrazil, F.; Martens, R. (1996). Production of ligninolytic exoenzymes and 14C-pyrene mineralization by *Pleurotus* sp. in lignocelluloses substrate, **Folia Microbiol.** 41, 489–493.
- Larbier, M.; Leclercq, B. (1992). **Raw materials employed in poultry production** In. **Nutrition and feedings of poultry.** Trowbridge, Wiltshire, UK. Nottingham University Press, 305 p.
- Laufenberg, G.; Kunz, B.; Nyztroem, M. (2003). Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; practical implementations. **Bioresour. Technol.** 87: 167-198.
- Leatham, G.F. (1985). Extracellular enzymes produced by the cultivated mushroom *Lentinus edodes* during degradation of a lignocellulosic medium. **Appl. Environ. Microbiol.** 50: 859-867.
- Leatham, G.F.; Stahmann, M.A. (1981). Studies on the laccase of *Lentinus edodes*: specificity, localization and association with the development of fruiting bodies. **J. Gen. Microbiol.** 125: 147-157.
- Lechner, B.E.; Papinutti, V.L. (2006). Production of lignocellulosic enzymes during growth and fruiting of the edible fungus *Lentinus tigrinus* on wheat straw. **Process Biochem.** 41: 594-598.

- Leifa, F. (1999) Produção de fungo comestível do gênero *Pleurotus* em bio-resíduos da agroindústria do café. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.
- Leonard, T.J.; Phillips, L.E. (1973). Study of phenoloxidase activity during the reproductive cycle in *Schizophyllum commune*. **J. Bacteriol.** 114: 7-10.
- Li, K.C.; Xu, F.; Eriksson, K.E.L. (1999). Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 2654-2660.
- Lopez, J. (1977). **Resíduos de vinificação na alimentação dos animais domésticos**. Porto Alegre: Sindicato Rural de Caxias do Sul.
- Madamwar, D.; Patel, S.; Parikh, H. (1989). Solid state fermentation for cellulases and β -glucosidase production by *Aspergillus niger*. **J. Ferment. Bioeng.** 6: 424-426.
- Manzi, P.; Marconi, S.; Guzzi, A.; Pizzoferrato, L. (2004). Comercial mushroom: nutritional quality and effect of cooking. **Food Chem.** 84: 201-206.
- Marino, R.H.; Abreu, J.B.; Ribeiro, G.T. (2008). Crescimento e cultivo de diferentes isolados de *Pleurotus ostreatus* (JACQ.: FR.) Kummer em serragem da casca de coco. **Arq. Inst. Biol.** 75: 29-36.
- Martínez-Carrera, D.; Soto, C.; Guzmán, G. (1985). Cultivo de *Pleurotus ostreatus* en pulpa de café con paja como substrato. **Rev. Mexicana. Micol.** 1: 101-108.
- Massadeh, M.I.; Yusoff, W.M.W.; Othman, O.; Kader, J. (2001). Synergism of cellulase enzymes in mixed culture solid substrate fermentation. **Biotechnol Lett.** 23: 1771-1774.
- Mata, G; Savoie, J.M. (2005). Whet straw. In: Gush, R. (Ed.) **Mushroom growers' handbk 2. Mush. World**. Seoul, pp 105-109.
- Maydata, A. G. (2002). Vino, polifenoles y protección a la salud. **Rev. Cubana Aliment. Nutr.** 16:134-141.
- Mayer, A.M.; Staples, R.C. (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochem.** 60: 551-565.
- Maziero, R. (1990). Substratos alternativos para o cultivo de *Pleurotus* spp. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil.

- Mendez, L.A.; Castro, C.A.S.; Casso, R.B.; Leal, C.M.C. (2005). Effect of substrate and harvest on the amino acid profile of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). **J. Food Comp. Anal.** 18: 447-450.
- Messner, K., Strebotnik, E. (1994). Biopulping: and overview of developments in environmentally safe paper-making technology. **FEMS Microbiol. Rev.** 13: 351-364.
- Minhoni, M.T.A.; Zied, D.C. (2008). Produção de micélio, spawn ou semente para o cultivo de cogumelos. In: IV Simpósio Internacional sobre Cogumelos no Brasil. **Anais.** pp. 48-57. Caxias do Sul, 2008.
- Moda, E.M.; Horri, J.; Spoto, M.H.F. (2005). Edible mushroom *Pleurotus sajor-caju* production on washed and supplemented sugarcane bagasse. **Scientia Agric.** 62: 127-132.
- Moo-Young, M.; Moreira, A.R.; Tengerdy, R.P. (1983). Principles of SSF. **Fungal Technol. Filament. Fungi.** 4: 117-144.
- Mukhtar, H.; Khan, W.A.; Wang, Z.Y.; Bik, D.P.; Bickers, D.R. (1988). Exceptional activity of tannic acid among naturally occurring plant phenols in protecting against 7-12-dimethylbenz(a)anthracene-, benzo(a)pyrene-, 3-methylcholanthrene-, and N-methyl-N-nitrosourea-induced skin tumorigenesis in mice. **Cancer Res.** 48: 2361-2365.
- Munari, F.M.; Gaio T.A.; Calloni, R.; Dillon, A.J.P. (2008). Decolorization of textile dyes by enzymatic extract and submerged cultures of *Pleurotus sajor-caju*. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 24: 1383-1392.
- Munari, F.M.; Gaio, T.A.; Dillon, A.J.P. (2007). Phenol degradation and colour removal in submerged culture of *Pleurotus sajor-caju* with paper mill effluents. **Biocatal. Biotransform.** 25: 24-28.
- Ngai, P.H.K.; Ng, T.B. (2004). A ribonuclease with antimicrobial, antimutagenic and antiproliferative activities from the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. **Peptides.** 25: 11-17.
- Nicolini, L., Volpe, C., Pezzoti, A.; Carilli, A. (1993). Changes in-vitro digestibility of orange peels and distillery grape stalks after solid-state fermentation by higher fungi. **Bioresour. Technol.** 45: 17-20.
- Nogueira, A.; Santos, L. D.; Paganini, C.; Wosiacki, G. (2005). Avaliação da fermentação alcoólica do extrato de bagaço de maçã. In: SEMINA: Ciências Agrárias. **Resumo.** 26: 187-194. Londrina, 2005.

- Olandoski, D.P.; Brand, M.A.; Rocha, M.P. (1998). Avaliação do rendimento em madeira serrada, qualidade e quantidade de resíduos no desdobro de *Pinus sp.* **Agrárias**. 17: 177-184.
- Onysko, K.A. (1993) Biological bleaching of chemical pulps: A review. **Biotechnol. Adv.** 11: 179-198.
- Pal, M.; Calvo, A.M.; Terrón, M.C.; González, A.E. (1995). Solid-state fermentation of sugarcane bagasse with *Flammulina velutipes* and *Trametes versicolor*. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 11: 541-545.
- Pandey, A.; Selvakumar, P.; Soccol, C.; Nigam, P. (1999). Solid state fermentation for the production of the industrial enzymes. **Curr. Sci.** 77: 149-162.
- Papinutti, V.L.; Diorio, A.; Forchiassin, F. (2003). Production of laccase and manganese peroxidase by *Fomes sclerodermeus* grown on wheat bran. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 30: 157-160.
- Philippoussis, A.; Diamantopoulou, P.; Zervakis, G. (2003). Correlation of the properties of several lignocellulosic substrates to the crop performance of the shiitake mushroom *Lentinula edodes*. **World J Microbiol. Biotechnol.** .19: 551-557.
- Putzke, J.; Putzke, L.M.T. (2002). **Os reinos dos fungos**. Vol. 2. Santa Cruz do Sul: EDUNISC. 214 p.
- Ragunathan, R.; Gurusamy, R.; Palaniswamy, M.; Swaminathan, K. (1996). Cultivation of *Pleurotus spp.* on varios agro-residues. **Food Chem.** 55: 139-144.
- Ragunathan, R.; Swaminathan, K. (2003). Nutricional status of *Pleurotus spp.* grow on various agro-wates. **Food Chem.** 80: 371-375.
- Rajarithnam, S.; Bano, Z. (1987). *Pleurotus* mushrooms. Part I A. Morphology, life cycle, taxonomy, breeding and cultivation. **Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.** 2: 15-19.
- Rajarithnam, S.; Bano, Z.; (1988). *Pleurotus* mushrooms. Part I B. Pathology, in vitro and in vivo, growth requirements and world status. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 3: 243-311.
- Rajarithnam, S.; Shashireka, M.N.U.; Bano, Z. (1998). Biodegradative and biosynthetic capacities of mushrooms: present and future strategies. **Crit. Rev. Biotechnol.** 18: 233-361.

- Reid, I.D.; Paice, M.G. (1994). Biological bleaching of kraft pulps by white-rot fungi and their enzymes. **FEMS Microbiol. Rev.** 13: 369-376.
- Reissig, J.L.; Strominger, J.L.; Leloir, L.F. (1955). A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. **J. Biol. Chem.** 217: 959-966.
- Rhodes, P.L., Mitchell, J.W.; Wilson, M.W.; Melton, L. D. (2006). Antilisterial activity of grape juice and grape extracts derived from *Vitis vinifera* variety Ribier. **Int. J. Food Microbiol.** 107: 281-286.
- Rizzon, L. A.; Manfrói, V.; Meneguzzo, J. (1999). **Elaboração de grapa na propriedade vinícola.** Bento Gonçalves: EMBRAPA UVA E VINHO.
- Roque, C.A.L.; Valença, A.C.V. (1998). Painéis de madeira aglomerada. BNDES Setorial. **Disponível (online)** <http://www.bndes.gov.br/conhecimento/bnset/set805.pdf> (outubro de 2005).
- Rosales, E.; Couto, R.; Sanroman, M.A. (2002). A. new uses of food waste: application to laccase production by *Trametes hirsuta*. **Biotechnol. Lett.** 24: 701-704.
- Rosales, E.; Couto, S.R.; Sanromán, M.A. (2005). Reutilisation of food processing wastes for production of relevant metabolites: application to laccase production by *Trametes hirsute*. **J. Food Eng.** 66: 419-423.
- Ross, I.K. (1982). The role of laccase in carpophore initiation in *Coprinus congregatus*. **J. Gen. Microbiol.** 128: 2763- 2770.
- Salmones, D.; Mata, G.; Waliszewski, K. N. (2005). Comparative culturing of *Pleurotus spp.* on coffee pulp and wheat straw: biomass production and substrate biodegradation. **Bioresour. Technol.** 96: 537-544.
- Sasaki, T.; Kajino, T.; Li, B.; Sugiyama, H.; Takahashi, H. (2001). New pulp biobleaching system involving manganese peroxidase immobilized in a silica support with controlled pore sizes. **Appl. Environ. Microbiol.** 67: 2208-2212.
- Scheel, T.; Hofer, M.; Ludwig, S.; Holker, U. (2000). Differential expression of manganese peroxidase and lacasein white-rot fungi in the presence of manganese or aromatic compounds. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 54: 686-691.
- Schoemaker, H.E. & Piontek, K. (1996). On the interaction of lignin peroxidases with lignin. **Pure & Appl. Chem.** V. 68, 11, pp.2089-2096.

- Scotti, C.T.; Vergoignan, C.; Feron, G.; Durand, A. (2001). Glucosamine measurement as indirect method for biomass estimation of *Cunninghamella elegans* grown in solid state cultivation conditions. **Biochem. Eng. J.** 7: 1-5.
- Sharma, P.D.; Fisher, P.J.; Webster, J. (1977). Critique of the chitin assay technique for estimation of fungal biomass. **University Exeter.** 3: 479-483.
- Shashirekha, M.N.; Rajarathnam, S.; Bano, Z. (2005). Effect of supplementing rice straw growth substrate with cotton seeds on the analytical characteristics of the mushroom *Pleurotus florida* (Block & Tsao). **Food Chem.** 92: 255-259.
- Silva, E.M.; Machuca, A.; Milagres, A.M.F. (2005) Effect of cereal brans on *Lentinula edodes* growth and enzyme activities during cultivation on forestry waste. **Lett. Appl. Microbiol.** 40: 283-288.
- Silva, S.M. (2004). Formulação de meios de crescimento para cultivo sólido de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 à base de serragem de *Pinus* spp. **Dissertação de mestrado.** Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, Brasil.
- Stamets, P.; Chilton, J.S. (1983). **The mushroom cultivator.** Washington: Agarikon Press Olimpia. 415 p.
- Sturion, G.L.; Ranzani, M.R.C. (2000). Mineral composition of edible mushrooms cultivated in Brazil – *Pleurotus* spp. and others dehydrated species. **Arch. Latinoamer. Nutric.** 50: 102-108.
- Sundaramoorthy, M.; Youngs, H.L.; Gold, M.H.; Poulos, T.L. (2005). High-Resolution crystal structure of manganese peroxidases: substrate and inhibitor complexes. **Biochemistry.** V.44, pp.6463-6470.
- Tan, Y.H.; Wahab, M.N. (1997). Extracellular enzyme production during anamorphic growth in the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 13: 613-617.
- Taveira, V.C.; Novaes, M.R.C.G. (2007). Consumo de cogumelos na nutrição humana: uma revisão de literatura. **Com. Ciênc. Saúde.** 18: 315-322.
- Tengerdy, R.P. (1985). Solid substrate fermentation. **Trends Biotechnol.** 3: 96-99.
- Thurston; C.F. (1994). The structure and function of fungal laccases. **Microbiol.** 140: 19-26.

- Tien, M.; Kirk, T.K. (1983). Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. **Science**. 221: 661-663.
- Tien, M.; Kirk, T.K. (1984). Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterisation, and catalytic properties of a unique H₂O₂ – requiring oxygenase. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 81: 2280-2284.
- Tisdale, T.E.; Miyasaka, S. C.; Hemmes, D.E. (2006). Cultivation of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on wood substrates in Hawaii. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 22: 201-206.
- Torres, J.L.; Varela, B.; García, M.T.; Carilla, J.; Matito, C.; Centelles, J.J.; Cascante, C.; Sort, X.; Bobet, R. (2002). Valorization of grape (*Vitis vinifera*) byproducts. antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content. **J. Agric. Food Chem.** 50: 7548- 7555.
- Tuomela, M.; Vikman, M.; Hatakka, A.; Itavaara, M. (2000). Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresour. Technol.** 72: 169-183.
- Urben, A.F. (2004). **Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada.** Brasília: Embrapa. 187 p.
- Urben, A.F.; Oliveira, C. (1998). Cogumelos comestíveis: utilização e fontes genéticas. **Rev. Anual Patol. Plantas.** 6: 173-196.
- UVIBRA. (2009). União Brasileira de Vinhos e Derivados. **Disponível (online)** <http://www.uvibra.com.br/> (9 de outubro de 2010).
- Vetter, J. (1994). Data on arsenic and cadmium contents of some common mushrooms. **Toxicon.** 32: 11-15.
- Wander, P.R. (2001). Utilização de resíduos de madeira e lenha como alternativas de energias renováveis para o desenvolvimento sustentável da Região Nordeste do Estado do Rio Grande do Sul. **Tese de doutoramento.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS.
- Withmore, T.C. (1978). **Biosynthesis and structure of lignocellulose.** In: Betts, W.B.; Dart, R.K.; Ball, A.S.; Pedlar, S.L. (1991). **Biodegradation: Natural and synthetic materials.** Berlin: Springer-Verlag. pp. 139-156.

- Wolfenden, R.S.; Wilson, R.L. (1982). Radical-cations as reference chromogens in the kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). **J. Chem. Soc. Perkin Trans. II.** 02: 805-812.
- Wood, D.A. (1980). Inactivation of extracellular laccase during fruiting of *Agaricus bisporus*. **J. Gen. Microbiol.** 117: 339-345.
- Yildiz, S.; Yildiz, U.C.; Gezer, E.D.; Temiz, A. (2002). Some lignocellulosic wastes used as raw material in cultivation of the *Pleurotus ostreatus* culture mushroom. **Process Biochem.** 38: 301-306.
- Zadrazil, F.; Puniya, A.K. (1994). Influence of carbon dioxide on lignin degradation and digestibility of lignocellulosics treated with *Pleurotus sajor-caju*. **Int. Biodeterior. Biodegrad.** 33: 237-244.
- Zadrazil, F.; Puniya, A.K. (1995). Studies on effect of particle size on solid state fermentation of sugar cane bagasse into animal feed using white-rot fungi. **Bioresour. Technol.** 54: 85-87.
- Zanetti, A.L.; Ranal, M.A. (1997). Suplementação de cana-de-açúcar com guandu no cultivo de *Pleurotus* sp. 'Florida'. **Pesq. Agropec. Bras.** 32: 959-964.
- Zhang, R.; Xiujin, L.; Fadel, J.G. (2002). Oyster mushroom cultivation with rice and wheat straw. **Bioresour. Technol.** 82: 277-284.