

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

**Melhoramento genético de *Lentinula edodes* e *Pleurotus sajor-caju* para
aumento da atividade extracelular de fenol-oxidases e
produtividade de basidiomas**

Anaméli Lipreri

Caxias do Sul

2012

ANAMÉLI LIPRERI

**Melhoramento genético de *Lentinula edodes* e *Pleurotus sajor-caju* para
aumento da atividade extracelular de fenol-oxidasas e
produtividade de basidiomas**

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

Orientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

Caxias do Sul

2012

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

L766m Lipreri, Anaméli
Melhoramento genético de *Lentinula edodes* e *Pleurotus sajor-caju* para aumento da atividade extracelular de fenol-oxidases e produtividade de basidiomas / Anaméli Lipreri. 2012.
134 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul,
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2012.
Orientação: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

1. Melhoramento genético. 2. Fungos. 3. Basidiomicetos. I.
Título.

CDU : 575

Índice para catálogo sistemático:

1. Melhoramento genético	575
2. Fungos	582.28
3. Basidiomicetos	582.284.3

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Kátia Stefani – CRB 10/1683

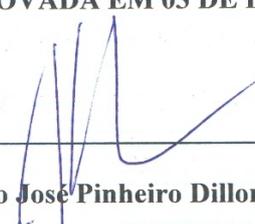
ANAMÉLI LIPRERI

**Melhoramento genético de *Lentinula edodes* e *Pleurotus sajor-caju*
para aumento da atividade extracelular de polifenol oxidases e
produtividade de basidiomas**

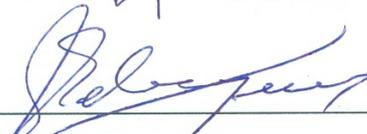
Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul visando à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon

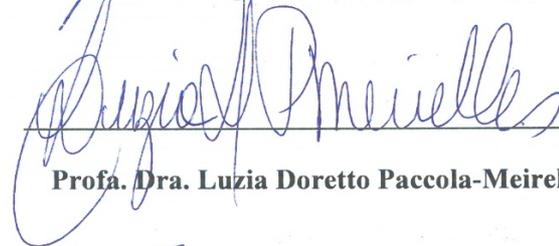
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 03 DE DEZEMBRO DE 2012.



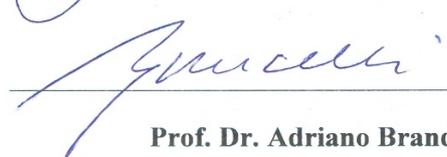
Prof. Dr. Aldo José Pinheiro Dillon (orientador)



Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray Laguna



Profa. Dra. Luzia Doretto Paccola-Meirelles



Prof. Dr. Adriano Brandelli

“Todos os grandes avanços da ciência nasceram de uma nova audácia da imaginação.”

(John Dewey)

*Dedico este trabalho ao meu filho
Pietro que é a minha luz, alegria e
inspiração.*

AGRADECIMENTOS

- Primeiramente, gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Aldo J. P. Dillon, pela grande oportunidade de realizar este trabalho, pelo incentivo, orientação, ensinamentos e acima de tudo pela confiança em mim depositada;
- À Roselei Fontana, técnica do laboratório, pela ajuda experimental, dúvidas solucionadas e companheirismo;
- À Prof. Dra. Marli Camassola por todo o incentivo e colaboração neste trabalho e principalmente pelo exemplo de profissional a ser seguido;
- Aos professores da banca de acompanhamento, Prof. Dra. Joséli Schwambach e Prof. Dr. Sergio Echeverrigaray Laguna pela disponibilidade, correções e sugestões;
- Aos colegas do Laboratório de Enzimas e Biomassas pela agradável convivência, pelos cafés e trocas de conhecimentos e experiências;
- Às estagiárias Vanessa Mouro e Aline Mezzomo pela colaboração;
- Aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia;
- Aos funcionários do Instituto de Biotecnologia, em especial a secretária do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Lucimara Serafini Rech pela disposição em ajudar sempre que necessário;
- Aos meus pais, Alceo e Sonia, pelo intenso incentivo aos estudos, pela confiança, ajuda no que fosse preciso, pela estrutura e pela base do que sou hoje;
- Ao meu filho Pietro que, mesmo pequeno, me ajudou muito apenas por ser uma criança maravilhosa e compreensiva;
- A UCS pelo apoio estrutural e financeiro;
- A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado;
- À luz que me guia!

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	v
NOMENCLATURA	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Filo Basidiomycota (basidiomicetos)	3
2.1.1 <i>Pleurotus sajor-caju</i>	5
2.1.1.1 Propriedades nutricionais, medicinais e biotecnológicas de <i>Pleurotus</i> sp.	6
2.1.2 <i>Lentinula edodes</i>	7
2.1.2.1 Propriedades nutricionais, medicinais e biotecnológicas de <i>L. edodes</i>	8
2.1.3 Cultivo de <i>Pleurotus</i> sp. e <i>L. edodes</i>	9
2.2 Fungos da degradação branca	11
2.3 Enzimas fenol-oxidases	12
2.4 Análise isoenzimática por eletroforese	16
2.5 Protoplastização em fungos	17
2.6 Mutagênese aplicada ao melhoramento genético em fungos	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Linhagens	21
3.2 Composições dos meios de cultivo em placa	21
3.2.1 Meio serragem de <i>Pinus</i> sp. (SP)	21
3.2.2 Meio serragem de <i>Eucalyptus</i> sp. (SE)	21

3.2.3 Meio BDA	21
3.2.4 Meio BDA com corante	21
3.2.5 Meio sólido para regeneração dos protoplastos (MYG)	21
3.3 Composições dos meios para cultivo submerso	22
3.3.1 Caldo MYPG	22
3.3.2 Caldo CEM	22
3.3.3 CBDY (caldo batata dextrose)	22
3.3.4 CFS	22
3.4 Substratos para cultivos em estado sólido e cultivo de basidiomas	22
3.5 Procedimentos experimentais	22
3.5.1 Manutenção das linhagens	22
3.5.2 Obtenção e regeneração dos protoplastos	23
3.5.3 Indução de mutantes utilizando radiação UV-C	23
3.5.4 Seleção dos protoclonos e mutantes com maior relação halo/colônia e maior diâmetro micelial	24
3.5.5 Cultivo submerso de <i>L. edodes</i> LE-06 e <i>P. sajor-caju</i> PS-2001 em diferentes meios	24
3.5.6 Cultivos para caracterização dos protoclonos e mutantes quanto ao crescimento e secreção de fenol-oxidases	25
3.5.6.1 Cultivo submerso	25
3.5.6.2 Cultivo em estado sólido	25
3.6 Determinações enzimáticas e de proteínas totais	26
3.6.1 Atividade de lacases	26
3.6.2 Cálculo da atividade de lacases com relação à biomassa fúngica	26
3.6.3 Manganês peroxidases (MnP)	27

3.6.4 Lignina peroxidases (LiP)	27
3.6.5 Oxidases do álcool veratrílico (OAV)	27
3.6.6 Proteínas totais	27
3.7 Determinações de biomassa fúngica	28
3.7.1 Cultivos submersos	28
3.7.2 Cultivos em estado sólido	28
3.8 Determinação de pH dos extratos enzimáticos	29
3.9 Produção de basidiomas	29
3.9.1 Parâmetros de produção dos basidiomas	30
3.9.1.1 Rendimento (R)	30
3.9.1.2 Eficiência biológica (Eb)	30
3.9.1.3 Produtividade (P)	31
3.10 Zimogramas para lacases	31
3.11 Análise estatística	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 Determinação de condições para obtenção e regeneração de protoplastos de <i>P. sajor-caju</i> e <i>L. edodes</i>	33
4.2 Mortalidade dos protoplastos em função do tempo de exposição à luz UV	39
4.3 Melhoramento genético de <i>P. sajor-caju</i> para aumento da atividade de fenol-oxidases e produtividade de basidiomas	40
4.3.1 Seleção dos protoclonos e mutantes de <i>P. sajor-caju</i>	40
4.3.2 Crescimento e atividade de fenol-oxidases de <i>P. sajor-caju</i> PS-2001 em diferentes meios de cultivo em condição submersa	43
4.3.3 Cultivo submerso dos protoclonos, mutantes e parental de <i>P. sajor-caju</i> para avaliação do crescimento e atividade de fenol-oxidases	47
4.3.4 Cultivo em estado sólido dos protoclonos, mutantes e parental de <i>P. sajor-</i>	55

<i>caju</i> para avaliação do crescimento e atividade de fenol-oxidases	
4.3.5 Produção de basidiomas pelos protoclonos, mutantes e parental de <i>P. sajor-caju</i>	61
4.4 Melhoramento genético de <i>L. edodes</i> para aumento da atividade de fenol-oxidases e produtividade de basidiomas	67
4.4.1 Seleção dos protoclonos e mutantes de <i>L. edodes</i>	67
4.4.2 Crescimento e atividade de fenol-oxidases de <i>L. edodes</i> LE-06 em diferentes meios de cultivo em condição submersa	70
4.4.3 Cultivo submerso dos protoclonos, mutantes e parental de <i>L. edodes</i> para avaliação do crescimento e atividade de fenol-oxidases	73
4.4.4 Cultivo em estado sólido dos protoclonos, mutantes e parental de <i>L. edodes</i> para avaliação do crescimento e atividade de fenol-oxidases	81
4.4.5 Estudo da produção de basidiomas nos protoclonos, mutantes e parental de <i>L. edodes</i>	89
5 CONCLUSÕES	91
6 PERSPECTIVAS	93
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida dos basidiomicetos.	4
Figura 2. Basidiomas de <i>P. sajor-caju</i> PS-2001.	5
Figura 3. Basidioma de <i>L. edodes</i> LE-06.	7
Figura 4. Estrutura proposta para a macromolécula de lignina de <i>Eucalyptus grandis</i>.	12
Figura 5. Oxidação do álcool veratrílico a aldeído.	13
Figura 6. Ciclo catalítico das manganês peroxidases.	14
Figura 7. Mecanismo de oxidação catalizado por lacases.	15
Figura 8. Sala de frutificação dos basidiomas.	30
Figura 9. Número de protoplastos obtidos em <i>P. sajor-caju</i> PS-2001 (A) e <i>L. edodes</i> LE-06 (B) nos tratamentos com diferentes concentrações da enzima Viscozyme[®] (3, 5 e 10%).	34
Figura 10. A) protoplastos de <i>L. edodes</i>; B) protoplastos de <i>P. sajor-caju</i>.	35
Figura 11. Número de protoplastos obtidos em <i>P. sajor-caju</i> PS-2001 (A) e <i>L. edodes</i> LE-06 (B) nos tratamentos com diferentes tempos de ação da enzima Viscozyme[®] a 5%.	36
Figura 12. Colônias obtidas a partir da regeneração dos protoplastos de: A - <i>L. edodes</i> após dez dias do plaqueamento e B - <i>P. sajor-caju</i> após oito dias do plaqueamento.	37
Figura 13. Protoplastos regenerados (%) em <i>P. sajor-caju</i> PS-2001 (A) e <i>L. edodes</i> (B) nos tratamentos com diferentes tempos de ação da enzima Viscozyme[®] 5%.	38
Figura 14. Taxa de mortalidade (%) dos protoplastos de <i>L. edodes</i> e <i>P. sajor-caju</i> em função do tempo de exposição à luz UV.	39
Figura 15. Clones selecionados após o segundo processo de seleção. A) clones com maior relação halo/colônia. B) clones com maior velocidade de crescimento micelial.	41

Figura 16. Tempo necessário para colonização total da placa de Petri com meio SP pelas linhagens de <i>P. sajor-caju</i>.	42
Figura 17. Morfologia e halo de descoloração do corante Reactive Blue 220, das linhagens de <i>P. sajor-caju</i>.	43
Figura 18. Variação dos valores de pH (A) e biomassa micelial (B) de <i>P. sajor-caju</i> PS-2001 em diferentes meios de cultivo.	46
Figura 19. Variação dos valores de proteínas totais (A) e atividade de LiP (B) de <i>P. sajor-caju</i> PS-2001 em diferentes meios de cultivo.	47
Figura 20. Atividade de lacases em função do tempo em cultivo submerso dos clones e parental de <i>P. sajor-caju</i> em meio CBDY.	48
Figura 21. Perfil da atividade de lacases dos clones e parental de <i>P. sajor-caju</i> em cultivo submerso, precipitadas a partir de 200 µL do extrato enzimático, separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida posteriormente corado com ABTS.	50
Figura 22. Variação do pH durante cultivo submerso dos clones e parental de <i>P. sajor-caju</i> em meio CBDY.	51
Figura 23. Biomassa micelial em função do tempo em cultivo submerso dos clones e parental de <i>P. sajor-caju</i> em meio CBDY.	52
Figura 24. Ab_{lac} - Atividade de lacases com relação à biomassa fúngica (atividade $U.g^{-1}$ de biomassa) em cultivo submerso dos clones e parental de <i>P. sajor-caju</i> em meio CBDY.	53
Figura 25. Atividade de lacases em função do tempo em cultivo em estado sólido dos clones e parental de <i>P. sajor-caju</i>.	56
Figura 26. Perfil da atividade de lacases dos clones e parental de <i>P. sajor-caju</i> em cultivo em estado sólido, precipitadas a partir de 200 µL do extrato enzimático, separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida posteriormente corado com ABTS.	57
Figura 27. Variação do pH durante cultivo em estado sólido dos clones e parental de <i>P. sajor-caju</i>.	58
Figura 28. Crescimento relativo com base nas concentrações de N-acetilglicosamina	59

mensurado no 8º dia do cultivo em estado sólido.

Figura 29. Primórdios formados após 23 dias de cultivo (6º dia após a abertura dos sacos). A) PS UV56; B) PS UV30; PS UV22. 61

Figura 30. Diferença de tamanho entre basidiomas coletados de *P. sajor-caju*. 62

Figura 31. Basidiomas dos protoclonos, mutantes e parental de *P. sajor-caju*. 63

Figura 32. Produtividade dos basidiomas dos clones e parental de *P. sajor-caju*. 65

Figura 33. Clones selecionados após o segundo processo de seleção. A) clones com maior relação halo/colônia. B) clones com maior velocidade de crescimento micelial. 68

Figura 34. Tempo necessário para colonização total da placa de Petri com meio SE pelos clones e parental de *L. edodes*. 69

Figura 35. Morfologia e halo de descoloração do corante Reactive Blue 220, dos clones e parental de *L. edodes*, após sete dias de incubação. 70

Figura 36. Atividade de MnP (A) e concentração de proteínas totais (B) de *L. edodes* LE-06 de *L. edodes* nos diferentes meios de cultivo. 72

Figura 37. Variação dos valores de pH (A) e biomassa micelial (B) de *L. edodes* LE-06 de *L. edodes* nos diferentes meios de cultivo. 73

Figura 38. Atividade de lacases em função do tempo em cultivo submerso dos clones e parental de *L. edodes* em meio CBDY. 75

Figura 39. Perfil da atividade de lacases dos clones e parental de *L. edodes* em cultivo submerso, precipitadas a partir de 100 µL do extrato enzimático, separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida posteriormente corado com ABTS. 76

Figura 40. Variação do pH durante cultivo submerso dos clones e parental de *L. edodes* em meio CBDY. 77

Figura 41. Biomassa micelial em função do tempo em cultivo submerso dos clones e parental de *L. edodes* em meio CBDY. 78

Figura 42. Ablac - Atividade de lacases com relação à biomassa fúngica (atividade U.g⁻¹ de biomassa) no cultivo submerso dos clones e parental de *L. edodes* em meio CBDY. 79

- Figura 43. Atividade de lacases em função do tempo em cultivo em estado sólido dos clones e parental de *L. edodes*. 82**
- Figura 44. Perfil da atividade de lacases dos clones e parental de *L. edodes* em cultivo em estado sólido, precipitadas a partir de 200 µL do extrato enzimático, separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida posteriormente corado com ABTS. 84**
- Figura 45. Variação do pH durante cultivo em estado sólido de linhagens de *L. edodes*. 85**
- Figura 46. Crescimento relativo com base nas concentrações de N-acetilglicosamina dos clones e linhagem parental de *L. edodes* mensurado no 8º dia do cultivo em estado sólido. 86**
- Figura 47. Ab_{lac} - Atividade de lacases com relação à biomassa fúngica (atividade $U \cdot g^{-1}$ de biomassa) no cultivo em estado sólido dos clones e parental de *L. edodes*. 87**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade de lacases (U.mL⁻¹) de <i>P. sajor-caju</i> PS-2001 em diferentes meios de cultivo.	44
Tabela 2. Atividade enzimática de OAV, LiP e MnP e proteínas solúveis totais em cultivo submerso dos clones e parental de <i>P. sajor-caju</i> em meio CBDY.	54
Tabela 3. Atividade enzimática (LiP e MnP) e proteínas solúveis totais em cultivo em estado sólido dos clones e parental de <i>P. sajor-caju</i>.	60
Tabela 4. Rendimento e eficiência biológica dos basidiomas dos protoclonos, mutantes e parental de <i>P. sajor-caju</i>.	64
Tabela 5. Atividade de lacases (U.mL⁻¹) de <i>L. edodes</i> LE-06 em diferentes meios de cultivo.	71
Tabela 6. Atividade enzimática de MnP e concentração de proteínas solúveis totais em cultivo submerso dos clones e linhagem parental de <i>L. edodes</i> em meio CBDY.	80
Tabela 7. Atividade enzimática de MnP e concentração de proteínas solúveis totais em cultivo em estado sólido dos clones e linhagem parental de <i>L. edodes</i>.	88

NOMENCLATURA

ABTS- 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)

Ab_{Lac}- atividade de lacases com relação à biomassa fúngica

BDA- ágar batata dextrose

CBDY- caldo batata dextrose

CFS- caldo de farelo e serragem

Lac- lacases

LiP- lignina peroxidases

MnP- manganês peroxidases

MYPG- caldo composto por peptona, glicose, extrato de levedura e extrato de malte.

OAV - oxidases do álcool veratrílico

Prot - protoplastos

SE- meio serragem de *Eucalyptus* sp.

SDS- dodecil sulfato de sódio

SP- meio serragem de *Pinus* sp.

U- unidade internacional

UV- ultravioleta

CEM- caldo extrato de malte

λ - comprimento de onda

RESUMO

Os basidiomicetos *Pleurotus sajor-caju* e *Lentinula edodes* despertam grande interesse industrial devido às propriedades nutritivas e terapêuticas e também devido à capacidade de secreção de fenol-oxidases, enzimas com grande potencial biotecnológico. O melhoramento genético torna-se importante para a obtenção de variantes com características de interesse, podendo ser realizado através de protoplastização e mutagênese. No presente estudo o objetivo foi a obtenção de clones com maior atividade de fenol-oxidases (com ênfase para as lacases) e clones com maior produtividade de basidiomas, visando possíveis aplicações biotecnológicas e industriais. As linhagens *P. sajor-caju* PS-2001 e *L. edodes* LE-06 foram submetidas às técnicas de protoplastização e mutagênese de protoplastos (radiação UV) e por método seletivo foram isolados clones com maior relação halo/colônia e também com maior diâmetro da colônia em relação aos parentais. Inicialmente realizou-se cultivo submerso em diferentes meios com o intuito de identificar uma condição adequada para a secreção de fenol-oxidases pelas linhagens parentais de *L. edodes* e *P. sajor-caju* e neste contexto, o caldo batata dextrose (CBDY) apresentou resultados satisfatórios para ambas as linhagens. Os clones selecionados, dos dois fungos, foram cultivados em estado sólido utilizando serragem como substrato e também a cultivo submerso em meio CBDY para caracterização quanto ao crescimento e secreção de fenol-oxidases. Adicionalmente, os clones também foram cultivados em sacos contendo serragem para a avaliação da produtividade de basidiomas. Um dos clones obtidos em *P. sajor-caju*, mutante PS UV22, apresentou secreção 1,5 vezes maior de lacases, em relação à linhagem parental em cultivo sólido. Outro mutante, PS UV56, apresentou secreção 2,1 vezes maior de lacases, em relação ao parental em cultivo submerso. Com relação à produtividade de basidiomas, dois clones, (PS3 e PS UV30) apresentaram aumento significativo em relação ao parental PS-2001. Em *L. edodes*, foram identificados quatro clones (LE UV6, LE UV9, LE UV11 e LE UV20), com aumento significativo na atividade de lacases em relação ao parental LE-06, em cultivo submerso. No cultivo sólido foi selecionado um clone, mutante LE UV23 que apresentou atividade de lacases 2,6 vezes maior que a parental LE-06. A partir dos resultados obtidos, é possível afirmar que as técnicas de protoplastização e mutagênese podem ser utilizadas no melhoramento genético de *L. edodes* e *P. sajor-caju* para aumento da atividade enzimática e produtividade de basidiomas.

Palavras-chave: *Pleurotus sajor-caju*, *Lentinula edodes*, melhoramento genético.

ABSTRACT

The basidiomycetes *Pleurotus sajor-caju* and *Lentinula edodes* exhibit great industrial interest due to properties nutritional and therapies and also due the secretion capacity of phenoloxidases, enzymes with high biotechnological potential. The improvement genetic becomes important to obtaining variants with features of interest, which can be obtained with protoplastization and mutagenesis techniques. In this study the objective was obtaining clones with increased activity of phenoloxidases (emphasizing laccases) and clones with high productivity of the mushroom, seeking possible biotechnological and industrial applications. The strains *P. sajor-caju* PS-2001 and *L. edodes* LE-06 were subjected to protoplastization and mutagenesis of protoplasts by radiation UV method, and, by selective clones were isolated with more relation halo/colony and also the larger diameter of the colony in comparison with their parents. Initially held submerged cultivate in different medium in order to identify the more adequate condition for growth and enzyme secretion by parental strains (*L. edodes* and *P. sajor-caju*). In this context, the potato dextrose broth (CBDY) showed satisfactory results for both strains. The new selected clones, from the two fungi were submitted to solid-state cultivate using sawdust as the substrate and also to the submerged cultivate in medium CBDY. In addition, new clones were also grown in bags containing sawdust to evaluate the productivity of the basidiomes. One of the mutants obtained from *P. sajor-caju*, strain PS UV22, showed 1.5 fold higher secretion of laccase in comparison of the parental strain growing on solid-state cultivate. Another mutant, strain PS UV56, showed 2.1 fold higher secretion of laccases, compared to parental submerged cultivate. Regarding the productivity of basidiomes, two clones (PS3 and PS UV30), showed a significant increase in comparison with parental PS-2001. In *L. edodes*, it was identified two clones (LE UV9 and LE UV20), with a significant increase in laccase activity in relation to parental LE-06 in submerged cultivate. For solid-state cultivate was selected a clone, mutant LE UV23 that showed laccase activity 2.6 times greater than the parental LE-06. From the results obtained in this study, it can be predicate that the protoplast formation and mutagenesis techniques can be used in improvement genetic of *L. edodes* and *P. sajor-caju* for enzyme activity and increased productivity of the basidiomes.

Keywords: *Pleurotus sajor-caju*, *Lentinula edodes*, improvement genetic.

INTRODUÇÃO

Os fungos basidiomicetos que há milênios são utilizados na alimentação humana, devido às suas propriedades nutritivas e terapêuticas, têm despertado grande interesse econômico. O resultado tem sido a maior tecnificação dos processos de produção, com unidades industriais localizadas em diversos países, com produções que alcançam toneladas diárias.

Entre os basidiomicetos com maior consumo no Brasil, estão *Agaricus bisporus* (champignon-de-Paris), *Lentinula edodes* (shiitake) e *Pleurotus* sp. (hiratake ou shimeji). *P. sajor-caju* é conhecido pelo basidioma rico em fibras, vitaminas, proteínas e sais minerais. *L. edodes* é conhecido principalmente pelas suas qualidades nutricionais e medicinais, sendo considerado ingrediente de pratos refinados. O cultivo comercial de *P. sajor-caju* e *L. edodes* vem se expandindo a cada ano com o uso de diferentes tecnologias, sendo de grande interesse o desenvolvimento de pesquisas que reduzam o tempo de cultivo, que geralmente é de 30 dias para *P. sajor-caju* e de 120 dias para *L. edodes*, visando maior rendimento e produtividade.

Adicionalmente, *L. edodes* e *P. sajor-caju* têm grande interesse biotecnológico, visto que apresentam capacidade de secretar fenol-oxidases, enzimas com potencial uso em diferentes bioprocessos, como biorremediação, produção de produtos químicos a partir da lignina, oxidação de corantes têxteis, tratamento de efluentes da indústria papelreira, na área médica, entre outras. Entre as principais fenol-oxidases secretadas extracelularmente por fungos da degradação branca estão as lacases, manganês peroxidases e lignina peroxidases. Entre os métodos utilizados para a produção de enzimas estão o cultivo em estado sólido e o cultivo submerso, sendo que a escolha do método pode depender da adaptabilidade do microrganismo ao meio.

As enzimas fenol-oxidases, secretadas pelos fungos para a degradação de polímeros, podem estar relacionadas ao crescimento fúngico e conversão do substrato para a produtividade de basidiomas. Desta maneira, uma estratégia de reduzir o tempo de cultivo e aumentar a atividade enzimática de *L. edodes* e *P. sajor-caju*, é a seleção de genótipos mais eficientes, sendo que a protoplastização e mutagênese dos protoplastos são técnicas auxiliares nos programas de melhoramento genético de fungos.

A obtenção de protoplastos (protoplastização) apresenta-se como uma ferramenta importante em pesquisas envolvendo manipulação genética em fungos filamentosos. A remoção da parede celular fúngica pode acarretar modificações moleculares no microrganismo, sendo que este efeito pode ser potencializado utilizando agentes mutagênicos, como a radiação ultravioleta

(UV), por exemplo. Estudos envolvendo protoplastização e tratamentos físicos ou químicos para mutagênese de protoplastos já são bem estabelecidos para diversos fungos. Uma maneira de verificar possíveis modificações nos perfis enzimáticos entre diferentes genótipos é a técnica de zimograma, onde isoformas enzimáticas podem ser visualizadas em gel.

Visando a condução de um programa de melhoramento genético em *L. edodes* e *P. sajor-caju*, objetivou-se, neste estudo, selecionar clones dos dois basidiomicetos, entre genótipos obtidos através da protoplastização e mutagênese de protoplastos, visando aumento da secreção de fenol-oxidases e também da produtividade de basidiomas.

Constituíram-se em objetivos específicos deste trabalho:

- Determinar condições para a obtenção, regeneração e mutagênese de protoplastos em *L. edodes* e *P. sajor-caju*
- Obter variantes em *L. edodes* e *P. sajor-caju* através da protoplastização e mutagênese de protoplastos por radiação UV;
- Selecionar a partir dos maiores halos de crescimento e maior relação halo/colônia, clones com potencial para maior velocidade de crescimento e/ou maior atividade de fenol-oxidases;
- Caracterizar as linhagens parentais de *L. edodes* e *P. sajor-caju* quanto ao crescimento e secreção de fenol-oxidases em diferentes meios de cultivo;
- Avaliar em cultivo submerso e cultivo em estado sólido a atividade de fenol-oxidases dos clones selecionados em comparação aos seus parentais;
- Avaliar a produtividade, eficiência biológica e rendimento dos basidiomas dos clones selecionados em relação aos seus parentais.
- Verificar através de zimogramas, a atividade de lacases nos clones selecionados e linhagens parentais de *L. edodes* e *P. sajor-caju*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Filo Basidiomycota (basidiomicetos)

Com cerca de 550 gêneros, os basidiomicetos representam uma das maiores classes de fungos (Rajan, 2001), compreendendo duas subclasses (Holobasidiomycetidae e Phragmobasidiomycetidae) que são diferenciadas pelo tipo de basídio formado. Recebem este nome devido à estrutura de reprodução sexual, em que os basidiósporos são produzidos por cariogamia seguida de meiose (Alcamo, 2000). Segundo Kirk *et al.* (2008), são conhecidas 29.914 espécies de basidiomicetos, as quais incluem desde os populares cogumelos e orelhas-de-pau, até os gelatinosos, ferrugens, carvões e gasteromicetos. A maior parte das espécies é sapróbia, porém, algumas espécies são parasitas obrigatórias ou facultativas.

A reprodução dos basidiomicetos pode ser sexuada através de esporos ou de forma assexuada. A fusão de hifas de dois micélios primários compatíveis pode formar durante o desenvolvimento, o basidioma ou cogumelo (Pelczar *et al.*, 1996). A esquematização do ciclo de vida de um basidiomiceto está representada na Figura 1.

Os basidiocarpos, basidiomas, ou ainda cogumelos, como são conhecidos popularmente, são formados por um estipe central, ligado a um píleo no topo, que pode possuir forma de chapéu, apresentando em sua superfície inferior um tecido chamado de himênio, que é constituído por lamelas, poros ou tubos que irão liberar os esporos no momento da maturação (Krugner & Bacchi, 1995).

Os basidiomicetos desempenham papel fundamental na ciclagem de nutrientes na natureza, participando principalmente do ciclo do carbono, na medida em que são excelentes degradadores de lignina, macromolécula abundante sobre a Terra. Também contribuem para a manutenção do ciclo de outros elementos como nitrogênio, fósforo e potássio, incorporados aos componentes insolúveis das paredes celulares (Carlile & Watkinson 1996).

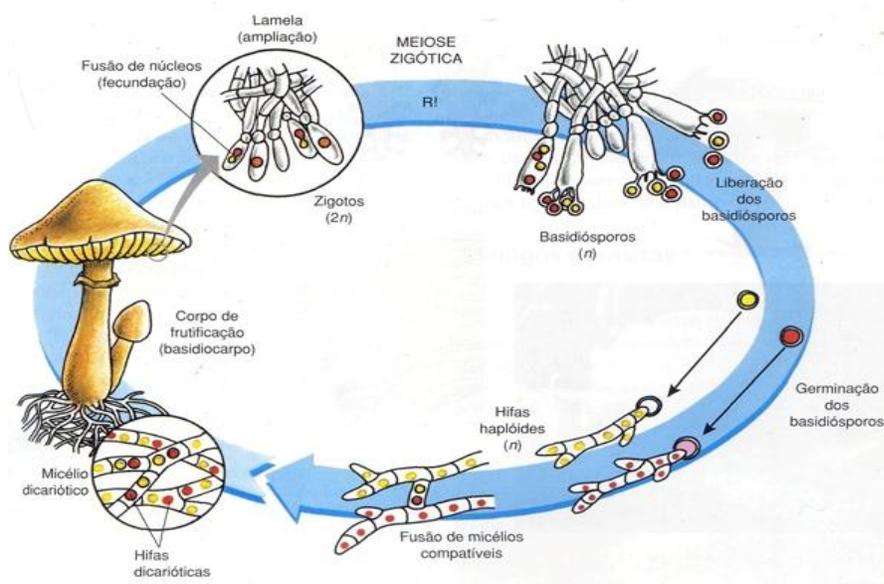


Figura 1. Ciclo de vida dos Basidiomicetos.

Fonte: biogeogondomar.blogspot.com.br/2011/01/ciclo-sexual-em-basidiomicetos.html

Desde a antiguidade, o consumo dos cogumelos comestíveis é associado a valores nutritivos e medicinais, além de serem tidos como alimentos nobres na culinária. Os cogumelos possuem alto teor de proteínas, comparando-se a alimentos de origem animal. Possuem grande quantidade de água, aproximadamente 90%, restando 10% que são constituídos por fibras, proteínas, carboidratos e minerais (Bononi *et al.*, 1999). Quando comparados com os peixes e as aves, os cogumelos apresentam menor quantidade de gordura saturada, sendo os teores de gorduras compostos por ácidos graxos livres, esteróis, fosfolipídios, entre outros. Evidências sugerem que há substâncias presentes nos cogumelos capazes de modular a carcinogênese nos estágios de iniciação, promoção e progressão, promovendo benefícios aos portadores de diversos tipos de câncer, estimulando o sistema imune e servindo como coadjuvante nas terapias contra o câncer (Fortes *et al.*, 2006).

O consumo de cogumelos no Brasil vem crescendo nas últimas décadas. Este fato pode ser atribuído às mudanças dos hábitos alimentares do brasileiro em busca de alimentos saudáveis. A maior área de produção de cogumelos no Brasil, localizada na região de Mogi das Cruzes em São Paulo, comercializando nos mercados interno e externo cerca de quatro mil toneladas, o equivalente a 80% da produção nacional (Coutinho, 2007).

Entre os principais basidiomicetos comercializados mundialmente, estão o *Pleurotus*

sajor-caju e o *Lentinula edodes* que despertam grande interesse industrial devido às suas diversas aplicações.

2.1.1 *Pleurotus sajor-caju*

Os cogumelos do gênero *Pleurotus* sp. ocupam o segundo lugar em produção no mundo. Este fungo é bastante difundido em diversos países, sendo a China o maior produtor. As principais espécies produzidas são: *P. sajor-caju*, *P. cystidus*, *P. citrinopileatus* e *P. flabellatus* (Ferreira, 1998).

As principais características do basidioma de *P. sajor-caju* é o seu formato de ostra (Figura 2) e a formação lateral do estipe em relação ao píleo. Sua coloração pode variar entre cinza-escuro, branco, creme e marrom (Stamets & Chilton, 1983). Devido às semelhanças com outras espécies do gênero *Pleurotus*, a taxonomia de *P. sajor-caju* se torna de difícil precisão, porém, Kirk *et al.* (2008) inserem *P. sajor-caju* na seguinte classificação: Reino Fungi; Filo Basidiomycota; Subfilo Agaricomycotina; Classe Agaricomycetes; Ordem Agaricales; Família Pleurotaceae; Gênero *Pleurotus*; Espécie *P. sajor-caju*.



Figura 2. Basidiomas de *P. sajor-caju* PS-2001.

Fonte: Letícia Osório da Rosa.

P. sajor-caju é geralmente comercializado *in natura* ou desidratado, utilizado na preparação de alimentos diversos como sopas, patês, recheios e pratos típicos. Pouco utilizados em conservas devido ao seu tamanho avantajado, os cogumelos deste gênero devem ser mantidos após a colheita em temperatura entre 21 e 25°C para maior preservação de suas propriedades (Nardim, 1999).

2.1.1.1 Propriedades nutricionais, medicinais e biotecnológicas de *Pleurotus* sp.

Os cogumelos pertencentes ao gênero *Pleurotus* sp. possuem todos os aminoácidos essenciais, sendo o teor de proteínas na faixa de 42 a 66% (Ranzani & Sturion, 1998). Um estudo com *Pleurotus* sp. e *L. edodes* determinou concentrações abundantes de potássio, estando o sódio presente em baixas concentrações nestes organismos, sugerindo seu consumo em pacientes hipertensos (Manzi *et al.*, 1999).

Pleurotus sp. além de apresentar sabor suave, é rico em fibras, vitaminas e aminoácidos, tem baixos níveis de gordura e pouco valor calórico, contribuindo para uma alimentação de alto valor nutritivo (Cohen *et al.*, 2002; Silveira, 2003; Bonatti, 2004). Apresenta diversas propriedades terapêuticas, sendo que, cinco tipos de polissacarídeos extraídos do cogumelo fresco apresentam atividade antitumoral, podendo ser úteis no desenvolvimento de novas drogas antitumorais (Mizuno & Zhuang, 1995).

P. sajor-caju tem despertado grande interesse da comunidade científica devido às suas propriedades medicinais, como por exemplo, a capacidade de modular o sistema imunológico (Refaie *et al.*, 2009), de diminuir a pressão arterial (Tam *et al.*, 1986), diminuição do colesterol sanguíneo, possuindo também ação hipoglicêmica, antitrombótica (Wasser, 2002), antioxidante (Lee *et al.*, 2007; Jayakumar *et al.*, 2009), e antimicrobiana (Iwalokun *et al.*, 2007; Wolff *et al.*, 2008).

Além das propriedades nutritivas e medicinais *P. sajor-caju* é considerado um fungo da podridão branca, pois são degradadores de lignina. Estes organismos estão sendo cada vez mais estudados para a utilização como biodegradadores de poluentes, pois são capazes de transformar e mineralizar contaminantes ambientais, como por exemplo: herbicidas, corantes e outros compostos tóxicos (Silva *et al.*, 2002).

O interesse na utilização de *Pleurotus* sp. na área têxtil vem crescendo consideravelmente. Embora ainda não existam muitos estudos sobre isso, sabe-se que linhagens

de *Pleurotus* são capazes de degradar o corante índigo, através da ação de enzimas, colaborando para o tratamento de efluentes procedentes de indústrias têxteis (Banat *et al.*, 1996).

2.1.2 *Lentinula edodes*

No Brasil, *L. edodes* é também conhecido como shiitake (nome japonês), porém, em outros lugares, pode ser chamado de cogumelo negro da floresta, cogumelo perfumado (shiang-gu) pelos chineses, “pyogo” pelos coreanos e “hed hom” pelos tailandeses (Chang & Miles, 1989). É o cogumelo comestível mais antigo em termos de cultivo, tendo início há aproximadamente 800 anos na China, onde faz parte dos hábitos alimentares da população (Nappi & Moretto, 1998).

Esta espécie, primeiramente chamada de *Agaricus edodes* pelo botânico inglês Miles Joseph Berkeley em 1878, foi mais tarde classificada como *Lentinus edodes*, permanecendo por muitos anos esta nomenclatura. Segundo Kirk *et al.* (2008), a classificação taxonômica atual para *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler (1976) é: Reino: Fungi; Filo: Basidiomycota; Classe: Agaricomycetidae; Ordem: Agaricales; Família: Marasmiaceae; Gênero: *Lentinula*; Espécie: *Lentinula edodes*. A morfologia do basidioma está apresentada na Figura 3.



Figura 3. Basidioma de *L. edodes* LE-06.

Fonte: Letícia Osório da Rosa.

Este cogumelo é considerado um decompositor primário, e ocorre naturalmente em florestas de países como o Japão, China, Coréia, Tailândia, entre outros países de zona temperada e subtropical (Nappi & Moretto, 1998).

2.1.2.1 Propriedades nutricionais, medicinais e biotecnológicas de *L. edodes*

Os basidiomas de *L. edodes* contém em média 67,5 a 78% de carboidratos (pentoses, hexoses e dissacarídeos), entre 7,3 a 7,8% de fibras e entre 13,4 e 17,5% de proteínas (Nappi & Moretto, 1998; Yang *et al.*, 2002). Quanto ao conteúdo lipídico, o teor de ácidos graxos varia de 1,1 a 8% (Chang & Miles, 1989). Contém alto teor de minerais, sendo os principais: o cálcio, manganês, fósforo, magnésio, potássio, ferro, cobre e zinco (Mattila *et al.*, 2001). Possui também grandes quantidades de vitaminas, entre elas: a Vitamina B1, Vitamina B2, niacina, biotina e ácido ascórbico. Também se destacam o β -caroteno e o ergosterol que é transformado em vitamina D ativa quando exposto à radiação ultravioleta (Longvah & Deosthale, 1998; Mattila *et al.*, 2001; Rowan *et al.*, 2002;).

Utilizado como alimento medicinal, *L. edodes* é também conhecido como o “elixir da vida” por ser utilizado na prevenção e no combate de diversas doenças. Diversos estudos principalmente nos Estados Unidos e no Japão comprovaram as propriedades medicinais deste cogumelo, contribuindo com a sua divulgação e conseqüentemente com o aumento do consumo pelo mundo (Bononi *et al.*, 1999). A introdução dos cogumelos na alimentação colabora para a restauração da homeostase, além de melhorar a resistência do indivíduo frente a diversas doenças e infecções (Rowan *et al.*, 2002).

Alguns compostos extraídos dos cogumelos têm efeito comprovado na diminuição do colesterol. Um composto derivado da adenina encontrado em *L. edodes* chamado de eritadenina, confere ação hipocolesterolêmica devido à diminuição na secreção do colesterol do fígado para a corrente sanguínea (Manzi & Pizzoferatto, 2000).

O oxigênio, embora essencial para a maioria dos organismos vivos, produz espécies reativas, as quais estão envolvidas em diversos danos à saúde. Praticamente todos os organismos possuem mecanismos de reparo para estes radicais, porém, esta proteção não é completa. A introdução de alimentos com ação antioxidante vem sendo uma arma contra estes produtos de oxidação (Yang *et al.*, 2002). Estudos realizados utilizando o shiitake a fim de verificar sua atividade antioxidante tiveram sucesso, entre eles, destacam-se: Cheung *et al.* (2003), e Yang *et al.* (2002) que realizaram a extração de compostos dos basidiomas de *L. edodes*.

Metabólitos secundários liberados pelos micélios dos cogumelos combatem vírus e bactérias, além de produzirem efeito contra protozoários que causam malária e outros microrganismos (Smânia, 2003). Um composto isolado de *L. edodes* chamado de cortinelina apresenta atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (Di Piero, 2003). Extratos clorofórmicos de shiitake apresentam atividade bactericida sobre células de *Streptococcus mutans*, o principal agente causal de cáries dentárias (Hirasawa *et al.*, 1999).

2.1.3 Cultivo de *Pleurotus* sp. e *L. edodes*

A escolha do substrato para a produção dos cogumelos (basidiomas) depende da capacidade do fungo em secretar celulases, hemicelulases e ligninases, as quais liberam nutrientes para o seu crescimento. Durante o crescimento vegetativo, as trocas gasosas do substrato são importantes para a produção destas enzimas. A escolha da metodologia de cultivo depende da espécie do cogumelo, da disponibilidade dos resíduos da agroindústria, além de outros insumos e matéria-prima (Silva *et al.*, 2007).

P. sajor-caju possui grande habilidade saprofítica, podendo colonizar substratos esterilizados, pasteurizados (60 a 90 °C) e fermentados (Zadrazil, 1980). Apresenta também grande variedade fenotípica, podendo ser cultivado em diferentes condições climáticas (Kashangura *et al.*, 2006). São descritas para o cultivo a utilização de produtos lignocelulolíticos, como folha de bananeira, palha de arroz, serragem, entre outros. Uma série de resíduos da agricultura pode servir como substrato para este cogumelo, dentre eles, o bagaço da cana-de-açúcar, o sabugo de milho, e os resíduos de algodão (Obodai *et al.*, 2003; Moda *et al.*, 2005). No Brasil o substrato mais utilizado é o bagaço de cana-de-açúcar acrescido de farelo de arroz.

A técnica de cultivo para o gênero *Pleurotus* sp. é basicamente a mesma para todas as espécies, o que muda é a temperatura para a formação do basidioma e em alguns casos o teor de umidade. Após a formação dos primórdios, a umidade relativa deve ser diminuída levemente para assegurar a qualidade dos cogumelos. Entre quatro a sete dias, os cogumelos estarão prontos para a colheita. Durante o crescimento, o controle da temperatura se torna essencial, pois, se estiver muito alta, poderá ocorrer morte ou maturação precoce, se muito baixa, poderá retardar o crescimento em alguns dias.

A produção pode ser dividida em três etapas, segundo Stamets (1993).

1) corrida do micélio, onde ocorre a colonização do substrato pelo fungo;

- 2) formação dos primórdios;
- 3) desenvolvimento dos basidiomas a partir dos primórdios.

O cultivo de *Pleurotus* sp. possui diversas vantagens, entre elas, a facilidade de manejo e produção, utilização de matéria-prima barata como capim e bagaços, relativa resistência a pragas e rápido retorno do investimento (Moda *et al.*, 2005). A escolha do substrato é de fundamental importância no processo de cultivo.

O cultivo de *L. edodes*, devido à aptidão em utilizar compostos como a lignina, a celulose e a hemicelulose, pode ser realizado em diversos resíduos agrícolas. No Brasil, por tradição, o cultivo é realizado em cepos de eucaliptos, porém, o cultivo em sistemas compostos vem aumentando, devido ao aumento da eficiência biológica e a diminuição no tempo de colheita. Quando cultivados em troncos, estes devem ter de 1 a 1,2 m de comprimento e 9 a 18 cm de diâmetro. A árvore cortada, dependendo da espécie e da região, deve permanecer na floresta durante 20 ou 30 dias para que sejam eliminadas substâncias nocivas ao micélio. Geralmente a inoculação nos troncos é realizada através da perfuração e os orifícios devem ser recobertos com parafina para impedir o ataque de insetos e a perda de água (Bononi *et al.*, 1999).

A incubação deve ser feita em terreno em declive, com boa drenagem, insolação de 30% e ventilação moderada, ou ainda em casas de cultivo com condições controladas. A temperatura ideal para desenvolvimento do micélio é de 24 a 28 °C e após a total colonização, os troncos devem ser transferidos para local com maior teor de umidade e temperatura entre 12 a 20 °C, o que propicia o desenvolvimento dos basidiomas (Pascholati *et al.*, 1998).

Outra técnica utilizada para a produção de shiitake é a do cultivo em serragem, desenvolvida no Japão e que propicia vantagens como menor tempo de produção, facilidade de manuseio e controle das condições climáticas. A origem das serragens são as mesmas árvores utilizadas para o cultivo em troncos, geralmente na formulação de 90% de serragem e 10% de farelos. A umidade deve ser mantida entre 55 e 70%. A mistura deve ser acondicionada em sacos plásticos de polipropileno fechados de maneira que ocorram as trocas gasosas. Deve-se dar um choque térmico de 10 °C por 24 h para o aparecimento dos basidiomas. O tempo de produção normalmente varia entre dois e cinco meses e a temperatura durante este tempo deve ser mantida entre 15 e 20 °C (Bononi *et al.*, 1999).

Quando o cultivo dos basidiomicetos visa à secreção de enzimas extracelulares, a escolha do tipo de cultivo para a produção é relacionada à espécie de microrganismo a ser utilizada, ao substrato utilizado e aos tipos de enzimas que ele sintetiza. O cultivo em estado sólido está

relacionado ao crescimento do microrganismo na ausência de água livre, geralmente apresentam alta produtividade e menor geração de efluentes (Pandey *et al.*, 1999). Porém, o cultivo submerso apresenta algumas vantagens, como obtenção de biomassa fúngica, controle dos parâmetros operacionais como pH, temperatura e transferência de oxigênio. A principal forma de produção de enzimas em larga escala é através de cultivo submerso, embora em países orientais chega-se a utilizar cultivo semi-sólido (Lima *et al.*, 2001).

2.2 Fungos da degradação branca

Na biosfera, a degradação da lignocelulose é importante para o ciclo do carbono. Grande parte dos microrganismos possui a capacidade de assimilação de materiais orgânicos, o que é dependente da capacidade de secreção de enzimas, que irão degradar o substrato em moléculas menores que poderão ser utilizadas pelas células para seu desenvolvimento (Tuomela *et al.*, 2000).

Os fungos capazes de degradar compostos lignocelulósicos podem ser divididos em: fungos da degradação marrom, macia e branca (Amer & Drew, 1980). Os fungos de degradação marrom decompõem apenas a celulose e a hemicelulose, sem causar grandes modificações na lignina. Os fungos de degradação macia são capazes de degradar lignina e os demais materiais celulósicos, porém, a degradação da lignina é pouco eficiente. Já os fungos da degradação branca, são aqueles que possuem a capacidade de oxidar compostos fenólicos relacionados à lignina, através da secreção de enzimas extracelulares lignocelulíticas (Jørgensen *et al.*, 2005).

A lignina é uma macromolécula amorfa, de estruturas aromáticas que faz parte da parede celular e da lamela média dos vegetais (Figura 4). Sua estrutura é composta por unidades moleculares originárias da oxidação de três precursores fenilpropanóides monoméricos: álcool cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, que não se repetem regularmente. A polimerização aleatória destas subunidades, através de ligações C-C (carbono-carbono) e C-O-C (carbono-oxigênio) dão origem a uma forma altamente complexa, tridimensional, estável e insolúvel em água. Dessa maneira, a lignina confere rigidez à madeira, diminuindo a permeabilidade das paredes celulares do xilema à água (Higushi, 1985).

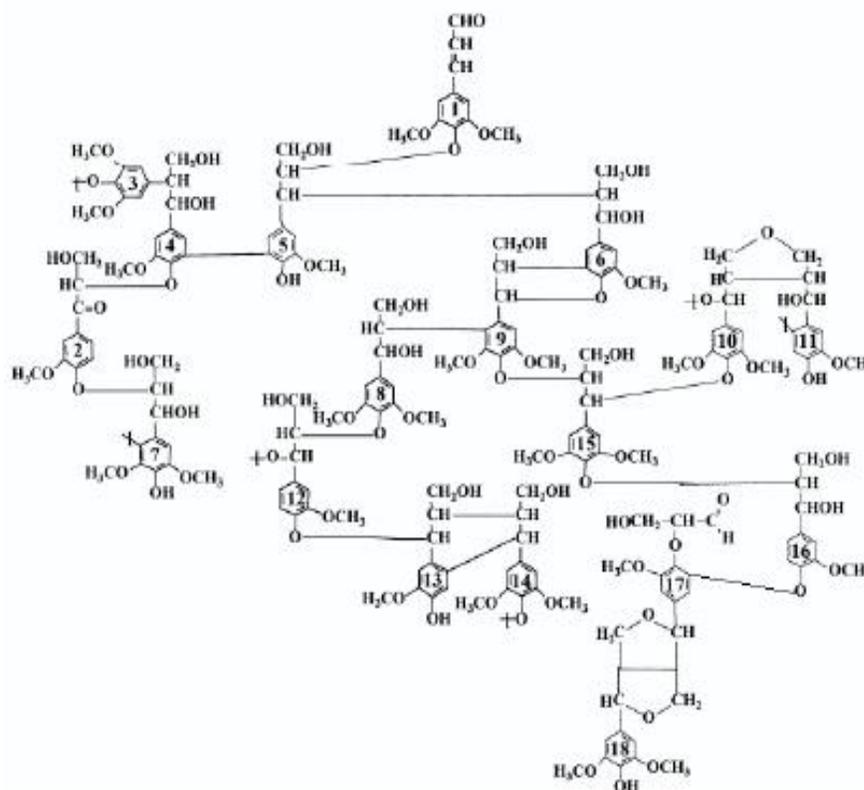


Figura 4. Estrutura proposta para a macromolécula de lignina de *Eucalyptus grandis*. Fonte: Zanuncio & Colodette (2011)

Fungos dos gêneros *Pleurotus* e *Lentinula* são considerados fungos de degradação branca, pois possuem a habilidade de degradar as macromoléculas de lignina presente nos vegetais. A capacidade em degradar os componentes da madeira, principalmente a lignina, pode ter influência sobre o tempo de cultivo, colheita e produtividade (Smith *et al.*, 1988; Kinugawa & Tanesaka, 1990; Tanesaka *et al.*, 1993; Ohga & Kitamoto, 1997).

2.3 Enzimas fenol-oxidases

A capacidade dos fungos da degradação branca em decompor a lignina está diretamente relacionada à secreção de enzimas extracelulares, especialmente as fenol-oxidases. Apesar de ainda não totalmente esclarecido, entende-se que o processo de degradação ocorre através de ação multienzimática resultante da ação coordenada de uma série de enzimas do grupo das fenol-oxidases catalisando várias oxidações de grupos alquil, clivagem de ligações C-C na cadeia de

lignina, clivagem de anéis aromáticos, e oxidação de álcoois benzílicos a aldeídos (Leonowicz et al. 1999, Moreira-Neto 2006)

As principais enzimas fenol-oxidases secretadas por basidiomicetos são a Manganês peroxidases (MnP), Lignina peroxidases (LiP) e Lacases (Lac) que além da degradação da madeira, também estão envolvidas em outros processos de degradação (Scheel *et al.*, 2000).

As enzimas LiP e MnP são pertencentes ao grupo das peroxidases, ambas, sendo heme-proteínas, apresentam ciclo catalítico semelhante às peroxidases de origem vegetal. As duas enzimas são ativadas através da oxidação por peróxido de hidrogênio (H₂O₂) levando à formação do composto I (C_I), um oxo-complexo deficiente de dois elétrons.

Lignina peroxidase possui grande potencial para oxidar estruturas aromáticas não fenólicas, presentes na lignina, dando origem a radicais catiônicos. A enzima catalisa a oxidação pela retirada de um elétron de compostos não fenólicos aromáticos com um alto potencial de redução, levando à formação de um substrato com radical catiônico (Kersten *et al.*, 1985; Schoemaker *et al.*, 1985). Além disso, provoca quebra de ligações C α -C β da cadeia propila da lignina, despolimerizando-a (Kirk *et al.*, 1984). Também é capaz de catalisar a oxidação do álcool veratrílico, redutor preferido pela LiP, a aldeído (Figura 5).



Figura 5. Oxidação do álcool veratrílico a aldeído.

Fonte: Glazer & Nikaido (1995).

Já as manganês peroxidases, são dependentes de Mn²⁺ e apresentam potencial de oxidação de estruturas fenólicas, como por exemplo, polímeros fenilpropanóides da parede

celular da lignina (Barr & Aust, 1994). O ciclo catalítico da MnP (Figura 6) é iniciado através da ligação do H_2O_2 com o ferro presente na enzima, formando o complexo ferro-peróxido. A clivagem da ligação oxigênio-oxigênio requer a transferência de dois elétrons do grupo heme, que resulta na formação de um radical complexo Fe^{4+} -oxo-porfirina. A ligação dioxigênica é quebrada heteroliticamente e uma molécula de água é liberada. A redução subsequente da enzima ocorre através da oxidação do manganês. O íon de Mn^{2+} monoquelado atua como um doador de um elétron para a porfirina intermediária e é oxidado à Mn^{3+} . Ocorre então, a oxidação no sítio ativo da enzima, através da oxidação de outro Mn^{2+} e a liberação de outra molécula de água (Hofrichter, 2002).

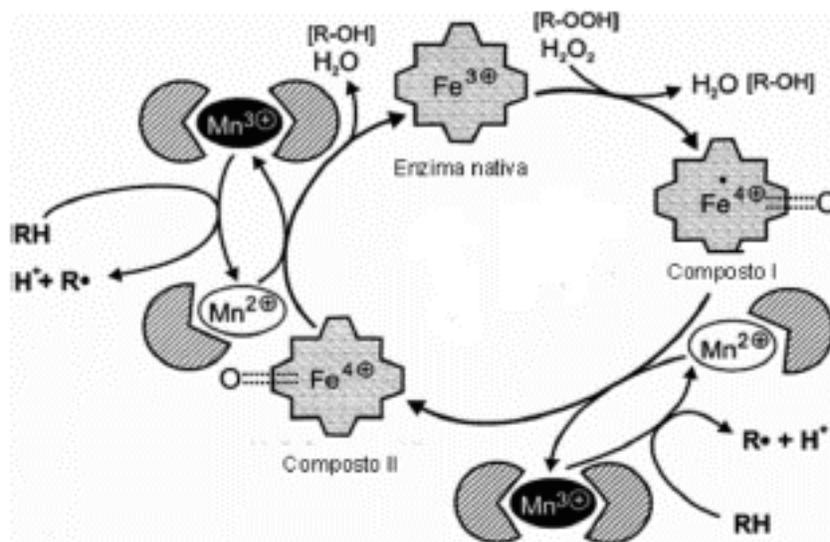


Figura 6. Ciclo catalítico das manganês peroxidases.

Fonte: Carvalho *et al.* (2009).

As lacases (Lac) são polifenol-oxidases que possuem a função de catalisar a oxidação de substratos fenólicos e não fenólicos, quando na presença de um mediador, tendo o O_2 molecular como agente para regeneração da forma ativa da enzima (Mcguirl & Dooley, 1999; Claus, 2004). Uma característica importante é a quantidade de hidrocarbonetos ligados covalentemente (10-45%), o que confere estabilidade à enzima.

De maneira geral, as lacases apresentam quatro átomos de cobre, distribuídos em diferentes sítios de ligação e classificados em três tipos: Cobre tipo 1, 2 e 3, caracterizando-se por propriedades específicas no mecanismo de catálise da enzima (Memillin *et al.*, 1997; Mcguirl & Dooley, 1999). De acordo com Call & Mücke (1997), o cobre do tipo 1 e 2 está envolvido na captura e transferência de elétrons. O cobre do tipo 2 e 3 está envolvido na ligação com o oxigênio.

Lacases são enzimas despolimerizantes de lignina que, por processo oxidativo (Figura 7), removem fenil-propano mais externo à cadeia, gerando radicais fenoxil. Esses radicais atuam em reações não catalíticas, como acoplamento radical-radical e desprotonação devido a ataques nucleofílicos pela água, levando a reações de polimerização, quebras alquílicas e oxidações nos C α e desmetilações. Alguns intermediários aromáticos de baixa massa molecular acabam sendo também liberados, resultando na despolimerização da lignina (Tien & Kirk, 1988).

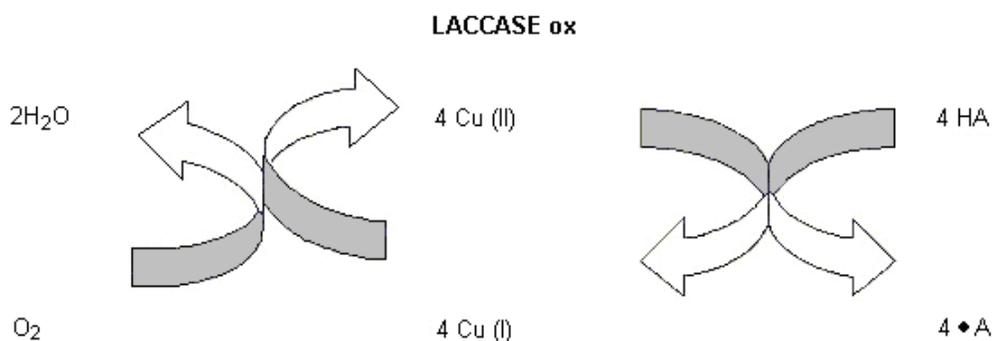


Figura 7. Mecanismo de oxidação catalizado por lacases.

Fonte: www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v52je06.htm.

A especificidade pelos substratos varia, dependendo da origem da enzima. Desta forma, lacases de diferentes fungos oxidam diferentes substratos, com velocidades de reação variadas (Freire *et al.*, 2001; Rosatto *et al.*, 2001). São inúmeras as aplicações industriais, entre elas, a deslignificação, despoluição ambiental (Schlosser *et al.*, 1997), aplicações médicas, oxidação de corantes e seus precursores enzimáticos, produção de derivados químicos a partir da lignina, entre outras. Devido ao fato de as lacases fúngicas serem em sua maioria extracelulares, termoestáveis e serem eficientes em uma ampla faixa de pH, apresentam maior número de

aplicações industriais quando comparadas com as produzidas por bactérias e plantas (Dwivedi *et al.*, 2011).

Algumas lacases isoladas e purificadas de basidiomicetos já foram relatadas com potencial de aplicação na área médica. Em estudo realizado por Wong *et al.* (2010), uma lacase de 66 kD isolada em *Pleurotus cornucopiae*, com atividade enzimática específica de $17,3 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ foi capaz de inibir a proliferação de células de leucemia L1210 e células de hepatoma humano HepG2. Além disso, também foi capaz de reduzir a atividade da transcriptase reversa do HIV-1. Em outro estudo, realizado por Xu *et al.* (2012), foi isolada uma lacase de 59 kD com atividade inibidora sobre a transcriptase reversa do HIV-1 (a partir de cultura líquida do cogumelo *Lentinus tigrinus*).

Lacases produzidas por fungos da degradação branca têm sido utilizadas na oxidação de alquenos, carbazol, N-etilcarbazol, fluoreno, e dibenzotiofeno (Niku & Viikari, 2000). Também possuem ação sobre aromáticos policíclicos (HPAs), que são tóxicos, carcinogênicos e contaminantes ambientais (Crawford & Crawford, 1996; Johannes *et al.*, 1998).

Na indústria têxtil as lacases podem ser utilizadas para melhorar a brancura de tecidos como o algodão possuindo vantagens como menor gasto de energia, produtos químicos e água (Tzanov *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2005). Possuem também aplicações para aumentar a resistência da lã (Lantto *et al.*, 2004).

Mais recentemente, Schmitt *et al.* (2012) avaliaram a capacidade de descoloração dos corantes utilizados na indústria têxtil, Disperse Red 343, Disperse Red 167 e Disperse Blue 148 pelo basidiomiceto *P. sajor-caju* PS-2001. Os resultados obtidos mostraram-se promissores, indicando que as enzimas oxidoreduases podem contribuir significativamente para o desenvolvimento de tecnologias envolvendo degradação de corantes.

2.4 Análise isoenzimática por eletroforese

Lacases fúngicas se organizam frequentemente como isoenzimas que se oligomerizam para formar complexos multiméricos. A massa molecular dos monômeros isoenzimáticos geralmente possuem cerca de 50 a 100 kDa.

Diferentes técnicas estão disponíveis para a realização de análise de proteínas (enzimáticas ou não), sendo a eletroforese em gel a mais simples e aplicável. Podemos definir eletroforese como a migração de modo diferencial das partículas carregadas eletricamente,

quando submetidas a um determinado potencial elétrico (Lopes, 1984).

Podem-se comparar proteínas sintetizadas por diferentes microrganismos fazendo-as correr em posição vizinha no gel durante um tempo determinado. Dessa forma, é possível visualizar no gel, as bandas referentes a cada proteína, de cada organismo, podendo diferenciá-las. Se houver apenas um tipo de enzima, apenas uma banda será vista no gel. Se a amostra contiver enzimas com diferentes cargas, diferentes tamanhos ou ainda diferentes configurações espaciais, serão separadas diversas frações, dando origem a diferentes bandas no gel (Medina Filho, 1983).

Levando em consideração que cada cadeia de aminoácidos de uma proteína é o produto de um só gene, estudos sobre isoenzimas permitem estimar o número de locos de uma população que apresenta múltiplos alelos e quantos estão em homozigose. Portanto, a eletroforese constitui-se em uma técnica que permite a detecção de alterações na estrutura das enzimas, que podem ter múltiplas formas moleculares, com variação na mobilidade eletroforética, porém, mantendo suas atividades catalíticas (Pires, 1983). Isoenzimas constituem-se em diferentes formas moleculares de uma proteína, que apresentam especificidade enzimática similar ou idêntica. O fenômeno da multiplicidade enzimática na maior parte das vezes é verificado através da técnica do zimograma, que fornece o padrão eletroforético para um determinado sistema enzimático (Lopes, 1984).

São muitas as vantagens da utilização da análise isoenzimática por eletroforese em estudos genéticos, entre elas, a determinação de bandas codificadas por genes alélicos e genes não alélicos, o emprego como marcadores, a possibilidade de contagem de locos que apresentam variação, entre outras (Pimentel, 1988).

2.5 Protoplastização em fungos

Diferentes técnicas podem ser utilizadas no melhoramento genético de fungos e entre algumas das principais podemos citar: o isolamento através de métodos convencionais, cruzamento monospórico, obtenção de protoplastos, mutagênese, fusão de protoplastos e seleção de linhagens. (Chang *et al.*, 1993).

Protoplastos são, por definição, todos os componentes de uma célula viva após remoção experimental da parede celular (Hawksworth *et al.*, 1995), geralmente por ação enzimática, podendo ser utilizados para fusão celular, mutagênese ou transformação. Bachman &

Bonner (1959) já referiam que o isolamento de protoplastos em microrganismos envolve a digestão total ou parcial da parede celular através da ação de enzimas que permitem a célula manter seu conteúdo através da membrana plasmática. Ao retirar-se a parede da célula, os protoplastos possibilitam a realização de manipulações envolvendo fusão, absorção de ácidos nucléicos ou processos difíceis de realizar com células intactas, como mutagênese.

Protoplastos de células fúngicas representam uma importante ferramenta na investigação genética e fisiológica do fungo (Prabavathy *et al.*, 2006). A manipulação genética pode ser realizada com sucesso através da fusão de protoplastos principalmente em fungos filamentosos que não possuem capacidade de reprodução sexual (Lalithakumari, 2000). Para cada fungo é realizada uma preparação com enzimas e estabilizadores osmóticos, cujas concentrações devem ser analisadas a fim de obter condições ideais para a preservação dos protoplastos e impedir a perda do seu material interno (Azevedo, 1998).

Estabilizadores osmóticos desempenham um importante papel na liberação e manutenção da integridade dos protoplastos (Hocart *et al.*, 1987; Mukherjee & Sengupta, 1988). Estabilizadores como sais e açúcares têm sido usados para estabilizar protoplastos liberados a partir do micélio. O tipo e a concentração do estabilizador podem influenciar o rendimento e a estabilidade dos protoplastos. Além disso, a molaridade dos estabilizadores também é de grande importância na regeneração destas células (Kelkar *et al.*, 1990; Gu & Ko, 2000). A regeneração de protoplastos serve como um sistema modelo para o estudo de vários processos celulares e especialmente nas células fúngicas sendo importante em experimentos de manipulação genética (Kim *et al.*, 2000).

Descendentes de organismos que foram submetidos à protoplastização são denominados protoclonos e podem ser utilizados em estudos morfológicos, em processos para dicariotização e em estudos envolvendo mutagênese e transformação gênica. Poucos estudos são encontrados na literatura envolvendo protoplastização de basidiomicetos para aumento da produtividade de basidiomas. Entre os disponíveis estão o realizado por Fukumasa-Nakai *et al.* (1994), que avaliaram protoclonos de *L. edodes* visando o aumento do crescimento micelial e da produtividade do basidioma. Os protoclonos exibiram variação nas taxas de crescimento do micélio vegetativo, porém, nenhuma diferença aparente na morfologia das colônias foi observada em comparação com a linhagem parental. Dos 134 protoclonos, quatro foram selecionados por produzir um aumento de 30-40% do rendimento em comparação ao parental. Foi verificada estabilidade na alta produtividade dos basidiomas após vários anos, sugerindo que a formação de

protoplastos pode ser utilizada para aumentar a variabilidade de linhagens quanto à capacidade de formação dos basidiomas. Magae *et al.* (1985), estudaram a capacidade de colônias originadas a partir da regeneração de protoplastos de *P. ostreatus* em desenvolver mais rapidamente o basidioma quando comparadas à linhagem parental, e demonstraram que a técnica de protoplastização e o processo de regeneração podem produzir variabilidade para o aumento da formação de basidiomas.

2.6 Mutagênese aplicada ao melhoramento genético em fungos

Os conhecimentos envolvendo eventos genéticos têm sido de grande importância para os propósitos de melhoramento de plantas, animais e microrganismos. A variabilidade genética é um dos mecanismos de evolução utilizados pelos seres vivos e pode ser alcançada pelos fungos através de mutação ou recombinação gênica, sendo a mutação, o principal mecanismo (Camargo, 1995).

A obtenção de mutantes diferentes do tipo selvagem ou parental é de grande importância para o estudo genético. O material genético dos microrganismos pode ser modificado de forma permanente, sendo possível transmitir a modificação aos seus descendentes. Essa modificação é chamada de mutação, que muitas vezes consegue distinguir o organismo mutante do seu organismo original (parental) por uma ou mais características genéticas. As mutações podem ser classificadas em mutação cromossômica ou mutação de ponto (Azevedo, 1998).

Sabendo que a ocorrência dos eventos mutacionais espontâneos é baixa, os programas objetivando o melhoramento genético em fungos utilizam técnicas que envolvem a indução das mutações para que haja aumento da variabilidade genética, por meio de agentes mutagênicos que podem ser físicos ou químicos (Vilas-Boas *et al.*, 1992). Alguns exemplos de agentes mutagênicos químicos utilizados são o ácido nitroso, as acridinas e a hidroxilamina. Os agentes físicos mutagênicos mais utilizados são as radiações ionizantes e a luz ultravioleta (Azevedo, 1998).

Luz ultravioleta (UV) é toda radiação com comprimento de onda (λ) entre 10 nm e 400 nm, menores que os da luz visível, e é classificada em diversas categorias segundo a faixa de λ em que se encontra. Os dois principais tipos de UV utilizados como agentes mutagênicos são a ultravioleta B (UVB) e a ultravioleta C (UVC). A UVB compreende a faixa de comprimento de 315 nm a 280 nm, que pode causar danos cromossômicos e mutações de ponto. A UVC possui comprimento de onda entre 280 nm – 100 nm, considerada a forma de radiação ultravioleta mais

mutagênica, sendo curto o tempo necessário para o estabelecimento de mutações (Rouessac & Rouessac, 2000).

A luz ultravioleta pode causar tanto mutações gênicas quanto mutações cromossômicas, dependendo da dose utilizada. Estudos mostram que a luz UV leva à formação de dímeros de pirimidinas no DNA, onde então, duas pirimidinas adjacentes são ligadas por um anel ciclobutano. Em pequena escala, a luz UV pode também hidratar a citosina, que então, passa a se comportar como uracila (Azevedo, 1998). A absorção máxima de UV pelo DNA ocorre no comprimento de onda de 254 nm e é neste comprimento de onda que ocorre a mutagenicidade máxima. A relação entre a taxa de mutação e a dose de UV é muito variável, dependendo do tipo de mutação, do organismo e das condições empregadas (Zaha, 1996).

Os mutantes obtidos podem ser classificados de acordo com as características fenotípicas. Podem ser mutantes auxotróficos, morfológicos, para patogenicidade, para locomoção e comportamento, para produção de substâncias de interesse, entre outros. Mutantes morfológicos são aqueles que apresentam modificações como coloração, tamanho da colônia quando comparados ao organismo parental. Em fungos, onde há uma maior complexidade de estruturas distintas, como formação de conídios e corpos de frutificação (basidiomas), os mutantes morfológicos mais encontrados são os que apresentam modificações em suas estruturas reprodutivas (Azevedo, 1998).

Diante das informações contidas nesta revisão bibliográfica, verifica-se que para *Pleurotus* sp. e *Lentinula edodes* estão disponíveis informações quanto a produção de basidiomas e enzimas fenol-oxidases, porém, ainda são poucos os trabalhos que utilizam técnicas de melhoramento genético para a obtenção de variantes que apresentem maior secreção de fenol-oxidases e maior produtividade de basidiomas, justificando o presente estudo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens

As linhagens dicarióticas utilizadas neste trabalho foram: *Lentinula edodes* LE-06 e *Pleurotus sajor-caju* PS-2001, ambas pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Enzimas e Biomassas - Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul-RS.

3.2 Composições dos meios de cultivo em placa.

Os meios de cultivo foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos e suas formulações são descritas nos subitens abaixo. Os componentes dos meios foram suspensos em água destilada conforme o volume necessário.

3.2.1 Meio serragem de *Pinus* sp. (SP)

Composto por 2% (m/v) farelo de trigo, 2% (m/v) serragem de *Pinus* sp., 0,2% (m/v) CaCO₃ e 2% (m/v) de ágar. A serragem utilizada é proveniente de uma indústria madeireira da região de Caxias do Sul-RS.

3.2.2 Meio serragem de *Eucalyptus* sp. (SE)

Composto por 2% (m/v) farelo de trigo, 2% (m/v) serragem de *Eucalyptus* sp., 0,2% (m/v) CaCO₃ e 2% (m/v) ágar. A serragem utilizada é proveniente de uma serralheria da cidade de Flores da Cunha – RS.

3.2.3 Meio BDA (ágar batata dextrose)

Composto por água de fervura de 250g de batatas brancas (tipo inglesa) em 1L de água destilada (fervura durante 20 minutos em micro-ondas), 1% (m/v) de glicose e 2% (m/v) de ágar.

3.2.4 Meio BDA com corante

Composto pelo meio BDA adicionado de 0,01% (m/v) do corante Reactive Blue 220.

3.2.5 Meio sólido para regeneração dos protoplastos (MYG)

Composto por 2% (m/v) de extrato de malte, 0,2% (m/v) de extrato de levedura, 2% (m/v) de dextrose, 2% (m/v) de ágar e 0,6 mol.L⁻¹ de sacarose.

3.3 Composições dos meios para cultivo submerso

Os meios de cultivo submerso foram esterilizados em autoclave a 121°C por 15 minutos e suas formulações são descritas nos subitens abaixo. Os componentes dos meios foram suspensos em água destilada conforme o volume necessário.

3.3.1 Caldo MYPG

Composto por 0,3% (m/v) de extrato de levedura, 0,3% (m/v) de extrato de malte, 0,5% (m/v) de peptona bacteriológica e 1% (m/v) de glicose.

3.3.2 Caldo CEM (3% (m/v) de extrato de malte e 0,3% (m/v) de peptona de soja.

3.3.3 CBDY (caldo batata dextrose)

Para 1 L de mio, foi utilizado caldo coado obtido do cozimento de 250g de batatas em 1L de água destilada, adicionado de 1% (m/v) de dextrose e 0,15% (m/v) de extrato de levedura.

3.3.4 CFS (caldo de farelo e serragem)

Composto por 50% (v/v) água de farelo de trigo (25g de farelo de trigo fervidos em água destilada e filtrada durante 15 minutos), 50% (v/v) água de serragem de *Eucalyptus* sp. (25g de serragem fervidos em água destilada e filtrada durante 15 minutos) e 1% (m/v) de extrato de malte.

3.4 Substratos para cultivos em estado sólido e cultivo de basidiomas

O substrato utilizado para cultivos em estado sólido visando a secreção de enzimas e também para os cultivos de basidiomas foi constituído de 94% (m/m) de serragem de *Pinus* sp. (para *Pleurotus*) ou *Eucalyptus* sp. (para *Lentinula*) e 5% (m/m) de farelo de trigo e 1% (m/m) de CaCO₃. O substrato misturado e homogeneizado com a adição de água destilada até obtenção de 66% de umidade foi autoclavado a 121°C durante duas horas.

3.5 Procedimentos experimentais

3.5.1 Manutenção das linhagens

Os meios utilizados para a manutenção das linhagens de *L. edodes* foram o SE (item 3.2.2) e BDA (item 3.2.3). Para as linhagens de *P. sajor-caju* os meios utilizados foram o SP (item 3.2.1) e BDA (item 3.2.3). Os repiques foram realizados conforme necessário, no mínimo

uma vez por mês. As placas foram mantidas em estufa a 28°C até a total colonização das placas pelo micélio.

3.5.2 Obtenção e regeneração de protoplastos

A solução enzimática para lise da parede celular e obtenção dos protoplastos foi constituída de: enzima comercial Viscozyme[®] (adquirida da Novozymes) diluída em tampão citrato 0,05 mol.L⁻¹ e 0,6 mol.L⁻¹ de sacarose. Viscozyme[®] é um complexo multi-enzimático que contém uma vasta gama de carbohidrases, incluindo arabanase, celulase, β -glucanase, hemicelulase, e xilanase. A solução foi esterilizada através da filtração utilizando membrana GS em éster de celulose com poros de 0,22 μ m da Millipore[®].

Para obtenção dos protoplastos foi realizado um cultivo das linhagens em meio CEM durante seis dias para *P. sajor-caju* e 14 dias para *L. edodes* a 28°C sob agitação de 180 rpm/min (o inóculo foi realizado com raspas de micélio de três discos de 1,5 cm de diâmetro). Depois de crescido, o micélio foi filtrado utilizando papel filtro, e um grama de massa fúngica foi separado em frascos Duran estéreis, onde foram adicionados 5 mL de solução enzimática 5% e mantidos em agitador orbital a 50 rpm na temperatura de 28 °C , durante 3 h.

Para os testes de obtenção, foram realizados experimentos utilizando soluções da enzima nas concentrações de 3, 5 e 10%. Também foram variados os tempos de ação enzimática (1, 2, 3 e 4 h) utilizando a concentração fixa de 5% da enzima.

A separação de protoplastos do micélio foi realizada através de filtragem com tecido de poliéster com poros menores que 10 μ m. Os protoplastos foram lavados uma vez com solução do estabilizador osmótico contendo sacarose 0,6 mol.L⁻¹ através de centrifugação durante 15 min e o precipitado ressuspenso em solução de sacarose 0,6 mol.L⁻¹.

A contagem dos potoplastos foi realizada em hemocitômetro. Após a contagem, as suspensões dos protoplastos foram plaqueadas em um volume de 150 μ L por placa com o auxílio de uma alça de Drigalski no meio de regeneração MYG. As placas foram mantidas em estufa a 28 °C por tempo suficiente para o aparecimento de colônias.

3.5.3 Indução de mutantes utilizando radiação UV-C

A contagem dos potoplastos foi realizada em hemocitômetro. Após a contagem, as suspensões dos protoplastos foram divididas em dois volumes, contendo 3 mL cada, onde a primeira foi plaqueada com o auxílio de uma alça de Drigalski imediatamente no meio de regeneração (150 μ L por placa) e considerada como controle e a segunda foi vertida em uma

placa de Petri e irradiada com luz UV (lâmpada Philips UV-C, 30W), com ausência de luz branca, em uma distância de 15 cm da lâmpada. Para o teste de mortalidade dos protoplastos, realizado anteriormente à mutagênese, os tempos em contato com a radiação UV foram: 15, 20, 25, 30 e 60 s. O tempo de radiação para a mutagênese foi 20 s para *L. edodes* e 30 s para *P. sajor-caju*. Após a irradiação, a suspensão foi plaqueada no meio de regeneração MYG (item 3.2.5) em um volume de 150 µL por placa. As placas foram mantidas em estufa a 28 °C por tempo suficiente para o aparecimento de colônias.

3.5.4 Seleção dos protoclonos e mutantes com maior relação halo/colônia e maior diâmetro micelial

Após a regeneração das colônias, as mesmas foram repicadas para meio BDA contendo 0,01 % do corante Reactive Blue 220. Após o crescimento, 100 colônias de cada fungo (*L. edodes* e *P. sajor-caju*), sendo 50 protoclonos e 50 protoclonos após radiação UV, foram repicadas novamente para placas contendo o mesmo meio de cultivo e incubadas em estufa a 28 °C. A nomenclatura adotada foi: protoclonos – PS ou LE seguido apenas de número; protoclonos após radiação UV – PS ou LE seguido de UV seguido de número. Foram medidos os diâmetros dos halos de descoloração do corante e também o diâmetro dos halos de crescimento. As medições dos halos foram realizadas em seis repetições, diariamente, durante quatro dias, utilizando paquímetro. Após o término das medições dos halos, foi calculada a relação entre o halo de descoloração do corante e o crescimento micelial (diâmetro do halo de descoloração/diâmetro do halo de crescimento micelial).

Os clones selecionados no primeiro processo de seleção foram submetidos a um segundo processo de seleção em placa, de maneira igual ao primeiro, a fim de verificar a estabilidade dos parâmetros avaliados nos protoclonos e mutantes.

3.5.5 Cultivo submerso de *L. edodes* LE-06 e *P. sajor-caju* PS-2001 em diferentes meios

As linhagens parentais *L. edodes* – LE-06 e *P. sajor-caju* – PS-2001 foram cultivadas em diferentes meios, (CBDY, CEM, MYPG e CFS). Frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL de cada meio, foram inoculados com raspas de micélio de três discos de 1,5 cm, retirados de placas contendo meio de serragem de *Pinus* sp. (*Pleurotus*) e serragem de *Eucalyptus* sp. (*Lentinula*) e fechados com camadas de gase e algodão. Os frascos foram mantidos em agitador recíproco de 180 rpm a 28 °C. O cultivo foi mantido até o 21º dia, sendo as coletas realizadas no 7º, 14º e 21º dias. O experimento foi realizado em duplicata. Para obtenção do extrato

enzimático, o conteúdo dos frascos foi filtrado em papel filtro. O micélio foi utilizado para a determinação da biomassa fúngica e o extrato líquido foi utilizado para as análises enzimáticas.

3.5.6 Cultivos para caracterização dos protoclonos e mutantes quanto ao crescimento e secreção de fenol-oxidases

3.5.6.1 Cultivo submerso

Frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 100 mL de caldo CBDY, foram inoculados com três discos de micélio de 1,5 cm, retirados de placas contendo meio BDA e fechados com camadas de gase e algodão. Os frascos foram mantidos em agitador recíproco de 180 rpm a 28 °C. O cultivo foi mantido até o 20º dia, sendo as coletas realizadas no 5º, 10º, 15º e 20º dias. O experimento foi realizado em triplicata. Para obtenção do extrato enzimático, o conteúdo dos frascos foi filtrado em papel filtro. O micélio foi utilizado para a determinação da biomassa fúngica e o extrato líquido foi utilizado para as análises enzimáticas.

3.5.6.2 Cultivo em estado sólido

Frascos de 100 mL contendo 15 g do substrato sólido úmido foram autoclavados a 1 ATM, durante 2 h. Após esfriarem, foram inoculados com um disco de micélio de 1,5 cm retirados de placas com meio SP para *P. sajor-caju* e SE para *L. edodes*. Após a inoculação, os frascos foram fechados com camadas de gase e algodão e mantidos em estufa a 25 °C durante oito dias.

Para a obtenção do extrato enzimático (coletas), o conteúdo dos frascos foi homogeneizado manualmente e alíquotas do substrato foram suspensas em água destilada na proporção 1:2 (m/v), agitadas por 30 min a 180 rpm a 4 °C. O extrato aquoso foi obtido após remoção dos sólidos por filtração em papel filtro e centrifugação a 3000 rpm por 30 min. Para a determinação da umidade, 1 g do substrato foi mantido em estufa para secagem até peso constante. As coletas foram realizadas no 2º, 4º, 6º e 8º dias e o experimento foi realizado em triplicata. A umidade do substrato foi determinada gravimetricamente, após secagem em estufa a 60 °C até peso constante.

3.6 Determinações enzimáticas e de proteínas totais

Foram determinadas as atividades enzimáticas de lacases (Lac) em todas as coletas dos cultivos (a cada dois dias para o cultivo em estado sólido e a cada cinco dias para o cultivo submerso). A concentração de biomassa fúngica foi determinada em todas as coletas do cultivo submerso e apenas na última coleta do cultivo em estado sólido (8º dia de cultivo). O perfil de lacases foi relacionado com a biomassa. No tempo do pico de atividade de Lac, foram determinadas as atividades de: manganês peroxidases (MnP), lignina peroxidases (LiP), oxidases do álcool veratrílico (OAV) e também, a concentração de proteínas totais.

As atividades enzimáticas foram expressas em unidades internacionais por mL ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) para os cultivos submersos e em unidades internacionais por grama de massa seca do substrato ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$) para os cultivos em estado sólido.

3.6.1 Atividade de lacases

A atividade de lacases foi determinada com o uso do substrato 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS) na concentração de 0,02%. A análise foi realizada em microplacas de 96 poços da marca TPP. A mistura reacional continha 0,18 mL de tampão acetato de sódio 0,2 M pH 5,0, 0,18 mL de amostra e 0,04 mL de ABTS. A oxidação do ABTS foi monitorada pelo aumento da absorbância em 420 nm utilizando espectrofotômetro (Spetra MAX 190 da Molecular Devices), durante 90 s, com leituras a cada 5 s em temperatura de 25 °C. Para os cálculos, utilizou-se o coeficiente de extinção molar $\epsilon = 3,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Wolfenden & Wilson, 1982). Uma unidade enzimática corresponde à quantidade (μmol) de produto liberado por minuto por mL de amostra.

3.6.1.2 Cálculo da atividade de lacases com relação à biomassa fúngica

A atividade de lacases relacionada à concentração de biomassa fúngica foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Ab}_{\text{Lac}} = U/[X]$$

Onde:

Ab_{Lac} = atividade de lacases relacionada à biomassa fúngica ($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$)

U = unidades enzimáticas de lacases ($\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$)

[X] = concentração de biomassa fúngica ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)

Os resultados foram expressos em unidades enzimáticas de lacases por grama de biomassa micelial (U.g^{-1}).

3.6.2 Manganês peroxidases (MnP)

A atividade de MnP foi determinada pelo método proposto por Kuwahara *et al.* (1984). A mistura reacional de 1,54 mL consistia de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de vermelho de fenol, $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de sulfato de manganês, $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de H_2O_2 , $12,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de lactato de sódio, $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de albumina bovina em tampão succinato de sódio pH 4,5, sendo adicionados 0,5 mL de amostra. Após 5 min a 30°C , as reações foram interrompidas pela adição de $40 \mu\text{L}$ de $\text{NaOH } 2 \text{ mol.L}^{-1}$. A formação do produto de oxidação foi quantificada pela variação da absorbância (610 nm) utilizando espectrofotômetro, sendo considerado como branco uma amostra em tempo zero de reação (o branco consistiu na mistura reacional adicionada de NaOH no tempo zero de reação). Para os cálculos utilizou-se o coeficiente de extinção molar $\epsilon = 4,46 \times 10^4 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar $1 \mu\text{mol}$ de vermelho de fenol por mL de amostra por minuto.

3.6.3 Lignina peroxidases (LiP)

A atividade de LiP foi determinada pela formação de veratrilaldeído ($\epsilon = 9,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), numa mistura reacional realizada em placas de 96 poços, contendo 0,15 mL de amostra, 0,10 mL de H_2O_2 2 mmol.L^{-1} , 0,15 mL de álcool veratrílico em 4 mmol.L^{-1} em tampão tartarato de sódio 250 mmol.L^{-1} pH 3,0 (Tien & Kirk, 1984). As reações foram iniciadas pela adição de 0,15 mL de amostra e a variação de absorbância, utilizando espectrofotômetro, observada durante 5 min, a 30°C . Uma unidade enzimática corresponde à quantidade de enzima que oxida $1 \mu\text{mol}$ de álcool veratrílico por mL de amostra por minuto.

3.6.4 Oxidases do álcool veratrílico (OAV)

Para a determinação da atividade de OAV, foi observada a formação de veratrilaldeído a partir de uma reação contendo 0,2 mL de amostra, 0,2 mL de álcool veratrílico 2 mmol.L^{-1} em tampão tartarato de sódio 250 mmol.L^{-1} pH 5,0. As reações foram realizadas em placas de 96 poços e monitoradas utilizando espectrofotômetro durante 5 min, a 30°C , utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar $\epsilon = 9,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (Bourbonnais & Paice, 1988).

3.6.5 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

utilizando espectrofotômetro (Bradford, 1976). A mistura reacional continha 1 mL de amostra (diluído quando necessário) e 0,5 mL de reagente de Bradford. A mistura foi agitada e incubada em temperatura ambiente durante 10 min quando a leitura foi iniciada. A concentração foi estimada correlacionando a absorbância das amostras a uma curva padrão de albumina bovina com concentrações entre 2 a 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

3.7 Determinações de biomassa fúngica

3.7.1 Cultivos submersos

Filtros de papel *Whatman* n° 1 foram secos em estufa de secagem a 60 °C durante 24 h seguido de 1 h em dessecador. Depois de secos, foram pesados em balança analítica e acoplados a um funil. O conteúdo de cada frasco foi filtrado e os filtros contendo apenas o micélio foram colocados em estufa de secagem a 60 °C por 48 h seguido de 1 h em dessecador. Após isso, os filtros foram pesados, e o peso inicial do filtro foi descontado para obtenção do peso micelial.

3.7.2 Cultivos em estado sólido

A biomassa fúngica dos cultivos sólidos foi medida indiretamente conforme metodologia adaptada de Bittencourt *et al.* (2002). 200 mg de substrato (para *Pleurotus*) e 300 mg (para *Lentinula*) foram retirados em triplicata dos frascos para cada linhagem testada, homogeneizados e secos em estufa a 60 °C. As alíquotas foram transferidas para tubos de ensaio e tratadas com 3 mL de tampão citrato ($0,05 \text{ mol.L}^{-1}$) em ultra-som ($f = 40 \text{ kHz}$, $P = 81 \text{ W}$) por 1 h. Após, foram acrescentados 2 mL de uma solução 15% (v/v) da enzima Viscozyme® diluída em tampão citrato de sódio ($0,05 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 4,8). As amostras, em triplicata, foram mantidas em banho agitado por 24 h, em temperatura de 45 °C a 40 rpm, sendo posteriormente retiradas para a dosagem de N-acetilglicosamina.

A hidrólise enzimática foi interrompida através de fervura dos tubos a 100 °C, durante 5 min. As amostras foram retiradas e centrifugadas por 30 min 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 foi 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 mol.L⁻¹ 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 ($\lambda = 583$ 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 μ L, completando-se com água destilada até um volume final de 500 μ L, para reação com 3 mL da solução de DMAB.

Mesmo sem ser conhecida uma curva relacionando as concentrações de N-acetilglicosamina com a biomassa de *P. sajor-caju* PS-2001 e *L. edodes* LE-06, a partir das concentrações obtidas de N-acetilglicosamina, é possível comparar o crescimento entre o parental e seus clones dentro de uma mesma espécie, uma vez que estas concentrações estimam a quantidade de quitina (constituente da parede celular fúngica) presente no substrato analisado.

3.8 Determinação de pH dos extratos enzimáticos

A determinação do potencial hidrogeniônico (pH) dos extratos enzimáticos foi realizada utilizando-se um pH-metro pHtek.

3.9 Produção de basidiomas

A produção dos basidiomas foi realizada em sacos de polipropileno (15 x 25 cm) contendo 200 g do substrato sólido úmido (item 3.4). Cada saco de cultivo foi autoclavado a 1 ATM, durante 2 h. Após os sacos esfriarem, foram inoculados em capela de fluxo laminar com 3 discos de micélio de 1,5 cm, fechados (amarrados com borrachas) e mantidos em câmara de crescimento com temperatura de 25 ± 2 °C até completa colonização do substrato pelo micélio. Para *P. sajor-caju*, após a total colonização, cada saco recebeu pequenas perfurações quando então, foram transferidos para a sala de frutificação com temperatura próxima a 25 °C e controle de umidade. Para *L. edodes*, após a total colonização dos sacos, os mesmos permaneceram em geladeira a 4 °C durante 48 h para a indução da formação dos basidiomas. Após esta etapa, foram perfurados e transferidos para a sala de frutificação, localizada no Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, com temperatura controlada entre 15 e 20 °C (Figura 8).

A umidade dos basidiomas foi determinada gravimetricamente, após secagem em estufa a 60 °C até peso constante.



Figura 8. Sala de frutificação dos basidiomas.

3.9.1 Parâmetros de produção dos basidiomas

Os cogumelos foram coletados manualmente e as variáveis avaliadas foram rendimento, eficiência biológica e produtividade, calculados conforme cálculos propostos por Yildiz *et al.*, (2002) ao final do primeiro fluxo de produção em cada clone e linhagem parental. Os valores foram calculados a partir da média das massas dos basidiomas de três sacos de cada linhagem.

3.9.1.1 Rendimento (R)

O rendimento foi determinado utilizando-se a seguinte fórmula:

$$R = \frac{\text{Massa fresca dos cogumelos}}{\text{Massa fresca do substrato (inicial)}} \times 100$$

Os dados de rendimento foram expressos em porcentagem.

3.9.1.2 Eficiência biológica (Eb)

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

$$EB = \frac{\text{Massa fresca dos cogumelos}}{\text{Massa fresca do substrato}} \times 100$$

Os dados de eficiência biológica foram expressos em porcentagem.

3.9.1.3 Produtividade (P)

A produtividade foi determinada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$P = \frac{\text{Eficiência biológica}}{\text{Número total de dias de cultivo}}$$

Os dados de produtividade foram expressos em grama de basidioma por grama de substrato por dia.

3.10 Zimogramas para lacases

Para a detecção da atividade de lacases sobre ABTS, foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida (8,5cm x 7,5 cm). O gel SDS foi realizado segundo metodologia descrita por Laemmli (1970).

As amostras foram precipitadas em microtubos de 1,5 mL utilizando acetona em uma proporção de 1:2, a mistura permaneceu a -20 °C durante 30 min. Os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm durante 30 min e a acetona foi retirada. Aos precipitados foram adicionados 30 µL de tampão amostra e agitados em vórtex para homogeneização. Foram utilizados 10µL do marcador Precision Plus Protein™ Standards All Blue (Bio-Rad). Nas canaletas do gel foram aplicados 25 µL de cada amostra. A corrida eletroforética foi realizada em cuba vertical Bio Rad Mini-Protean® Tetra System a 200 V por aproximadamente 1:30 h.

Para a atividade de coloração de atividade de lacase, o SDS foi removido do gel por lavagem do gel em temperatura ambiente, em solução de Triton X-100® na concentração de 2,5%, com agitação de 50 rpm durante 30 min. Após esta etapa, o Triton foi retirado e ao recipiente contendo o gel foi adicionado tampão acetato de sódio, pH 5,0 em temperatura ambiente por 10 min com agitação de 50 rpm. O tampão foi retirado e ao recipiente contendo o gel foi adicionado novamente tampão acetato de sódio, pH 5 na temperatura de 40 °C durante 10 min. Após esta etapa o gel foi transferido para uma placa de vidro ficando em contato com uma camada de ABTS-ágar (0,02 g de ABTS, 0,4 g de ágar, 40 mL de água, aquecida até dissolver o ágar). Essas camadas foram incubadas por cerca de 10 min, até o surgimento das bandas de cor verde, indicando a atividade de lacases.

3.11 Análise Estatística

Os dados obtidos, quando necessário, foram comparados pela análise da variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey tendo como nível de significância $p \leq 0,05$. Foi utilizado para as análises o software **GraphPad Prism[®] 5.0**.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados referentes aos experimentos realizados no presente estudo, onde as linhagens parentais de *Pleurotus sajor-caju* e *Lentinula edodes* foram submetidas à protoplastização e mutagênese com o intuito de obter variantes genéticos com aumento da secreção de enzimas fenol-oxidases e também com maior produtividade de basidiomas.

Inicialmente serão apresentados os resultados referentes à obtenção e regeneração dos protoplastos e mortalidade em relação ao tempo de tratamento com radiação UV, desenvolvidos a fim de verificar as melhores condições, entre as testadas para os experimentos visando à obtenção de clones. Os resultados posteriores estão divididos em dois itens. O primeiro sobre os experimentos realizados com os protoclonos e mutantes de *P. sajor-caju* e o segundo referente aos resultados dos protoclonos e mutantes de *L. edodes*.

Após o isolamento das colônias obtidas a partir dos protoplastos regenerados, serão apresentados os resultados sobre o processo de seleção em placas contendo corante Reactive Blue 220. Este experimento teve como objetivo o isolamento dos clones com potencial para maior secreção de fenol-oxidases, além de clones com crescimento micelial mais rápido em relação às linhagens parentais.

Em seguida são apresentados os dados de cultivos em estado sólido e submerso para a avaliação da capacidade de crescimento e secreção enzimática, e análise isoenzimática de lacases. No final, são apresentados os dados obtidos a partir dos cultivos em sacos de polipropileno para a avaliação da produtividade de basidiomas dos protoclonos e mutantes em relação aos parentais.

4.1 Determinação de condições para obtenção e regeneração de protoplastos de *P. sajor-caju* e *L. edodes*

Na Figura 9, são apresentados os resultados referentes ao teste de obtenção dos protoplastos utilizando diferentes concentrações da enzima Viscozyme[®]. Tanto para *L. edodes* (Figura 9B) quanto para *P. sajor-caju* (Figura 9A), a maior concentração enzimática avaliada

(10% (v/v) da enzima) possibilitou o maior número de protoplastos. Para *L. edodes*, o número médio de protoplastos obtido nesta concentração foi $2,7 \times 10^6$ prot. mL⁻¹ e em *P. sajor-caju* o número foi $2,54 \times 10^6$ prot. mL⁻¹. Na concentração de 3% (v/v), o número de protoplastos obtidos foi $1,53 \times 10^6$ prot. mL⁻¹ em *L. edodes* e $1,08 \times 10^6$ prot. mL⁻¹ em *P. sajor-caju*. Na concentração de 5% (v/v), o número de protoplastos em *L. edodes* foi $1,92 \times 10^6$ prot. mL⁻¹ e em *P. sajor-caju* $1,41 \times 10^6$ prot. mL⁻¹. Observa-se aumento crescente no número de protoplastos obtidos conforme o aumento das concentrações enzimáticas testadas.

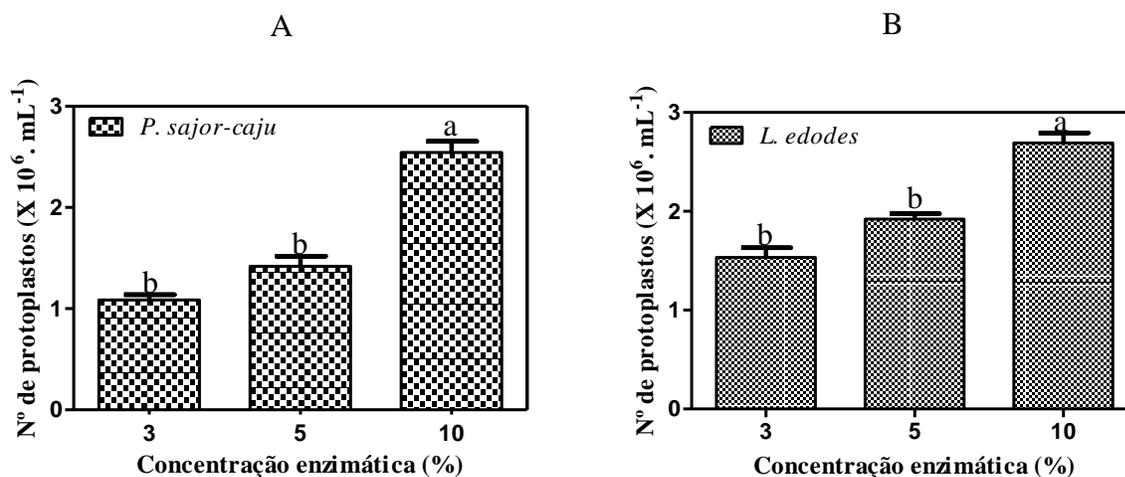


Figura 9. Número de protoplastos obtidos em *P. sajor-caju* PS-2001 (A) e *L. edodes* LE-06 (B) nos tratamentos com diferentes concentrações da enzima Viscozyme[®] (3, 5 e 10%). Os valores correspondem à média de duas replicatas e as barras ao desvio padrão. As legendas referem-se às linhagens parentais de *L. edodes* e *P. sajor-caju* e os resultados são referentes à obtenção de protoplastos utilizando diferentes concentrações enzimáticas: 3, 5 e 10%. Letras iguais nas colunas não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A liberação dos protoplastos está relacionada com diversos fatores. Entre eles, a composição da parede celular de cada espécie, a idade micelial, o tipo de estabilizador osmótico utilizado, a enzima, temperatura, entre outros (Gu & Ko, 2000).

Observou-se nas concentrações da enzima de 3 e 5%, os protoplastos apresentaram-se mais volumosos, indicando maior integridade celular já que na concentração de 10% da enzima, apesar do rendimento de protoplastos ter sido maior, os mesmos apresentaram-se com média de tamanho inferior às demais concentrações. Desta maneira, a concentração de 5% da solução

enzimática foi escolhida para a realização dos próximos testes, uma vez que para uma maior regeneração dos protoplastos é necessário que ainda exista restos de parede celular. De maneira geral, os protoplastos de *P. sajor-caju* e *L. edodes* apresentaram tamanhos variados, como observado na Figura 10.

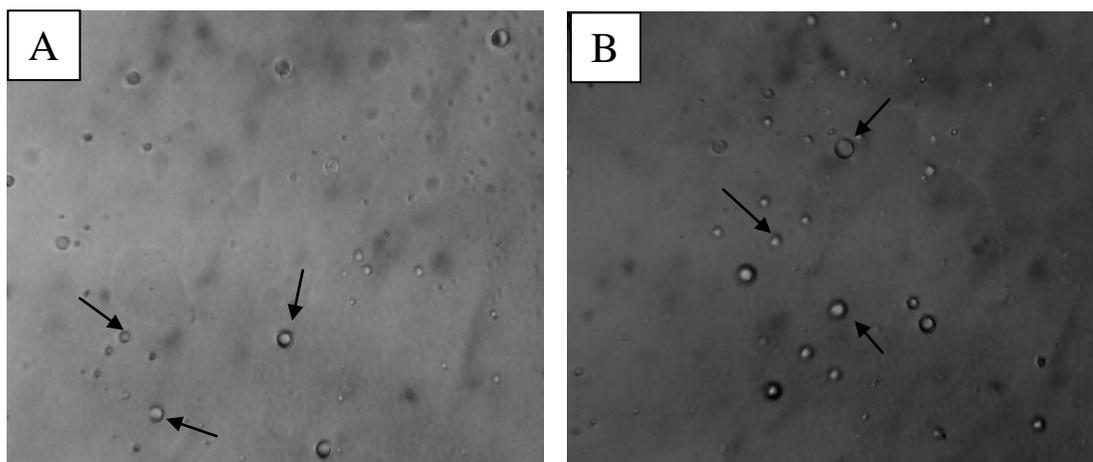


Figura 10. A) protoplastos de *L. edodes*; B) protoplastos de *P. sajor-caju*. As imagens referem-se aos protoplastos obtidos com solução de Viscozyme[®] na concentração de 5% em três horas de tratamento visualizadas em aumento de 400x.

Na Figura 11 estão representados os resultados do experimento onde objetivou-se verificar a liberação de protoplastos de *P. sajor-caju* (Figura 11A) e *L. edodes* (Figura 11B) em diferentes tempos de ação enzimática utilizando a concentração de 5% da enzima Viscozyme[®]. O número de protoplastos liberados por *L. edodes* em relação ao tempo de ação enzimática foi: $0,53 \times 10^6$ prot. mL⁻¹, $1,64 \times 10^6$ prot. mL⁻¹, $2,05 \times 10^6$ prot. mL⁻¹ e $2,776 \times 10^6$ prot. mL⁻¹ para os tempos de 1, 2, 3 e 4 horas, respectivamente. O número de protoplastos liberados por *P. sajor-caju* foi: $0,58 \times 10^6$ prot. mL⁻¹, $0,88 \times 10^6$ prot. mL⁻¹, $1,44 \times 10^6$ prot. mL⁻¹ e $2,09 \times 10^6$ prot. mL⁻¹ nos tempos de 1, 2, 3 e 4 horas, respectivamente. Observa-se aumento crescente no número de protoplastos obtidos conforme o aumento nos tempos de ação enzimática.

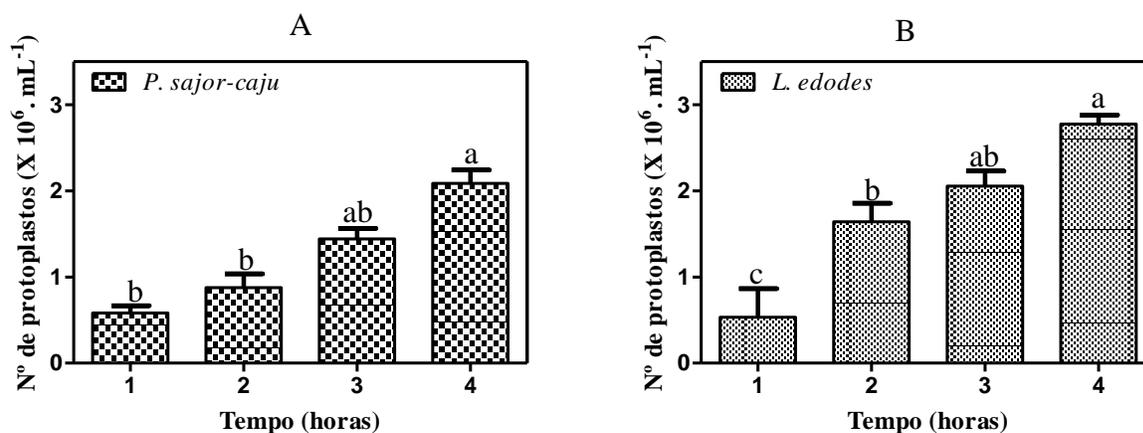


Figura 11. Número de protoplastos obtidos em *P. sajor-caju* PS-2001 (A) e *L. edodes* LE-06 (B) nos tratamentos com diferentes tempos de ação da enzima Viscozyme[®] a 5%. Os valores correspondem à média de duas replicatas e as barras ao desvio padrão. As legendas referem-se às linhagens parentais de *L. edodes* e *P. sajor-caju* e os resultados são referentes à obtenção de protoplastos utilizando diferentes tempos de ação enzimática (1, 2, 3 e 4 horas). Letras iguais nas colunas não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Eyini *et al.* (2006) mostraram que para os fungos *P. pulmonarius* e *P. florida*, a mistura de enzimas líticas (celulase comercial, pectinase bruta, e quitinase bruta) foi mais eficiente na liberação de protoplastos que a utilização da enzima celulase comercial isoladamente, sendo o rendimento máximo de $6,0 \times 10^7$ prot. mL⁻¹ e $5,42 \times 10^7$ prot. mL⁻¹, respectivamente.

Não foram encontrados estudos envolvendo a utilização da enzima Viscozyme[®] para a obtenção de protoplastos de fungos, esta é utilizada em misturas com outras enzimas para a protoplastização em plantas. Portanto, este estudo vem a contribuir com dados iniciais sobre a possibilidade e eficácia da utilização desta enzima em processos biotecnológicos visando a protoplastização de fungos filamentosos.

Após o plaqueamento dos protoplastos no meio de regeneração MYG, observou-se que o aparecimento de colônias após a regeneração dos protoplastos de *P. sajor-caju* iniciou-se no quarto dia (após o plaqueamento), enquanto as colônias de *L. edodes* foram mais tardias, aparecendo no sexto dia. Entretanto, as colônias regeneradas de ambas as espécies apresentaram tamanhos variados (Figura 12) e algumas colônias com aspecto diferenciado como, por exemplo, maior ou menor compactação do miélio.

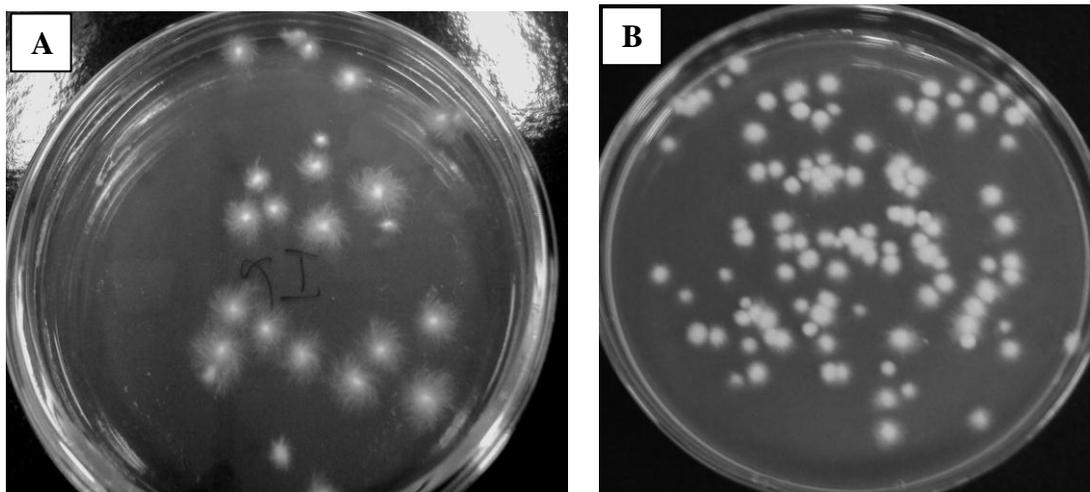


Figura 12. Colônias obtidas a partir da regeneração dos protoplastos de: **A** - *L. edodes* após dez dias do plaqueamento e **B** - *P. sajor-caju* após oito dias do plaqueamento.

Sobre a regeneração de protoplastos, Zhao & Chang (1993) observaram em *P. florida* e *P. sajor-caju*, que o tempo necessário para a regeneração de protoplastos foi de três e quatro dias, respectivamente, na temperatura de 30 °C. Neste mesmo estudo, foi observada uma maior taxa de regeneração (9,6%) em *P. florida* quando comparadas com as de *P. sajor-caju* e *L. edodes*, que tiveram frequência de regeneração de 2,4% e 0,96% respectivamente. Magae *et al.* (1985) em estudo com *P. ostreatus*, as colônias após a regeneração dos protoplastos tornaram-se visíveis entre 6 a 7 dias de incubação a 24 °C.

A regeneração dos protoplastos, como se observa na Figura 13, foi inversamente proporcional ao tempo de ação enzimática. Protoplastos de *L. edodes* (Figura 13 B) apresentaram taxa de regeneração de 0,13 %, valor menor que o observado para protoplastos de *P. sajor-caju* (Figura 13A), com valores de 0,305 %, no mesmo tempo de ação enzimática (3 h). Desta maneira, aliando os resultados da obtenção e da regeneração, foi escolhido o tempo de 3 horas de ação enzimática, com a concentração de 5% da enzima para as posteriores obtenções de protoplastos.

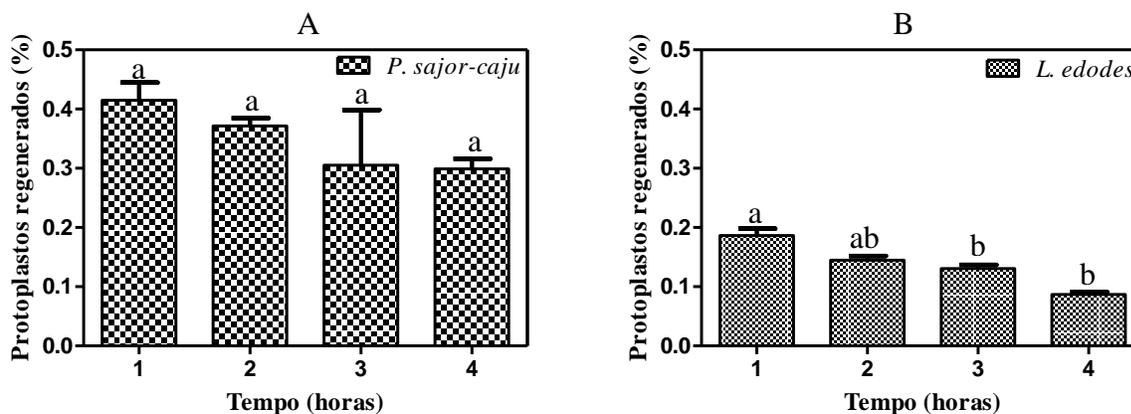


Figura 13. Protoplastos regenerados (%) em *P. sajor-caju* PS-2001 (A) e *L. edodes* (B) nos tratamentos com diferentes tempos de ação da enzima Viscozyme® 5%. Os valores correspondem à média de duas replicatas e as barras ao desvio padrão. As legendas referem-se às linhagens parentais de *L. edodes* e *P. sajor-caju* e os resultados são referentes à regeneração dos protoplastos em função dos diferentes tempos de ação enzimática (1, 2, 3 e 4 horas). Letras iguais nas colunas não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Sobre a obtenção de protoplastos em basidiomicetos, Magae *et al.* (1985) mostraram em *P. ostreatus* taxa de regeneração de 0,16%. Em estudo realizado por Eyini *et al.* (2006) também utilizando o meio de regeneração MYG, foi observado que para protoplastos de *P. florida* e *P. pulmonarius*, a frequência de regeneração foi de 3,3% e 4,1%, respectivamente.

Embora os trabalhos realizados por Magae *et al.* (1985) e Eyini *et al.* (2006) apresentem dados de regeneração de protoplastos, não são apresentadas explicações sobre as taxas de regeneração. As diferenças na regeneração dos protoplastos entre as linhagens de *P. sajor-caju* e *L. edodes* observadas no presente estudo, entre outras causas, podem estar relacionadas ao estabilizador osmótico utilizado, bem como com sua molaridade. Pois, como relatado por Kelkar *et al.* (1990) e Gu & Ko 2000, o estabilizador osmótico é de extrema importância na manutenção da integridade celular e regeneração de protoplastos, sendo que para cada espécie devem ser avaliadas condições ideais para a manutenção celular.

Outros fatores podem exercer influência na regeneração de protoplastos, como por exemplo, a composição da parede celular de cada gênero e espécie, necessidades nutricionais distintas e a enzima utilizada para a protoplastização.

4.2 Mortalidade dos protoplastos em função do tempo de exposição à luz UV

Anteriormente à mutagênese, foi determinada a taxa de mortalidade dos protoplastos em função do tempo de radiação UV. A taxa de mortalidade foi determinada considerando a regeneração do controle positivo, ou seja, protoplastos que não foram submetidos à irradiação como 100%, comparando com a regeneração dos protoplastos submetidos à radiação UV-C.

Para os protoplastos de *L. edodes*, o maior tempo de exposição à luz UV onde ainda houve regeneração de colônias foi 20 segundos, onde houve mortalidade de 97,5% dos protoplastos. Já para os protoplastos de *P. sajor-caju*, o tempo foi de 30 segundos, onde a taxa de mortalidade foi de 96% (Figura 14).

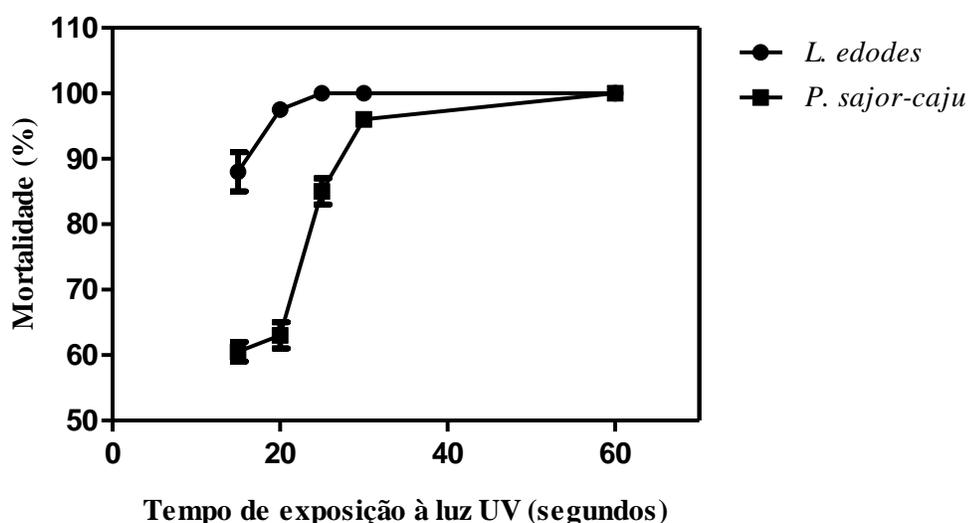


Figura 14. Taxa de mortalidade (%) dos protoplastos de *L. edodes* e *P. sajor-caju* em função do tempo de exposição à luz UV. Os valores correspondem à média de duas replicatas e as barras ao desvio padrão. As legendas referem-se as linhagens parentais de *L. edodes* e *P. sajor-caju* e os resultados são referentes à mortalidade dos protoplastos em função dos diferentes tempos de exposição à luz UV (15, 20, 25, 30 e 60 segundos).

A mortalidade dos protoplastos decorrente da exposição à radiação UV pode estar relacionada com a toxicidade causada pela presença de ozônio (O_3), que é um gás estável formado normalmente pelas lâmpadas UV-C (Soo, 2002). As espécies reativas de oxigênio formadas durante a irradiação UV-C, podem acabar oxidando as estruturas constituintes dos microrganismos. Além disso, a morte celular pode também ter relação com os danos causados ao DNA quando não reparados. As principais lesões causadas pela radiação UV são os dímeros de

ciclobutano de pirimidina (CPDs) em nucleotídeos deficientes de mecanismos de excisão-reparação (Yasui & Eker, 1999; Wood *et al.* 2001).

4.3 Melhoramento genético de *P. sajor-caju* para aumento da atividade de fenol-oxidases e produtividade de basidiomas

4.3.1 Seleção dos protoclonos e mutantes de *P. sajor-caju*

O método de seleção para a identificação das linhagens com maior potencial de secreção de fenol-oxidases e também para a avaliação da velocidade de crescimento micelial foi o cultivo em meio BDA adicionado de 0,01% do corante Reactive Blue 220, o que favorece o crescimento fúngico além de permitir a diferenciação entre os halos de descoloração de diferentes linhagens. Em estudo realizado por Munari *et al.* (2008), foi comprovada a capacidade da linhagem PS-2001 de *P. sajor-caju* em degradar o corante Reactive Blue 220, pertencente ao grupo das antraquinonas em placas de Petri. Uma vez que a degradação de compostos aromáticos por fungos está envolvida com a secreção de enzimas oxidativas, uma maneira de selecionar linhagens com maior potencial para a secreção de fenol-oxidases é a utilização de corantes em meios de cultivo artificiais.

O diâmetro da colônia e dos halos de descoloração foram medidos diariamente durante quatro dias. No primeiro processo de seleção, dos 100 clones testados, dez foram selecionados por apresentarem maior relação halo/colônia e nove por apresentarem maior velocidade de crescimento micelial em relação ao parental, em um total de 19 (dados não mostrados).

Os clones selecionados no primeiro processo de seleção foram submetidos novamente à avaliação da relação halo/colônia e velocidade de crescimento micelial para verificação da estabilidade dos protoclonos e mutantes (segundo processo de seleção). Após o segundo processo de seleção e verificada a estabilidade dos clones, quatro foram selecionados por apresentarem maior relação halo/colônia, porém, apenas PS UV 55 e PS UV 56 diferenciaram estatisticamente do parental (Fig. 15A) e quatro por apresentarem maiores médias de crescimento em relação à linhagem parental PS-2001, porém apenas o clone PS UV30 apresentou diferença estatística (Fig. 15B), em um total de oito clones. A estabilidade dos protoclonos (PS3 e PS45) e mutantes (PS UV22, PS UV48, PS UV55, PS UV56, PS UV14 e PS UV30) com relação aos parâmetros testados (relação halo/colônia e crescimento) foi verificada por cinco gerações.

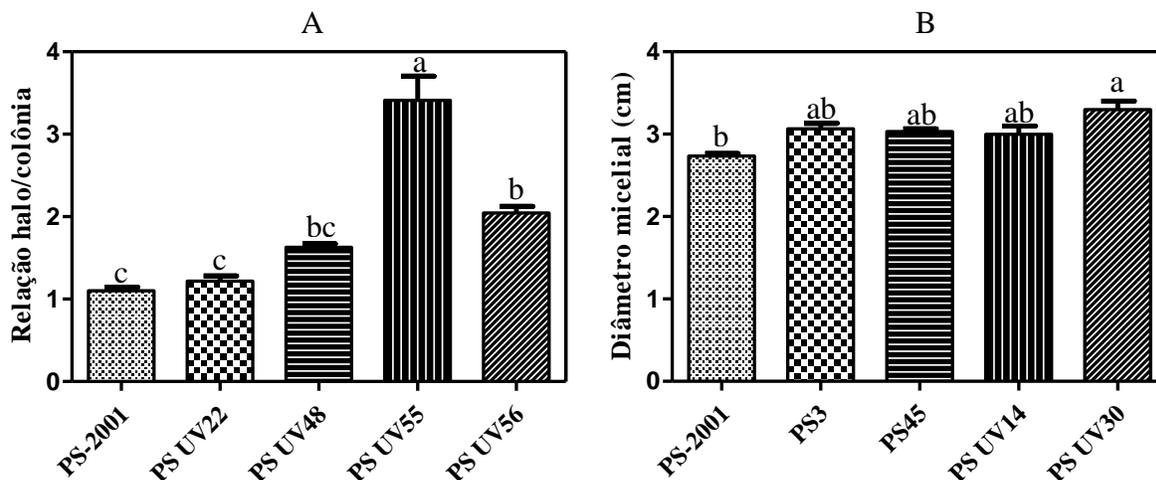


Figura 15. Clones selecionados após o segundo processo de seleção. A) clones com maior relação halo/colônia. B) clones com maior velocidade de crescimento micelial. Nos dados de relação halo/colônia os valores correspondem à média de três replicatas referente à média do terceiro dia. Nos dados de halo de crescimento as médias representam os valores obtidos no quarto dia. As barras correspondem ao desvio padrão e as legendas referem-se aos mutantes, protoclonos e parental de *P. sajor-caju*.

Letras iguais nas colunas não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Poucos estudos foram realizados utilizando radiação UV para obtenção de mutantes com aumento da atividade de fenol-oxidases e tampouco para aumento da produtividade de basidiomas. Adegoke *et al.* (2012), embora sem uso de protoplastos, utilizaram a radiação UV em *P. pulmonarius*, obtendo um mutante denominado de LAU 09, com secreção de lacases aumentada significativamente em relação à linhagem parental. Qiu *et al.* (2011), através de exposições repetidas do fungo *Phanerochaete chrysosporium* à luz UV, isolaram mutantes com capacidade de secreção de Lac, MnP e LiP em situações de limitações de nutrientes.

Visto que, o meio empregado para a realização de cultivos em estado sólido utiliza a serragem de *Pinus* sp., os clones e linhagem parental foram caracterizados quanto ao crescimento em placas de Petri contendo meio SP. Na Figura 16 são apresentados dados sobre o tempo (dias) para a colonização total pelo micélio em placas de Petri pelos clones selecionados de *P. sajor-caju*. Observa-se que, quatro clones (PS3, PS45, PS UV14 e PS UV30) apresentaram diminuição no tempo de cultivo, diferenciando estatisticamente em comparação à linhagem parental, sendo que, estes clones também apresentaram maior taxa de crescimento no meio BDA com corante Reactive Blue 220 utilizado nos processos de seleção dos clones. Os mutantes PS UV 22, PS UV48, PS UV55 e PS UV56 que apresentaram crescimento inferior ao parental no meio

utilizado nos processos de seleção, porém, no teste com serragem, mostraram crescimento semelhante à PS-2001.

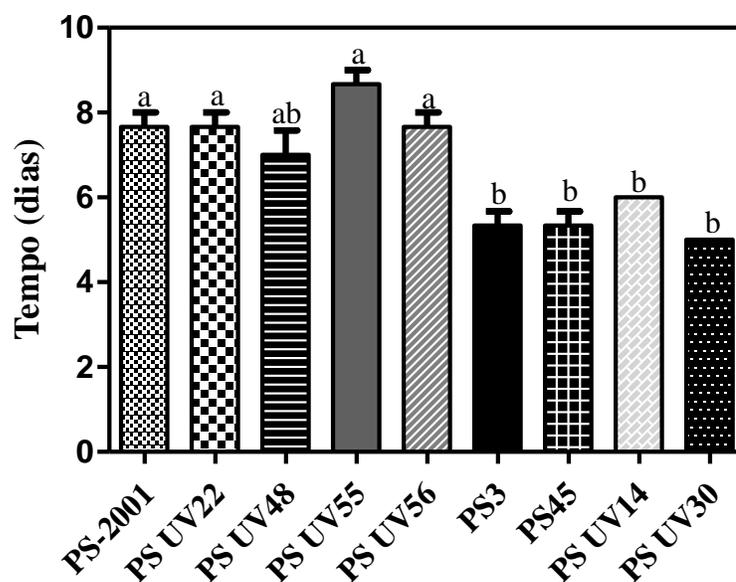


Figura 16. Tempo necessário para colonização total da placa de Petri com meio SP pelas linhagens de *P. sajor-caju*. Os valores correspondem à média de três replicatas e as barras ao desvio padrão. As legendas referem-se às linhagens mutantes, protoclonas e parental de *P. sajor-caju*.

Letras iguais nas colunas não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Na Figura 17 pode ser evidenciada a diferença morfológica entre os clones de *P. sajor-caju* selecionados, em placas de Petri contendo meio BDA adicionado de corante Reactive Blue 220, sendo que a última imagem corresponde ao parental PS-2001. Identificam-se as linhagens com maior relação halo/colônia (PS UV22, PS UV48, PS UV55 e PS UV56) e também as de maior crescimento micelial (PS3, PS45, PS UV14 e PS UV30). Também pode ser percebida a formação precoce de primórdios nos clones PS UV22, PS UV48 e PS UV56.

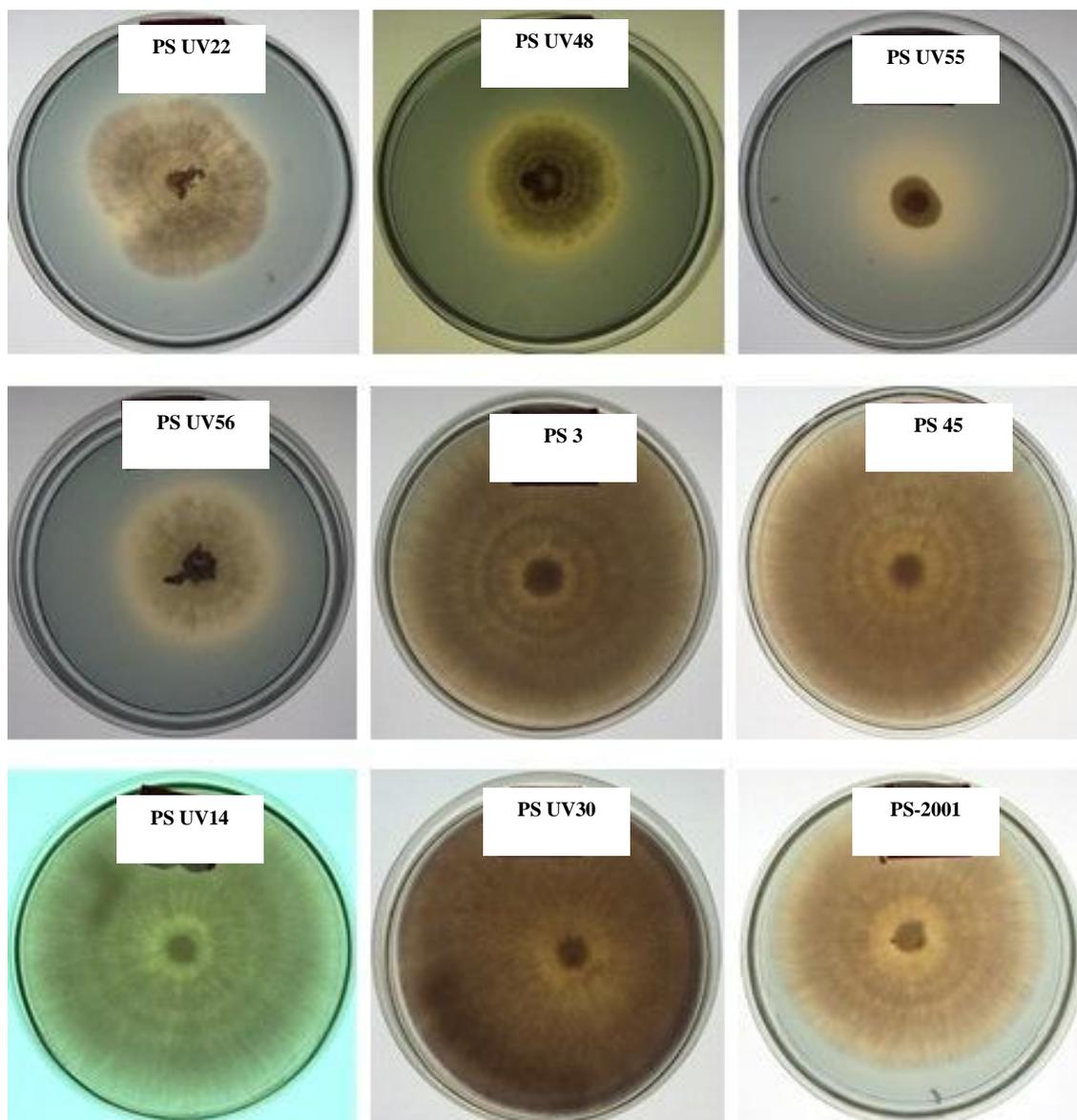


Figura 17. Morfologia e halo de descoloração do corante Reactive Blue 220, das linhagens de *P. sajor-caju*. Colônias das linhagens de *P. sajor-caju* em meio BDA com corante, após sete dias de incubação.

4.3.2 Crescimento e atividade de fenol-oxidases de *P. sajor-caju* PS-2001 em diferentes meios de cultivo em condição submersa

Visto a importância da composição do meio de cultivo para a secreção de enzimas foi realizado inicialmente um estudo com apenas a linhagem parental PS-2001 visando a caracterização quanto ao crescimento e secreção de fenol-oxidases. O estudo foi realizado em

cultivo submerso e foram empregados diferentes meios (CBDY, CEM, MYPG e CFS). As coletas foram realizadas a cada sete dias, durante 21 dias.

Na Tabela 1 são apresentados os resultados referentes às atividades de lacases pela linhagem parental de *P. sajor-caju* cultivada nos diferentes meios. Em sete dias de cultivo, as maiores atividades foram verificadas no cultivo em meio CBDY com 65 U.mL^{-1} , diferenciando estatisticamente dos outros meios. No 14º dia de cultivo, atividades semelhantes foram observadas para os meios CBDY e CFS, com 150 e 162 U.mL^{-1} respectivamente. A maior média de 207 U.mL^{-1} foi observada no 21º dia para o meio CBDY, não apresentando diferença estatística quando comparada ao meio CFS.

Tabela 1. Atividade de lacases (U.mL^{-1}) de *P. sajor-caju* PS-2001 em diferentes meios de cultivo. Os valores correspondem à média de duas replicatas e o desvio padrão é apresentado ao lado. Os títulos correspondem aos diferentes meios de cultivos testados.

Dias	CBDY	CEM	MYPG	CFS
7	65.61 ± 1.85^a	5.55 ± 1.55^b	9.25 ± 1.95^b	0^c
14	150 ± 24.07^a	12.96 ± 1.85^c	11.11 ± 0^c	162.96 ± 7.4^a
21	207.4 ± 33.33^a	0^c	11.11 ± 0^c	144.4 ± 14.81^a

Letras iguais na horizontal para o mesmo dia não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A secreção de enzimas por microrganismos pode ser afetada por diversos fatores, entre eles, a concentração do inóculo utilizada, composição do meio de cultura, concentrações de carbono e nitrogênio, pH, temperatura, agitação do meio de cultura; presença de indutores, ausência de inibidores, entre outros (Tavares, 2006).

Justificando a formulação do meio CBDY que contém batatas, a batata inglesa (*Solanum tuberosum* L.) contém grande quantidade de nutrientes, entre eles, proteínas, aminoácidos essenciais, carboidratos, fibras e minerais. Segundo White *et al.* (2009), batatas contém teores de cobre, potássio, fósforo, ferro, zinco, manganês e magnésio. Adicionalmente, os autores informam que a batata é boa fonte de vitamina C e de algumas vitaminas do complexo B, especialmente niacina, tiamina e vitamina B6, o que torna o produto altamente nutritivo.

Diversos estudos demonstram que a adição de Cu ao meio de cultura, aumenta a produção desta enzima. Giardina *et al.* 1999, observaram que a adição de sulfato de cobre ao meio de cultura de *P. ostreatus* aumentou a atividade da enzima e que este aumento foi proporcional à quantidade de cobre adicionado, atingindo um valor máximo com $150 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de sulfato de cobre. Outro estudo, também com *P. ostreatus*, mostrou um aumento de oito vezes na atividade da lacase com a adição de cobre (1mmol.L^{-1}) ao meio de cultura (Baldrian & Gabriel, 2002). O meio CBDY, constituído de caldo de batatas, ao apresentar teores de cobre, juntamente com outros componentes nutricionais, pode ter apresentado efeito positivo na secreção de lacases de *P. sajor-caju*.

Já no meio CFS, pode ser sugerida a presença de estruturas fenólicas em maior quantidade em relação aos demais meios, uma vez que o farelo de trigo e a serragem são fontes ricas destes compostos, os quais poderiam estar induzindo a secreção de lacases, uma vez que estas enzimas são capazes de catalisar oxidações de estruturas fenólicas. Desta maneira, a diferença observada entre as atividades enzimáticas de lacases nos diferentes meios testados pode ter relação, entre os fatores influenciáveis citados anteriormente, com a presença de indutores nos meios CBDY e CFS.

As diferenças nas atividades enzimáticas observadas para os diferentes meios de cultivo podem ter relação segundo Garcia (2006), com as quantidades de carbono e nitrogênio presentes nos meios de cultivo, sendo que estas variáveis podem ocasionar variações conforme a espécie fúngica e o meio estudado.

Os valores observados para as atividades de lacases em meio CBDY encontrados no presente estudo são superiores aos encontrados por Maciel (2011) em cultivo submerso em meio BDA do basidiomiceto *Hexagonia glabra*. O autor verificou produção enzimática de lacase em todos dias de coleta (22 dias), apresentando um pico de atividade no 18º dia com $4,56 \text{ U.mL}^{-1}$, já a menor produção da enzima foi no 1º dia de coleta com produção igual de $0,6 \text{ U.mL}^{-1}$.

Com relação aos valores de pH (Figura 18A), observa-se uma variação entre 5,1 e 8,6, sendo que foi observado comportamento similar entre os meios CBDY e MYPG e entre os meios CEM e CFS. Quanto ao crescimento micelial de *P. sajor-caju* nos diferentes meios (Figura 18B) verifica-se, que para o meio CEM, os maiores valores de biomassa foram alcançados no 14º dia de cultivo ($16,6 \text{ g.L}^{-1}$) diferenciando estatisticamente dos demais meios, com posterior queda, apresentando no 21º dia, 11 g.L^{-1} , valor semelhante ao meio CFS, onde para o mesmo dia foram mensurados $10,6 \text{ g.L}^{-1}$. Em meio CBD, o pico de crescimento foi observado no 14º dia, com $7,3 \text{ g.L}^{-1}$, mantendo praticamente constante até o 21º dia. O meio que proporcionou menor

crescimento micelial foi o meio MYPG, com pico no 14º dia de cultivo, apresentando média de 4,1 g.L⁻¹.

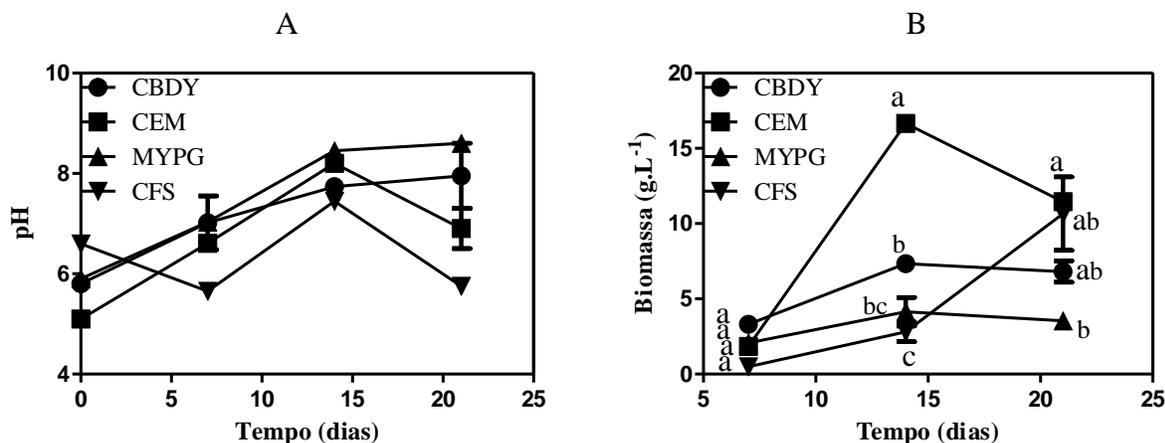


Figura 18. Variação dos valores de pH (A) e biomassa micelial (B) de *P. sajor-caju* PS-2001 em diferentes meios de cultivo. Os valores correspondem à média de duas replicatas. As legendas correspondem aos diferentes meios de cultivos testados. Letras iguais para um mesmo dia não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Para o meio CEM, no 21º dia de cultivo, onde observa-se queda na biomassa micelial, o valor de pH também apresentou queda, indicando que para este meio, o aumento de pH está relacionado ao aumento do metabolismo fúngico. Relação semelhante entre valores de pH e biomassa também é observada para os meios CBDY e MYPG, onde os valores de pH aumentam e após se mantêm constantes, como observado para os valores de biomassa.

A variação de pH nos cultivos pode ser devido à modificações na acidez do meio conforme explicado por Gadd (2001), sendo uma consequência das atividades metabólicas dos microrganismos, que resultam na produção de ácidos intermediários, como o ácido oxálico, por exemplo.

Na Figura 19A são apresentados os dados de concentração de proteínas solúveis durante o cultivo. Verifica-se que no último dia dos experimentos as concentrações foram diferentes, sendo semelhantes para os meios CEM e MYPG e para os meios CBDY e CFS. Não foi

encontrada relação entre as concentrações de proteínas e as atividades enzimáticas e a massa fúngica.

Como já relatado por Bettin *et al.* (2011), *P. sajor-caju* secreta baixos níveis de LiP. Os dados da Figura 19B mostram que os valores de atividade desta enzima nos cultivos foram baixos, embora no 21º dia esta atividade ainda encontrava-se aumentada no meio CBDY. Não foram verificadas atividades de OAV e MnP em nenhum dos meios testados.

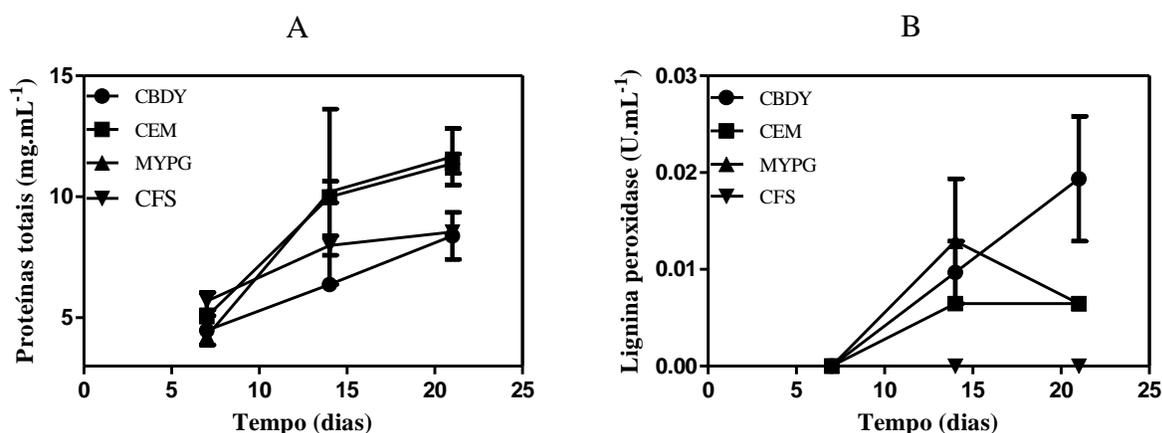


Figura 19. Variação dos valores de proteínas totais (A) e atividade de LiP (B) de *P. sajor-caju* PS-2001 em diferentes meios de cultivo. Os valores correspondem à média de duas replicatas. As legendas correspondem aos diferentes meios de cultivos testados.

4.3.3 Cultivo submerso dos protoclones, mutantes e parental de *P. sajor-caju* para avaliação do crescimento e atividade de fenol-oxidases

Os protoclones e mutantes de *P. sajor-caju* também foram avaliados quanto à secreção de fenol-oxidases em cultivo submerso, uma vez que é o processo mais utilizado industrialmente.

Levando em consideração os estudos com diferentes meios de cultivo descritos anteriormente que mostraram que as maiores atividades de lacases ocorreram com o emprego do meio CBDY, este meio foi utilizado para os experimentos de cultivo submerso com finalidade de comparação do crescimento e secreção enzimática dos clones de *P. sajor-caju*.

Na Figura 20 observa-se que para a maior parte dos clones o pico enzimático de lacases ocorreu no 10º dia de cultivo, com exceção dos clones PS UV55 e PS45, que apresentaram pico

no 15º dia e do PS UV30 que apresentou pico no 20º dia de cultivo. A maior atividade (404,3 U.mL⁻¹) ocorreu no 10º dia pelo clone PS UV56, diferenciando-o estatisticamente do parental que apresentou pico de 192,5 U.mL⁻¹ no mesmo dia de cultivo. Embora sem diferenças estatísticas pelo teste de Tukey, no 15º dia de cultivo, os clones PS UV56 e PS45 apresentaram aumento notável nas médias de atividades em comparação à linhagem parental. O mesmo pode ser observado no 20º dia de cultivo nos clones PS UV56, PS45 e PS UV30.

Os resultados apresentados sobre a secreção de lacases mostram a variabilidade gerada a partir da protoplastização e mutagênese em *P. sajor-caju*. Com relação à geração de variabilidade, Lee *et al.* (2000) obtiveram mutantes lignocelulolíticos de *Pleurotus ostreatus* através da radiação gama. Os autores verificaram aumento de até 10 vezes na atividade de enzimas extracelulares em cultivo submerso quando comparadas ao controle. Neste mesmo estudo, a partir da análise genética utilizando marcadores moleculares, foram notadas semelhanças genéticas entre os mutantes isolados na faixa entre 64,4% a 93,3% comparados ao controle, comprovando a variabilidade genética entre os mutantes e seu parental.

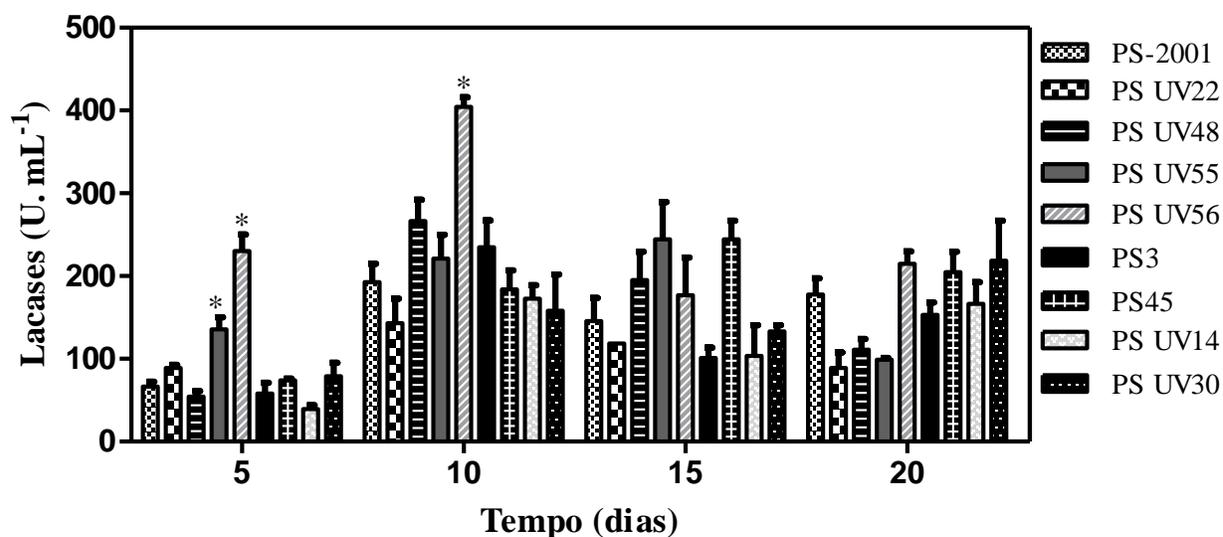


Figura 20. Atividade de lacases em função do tempo em cultivo submerso dos clones e parental de *P. sajor-caju* em meio CBDY. Os valores correspondem à média de três replicatas e as barras ao desvio padrão. As legendas referem-se aos mutantes, protoclones e parental de *P. sajor-caju*.

*Os valores apresentaram aumento significativo pelo teste de Tukey com $p \leq 0,05$ em comparação ao parental PS-2001 para o mesmo dia de cultivo.

Em estudo realizado anteriormente por Bettin *et al.* (2011) utilizando a linhagem PS-2001 de *P. sajor-caju* em cultivo submerso em biorreator com agitação mecânica, o máximo de atividade de lacases (40 U.mL^{-1}) foi observado no 6º dia de cultivo com queda na atividade após o 7º dia. Entretanto, o meio de cultivo utilizado por estes autores foi constituído por sacarose, caseína, CuSO_4 , ácido gálico e solução mineral, diferente do meio CBDY utilizado no presente estudo.

Na Figura 21 são apresentados géis de atividade de lacases para as amostras das nove diferentes linhagens no 5º, 10º, 15º e 20º dias de cultivo utilizadas para a atividade de lacases na figura 20. Embora sem propósito de caracterização de massa molecular, verifica-se em todos os géis a existência de uma banda mais evidente posicionada entre os marcadores de massa molecular de 25 e 37 kD. Apesar da observação de borrões é possível verificar a existência de até quatro bandas, uma posicionada entre os marcadores de massa molecular de 37 e 50 kD, e outras duas entre os marcadores de 50 e 75 kD, embora estas não tenham sido evidenciadas em alguns clones e para determinados dias. Não é possível determinar a massa extata dos monômeros enzimáticos pela técnica de zimograma, uma vez que a comparação é realizada com marcadores (padrões) de massa molecular conhecida que já são previamente expostos a agentes redutores, enquanto a enzima a ser analisada permanece praticamente naturalada.

A análise dos géis não permitiu relacionar a intensidade das bandas com as atividades apresentadas na Figura 20. A relação da atividade enzimática com a intensidade das bandas no gel pode se tornar difícil devido à perda de parte da atividade durante a técnica de zimograma. Também é importante considerar que a presença de SDS (dodecil sulfato de sódio) pode ocasionar dissociação das enzimas, indicando assim, a presença delas, mas não a real atividade enzimática (Snoek-Van Beurden & Von Den Hoff, 2005).

A presença de borrões observados na Figura 21, que são de ocorrência comum em zimogramas, pode ser explicada pela difusão da enzima no gel em decorrência do tamanho do poro e da dimensão do complexo multimérico. Enquanto as bandas posicionadas mais abaixo refletem o posicionamento de proteínas de mais rápido deslocamento devido à sua menor massa molecular, os borrões mostram a detecção da atividade enzimática em várias regiões do gel, como consequência das proteínas estarem formando complexos multiméricos de diferentes unidades monoméricas. A identificação dos complexos multiméricos observados pode ser realizada através de análise de Western Blot, por exemplo (Gogly *et al.*, 1998).

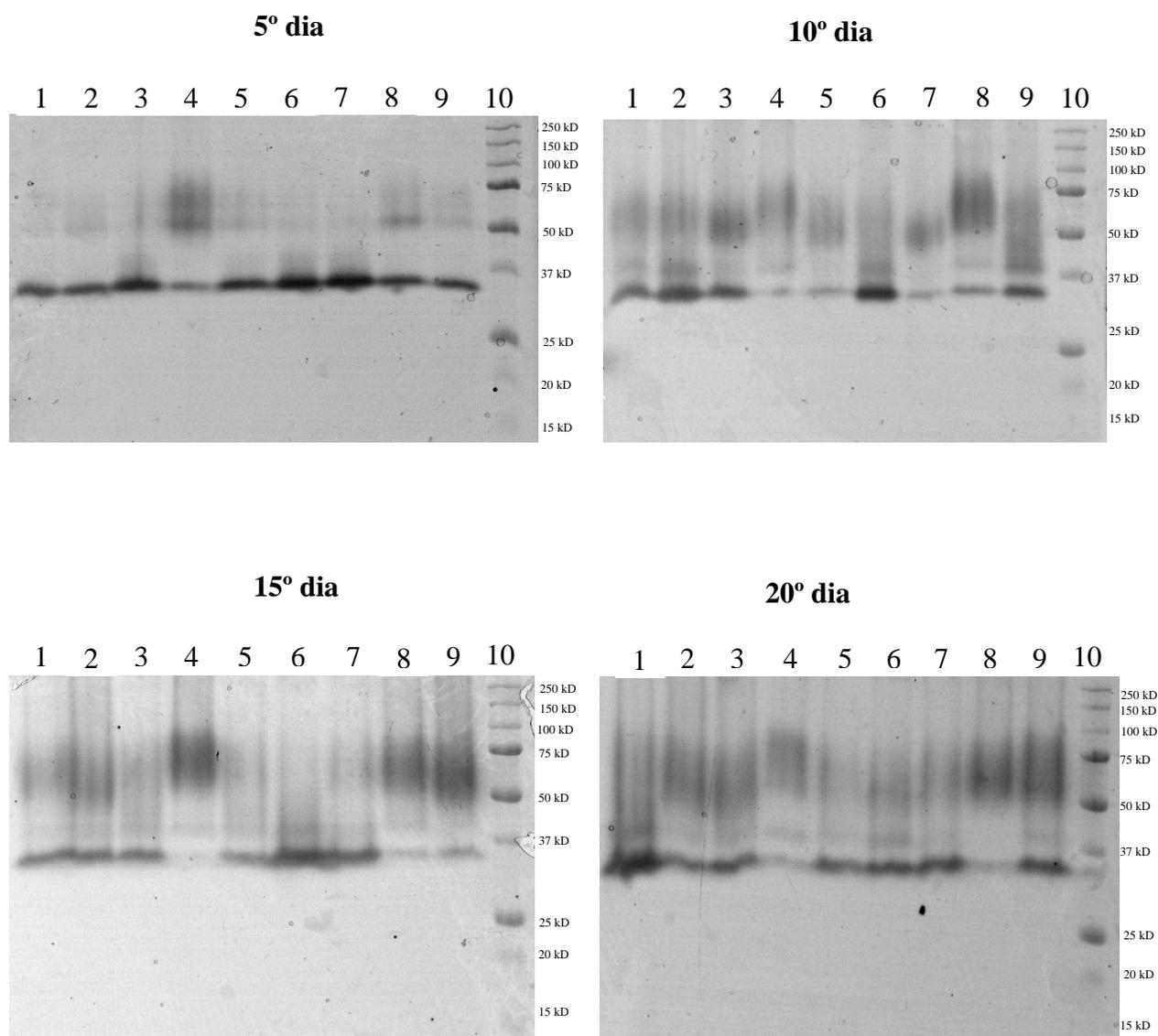


Figura 21. Perfil da atividade de lacases dos clones e parental de *P. sajor-caju* em cultivo submerso, precipitadas a partir de 200 μ L do extrato enzimático, separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida posteriormente corado com ABTS. Os números de 1 a 9 acima dos géis representam os clones e parental de *P. sajor-caju*: 1- PS-2001, 2- PS UV22, 3- PS UV48, 4- PS UV55, 5- PS UV56, 6- PS3, 7- PS45, 8- PS UV14 e 9- PS UV30. O número 10 de cada gel corresponde ao marcador de massa molecular.

Com relação aos valores de pH do cultivo submerso dos clones e parental de *P. sajor-caju*, houve variação entre 6,1 e 8,8 (Figura 22), sendo que a maioria apresentou tendência de aumento de pH durante o cultivo, com exceção dos clones PS3 e PS UV14 que tiveram queda do 10º dia de cultivo e o clone PS UV30 a partir do 15º dia de cultivo. O aumento dos valores de pH

pode ter sido ocasionado pela redução de ácidos orgânicos, presentes no meio de cultivo, durante o metabolismo fúngico (Ávila *et al.* 2009).

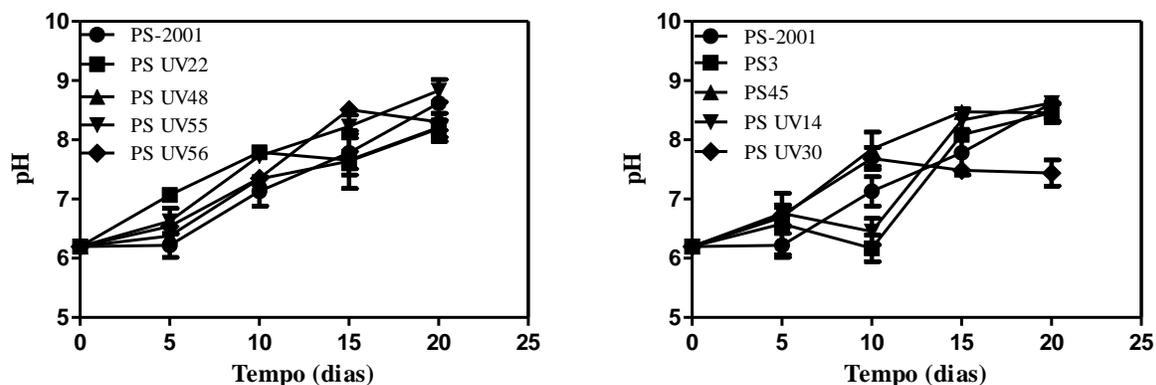


Figura 22. Variação do pH durante cultivo submerso dos clones e parental de *P. sajor-caju* em meio CBDY. Os valores correspondem à média de três replicatas e as barras ao desvio padrão. As legendas referem-se aos mutantes, protoclonos e parental de *P. sajor-caju*.

De modo geral, as enzimas fúngicas possuem um pH ótimo, no qual a sua atividade é máxima e valores maiores ou menores que este pH ótimo podem resultar em redução da atividade enzimática. O controle de pH nos cultivos visando à comparação entre linhagens pode acabar favorecendo apenas algumas delas. Portanto, em estudos iniciais, cultivos sem controle de pH permitem a elucidação do comportamento de cada linhagem em relação ao aumento ou diminuição da acidez no meio de cultivo. Entretanto, após a seleção dos melhores clones, o interessante é realizar a otimização dos valores de pH.

Na Figura 23 são apresentados os valores referentes ao crescimento estimado a partir do peso seco micelial dos clones e parental de *P. sajor-caju* durante o cultivo submerso, onde se observa variação entre as massas miceliais. A maior média de biomassa foi observada no 15º dia de cultivo e corresponde ao clone PS UV30 com 5,1 g.L⁻¹. A linhagem parental obteve crescimento máximo no 10º dia de cultivo, com 4,3 g.L⁻¹, coincidindo com o dia da atividade máxima de lacases (Figura 20). A menor média de biomassa foi observada no clone PS UV55 no 5º dia de cultivo, com 1,2 g.L⁻¹. Nenhum clone apresentou aumento significativo nos valores de crescimento em relação ao parental PS-2001.

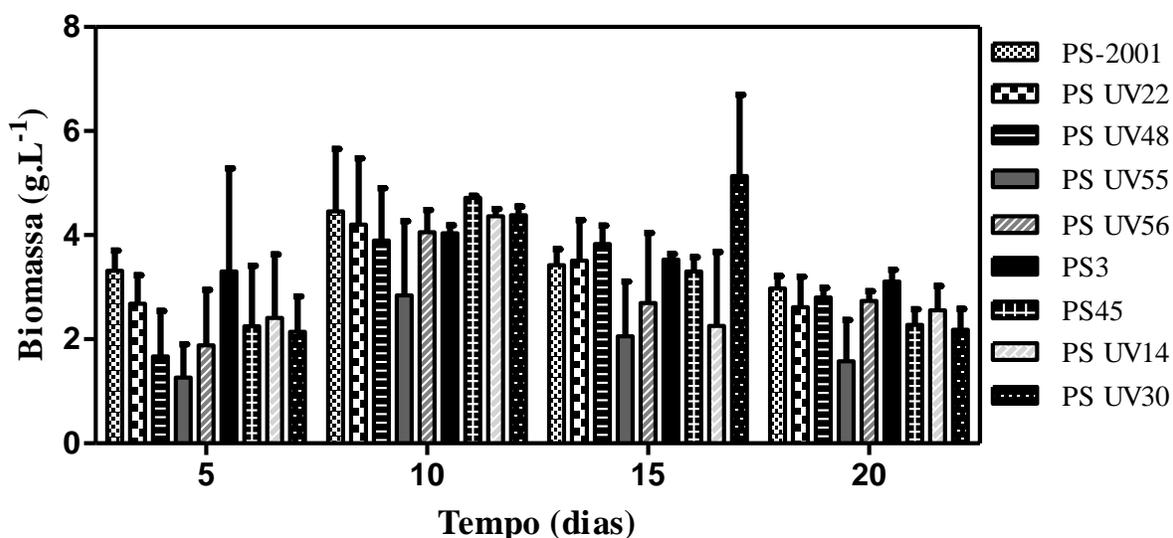


Figura 23. Biomassa micelial em função do tempo em cultivo submerso dos clones e parental de *P. sajor-caju* em meio CBDY. Os valores correspondem à média de três replicatas e as barras ao desvio padrão. As legendas referem-se aos mutantes, protoclonos e parental de *P. sajor-caju*.

Em estudos envolvendo melhoramento genético para aumento da secreção enzimática, se faz necessário o estudo da atividade enzimática com relação à biomassa fúngica. Desta forma é possível verificar se os aumentos nas atividades enzimáticas se devem ao aumento da secreção ou apenas em consequência do aumento de crescimento micelial.

Os valores de atividade de lacases com relação à biomassa fúngica (Ab_{lac}) estão representados na Figura 24. Em cinco dias de cultivo, os clones PS UV55 e PS UV56 apresentam aumento significativo nos valores de Ab_{lac} , apresentando 72.700 e 86.800 $U.g^{-1}$ de lacases. A maior média no 10º dia de cultivo foi observada para o clone PS UV56 apresentando 101.000 $U.g^{-1}$ seguido do clone PS UV48 com 83.600 $U.g^{-1}$, porém, neste dia nenhum clone apresentou diferença significativa em relação ao parental, o que também é observado para os valores obtidos nos dias 15 e 20 de cultivo.

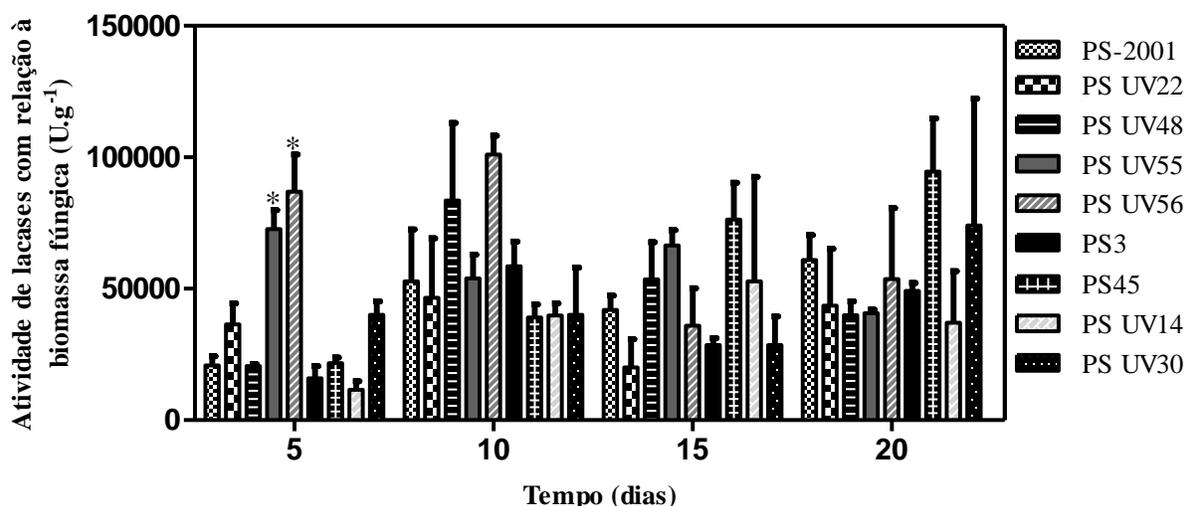


Figura 24. Ab_{lac} - Atividade de lacases com relação à biomassa fúngica (atividade $U.g^{-1}$ de biomassa) em cultivo submerso dos clones e parental de *P. sajor-caju* em meio CBDY. Os valores correspondem à média de três replicatas e as barras ao desvio padrão. As legendas referem-se aos mutantes, protoclonos e parental de *P. sajor-caju*.

* Os valores apresentaram aumento significativo pelo teste de Tukey com $p \leq 0,05$ em comparação ao parental PS-2001 para o mesmo dia de cultivo.

Analisando conjuntamente os valores contidos nas Figuras 20, 23 e 24, observa-se que no cultivo submerso dos clones de *P. sajor-caju*, os clones com maior secreção enzimática de lacases são aqueles que inicialmente foram selecionados por apresentarem maior relação halo/colônia, indicativo de que o método de seleção para aumento da atividade de lacases foi eficiente.

Embora o objetivo principal do trabalho tenha sido obtenção de variantes para o aumento da produção de lacases, também estudou-se a secreção de OAV, LiP e MnP. Entretanto, a análise para essas enzimas foi realizada apenas no dia em que ocorreu o pico da atividade de lacases em cada clone (Tabela 2). Este procedimento da análise de atividade de OAV, LiP e MnP no dia de pico para lacases também foi repetido para os cultivos posteriores em *P. sajor-caju*. Tal como para lacases também ocorreu variação da atividade para estas enzimas entre as linhagens. Para a atividade OAV, a maior média ocorreu para a linhagem PS UV56, que também apresentou a maior atividade de lacases. A variação na atividade de OAV entre as linhagens pode ser verificada desde que as linhagens PS UV22 e PS UV55 não apresentaram atividade.

Como verificado anteriormente para a linhagem parental, o estudo de atividade de LiP dos protoclonos e mutantes mostrou valores baixos de atividade enzimática. Para atividade de

MnP verificou-se, embora menos expressivo, também variação entre a atividade enzimática, com inexistência de atividade em alguns clones (PS UV22, PS UV55, PS3, PS45 e PS UV30). Os dados de concentração de proteínas por sua vez não mostraram grande variação e também não apresentaram relação com as atividades enzimáticas.

Tabela 2. Atividade enzimática de OAV, LiP e MnP e proteínas solúveis totais em cultivo submerso dos clones e parental de *P. sajor-caju* em meio CBDY.

Linhasgens	OAV (U.mL ⁻¹)	LiP (U.mL ⁻¹)	MnP (U.mL ⁻¹)	Proteínas mg.mL ⁻¹	Dia de cultivo (pico da atividade de Lac)
PS-2001	0,57 ± 0,07	0,01 ± 0,002	0,49 ± 0,31	16,39 ± 2,12	10°
PS UV22	nd	nd	nd	18,01 ± 0,5	10°
PS UV48	0,5 ± 0,07	0,013 ± 0	0,35 ± 0,09	16,77 ± 1,98	10°
PS UV55	nd	nd	nd	20,67 ± 1,79	15°
PS UV56	0,61 ± 0,08	0,013 ± 0	0,36 ± 0,18	16,82 ± 1,03	10°
PS3	0,5 ± 0,07	0,011 ± 0,002	nd	18,97 ± 2,23	10°
PS45	0,28 ± 0,07	0,006 ± 0	nd	16,96 ± 0,13	15°
PS UV14	0,5 ± 0,07	0,009 ± 0,002	0,35 ± 0,09	17,07 ± 1,03	10°
PS UV30	0,35 ± 0,07	0,004 ± 0,002	nd	20,86 ± 3,21	20°

Média de atividades enzimáticas obtidas em cultivo submerso realizadas em triplicata;
nd não detectada pelo método utilizado.

Resultados semelhantes foram obtidos por Bettin *et al.* (2011), que observaram atividades de MnP em cultivo submerso no 4°, 9° e 15° dias de cultivo, com a maior média de 0.5 UmL⁻¹

mostrando aumento não linear na atividade desta enzima. Os autores verificaram atividades de OAV a partir do terceiro dia, mostrando a maior média de 1.5 U.mL^{-1} e atividades de LiP a partir do terceiro dia, atingindo 1 U.mL^{-1} .

4.3.4 Cultivo em estado sólido dos protoclonos, mutantes e parental de *P. sajor-caju* para avaliação do crescimento e atividade de fenol-oxidases

A atividade de enzimas fenol-oxidases dos protoclonos e mutantes de *P. sajor-caju* foi avaliada em comparação com a linhagem parental PS-2001 em cultivo em estado sólido. O resíduo lignocelulósico utilizado foi a serragem de *Pinus* sp. As coletas foram realizadas com intervalos de dois dias durante oito dias.

Tal como nos cultivos líquidos, verifica-se na Figura 25 variação para as atividades de lacases nos cultivos sólidos. Já no segundo dia de cultivo, o clone PS UV48 apresentou 753 U.g^{-1} valor significativamente superior ao apresentado pelo parental. Entretanto, a maior atividade de Lac foi observada no 6º dia no clone PS UV22, que apresentou o pico enzimático de 1.783 U.g^{-1} , diferenciando estatisticamente do parental PS-2001, que apresentou no mesmo dia de cultivo o pico enzimático de 1.165 U.g^{-1} . Outros clones também apresentaram incremento da atividade em relação ao parental no dia do pico, é o caso do PS UV56, PS45 e PS UV30 com atividades de 1.457, 1.360 e 1.305 U.g^{-1} de lacases respectivamente, porém, sem apresentarem diferenças significativas em relação ao parental.

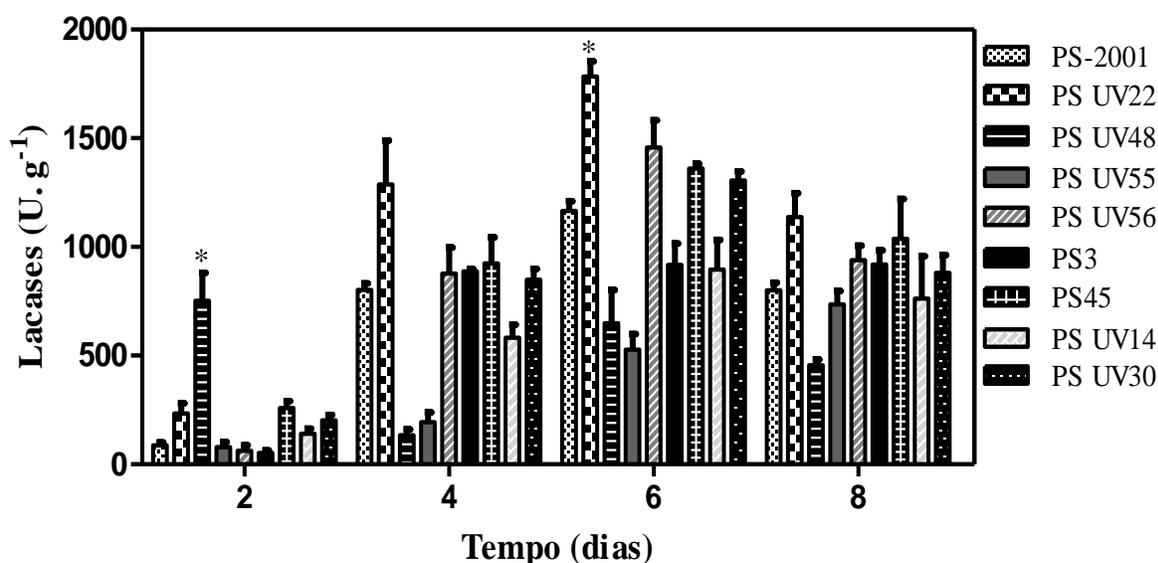


Figura 25. Atividade de lacases em função do tempo em cultivo em estado sólido dos clones e parental de *P. sajor-caju*. Os valores correspondem à média de três replicatas e as barras ao desvio padrão. As legendas referem-se aos mutantes, protoclonos e parental de *P. sajor-caju*.

* Os valores apresentaram aumento significativo pelo teste de Tukey com $p \leq 0,05$ em comparação ao parental PS-2001 para o mesmo dia de cultivo.

Diferentemente do observado nas atividades de lacases dos clones em cultivo submerso (Figura 20), no cultivo em estado sólido o clone PS UV55 que inicialmente apresentou a maior relação halo/colônia, apresentou menor atividade de lacases que o parental durante todo o período de cultivo. Tendo em vista, que este clone também apresentou menor crescimento micelial em placa de Petri, pode-se sugerir que para este clone, o crescimento em substratos sólidos à base de serragem pode ter relação com a secreção de fenol-oxidases.

Objetivando verificar uma possível mudança nos perfis de atividade de lacases produzidas em cultivo sólido em relação às observadas em cultivo submerso, também realizou-se gel de atividade nos extratos enzimáticos utilizados para análise de lacases apresentadas na figura 25. Na Figura 26, são apresentados géis de atividade de lacases para as amostras dos clones e linhagem parental no 2º, 4º, 6º e 8º dias do cultivo sólido. Embora sem propósito de caracterização de massa molecular, verifica-se em todos os géis a existência de uma banda mais evidente posicionada entre os marcadores de massa molecular de 25 e 37 kD, embora estas não tenham sido evidenciadas em alguns clones e em determinados dias. A presença de borrões entre os marcadores de 50 e 75 kD pode ser explicado tal como discutido anteriormente para os dados de cultivo submerso na Figura 21. Como verifica-se, a análise dos géis não permite uma relação

da intensidade das bandas com as atividades de lacases apresentadas na figura 25. Interessante é o fato da presença de bandas de grande intensidade no clone PS UV55, apesar de sua atividade de lacases na Figura 25 ter sido baixa. Visto que a comparação dos perfis enzimáticos do cultivo líquido (Figura 21) e do cultivo sólido (Figura 26) terem apresentado bandas de menor massa molecular semelhantes, posicionadas entre os marcadores de 25 e 37 kD, pode-se sugerir que não há glicosilações diferenciais nos dois métodos de cultivo ou pelo menos se estas existirem, não foram detectadas.

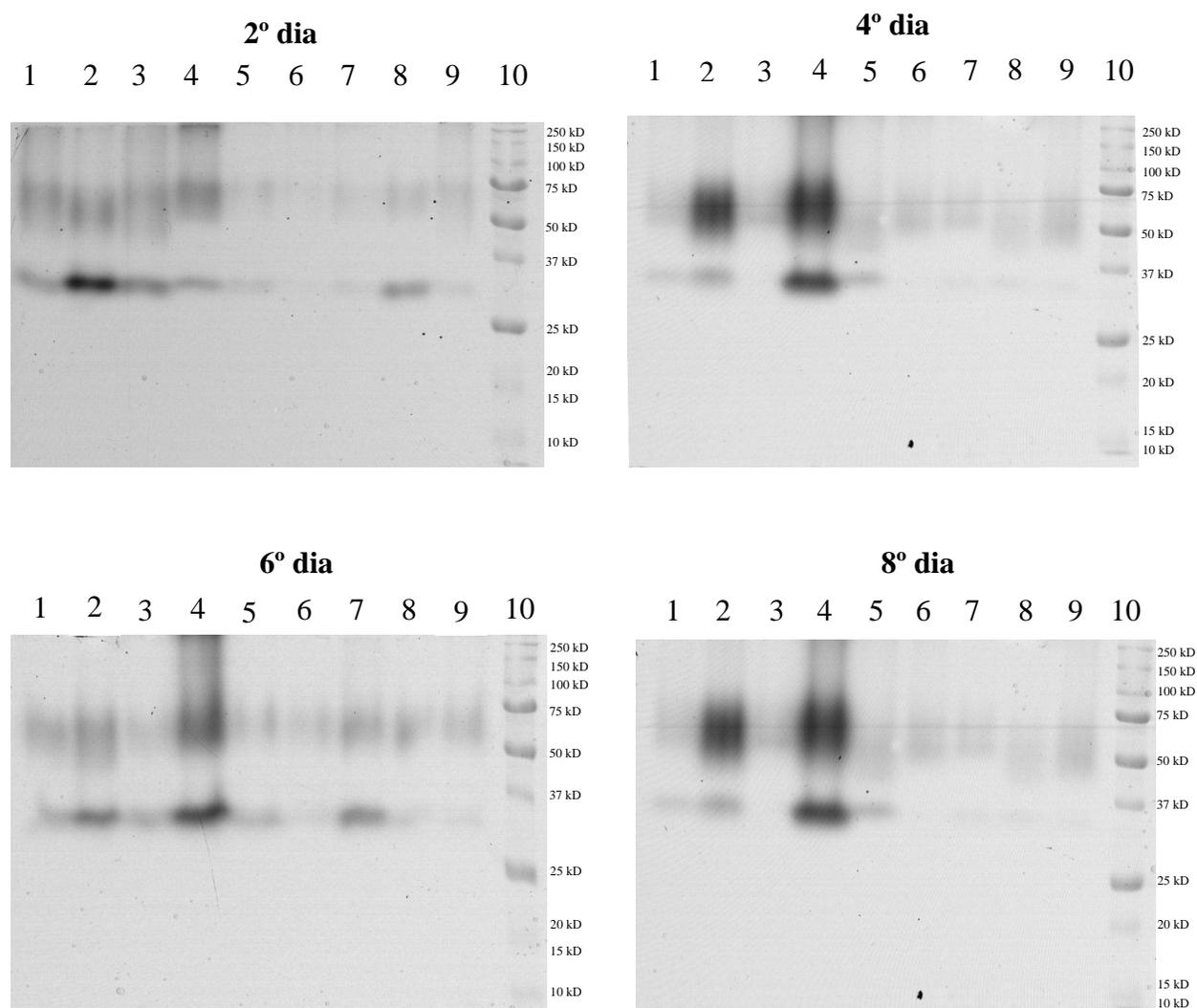


Figura 26. Perfil da atividade de lacases dos clones e parental de *P. sajor-caju* em cultivo em estado sólido, precipitadas a partir de 200 μ L do extrato enzimático, separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida posteriormente corado com ABTS. Os números de 1 a 9 acima dos géis representam: 1- PS-2001, 2- PS UV22, 3- PS UV48, 4- PS UV55, 5- PS UV56, 6- PS3, 7- PS45, 8- PS UV14 e 9- PS UV30. O número 10 de cada gel corresponde ao marcador de massa molecular.

Com relação aos valores de pH do cultivo em estado sólido dos clones e parental de *P. sajor-caju* (Figura 27) houve variação entre 5,4 e 6,5, sendo que a maioria apresentou tendência de queda de pH durante o cultivo, com exceção dos clones PS UV14 e PS45 que tiveram aumento dos valores no 6º dia de cultivo. Este fato pode ser interpretado como indicação de variação no metabolismo o qual pode resultar na diminuição de ácidos orgânicos (Ávila *et al.*, 2009).

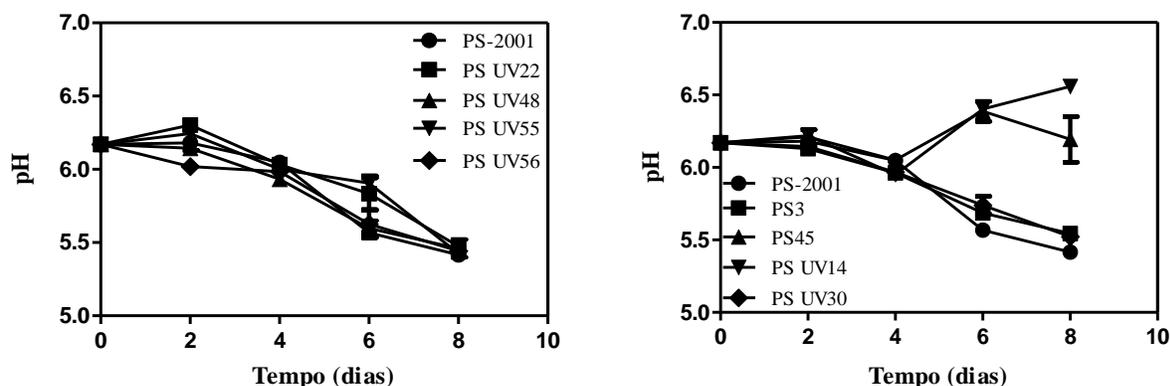


Figura 27. Variação do pH durante cultivo em estado sólido dos clones e parental de *P. sajor-caju*. Os valores correspondem à média de três replicatas e as barras ao desvio padrão. As legendas referem-se aos mutantes, protoclonos e parental de *P. sajor-caju*.

A maior parte dos fungos possuem a parede celular composta principalmente por quitina, que por sua vez, é um homopolímero linear de β 1-4 N-acetilglicosamina. Desta maneira, em cultivos onde o meio utilizado é constituído por substratos insolúveis ou que contenham material genético (o que dificultaria a estimativa do crescimento pela determinação da quantidade de DNA), a técnica de dosagem de N-acetilglicosamina se torna viável para a determinação indireta do crescimento fúngico. Neste estudo o crescimento dos clones e parental de *P. sajor-caju*, ao final de oito dias de cultivo sólido, foi estimado indiretamente pela análise do conteúdo de N-acetilglicosamina liberado por hidrólise da quitina do micélio utilizando a enzima Viscozyme® (Figura 28).

A maior média de conteúdo de N-acetilglicosamina foi observada no clone PS45, com $36,9 \text{ mg.g}^{-1}$, porém, sem diferenciar significativamente da linhagem parental PS-2001, que apresentou $32,6 \text{ mg.g}^{-1}$. O clone que apresentou a menor concentração de N-acetilglicosamina foi

o PS UV55, diferenciando estatisticamente da linhagem parental com 19,2 mg.g⁻¹ sendo que este clone também foi o que apresentou menor atividade de lacases. O clone PS UV22 que apresentou a maior atividade de lacases, apresentou 31,3 mg.g⁻¹ de N-acetilglicosamina.

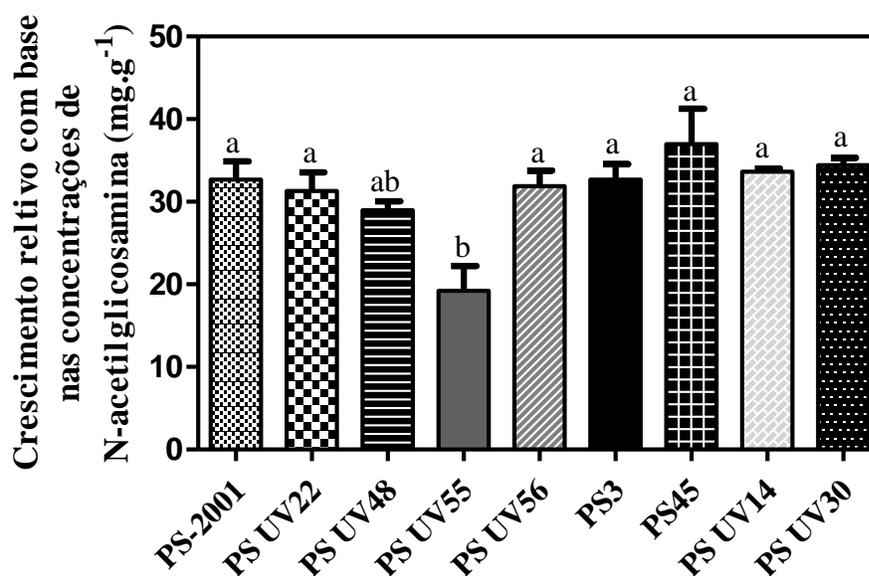


Figura 28. Crescimento relativo com base nas concentrações de N-acetilglicosamina mensurado no 8º dia do cultivo em estado sólido. Os valores correspondem à média de três replicatas e as barras ao desvio padrão. As legendas referem-se aos mutantes, protoclones e parental de *P. sajor-caju*.

Letras iguais nas colunas não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Na Tabela 3 verifica-se que os dados referentes às análises de LiP e MnP (mensuradas no dia em que ocorreu o pico na atividade de lacases em cada clone) foram baixos para o cultivo sólido, não permitindo uma análise quanto à variação entre os clones nas atividades destas enzimas. Não foram detectadas atividade de OAV em nenhum clone. Os dados de proteínas solúveis totais mostram pouca variação entre os clones e parental, tendo valores entre 22,33 (PS UV14) e 37,41 (PS UV55), não tendo relação com as análises de lacases apresentadas na Figura 28.

Tabela 3. Atividade enzimática (LiP e MnP) e proteínas solúveis totais em cultivo em estado sólido dos clones e parental de *P. sajor-caju*.

Linhagens	LiP (U.g⁻¹)	MnP (U.g⁻¹)	Proteínas (mg.g⁻¹)	Dia de cultivo (pico da atividade de Lac)
PS-2001	nd	1,84 ± 0,78	27,87 ± 2,94	6°
PS UV22	0,014 ± 0,004	3,94 ± 1,32	34,81 ± 1,68	6°
PS UV48	nd	2,028 ± 1,09	27,27 ± 2,33	2°
PS UV55	nd	2,04 ± 1,55	37,41 ± 1,8	8°
PS UV56	nd	2,637 ± 1,2	25,65 ± 3,68	6°
PS3	0,032 ± 0,008	nd	23,89 ± 1,41	8°
PS45	0,024 ± 0,004	1,63 ± 0,39	35,54 ± 1,93	6°
PS UV14	nd	0,53 ± 0,2	22,36 ± 7,11	6°
PS UV30	0,07 ± 0,003	1,29 ± 0,56	36,4 ± 1,7	6°

Média de atividades enzimáticas obtidas em cultivo em estado sólido realizadas em triplicata;
nd não detectada pelo método utilizado.

Uma das vantagens da utilização de cultivos em estado sólido para a produção de enzimas é a possibilidade da utilização de resíduos industriais como substrato para o crescimento fúngico e secreção das enzimas, que além de ser mais econômica, colabora para a reciclagem de resíduos. Neste estudo, utilizamos a serragem de *Pinus* sp. que é muitas vezes descartada pelas indústrias serralheiras da região.

4.3.5 Produção de basidiomas pelos protoclonos, mutantes e parental de *P. sajor-caju*

Os protoclonos e mutantes de *P. sajor-caju* foram avaliados quanto ao desenvolvimento de basidiomas em meio contendo serragem de *Pinus* sp. Foram avaliados parâmetros como rendimento, eficiência biológica e produtividade.

Após a etapa de crescimento os sacos foram perfurados e transferidos para a sala de frutificação, 17 dias após o inoculo. Foram utilizados sete sacos para cada clone e linhagem parental, sendo que a maior parte deles já se apresentava totalmente colonizada, com exceção de PS UV22, PS UV48, PS UV55 e PS3, que foram transferidos em triplicata juntamente com os demais em 17 dias apesar de o crescimento ter sido aparentemente inferior e o restante foi transferido, conforme a colonização total dos sacos.

No 6º dia após a abertura dos sacos, ou seja, no 23º dia de cultivo, ocorreu o aparecimento dos primeiros primórdios das linhagens PS UV22 e PS UV56 (Figura 29), cujas linhagens já haviam apresentado formação de primórdios em placa de Petri, e da PS UV30 que apresentou maior crescimento micelial nos meios BDA e SP.

A formação de primórdios em meios artificiais, como o BDA em alguns clones, foi uma indicação de que estes apresentam maior potencial para formação mais rápida de basidiomas. Porém, o clone PS UV48 que também apresentou esta característica de formação de primórdios na placa, não mostrou o mesmo comportamento nos sacos contendo serragem, possivelmente devido à instabilidade ou exigências nutricionais distintas.

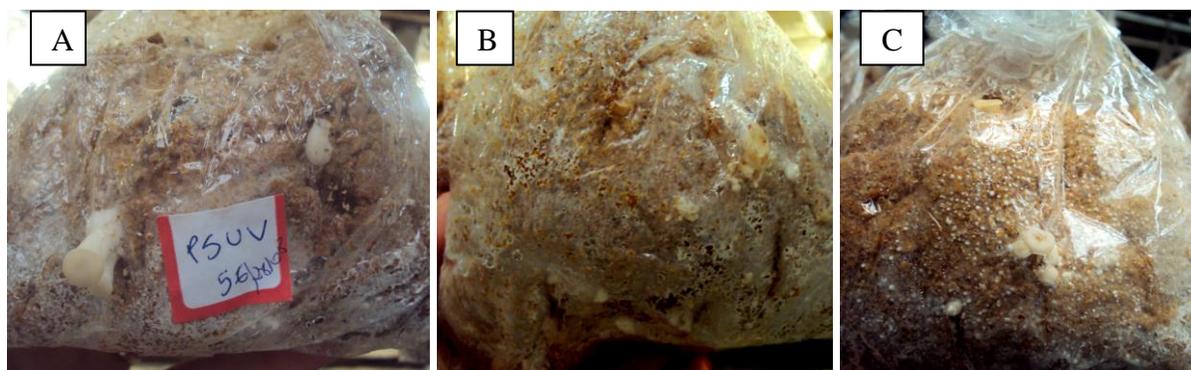


Figura 29. Primórdios formados após 23 dias de cultivo (6º dia após a abertura dos sacos). A) PS UV56; B) PS UV30; PS UV22.

O desenvolvimento de basidiomas foi monitorado diariamente e as coletas que permitiram calcular os parâmetros de produção (R, EB e P) foram realizadas quando observado a estabilização do crescimento dos basidiomas no primeiro fluxo de produção. Verificou-se que os clones mostraram variação quanto ao dia em que foram coletados. Para PS UV56 e PS UV30 a coleta foi realizada já no 29º dia de cultivo, enquanto para PS-2001, PS3 e PS UV14 a coleta foi realizada após um dia. Os demais clones foram coletados até o 36º dia. Os basidiomas de *P. sajor-caju* coletados apresentaram tamanhos que variaram de 2,5 cm a 7 cm (Figura 30) sendo que, nenhum clone apresentou cogumelos maiores, entretanto, PS UV30 apresentou basidiomas de tamanho maior que a média dos demais.

A ausência de basidiomas maiores pode ser justificada pelo tamanho do saco de cultivo e pela quantidade do meio utilizada. Desde que, sacos maiores com maior quantidade de meio possibilitam a produção de cogumelos maiores.

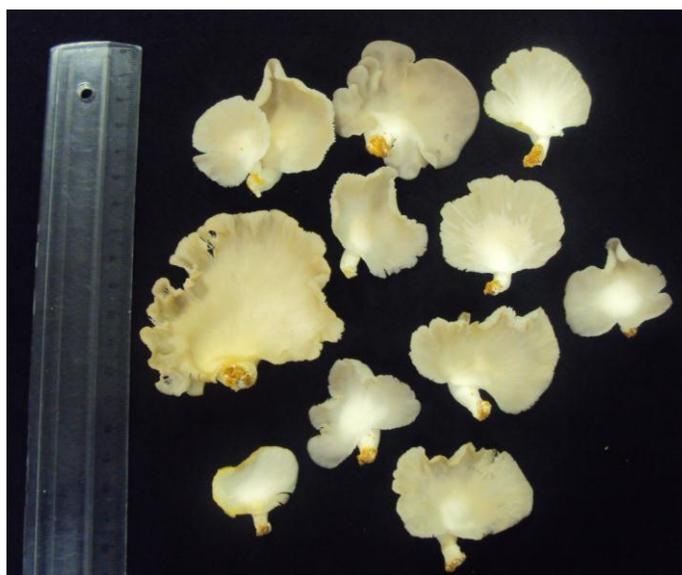


Figura 30. Diferença de tamanho entre basidiomas coletados de *P. sajor-caju*.

O teor de umidade dos cogumelos ficou em torno de 90% e a coloração variou nos tons de cinza e esbranquiçado, alguns apresentaram coloração uniforme e outros, coloração mais escura nas bordas. Alterações morfológicas significativas foram observadas apenas no clone PS

UV22, onde o basidioma apresentou aspecto emaranhado, como mostrado pela Figura 31. A diferença observada entre os demais clones e linhagem parental, são decorrentes de alterações fenotípicas normais, que podem ser observadas entre basidiomas pertencentes a um mesmo saco de cultivo.

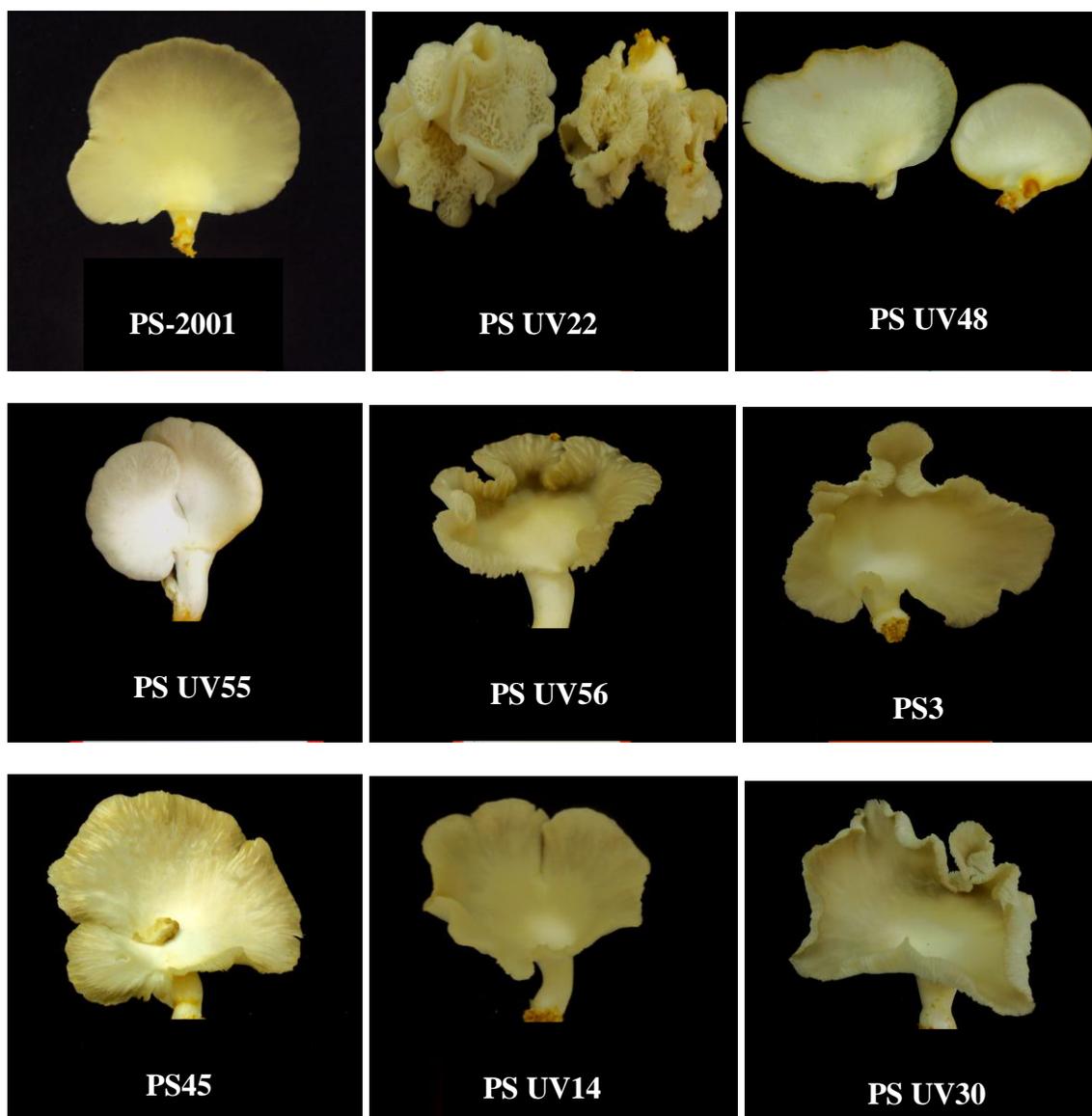


Figura 31. Basidiomas dos protoclones, mutantes e parental de *P. sajor-caju*. As figuras correspondem aos basidiomas das linhagens de *P. sajor-caju* no primeiro fluxo de produção.

São apresentados na Tabela 4 os resultados de rendimento (R) e eficiência biológica (EB) dos basidiomas produzidos pelos clones e linhagem parental de *P. sajor-caju* em sacos de polipropileno. Com relação aos resultados de rendimento, observa-se a maior média para o clone PS UV30 seguido de PS3 e PS UV56, com valores de 6.28, 4.69 e 3.24% respectivamente. A linhagem parental PS-2001 teve média de rendimento de 2.47%, enquanto o menor valor foi observado para o clone PS UV48 com 0,36%. O maior valor de eficiência biológica foi observado para o clone PS UV30 com 19%, média 2,3 vezes maiores que o parental PS-2001 que obteve média de 8.2%.

Tabela 4. Rendimento e eficiência biológica dos basidiomas dos protoclonos, mutantes e parental de *P. sajor-caju*.

Linhagens	Rendimento (%)	Eficiência Biológica (%)	Tempo de cultivo (dias)
PS-2001	2.47 ± 0.15	8.2 ± 0.43	30
PS UV22	2.28 ± 0.27	7.8 ± 0.21	31
PS UV48	0.36 ± 0.09	0.6 ± 0.34	34
PS UV55	0.615	1.02	36
PS UV56	3.24 ± 0.21	10.7 ± 0.51	29
PS3	4.69 ± 0.3	15.22 ± 0.84	30
PS45	3.03 ± 0.23	9.51 ± 0.28	31
PS UV14	2.5 ± 0.45	5.3 ± 0.18	30
PS UV30	6.28 ± 0.39	19.07 ± 0.82	29

Os valores de peso fresco dos basidiomas obtidos em cultivos com serragem de *Pinus* sp. foram obtidos em triplicata, sendo a média utilizada para os cálculos dos parâmetros apresentados acima;

Os valores de eficiência biológica representam a conversão do substrato seco em cogumelos frescos, podendo-se dizer que 1 Kg de cogumelos frescos obtidos de 100 g de substrato seco, representa 100% de eficiência biológica. Stamets (1993) sugere que a melhor

maneira de aumentar a eficiência biológica seria aumentar a quantidade de inóculo. Porém, o desenvolvimento de linhagens melhoradas geneticamente com maior capacidade de colonização do substrato se torna mais viável economicamente, uma vez que a etapa pré inóculo ocorre com maior rapidez e o tamanho do inóculo utilizado pode ser o mesmo das linhagens parentais.

Comparando os resultados de produtividade (P) dos basidiomas dos clones e parental de *P. sajor-caju* na Figura 32, observa-se que os maiores valores são apresentados pelos clones PS UV30 e PS3, com $0,65 \text{ g.g}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ e $0,52 \text{ g.g}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ respectivamente, aumento significativo em relação ao parental PS-2001, que apresentou produtividade de $0,27 \text{ g.g}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$. Outros clones também apresentaram maior produtividade, porém, sem diferença estatística em relação ao parental, é o caso do PS UV56 e PS45. Os menores valores foram observados nos clones PS UV55 e PS UV48, sendo que PS UV55 desenvolveu apenas um basidioma no primeiro fluxo de produção.

Observa-se que os maiores valores de R, EB e P, com exceção do clone PS UV56, foram encontrados entre os clones selecionados para maior velocidade de crescimento micelial, sendo um indicativo de que linhagens com maior crescimento micelial poderiam estar relacionadas à maior produtividade de basidiomas.

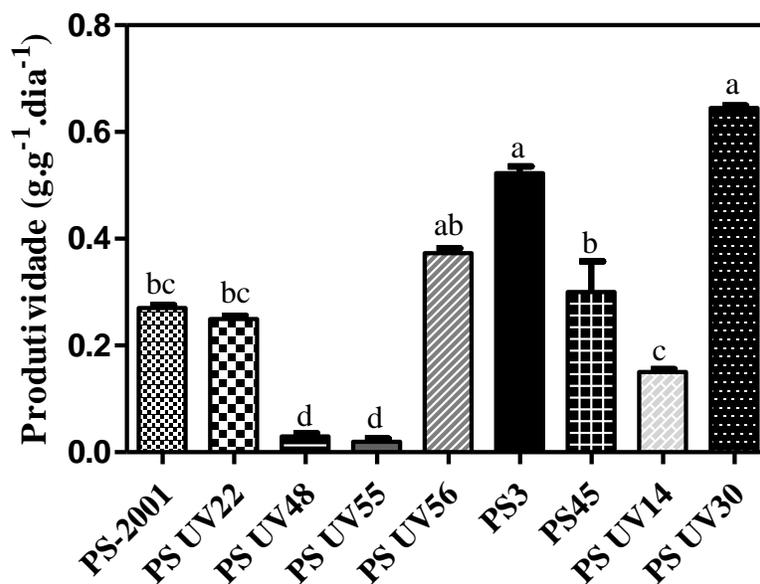


Figura 32. Produtividade dos basidiomas dos clones e parental de *P. sajor-caju*. Os valores correspondem à média de três replicatas e as barras ao desvio padrão. As legendas referem-se aos mutantes, protoclonos e parental de *P. sajor-caju*.

Letras iguais nas colunas não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

O desempenho de formação de basidiomas de PS UV30 e PS3 (clones selecionados por apresentarem maior crescimento micelial em relação ao parental em placas de Petri contendo meio BDA adicionado de corante) corrobora a informação de Silva *et al.* (2005) que relata que o crescimento do micélio influencia na taxa de formação dos primórdios e na produção de cogumelos. Além disso, a velocidade de colonização do substrato pelo fungo se torna importante também pelo fato de que os índices de contaminações são reduzidos (Sales-Campos & Andrade, 2010).

Por outro lado, as baixas produtividades de basidiomas observadas em PS UV48 e PS UV55 provavelmente estão associadas à lenta colonização do substrato por estes clones, o que favorece o desenvolvimento de microrganismos contaminantes, dificultando o desenvolvimento dos basidiomas. Esta observação sobre velocidade de crescimento lenta em alguns clones está de acordo com estudo de Ramasamy & Muthukumarasamy (2012) em mutantes de *Pleurotus* sp. Os autores observaram que todos os mutantes obtidos por radiação UV apresentaram menor taxa de colonização do substrato, entretanto, ao contrário dos nossos dados, houve aumento de produtividade de basidiomas nestas linhagens.

Apesar do pequeno aumento na produtividade, não foi observada diferença significativa nos parâmetros de produção dos basidiomas no protoclon PS45. Resultados semelhantes foram observados por Magae *et al.* (1985) com protoclon em *P. ostreatus*, seis clones regenerantes selecionados aleatoriamente foram avaliados quanto à formação de basidiomas. Não foram observadas diferenças significativas entre os protoclon e a linhagem parental quanto ao diâmetro do estipe, diâmetro do píleo e número de basidiomas. Todavia, foram observadas diferenças quanto ao peso dos basidiomas, onde foi verificado aumento de 5,7 para 18,1% em produção de basidiomas além de diminuição no tempo de cultivo em cinco dos seis clones regenerantes em comparação ao parental. Os mesmos autores relatam que a variação obtida em protoclon de *P. ostreatus* pode ser desencadeada por uma variação natural ou citoplasmática durante o processo de obtenção de protoplastos.

Os resultados observados neste estudo, sobre a variação observada entre os protoclon, mutantes e parental de *P. sajor-caju* demonstram que os processos de protoplastização e mutagênese são aplicáveis no melhoramento de linhagens para maior produtividade de basidiomas. Entretanto, testes adicionais são necessários a fim de determinar a estabilidade dos clones quanto à produtividade, verificar a reprodutibilidade do método utilizado e produtividade nos demais fluxos de produção.

4.4 Melhoramento genético de *L. edodes* para aumento da atividade de fenol-oxidases e produtividade de basidiomas

4.4.1 Seleção dos protoclonos e mutantes de *L. edodes*

Tal como em *P. sajor-caju*, *L. edodes* também possui a capacidade de descoloração de corantes têxteis que está relacionada à secreção de enzimas ligninolíticas (Boer *et al.*, 2004), sendo portanto, importante a seleção de clones com características para aumento da atividade de fenol-oxidases e desenvolvimento micelial mais rápido.

Com relação a um primeiro processo de seleção de 100 colônias, sendo 50 protoclonos e 50 clones após radiação UV, nove foram selecionadas por apresentarem maior relação halo/colônia e cinco por apresentarem maior velocidade de crescimento micelial em relação ao parental, em um total de 14 colônias (dados não mostrados). Os 14 clones selecionados foram submetidos novamente à avaliação da relação halo/colônia e velocidade de crescimento micelial, para verificação da estabilidade dos mesmos. Após o segundo processo de seleção, verificada a estabilidade dos clones, quatro foram selecionados por apresentarem maior relação halo/colônia diferenciando estatisticamente da linhagem parental (Figura 33A), e quatro por apresentarem maiores médias de crescimento em relação à parental LE-06, porém apenas LE3 e LE17 apresentaram diferenças estatísticas pelo teste de Tukey (Figura 33B), em um total de 8 clones. A estabilidade quanto ao crescimento e descoloração pelos protoclonos (LE1, LE3 e LE17) e mutantes (LE UV6, LE UV9, LE UV11, LE UV20 e LE UV23) foi verificada após cinco gerações.

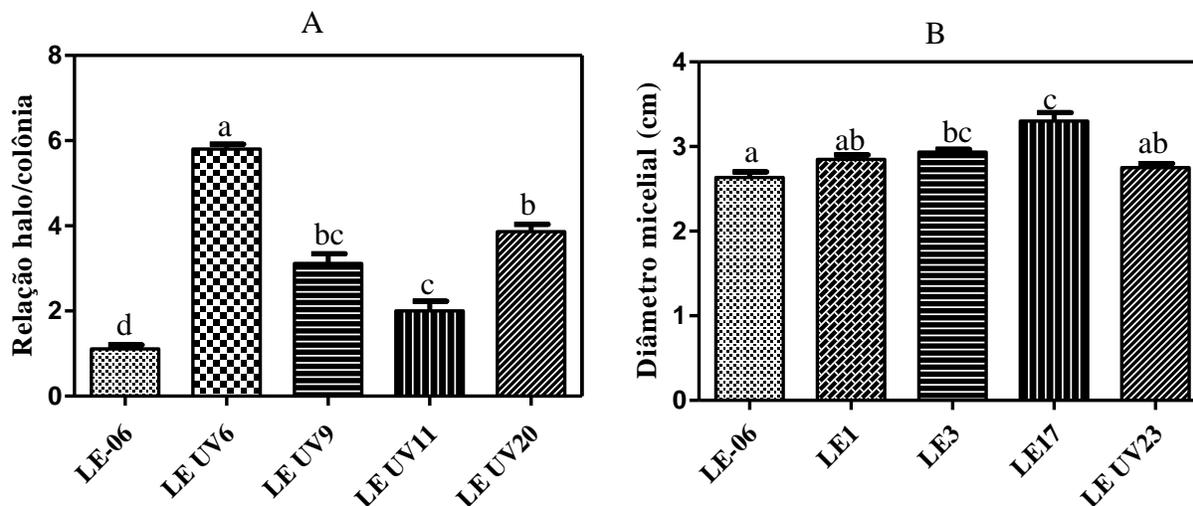


Figura 33. Clones selecionados após o segundo processo de seleção. A) clones com maior relação halo/colônia. B) clones com maior velocidade de crescimento micelial. Nos dados de relação halo/colônia os valores correspondem à média do terceiro dia. Nos dados de halo de crescimento as médias representam os valores obtidos no quarto dia. As barras representam o desvio padrão e as legendas referem-se aos mutantes, protoclonos e parental de *L. edodes*. Letras iguais nas colunas não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Os protoclonos e mutantes também foram avaliados quanto ao crescimento micelial em meio contendo serragem de *Eucalyptus* sp., uma vez que este composto foi utilizado para a realização dos cultivos em estado sólido. Na Figura 34 são mostrados o número de dias necessários para a colonização total da placa de Petri pelos clones e parental de *L. edodes*. Observa-se que, quatro clones mais tardios, apresentaram diferença significativa em relação ao parental LE-06: LE UV6, LE UV9, LE UV11 e LE UV20, sendo que, os mesmos apresentaram a maior relação halo/colônia (Figura 33A) em meio BDA com corante Reactive Blue 220. Os demais clones apresentaram crescimento semelhante ao parental LE-06.

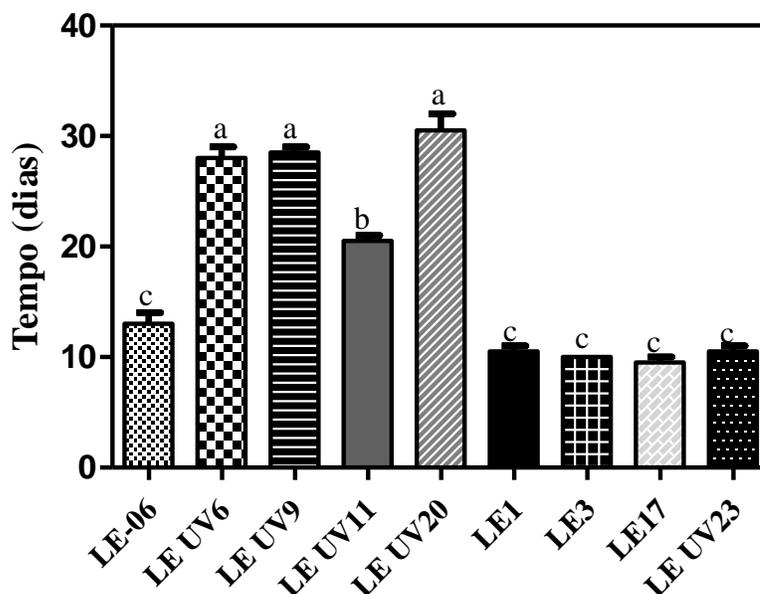


Figura 34. Tempo necessário para colonização total da placa de Petri com meio SE pelos clones e parental de *L. edodes*. Os valores correspondem à média de três replicatas e as barras ao desvio padrão. As legendas referem-se aos mutantes, protoclonos e parental de *L. edodes*. Letras iguais nas colunas não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A variação no tempo de crescimento decorrente de tratamento mutagênico foi observado anteriormente por Adegoke *et al.* (2012). Os autores verificaram em *P. pulmonarius*, que o tempo de exposição à radiação UV provocou uma diminuição do crescimento radial e da velocidade de crescimento em clones variantes. A redução da capacidade de crescimento de fungos devido à radiação UV pode estar relacionada a vários fatores, como por exemplo, a geração de auxotróficos e alterações no metabolismo (Levitin *et al.* 1971). Além disso, as mutações podem aumentar ou diminuir a expressão de metabólitos, enzimas e toxinas (Champlin *et al.* 1981; Hegedus & Khachatourians, 1994).

A Figura 35 corresponde aos protoclonos, mutantes e parental de *L. edodes* em placas de Petri contendo meio BDA com corante Reactive Blue 220. Identificam-se os clones com maior relação halo/colônia (LE UV6, LE UV9, LE UV11, LE UV20) e também os de maior crescimento micelial (LE1, LE3, LE17 e LE UV20).

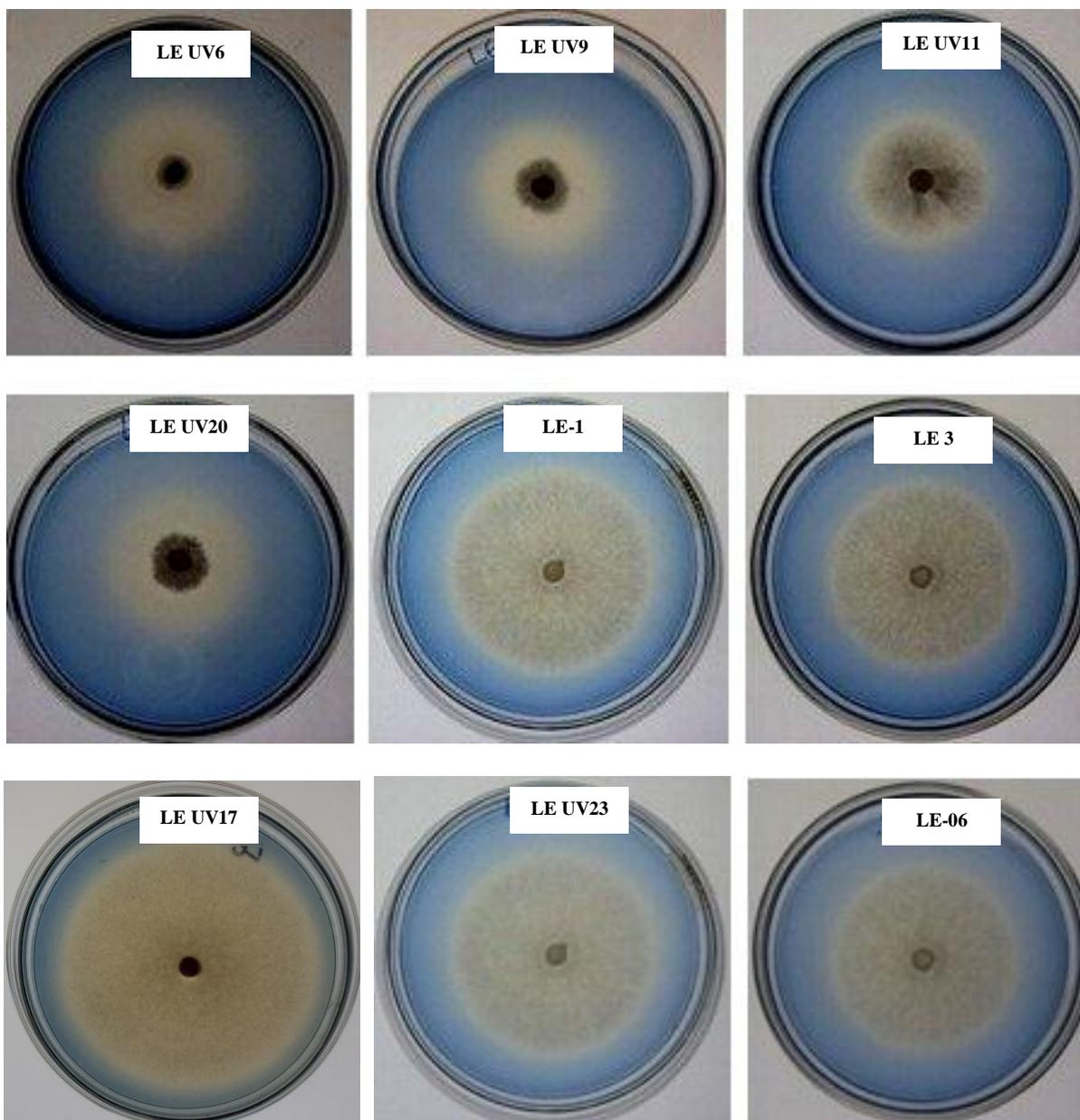


Figura 35. Morfologia e halo de descoloração do corante Reactive Blue 220, dos clones e parental de *L. edodes*, após sete dias de incubação.

4.4.2 Crescimento e atividade de fenol-oxidases de *L. edodes* LE-06 em diferentes meios de cultivo em condição submersa

Como verificado para *P. sajor-caju*, a composição do meio de cultivo pode influenciar no crescimento micelial fúngico e também na secreção de enzimas. Em vista disso, inicialmente foram testados alguns meios em cultivo submerso para a avaliação destes parâmetros com a

linhagem parental LE-06 tendo o intuito de identificar o meio mais apropriado para o crescimento e secreção enzimática.

Na Tabela 5 são apresentados os resultados do 7º, 14º e 21º dias de cultivo, referentes às atividades de lacases por *L. edodes* cultivada em diferentes meios. Até o sétimo dia de cultivo, não foi observado atividade enzimática em nenhum dos meios testados. No 14º dia de cultivo, atividades semelhantes foram observadas para os meios CBDY e CEM, com 18 e 12 U.mL⁻¹ respectivamente não diferenciando estatisticamente. A maior atividade de 31 U.mL⁻¹ foi observada no 21º dia para o meio CBDY. Tal como discutido em *P. sajor-caju*, o meio CBDY pode, pode ter apresentado efeito positivo na secreção de lacases em *L. edodes* devido aos seus diversos componentes nutricionais e teores de cobre.

Tabela 5. Atividade de lacases (U.mL⁻¹) de *L. edodes* LE-06 em diferentes meios de cultivo. Os valores correspondem à média de duas replicatas e o desvio padrão é apresentado ao lado. Os títulos correspondem aos diferentes meios de cultivos testados.

Dias	CBDY	CEM	MYPG	CFS
7	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
14	18.14 ± 7.4 ^a	12.48 ± 1.85 ^a	0 ^b	0 ^b
21	31.48 ± 11.11 ^a	25.18 ± 9.25 ^a	11.11 ± 0 ^b	0 ^c

Letras iguais na horizontal para um mesmo dia não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Com relação à atividade de MnP durante o cultivo de LE-06 nos diferentes meios (Figura 36A), observa-se ausência de atividade nos meios CEM e MYPG. Atividades baixas foram observadas para os meios CFS e CBDY, que apresentaram no último dia de cultivo 0,4 e 1,6 U.mL⁻¹ respectivamente.

Na Figura 36B são apresentados os dados de concentração de proteínas solúveis durante o cultivo de *L. edodes* nos diferentes meios. Verifica-se que no último dia dos experimentos as concentrações foram diferentes, sendo o menor valor de 4,8 mg.g⁻¹ no meio CEM e o maior valor de 6,2 mg.g⁻¹ no meio CFS. Não foi encontrada relação entre as concentrações de proteínas e as atividades enzimáticas.

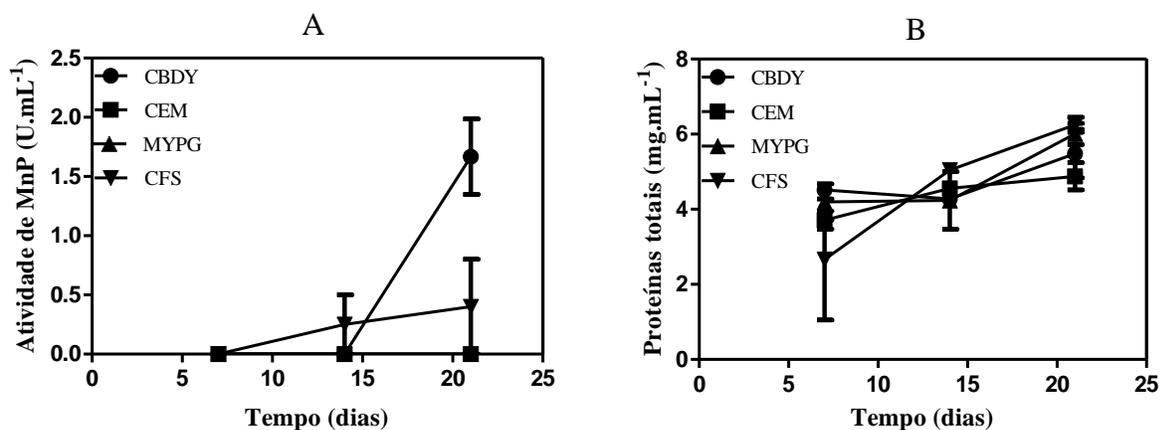


Figura 36. Atividade de MnP (A) e concentração de proteínas totais (B) de *L. edodes* LE-06 de *L. edodes* nos diferentes meios de cultivo. Os valores correspondem à média de duas replicatas. As legendas correspondem aos diferentes meios de cultivos testados.

Não foram verificadas atividades de LiP em nenhum dos meios testados. Os resultados das atividades enzimáticas corroboram os encontrados por Regina & Broetto (2005) que verificaram atividades de lacases e manganês peroxidase e ausência de atividade de lignina peroxidases em cultivos submersos de *L. edodes* em diferentes meios com subprodutos energéticos.

Com relação aos valores de pH, observa-se uma variação entre 3,6 e 6,6. Os cultivos nos meios CBDY, CEM e MYPG apresentaram queda de pH durante o período analisado (Figura 37A). Comportamento diferente pode ser observado para o meio CFS, que apresentou valores praticamente constantes de pH durante o cultivo.

Os dados de crescimento micelial de *L. edodes*, nos 7º, 14º e 21º dias de cultivo nos diferentes meios de cultivo submerso são apresentados na Figura 37B. Para todos os meios testados, o maior crescimento foi observado no 21º dia de cultivo. Os maiores valores foram obtidos com os meios CEM e CBDY, com médias de 3,29 e 3,25 g.L⁻¹, respectivamente, não diferenciando pelo teste de Tukey com $p \leq 0,05$. O meio que proporcionou menor crescimento micelial foi o CFS, onde a maior média foi de 1,31 g.L⁻¹. Para o meio MYPG, o maior valor observado foi 2,38 g.L⁻¹.

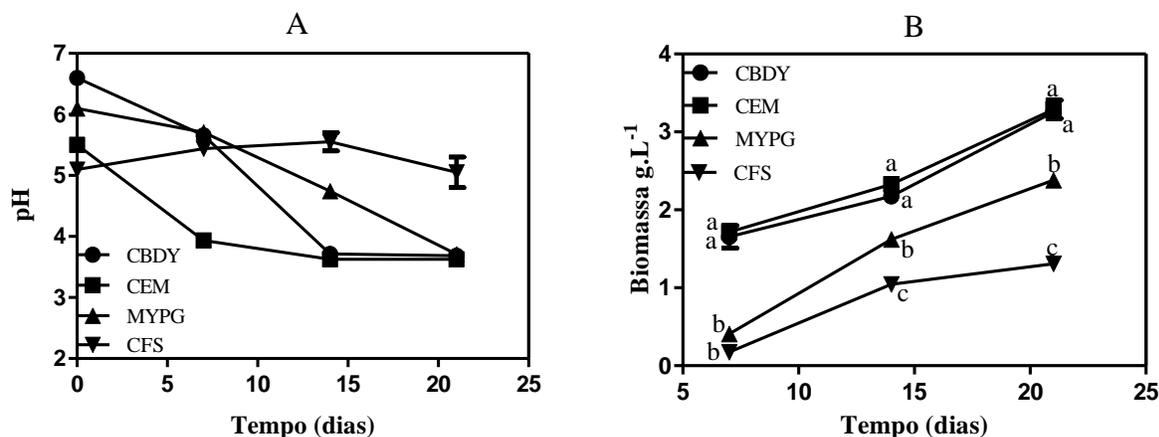


Figura 37. Variação dos valores de pH (A) e biomassa micelial (B) de *L. edodes* LE-06 de *L. edodes* nos diferentes meios de cultivo. Os valores correspondem à média de duas replicatas. As legendas correspondem aos diferentes meios de cultivos testados. Letras iguais para um mesmo dia não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Relacionando os valores de pH e crescimento fúngico, pode-se perceber que para os meios CEM e CBDY, que alcançaram os maiores valores de biomassa, a queda de pH é mais acentuada. Já para o meio CFS, onde o menor crescimento foi observado, houve aumento nos valores de pH, indicando que este pode estar relacionado ao menor metabolismo do fungo nesta condição de cultivo. Estas considerações estão baseadas em Gadd (2001) que relaciona atividade metabólica com a secreção de ácido oxálico.

4.4.3 Cultivo submerso dos protoclonos, mutantes e parental de *L. edodes* para avaliação do crescimento e atividade de fenol-oxidases

L. edodes quando comparado a outros fungos, como por exemplo, *P. sajor-caju* apresenta atividade baixa de fenol-oxidases. Desta maneira, o melhoramento genético de linhagens para o aumento da secreção enzimática pode se tornar importante.

O crescimento micelial e a atividade de enzimas fenol-oxidases dos protoclonos e mutantes de *L. edodes* foram avaliados em comparação com a linhagem parental LE-06 em cultivo submerso. O meio utilizado foi o CBDY e as coletas foram realizadas a cada cinco dias durante 20 dias.

Na Figura 38 estão apresentados os valores correspondentes às atividades enzimáticas de lacases em cultivo submerso dos clones e parental de *L. edodes*, nos 5º, 10º, 15º e 20º dias, sendo que do dia 18 ao dia 20 os cultivos permaneceram estáticos. Observa-se que houve grande variação de atividade enzimática entre os clones testados em comparação ao parental LE-06. No quinto dia de cultivo, cinco clones apresentaram atividade de lacases (LE UV6, LE UV9, LE UV11, LE UV20 e LE UV23). No décimo dia, todos os clones e linhagem parental já apresentaram atividade, sendo a maior atividade enzimática apresentada pelo mutante LE UV9 com 32 U.mL⁻¹. Apesar de não terem apresentado diferenças significativas pelo teste de Tukey, no 15º dia de cultivo, observa-se um aumento nas médias de atividade de lacases nos clones LE UV9 e LE UV20, sendo que a maior média foi verificada em LE UV20 (63 U.mL⁻¹), enquanto a linhagem parental apresentou neste dia a atividade máxima de lacases com 22,7 U.mL⁻¹. As maiores atividades foram observadas no último dia de cultivo (20º dia), onde os mutantes LE UV9 e LE UV 20 apresentaram aumento significativo nas atividades, com médias de 166 e 135 U.mL⁻¹, respectivamente, quando comparados à parental, que apresentou média de 8,6 U.mL⁻¹.

O aumento na atividade enzimática através do melhoramento genético por tratamentos mutagênicos (irradiação e tratamentos químicos) também foi relatado por Jatinder *et al.* (2011) em *Calocybe indica*, o terceiro cogumelo mais popular na Índia. Os autores relataram a indução de mutantes com maior velocidade de crescimento em diferentes meios de cultivo, mutantes com maior secreção de enzimas (endoglicanases e xilanases) e com maior rendimento em relação ao parental.

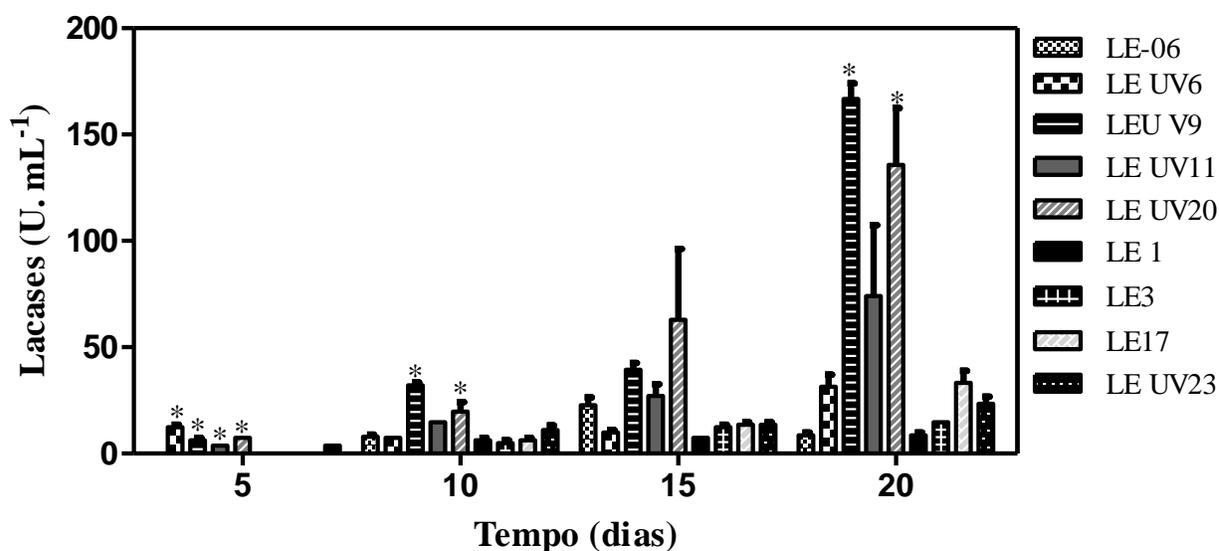


Figura 38. Atividade de lacases em função do tempo em cultivo submerso dos clones e parental de *L. edodes* em meio CBDY.

Os valores correspondem à média de três replicatas e as barras ao desvio padrão. As legendas referem-se aos mutantes, protoclones e parental de *L. edodes*.

* Os valores apresentaram aumento significativo pelo teste de Tukey com $p \leq 0,05$ em comparação ao parental LE-06 para o mesmo dia de cultivo.

Na Figura 39 são apresentados géis de atividade de lacases para as amostras dos clones e parental de *L. edodes* no 5º, 10º, 15º e 20º dias do cultivo submerso, utilizadas para a atividade de lacases na Figura 38, sendo que as bandas referem-se à atividade de lacases sobre ABTS. Embora sem propósito de caracterização de massa molecular, verifica-se no gel referente à primeira coleta, a presença de uma banda posicionada entre os marcadores de massa molecular de 50 e 75 kD, embora estas não tenham sido evidenciadas em alguns clones. No gel referente à segunda coleta (10º dia), observa-se a presença de banda também posicionada entre os marcadores de massa molecular de 50 e 75 kD em alguns clones, sendo que, a parental LE-06 apresentou a banda de menor intensidade. A presença de arrastes nos géis referentes as terceira e quarta coletas dificultou a análise da presença de bandas, porém, é possível relacionar a intensidade dos arrastes com as análises enzimáticas de lacases apresentadas na Figura 38.

Tal como discutido para *P. sajor-caju*, a presença de borrões (detecção da atividade enzimática em várias regiões do gel) é comumente observada em zimogramas e pode ter relação com o tamanho dos poros no gel, difusão da enzima, entre outros fatores.

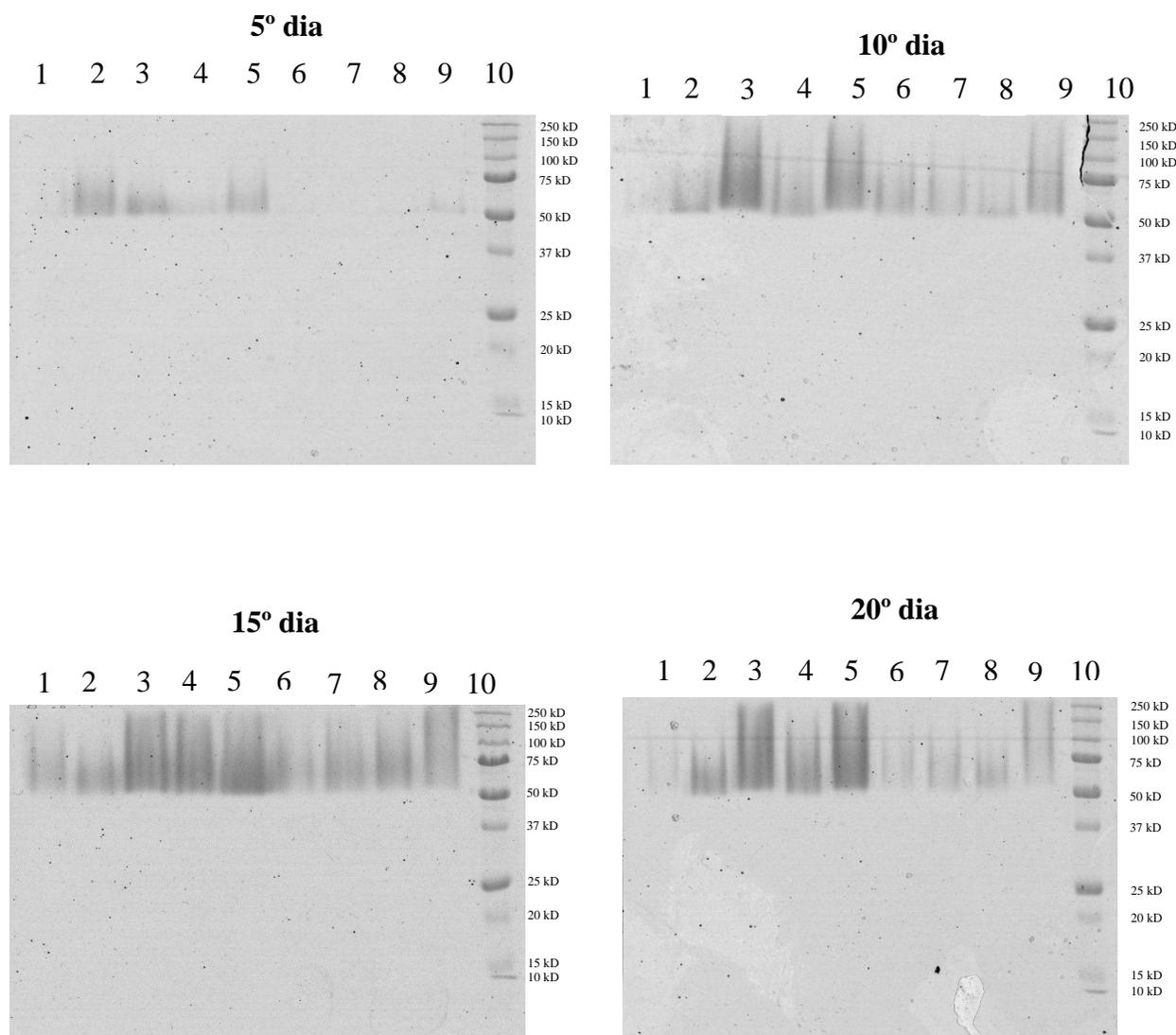


Figura 39. Perfil da atividade de lacases dos clones e parental de *L. edodes* em cultivo submerso, precipitadas a partir de 100 μ L do extrato enzimático, separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida posteriormente corado com ABTS. Os números de 1 a 9 acima dos géis representam: 1- LE06, 2- LE UV6, 3- LE UV9, 4- LE UV11, 5- LE UV20, 6- LE1, 7- LE3, 8- LE17 e 9- LE UV23. O número 10 de cada gel corresponde ao marcador de massa molecular.

Na Figura 40 são apresentados os resultados referentes à variação dos valores de pH durante o cultivo submerso dos clones e parental de *L. edodes*. Observa-se em todos os clones e na linhagem parental queda de pH no início do cultivo, mantendo-se constante a partir do 10° dia para a maior parte dos clones. Os valores variaram entre 3,13 e 5,9, sendo no final do cultivo valores semelhantes para todos os clones e parental.

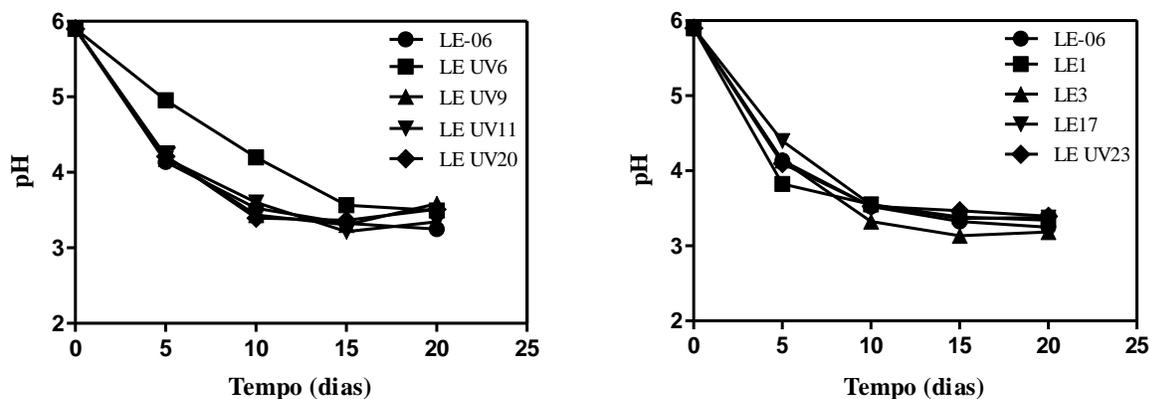


Figura 40. Variação do pH durante cultivo submerso dos clones e parental de *L. edodes* em meio CBDY. Os valores correspondem à média de três replicatas e as barras ao desvio padrão. As legendas referem-se aos mutantes, protoclones e parental de *L. edodes*.

Na Figura 41 são apresentados os valores referentes ao crescimento estimado a partir do peso seco micelial durante o cultivo submerso, onde observa-se variação entre as massas dos clones e linhagem parental de *L. edodes* e entre os diferentes tempos. As maiores médias de biomassa foram observadas nos clones LE UV9, LE UV11 e LE UV20 no 15º dia de cultivo, com as médias de 3,6 g.L⁻¹, 3,2 g.L⁻¹ e 3,5 g.L⁻¹. Os dados da linhagem parental apresentam mostram um crescimento máximo no 15º dia de cultivo, com 2,3 g.L⁻¹, coincidindo com o dia da atividade máxima de lacases. A menor biomassa foi observada no mutante LE UV6 no 5º dia de cultivo, com 0,18 g.L⁻¹. Apesar das diferenças, não foi observado aumento significativo de crescimento em nenhum dos clones em relação ao parental LE-06. Observa-se que os clones que apresentaram maior crescimento micelial foram aqueles selecionados por apresentarem maior halo/colônia (com exceção de LE UV6).

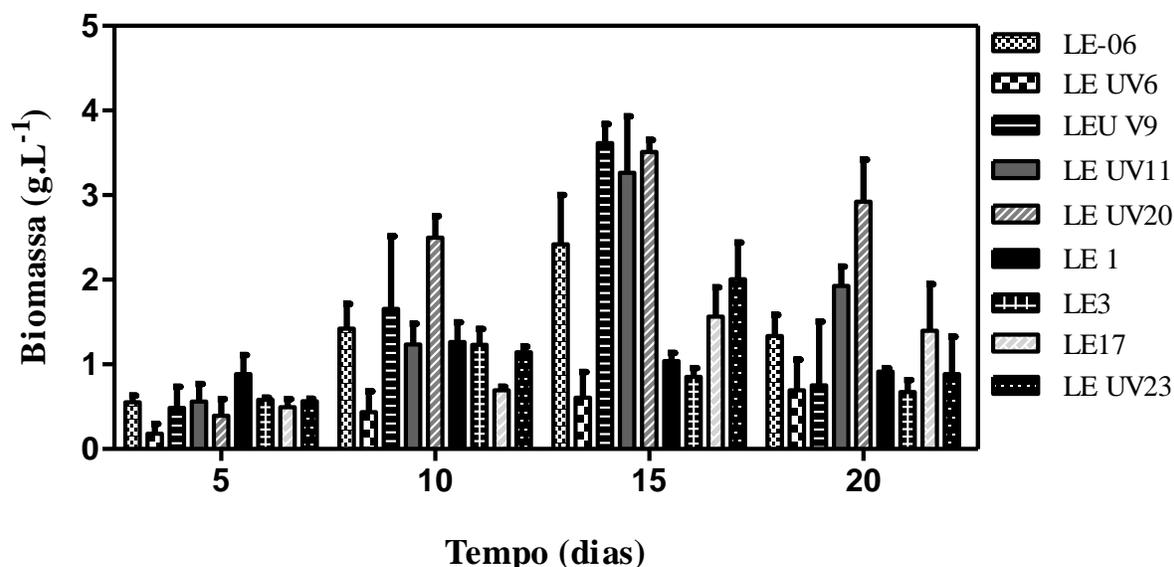


Figura 41. Biomassa micelial em função do tempo em cultivo submerso dos clones e parental de *L. edodes* em meio CBDY. Os valores correspondem à média de três replicatas e as barras ao desvio padrão. As legendas referem-se aos mutantes, protoclones e parental de *L. edodes*.

Como já citado anteriormente, para a verificação da quantidade de enzimas secretadas por cada clone com relação à concentração de biomassa, é necessário a realização dos cálculos de atividade enzimática de lacases com relação à biomassa fúngica (Ab_{lac}). Desta forma é possível verificar se os aumentos nas atividades enzimáticas se devem ao aumento da secreção ou apenas em consequência do aumento de crescimento micelial.

Os valores de Ab_{lac} estão representados na Figura 42. Em cinco dias de cultivo, o clone LE UV6 apresentou aumento significativo nos valores de Ab_{lac} , apresentando 66.700 U.g⁻¹ de lacases, em relação à parental LE-06. Este alto valor deve-se principalmente ao fato da massa fúngica no 5º dia no clone LE UV6 ter apresentado um pequeno valor. Entretanto, os dados de Ab_{lac} para LE UV6 são coerentes com os observados na Figura 35. As maiores médias para Ab_{lac} no 20º dia de cultivo (46.121 e 67.191 U.g⁻¹) foram verificadas nos mutantes LE UV20 e LE UV9, respectivamente, diferenciando significativamente da linhagem parental que apresentou média de 8.591 U.g⁻¹.

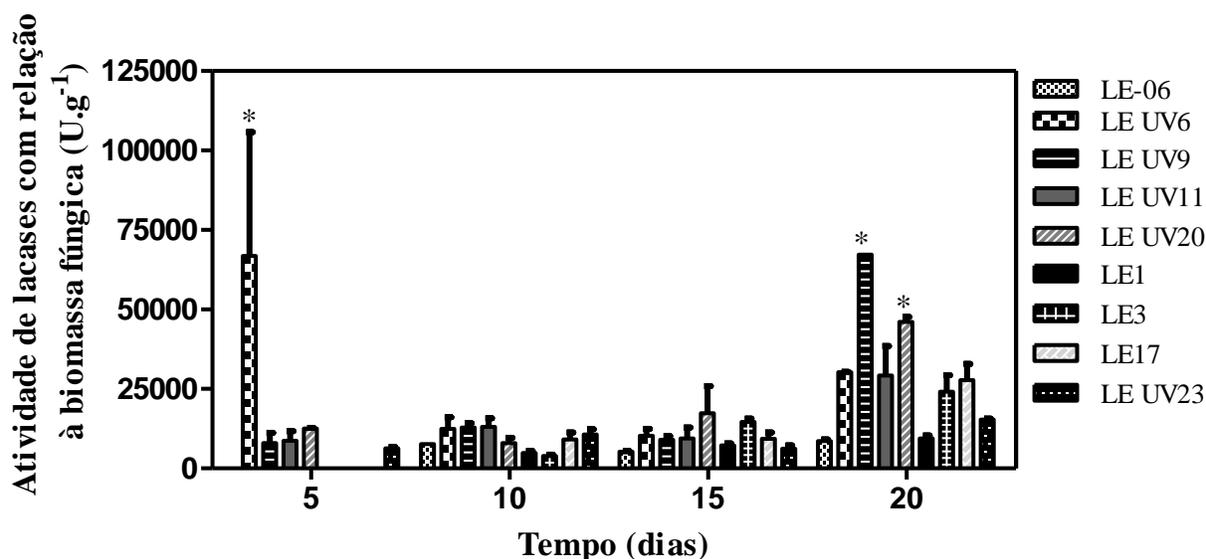


Figura 42. Ab_{lac} - Atividade de lacases com relação à biomassa fúngica (atividade $U.g^{-1}$ de biomassa) no cultivo submerso dos clones e parental de *L. edodes* em meio CBDY. Os valores correspondem à média de três replicatas e as barras ao desvio padrão. As legendas referem-se aos mutantes, protoclonos e parental de *L. edodes*.

* Os valores apresentaram aumento significativo pelo teste de Tukey com $p \leq 0,05$ em comparação ao parental LE-06 para o mesmo dia de cultivo.

Verifica-se pela análise dos dados das Figuras 38 e 42 que tanto a indução de protoclonos como a obtenção de mutantes em *L. edodes* utilizando radiação UV permitem a geração de variabilidade para produção de lacases.

Analisando conjuntamente os valores contidos nas Figuras 33A, e 42, observa-se que no cultivo submerso, os clones com maior secreção enzimática de lacases são aqueles que inicialmente foram selecionados por apresentarem maior relação halo/colônia, indicando que o método de seleção de clones para maior atividade de lacases foi eficiente.

Embora o objetivo principal do trabalho tenha sido obtenção de variantes para o aumento da atividade de lacases, também estudou-se a secreção de OAV, LiP e MnP. Entretanto, a análise para essas enzimas foi realizada apenas no dia em que ocorreu o pico da atividade de lacases em cada clone (Tabela 6). Este procedimento da análise de atividade de OAV, LiP e MnP no dia de pico para lacases também foi repetido para os cultivos posteriores em *L. edodes*. Estão apresentados na Tabela 6 os dados referentes à atividade de MnP e concentração de proteínas solúveis totais referentes ao cultivo submerso dos clones e linhagem parental de *L. edodes*. Com

relação à atividade de MnP, observam-se valores baixos de atividade, variando entre não detectados (LE UV6 e LE3) e $0,93 \text{ U. mL}^{-1}$ (LE UV9), sendo que as maiores médias, verificadas nos clones LE UV9 e LE UV20, mostram relação com a maior atividade de lacases por estes clones. Com relação à concentração de proteínas totais, observa-se relação com os dados de atividade de lacases (Figura 38) em alguns clones, sendo que LE UV9 e LE UV20, que apresentaram as maiores atividades de lacases (166 e 135 U.mL^{-1} , respectivamente), também tiveram as maiores médias de proteínas solúveis totais ($6,34$ e $7,8 \text{ mg.mL}^{-1}$, respectivamente). A menor média para proteínas totais foi observada no mutante LE UV6 ($1,96 \text{ mg.mL}^{-1}$). Não foram verificadas atividades de LiP e OAV em nenhum clone e linhagem parental.

Tabela 6. Atividade enzimática de MnP e concentração de proteínas solúveis totais em cultivo submerso dos clones e linhagem parental de *L. edodes* em meio CBDY.

Linhagens	MnP (U.mL⁻¹)	Proteínas (mg.mL⁻¹)	Dia de cultivo (pico da atividade de Lac)
LE-06	$0,64 \pm 0,08$	$3,41 \pm 0,3$	15°
LE UV6	nd	$1,96 \pm 1,48$	20°
LE UV9	$0,93 \pm 0,12$	$6,34 \pm 0,47$	20°
LE UV11	$0,34 \pm 0,08$	$4,38 \pm 0,44$	20°
LE UV20	$0,87 \pm 0,1$	$7,28 \pm 0,71$	20°
LE1	$0,45 \pm 0,02$	$3,4 \pm 0,25$	20°
LE3	nd	$3,46 \pm 0,12$	20°
LE17	$0,43 \pm 0,14$	$4,11 \pm 0,41$	20°
LE UV23	$0,72 \pm 0,09$	$3,65 \pm 0,2$	20°

Média de atividades enzimáticas obtidas em cultivo submerso realizadas em triplicata;
nd não detectada pelo método utilizado.

4.4.4 Cultivo em estado sólido dos protoclonos, mutantes e parental de *L. edodes* para avaliação do crescimento e atividade de fenol-oxidases

Visto que a serragem de *Eucalyptus* se mostrou o mais adequado entre outros substratos para a produção de Lac em diferentes linhagens de *L. edodes* (Regina *et al.* 2009), o meio de cultivo para a avaliação de secreção enzimática foi composto por serragem de *Eucalyptus* sp.

A atividade de enzimas fenol-oxidases dos protoclonos e mutantes de *L. edodes* foi avaliada em comparação com a linhagem parental LE-06 em cultivo em estado sólido. As coletas foram realizadas com intervalos de dois dias durante oito dias.

Com relação à secreção de lacases, observa-se variação nas atividades enzimáticas (Figura 43). No segundo dia de cultivo apenas o mutante LE UV23 apresentou atividade enzimática ($18,2 \text{ U.g}^{-1}$). No quarto dia, as atividades enzimáticas apresentaram-se baixas para todos os clones e linhagem parental, sendo a maior média observada no mutante LE UV23 ($237,9 \text{ U.g}^{-1}$). No sexto dia, houve um aumento considerável da atividade enzimática, com o maior valor apresentado pelo clone LE3 ($848,7 \text{ U.g}^{-1}$). O pico da atividade enzimática para todos os clones e parental ocorreu no oitavo dia de cultivo, sendo a maior atividade verificada para o mutante LE UV23, com $2.210,7 \text{ U.g}^{-1}$, apresentando aumento significativo em relação à parental LE-06, que apresentou valor máximo de 668 U.g^{-1} .

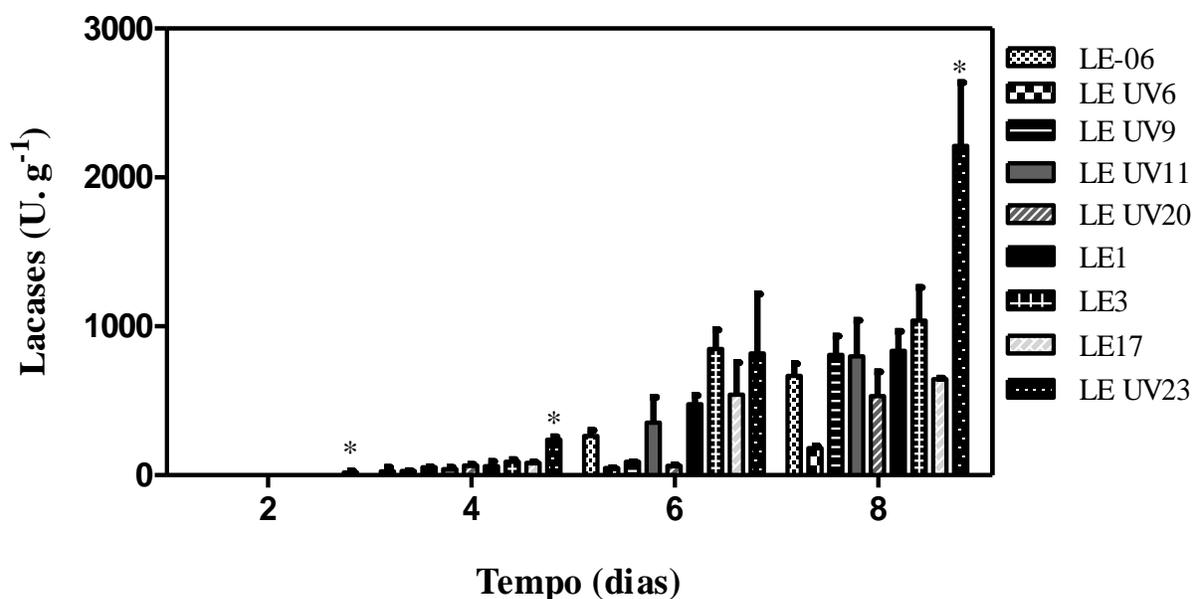


Figura 43. Atividade de lacases em função do tempo em cultivo em estado sólido dos clones e parental de *L. edodes*. Os valores correspondem à média de três replicatas e as barras ao desvio padrão. As legendas referem-se aos mutantes, protoclones e parental de *L. edodes*.

* Os valores apresentaram aumento significativo pelo teste de Tukey com $p \leq 0,05$ em comparação ao parental LE-06 para o mesmo dia de cultivo.

Calloni & Dillon (2007) avaliaram a produção de enzimas lignocelulolíticas durante o crescimento de *L. edodes* em meio contendo serragem de *Eucalyptus* sp. em sacos de polipropileno. O experimento, conduzido durante 63 dias, revelou o pico da atividade de lacases no 7º dia, com média de 614 U.g^{-1} , valor semelhante ao observado neste trabalho (668 U.g^{-1}) pela mesma linhagem no 8º dia de cultivo. Cavallazzi *et al.* (2004) obtiveram atividades próximas a 220 U de lacases por μg de proteína no 25º dia de cultivo em serragem de *Eucalyptus*.

A variação na atividade de lacases entre os clones e linhagem parental de *L. edodes* pode ter sido causada por alteração nos genótipos devido à indução de protoclones e mutagênese. Como referido por Shearer (1995), as quantidades de enzimas produzidas para a degradação da lignina podem ser influenciadas por diversos fatores, entre eles, o genótipo específico do fungo associado à adaptação a um determinado substrato.

Objetivando verificar uma possível mudança nos perfis de atividade de lacases produzidas em cultivo sólido em relação às observadas em cultivo submerso, também realizou-se gel de atividade nos extratos enzimáticos utilizados para análise de lacases apresentadas na figura 43. Na Figura 44 são apresentados géis de atividade de lacases para as amostras dos clones

e linhagem parental de *L. edodes* no 2º, 4º, 6º e 8º dias do cultivo sólido, sendo que as bandas referem-se à atividade de lacases sobre ABTS. Verifica-se no gel que já ao 2º dia de cultivo, podem ser detectadas proteínas com atividade sobre ABTS (apesar da difícil visualização), pelo menos nos mutantes LE UV6, LEUV9, LE UV11 e LE UV20 e LE UV23, sendo que nesta última, embora sem propósito de caracterização de massa molecular, foram observadas duas bandas posicionadas entre os marcadores de massa molecular de 50 e 75 kD. No 4º dia, verificam-se bandas mais nítidas, também podendo ser evidenciadas duas bandas posicionadas entre os marcadores de 50 e 75 kD em LE UV11, LE1, LE3, LE17 e LE UV23 e menos nítidas em LE-06, LE UV6 e LE UV20 sendo visíveis duas bandas para a maior parte delas. Relevante é a observação de maior intensidade de banda no 8º dia no mutante LE UV23 que explica o comportamento da mesma com relação à atividade de lacases na Figura 43.

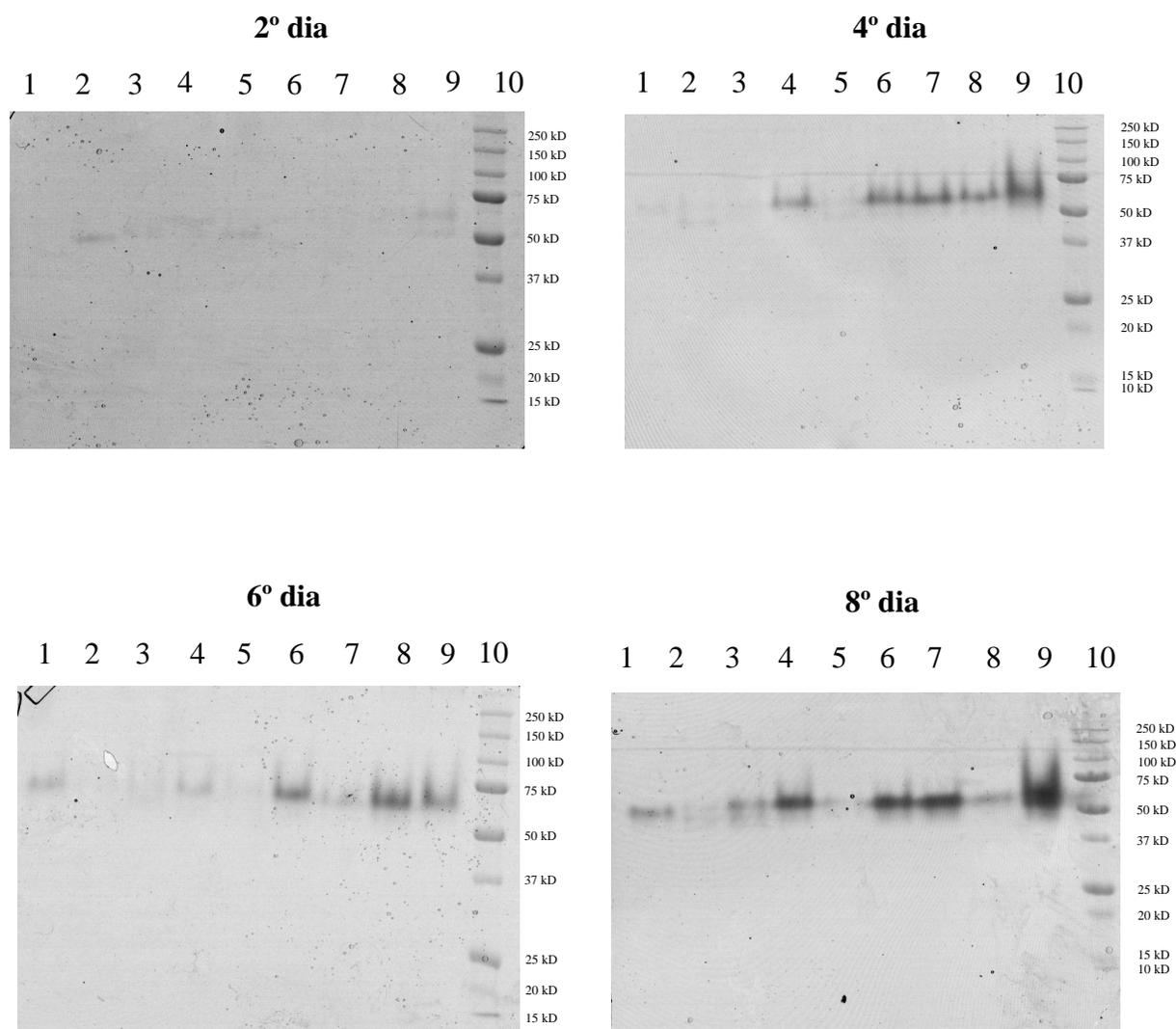


Figura 44. Perfil da atividade de lacases dos clones e parental de *L. edodes* em cultivo em estado sólido, precipitadas a partir de 200 μ L do extrato enzimático, separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida posteriormente corado com ABTS. Os números de 1 a 9 acima dos géis representam: 1- LE06, 2- LE UV6, 3- LE UV9, 4- LE UV11, 5- LE UV20, 6- LE1, 7- LE3, 8- LE17 e 9- LE UV23. O número 10 de cada gel corresponde ao marcador de massa molecular.

Na Figura 45 são apresentados os dados sobre a variação de pH durante o cultivo em estado sólido dos clones e linhagem parental de *L. edodes*. Verifica-se uma variação nos valores entre 4,5 e 6, sendo que a maioria dos clones apresentou aumento de pH até o 4º dia de cultivo com posterior queda. O mutante LE UV20 apresentou aumento até o 2º dia de cultivo, mantendo-se praticamente constante até o final do cultivo. O mutante LE UV23, que apresentou a maior atividade de lacases neste cultivo, teve aumento nos valores de pH até o 2º dia de

cultivo, com queda acentuada para 4,5 no 8º dia, onde também ocorreu o pico da atividade enzimática. O aumento nos valores até o quarto dia pode ter relação com a diminuição de ácidos orgânicos pelo fungo (Ávila *et al.*, 2009). Já a diminuição dos valores de pH, tal como discutido para *P. sajor-caju* e no cultivo submerso, pode estar relacionado a diversos fatores, como a produção de ácidos orgânicos durante o metabolismo fúngico (Gadd, 2001).

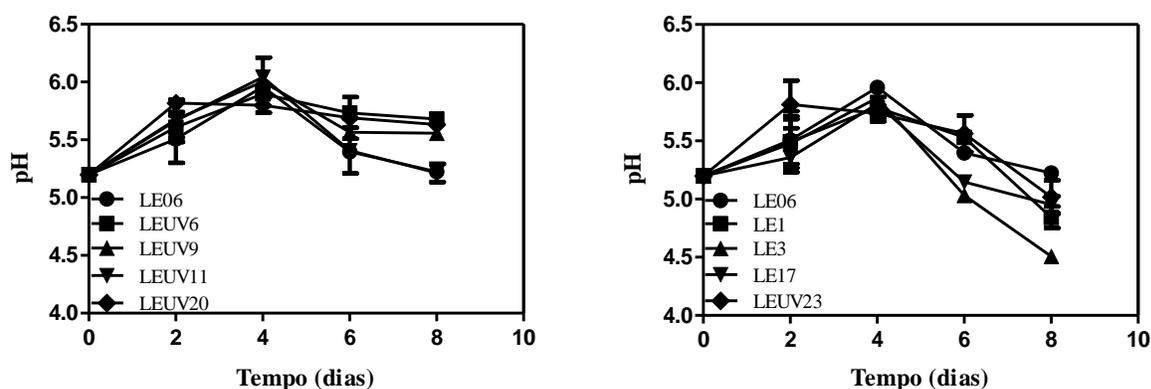


Figura 45. Variação do pH durante cultivo em estado sólido de linhagens de *L. edodes*. Os valores correspondem à média de três replicatas e as barras ao desvio padrão. As legendas referem-se às linhagens mutantes, protoclonas e parental de *L. edodes*.

O crescimento micelial dos clones e linhagem parental de *L. edodes* ao final de oito dias de cultivo foi estimado a partir da análise do conteúdo de N-acetilglicosamina, que é expresso na Figura 46. As biomassas miceliais foram semelhantes, sendo que o clone LE3 apresentou a maior média, com 49 mg.g^{-1} de N-acetilglicosamina, porém, sem diferenciar significativamente da linhagem parental LE-06, que apresentou 42 mg.g^{-1} . O clone que apresentou menor crescimento micelial foi o LE UV6 com $36,7 \text{ mg.g}^{-1}$ de N-acetilglicosamina. O mutante LE UV23 que teve a maior atividade de lacases, apresentou $39,3 \text{ mg.g}^{-1}$ de N-acetilglicosamina.

Analisando conjuntamente a Figura 34 e os dados da Figura 46, observa-se que as proporções do lignocelulósico (serragem de *Eucalyptus* sp.) interferem no crescimento fúngico. Visto que, o comportamento de crescimento apresentado na Figura 34 (crescimento em placa em meio Serragem de *Eucalyptus* sp.), com grande variação entre os clones e linhagem parental, mudou para um comportamento menos variável analisando os dados de N-acetilglicosamina na

Figura 46. Isso poderia ser explicado pela maior presença de compostos fenólicos bem como à maior quantidade de serragem e umidade disponível presentes no substrato utilizado para os cultivos em estado sólido para a produção de enzimas.

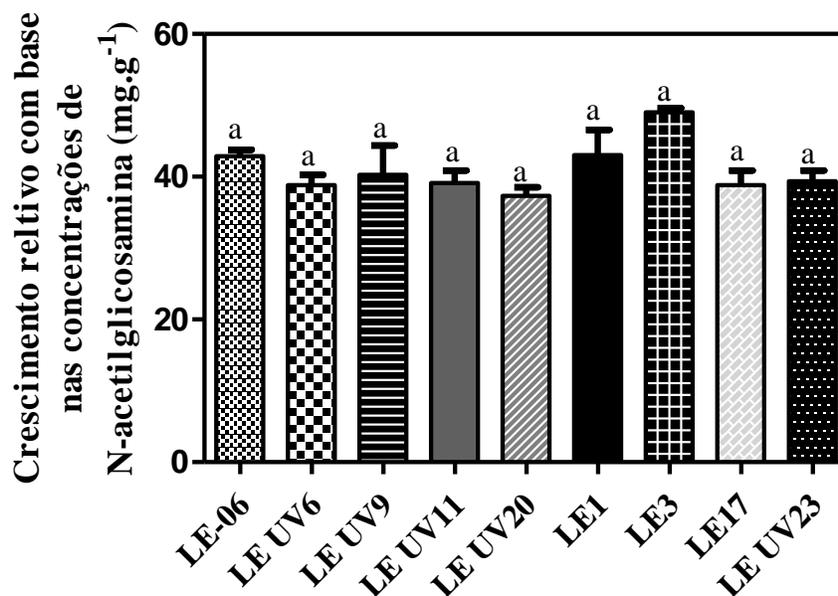


Figura 46. Crescimento relativo com base nas concentrações de N-acetilglicosamina dos clones e linhagem parental de *L. edodes* mensurado no 8º dia do cultivo em estado sólido. Os valores correspondem à média de três replicatas e as barras ao desvio padrão. As legendas referem-se aos mutantes, protoclonos e parental de *L. edodes*. Letras iguais nas colunas não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

São apresentados na Figura 47 os dados referentes à atividade de lacases relacionada à biomassa fúngica (Ab_{lac}) no 8º dia do cultivo em estado sólido dos clones e linhagem parental de *L. edodes* onde pode ser notada variação nos valores obtidos. O maior valor de Ab_{lac} foi observado no mutante LE UV23, que apresentou $55,8 \text{ U.mg}^{-1}$ de N-acetilglicosamina, diferenciando significativamente da parental LE-06, onde foi observada Ab_{lac} de $14,4 \text{ U.mg}^{-1}$ de N-acetilglicosamina. Este dado confirma que o mutante LE UV23 secreta maior quantidade de lacases em cultivo sólido e este fato não está relacionado com maior crescimento micelial por esta linhagem.

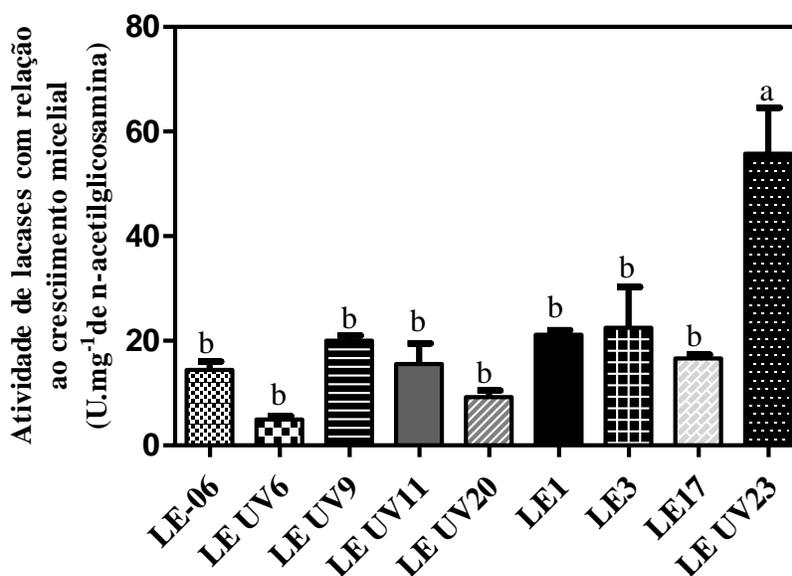


Figura 47. Ab_{lac} - Atividade de lacases com relação à biomassa fúngica (atividade $U.g^{-1}$ de biomassa) no cultivo em estado sólido dos clones e parental de *L. edodes*. Os valores correspondem à média de três replicatas e as barras ao desvio padrão. As legendas referem-se às linhagens mutantes, protoclones e parental de *L. edodes*. Letras iguais nas colunas não diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Não foram verificadas atividades de LiP e OAV nos extratos enzimáticos dos dias de pico para Lac em cada clone de *L. edodes* pelo método utilizado. O mesmo foi observado por Calloni & Dillon (2007), onde também foi demonstrado que *L. edodes* não produz estas enzimas em cultivo contendo serragem de *Eucalyptus sp.* Também não foi verificada atividade de LiP no trabalho realizado por Cavallazzi *et al.* (2004) em cultivo utilizando serragem de *Eucalyptus sp.* por três linhagens de *L. edodes*.

Sabendo que são vários os fatores que contribuem para a ativação do sistema ligninolítico e que o substrato empregado para a análise enzimática também pode modificar os resultados, mesmo que não tenham sido detectadas atividades de LiP e OAV, não pode ser totalmente descartada a secreção destas pelos clones e linhagem parental.

Tal como no cultivo submerso, as atividade de MnP, e o conteúdo de proteínas totais solúveis foram mensurados apenas no dia em que ocorreu o pico das lacases, com propósito de caracterização. Verifica-se na Tabela 7, aumento de 8,5 vezes na atividade de MnP no mutante LE UV23 quando comparado ao parental, sendo as atividades de 11,92 e 1,34 $U.g^{-1}$

respectivamente. Os clones LE UV9, LE UV11 e LE3 também apresentaram aumento na atividade de Lac, com médias de 2,9, 3,31 e 4,45 U.g⁻¹. Os valores de proteínas totais, mensurados no 8º dia de cultivo em estado sólido apresentaram-se semelhantes para todos os clones e linhagem parental. Isto pode ser devido ao fato do meio contendo serragem já apresentar grande quantidade de proteínas, sobre valendo sobre as proteínas secretadas pelo fungo.

Tabela 7. Atividade enzimática de MnP e concentração de proteínas solúveis totais em cultivo em estado sólido dos clones e linhagem parental de *L. edodes*.

Linhagens	MnP (U.g⁻¹)	Proteínas (mg.g⁻¹)	Dia de cultivo (pico da atividade de Lac)
LE-06	1,34 ± 0,71	15,4 ± 0,27	8º
LE UV6	0,4 ± 0,4	14,7 ± 1,14	8º
LE UV9	2,9 ± 1,77	16,2 ± 0,18	8º
LE UV11	3,31 ± 1,81	14,6 ± 0,33	8º
LE UV20	nd	16,6 ± 0,03	8º
LE1	1,88 ± 0,22	16,5 ± 2,01	8º
LE3	4,45 ± 0,81	13,5 ± 0,5	8º
LE17	0,4 ± 0,13	15,5 ± 0,7	8º
LE UV23	11,92 ± 1,81	14,3 ± 2,4	8º

Média de atividades enzimáticas obtidas em cultivo em estado sólido realizadas em triplicata;
nd não detectada pelo método utilizado.

As baixas atividades de MnP encontradas neste estudo poderiam ser explicadas devido ao curto tempo de condução do experimento, sendo que esta enzima necessita um tempo maior para alcançar o pico enzimático, como relatado por Calloni & Dillon (2007), onde a atividade máxima de MnP foi observada no 35º dia de cultivo, com cerca de 255 U.g-1. Mesmo sabendo desta informação, o experimento não foi conduzido por mais tempo, pois o interesse principal entre as enzimas fenol-oxidases neste trabalho foi a atividade de lacases.

Durante o cultivo em estado sólido dos clones e parental *L. edodes*, notou-se variação com relação à coloração da serragem de *Eucalyptus* sp. que passa a ganhar tons mais claros, conforme o tempo de cultivo, sendo que os clones que cresceram menos, visualmente degradaram menos o substrato. Observações semelhantes foram feitas por Brienzo *et al.* (2007) que comprovaram que há muitas mudanças, tanto qualitativa e quantitativa, nos resíduos de *Eucalyptus* sp. durante o crescimento e frutificação de *L. edodes*. Os autores descreveram diminuição dos teores de celulose, hemicelulose e lignina, sendo que esta última é atacada pelo fungo principalmente nas fases iniciais da biodegradação. Após cinco meses de cultivo, foi verificado decréscimo de 18-47% de celulose e 39-60% de lignina. O clareamento observado na serragem pode ser devido à oxidação de compostos derivados da lignina, pois, Guillén *et al.* (2000) observaram a oxidação de derivados da lignina como metoxihidroquinonas por lacases em *P. eryngii*.

4.4.5 Estudo da produção de basidiomas nos protoclonos, mutantes e parental de *L. edodes*

Os protoclonos, mutantes e parental de *L. edodes* foram cultivados em sacos de polipropileno contendo meio composto por serragem de *Eucalyptus* sp. a fim de verificar a produtividade dos basidiomas. Justificando a utilização do meio composto por serragem para a produção dos basidiomas de *L. edodes*, Eira *et al.* (1997) relataram que a serragem é o principal componente utilizado na maioria das misturas, em cultivos axênicos do shiitake, sendo a serragem de *Eucalyptus* sp. a mais comumente utilizada.

A etapa de colonização dos sacos em estufa ocorreu durante 30 dias para algumas linhagens (LE-06, LE UV11, LE1, LE3 e LE17) e 37 dias para outras (LE UV6, LE UV9, LE UV20 e LE UV23). Após este período, os sacos receberam choque térmico em geladeira a 4 °C durante 48 h para a indução da formação dos basidiomas. O choque térmico é indispensável para que ocorra a frutificação ou desenvolvimento de basidiomas de *L. edodes*. Segundo Tokimoto &

Fukuda (1997) são necessárias mudanças para a formação dos basidiomas em *L. edodes*, as principais são redução da temperatura e aumento da umidade e luminosidade, fazendo com que o metabolismo do fungo modifique, forçando-o a realocar suas fontes de energia para a produção de cogumelos.

Até o fechamento do presente trabalho, que ocorreu após 50 dias de cultivo dos clones e parental de *L. edodes*, não foi observado formação de basidiomas, não permitindo a obtenção dos parâmetros de produção.

Os dados do presente trabalho mostram que tanto a obtenção de protoplastos como sua regeneração podem apresentar alterações em número, de acordo com a concentração da enzima e tempo de ação enzimática, e ainda, que os proclones apresentaram variabilidade, quanto ao crescimento, secreção de fenol-oxidases e produtividade de basidiomas. Esta variabilidade pode ser explicada por fatores genéticos ou citoplasmáticos, decorrentes da segregação de núcleos e mitocôndrias durante a formação de protoplastos. Entretanto, como observado, embora a formação e regeneração de protoplastos sejam geradoras de variabilidade, clones com maior secreção de lacases e produtividade de basidiomas foram encontrados entre os obtidos de protoplastos tratados com radiação UV.

A continuidade dos estudos de produção de lacases bem como de produtividade de basidiomas são necessários para obter maior quantidade de dados sobre o potencial econômico dos clones selecionados.

5 CONCLUSÕES

- O número de protoplastos varia para cada espécie de acordo com a concentração enzimática e tempo de ação enzimática;
- A mortalidade dos protoplastos é diretamente proporcional ao tempo de exposição à radiação UV;
- Através da protoplastização e mutagênese de protoplastos é possível gerar variabilidade em *P. sajor-caju* e *L. edodes*;
- O método de seleção utilizando meio BDA adicionado do corante Reactive Blue 220 apresenta-se viável no isolamento de variantes de *P. sajor-caju* e *L. edodes* com maior potencial de secreção de fenol-oxidases, bem como para a seleção de variantes com maior crescimento micelial;
- O caldo batata dextrose (CBDY) apresentou-se como o meio mais apropriado entre os testados para a secreção de lacases tanto na linhagem parental de *L. edodes* como em *P. sajor-caju*.

Com relação à *P. sajor-caju*:

- A partir das análises enzimáticas do cultivo em estado sólido foi possível a identificação de dois clones (PS UV22 e PS UV48) com aumento significativo de atividade de lacases em relação ao parental PS-2001;
- A partir das análises enzimáticas do cultivo submerso foi possível a identificação de dois clones (PS UV55 e PS UV56) com aumento significativo de atividade de lacases em relação ao parental PS-2001;
- O cultivo dos basidiomas em serragem de *Pinus* sp. permitiu a identificação de dois clones (PS3 e PS UV30) com aumento significativo de produtividade em relação ao parental PS-2001;

Com relação à *L. edodes*:

- O cultivo em estado sólido permitiu a identificação de um clone (LE UV23) com aumento significativo na atividade de lacases em relação à parental LE-06;

- O cultivo submerso permitiu a identificação de clones (LE UV6, LE UV9, LE UV11 e LE UV20) com aumento significativo na atividade de lacases em relação ao parental LE-06;

6 PERSPECTIVAS

- Verificar a estabilidade dos melhores clones visando possível aplicação industrial;
- Realizar cultivos dos protoclones e mutantes de *L. edodes* e *P. sajor-caju* em diferentes meios de cultivo submerso para avaliação do crescimento e secreção de fenol-oxidases;
- Realizar cultivos sólidos dos protoclones e mutantes de *L. edodes* e *P. sajor-caju* utilizando diferentes resíduos agroindustriais para avaliação do crescimento e secreção de fenol-oxidases;
- Otimizar o processo de produção e secreção enzimática dos clones com maior secreção de fenol-oxidases em biorreatores com agitação mecânica em meio CBDY a fim de aumentar a produtividade enzimática;
- Realizar estudo com os clones que apresentaram maior produtividade de basidiomas, visando possível aplicação industrial;
- Realizar estudos genéticos a fim de identificar possíveis alterações no genoma dos protoclones e mutantes de *L. edodes* e *P. sajor-caju*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adegoke, E. A.; Oloke Julius. Kola, J. O.; Yadav, A.; Chandral, T. B. (2012). Improvement of Laccase Production in *Pleurotus pulmonarius*-LAU 09 by Mutation. **J. Microbiol. Res.** 2: 11-17.
- Alcamo, I. E. (2000). **Fundamentals of microbiology**. 6 ed. Jones and Bartlett Publishers.
- Amer, G. I.; Drew, S. W. (1980). Microbiology of lignin degradation. In: Tsao, G.T.; Flickinger, M.C.; Finn, R.K. (Ed.) **Ann. Rep. Ferment. Proc.** 4: 67-103.
- Ávila, C. L. S.; José Cardoso Pinto, J. C.; Figueiredo, H. C. P.; Augusto Ramalho de Moraes, A. R.; Pereira, O. G.; Schwan, R. F. (2009). Estabilidade aeróbia de silagens de capim-mombaça tratadas com *Lactobacillus buchneri*. **R. Bras. Zootec.** 38: 779-787.
- Azevedo, J. L. (1998). **Genética de Microrganismos**. Goiânia, GO. Editora UFG. 478p.
- Bachman, B. J.; Bonner, B. M. (1959). Protoplasts from *Neurospora crassa*. **J. Bacteriol.** 58: 550-556.
- Baldrian, P.; Gabriel, J. (2002). Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. **FEMS Microbiol. Lett.** 206: 69-74.
- Banat, I. M.; Singh-Nee, N.; Poonam, S. D.; Marchant, R. (1996). Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review. **Bioresource Technol.** 58: 217-227.
- Barr, D.P.; Aust, S. D. (1994). Mechanism white rot fungi use to degrade pollutants. **Environ. Sci. Technol.** 28: 78-87.
- Bettin, F.; Rosa, L. O., Montanari, Q.; Calloni, R.; Gaio, T. A.; Malvessi, E.; Silveira, M. M.; Dillon, A. J. P. (2011). Growth kinetics, production, and characterization of extracellular laccases from *Pleurotus sajor-caju* PS-2001. **Process Biochem.** 46: 758-764.

Bittencourt, L. R.; Silveira, M. M. e Dillon, A. J. P. (2002), Quantificação de massa celular de *Penicillium echinulatum* a partir do conteúdo de quitina hidrolisada enzimaticamente. **Programa e Resumos do VII Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas**. Maringá, p.70.

Boer, C. G.; Obici, L.; de Souza, C. G.; Peralta, R. M. (2004). Decolorization of synthetic dyes by solid state cultures of *Lentinula (Lentinus) edodes* producing manganese peroxidase as the main ligninolytic enzyme. **Bioresour. Technol.** 94:107-12.

Bonatti, M.; Karnopp, P.; Soares, H. M.; Furlan, S. A. (2004). Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. **Food Chem.** 88: 425-428.

Bononi, V. L.; Capelari, M.; Trufem, S. F. B. (1999) **Cultivo de cogumelos comestíveis**. 2 ed. São Paulo: Ícone. 206p.

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.

Brienzo, M.; Silva, E. M.; Milagres, A. M. (2007). Degradation of eucalypt waste components by *Lentinula edodes* strains detected by chemical and near-infrared spectroscopy methods. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 141: 37-50.

Call, H. P.; Mücke, I. (1997). History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lygnozyl® process): Minireview. **J. Biotechnol.** 53: 163-202.

Calloni, R.; Dillon, A. J. P. (2007). Perfil de secreção de enzimas lignocelulolíticas por *Lentinula edodes* em serragem de *Eucalyptus* spp. **Resumos do Jovem Pesquisador**, Universidade de Caxias do Sul.

Camargo, L. E. A. (1995). **Análise genética da resistência e da patogenicidade**. In: Bergamin Filho, A. et al. Manual de fitopatologia. 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres. 1: 470-492.

Carlile, J. M.; Watkinson, S. C. (1996). **The Fungi**. 3 ed. London: Academic Press. 482p.

Carvalho, W.; Canilha, L.; Ferraz, A.; Milagres, A. M. F. (2009). Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Quim. Nova**. 32: 2191-2195.

Cavallazzi, J. R. P.; Brito, S. M.; Oliveira, A. G. M.; Villas-Bôas, G. S.; Kasuya, M. C. M. (2004). Lignocellulolytic enzymes profile of three *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler strains during cultivation on eucalyptus bark-based medium. **J. Food. Agr. Environ**. 2: 291-297.

Champlin, F. R.; Cheung, P. Y. K.; Pekrul, S. Smith, R. J.; Burton, R. L.; Grula, E. A. (1981): Virulence of *Beauveria bassiana* mutants for the pecan weevil. **J. Econ. Entomol**. 74: 617-621.

Chang, S. T.; Buswell, J. A.; Miles, P. G. (1993). **Genetics and breeding of edible mushrooms**. Gordon and Breach Science. 329p.

Chang, S. T.; Miles, P. G. (1989). **Edible mushrooms and their cultivation**. Florida: CRC Press.

Cheung, L. M.; Cheung, P. C. K.; Ooi, V. E. C. (2003). Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. **Food Chem**. 81: 249-255.

Claus, H. Laccases: structure, reactions, distribution. (2004). **Micron**. 35: 93-96.

Cohen, R.; Persky, L.; Hadar, Y. (2002). Biotechnological applications and potential of wooddegrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. **Appl. Microbiol. Biot**. 58: 582-594.

Coutinho, L.N. Cultivo de espécies comestíveis de cogumelos. Outubro, 2007. Disponível em: <http://www.geocities.com/esabio.geo/cogumelo/agaricus.htm>.

Crawford, R. L.; Crawford, D. L. Bioremediation: principles and applications. (1996). **Cambridge University Press**. 412p.

Di Piero, R. M. (2003). Pontencial dos cogumelos *Lentinula edodes* (shiitake) e *Agaricus blazei* (cogumelo-do-sol) no controle de doenças em plantas de pepino, maracujá e tomate, e a purificação parcial de compostos biologicamente ativos. Piracicaba. **Tese de doutorado**. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo.

Dwivedi, N. U.; Singh, P.; Pandey, P. V.; Kumar, A. (2001). Structure–function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. **J. Mol. Catal. B-Enzym.** 68: 117-128.

Eyini, M.; Rajkumar, K.; Balaji, P. (2006). Isolation, regeneration and PEG-Induced fusion of protoplasts of *Pleurotus pulmonarius* and *Pleurotus florida*. **Mycobiology.** 34: 73-78.

Ferreira, J. E. F. (1998). **Produção de cogumelos**. Agropecuária, Guaíba. 137 p.

Fortes, R. C.; Taveira, V. C.; Novaes, M. R. C. G. (2006). The immunomodulator role of β -D-glucans as co-adjuvant for cancer therapy. **Rev. Bras. Nut. Clín.** 2: 163-8.

Freire, R. S.; Durán, N.; Kubota, L. T. (2001). Effect of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds. **Talanta.** 54: 681-686.

Fukumasa-Nakai, Y.; Matsumoto, T.; Komatsu, M. (1994). Fruiting body productivity of protoplast-derived clones in *Lentinula edodes*. **Mycoscience.** 35: 137-139.

Gadd, G. M. (2001). **Fungi in bioremediation**. United Kingdom: Cambridge University Press, p.136-187.

Garcia, T.A. (2006). Purificação e caracterização das lacases de *Pycnoporus sanguineus*. **Tese de Doutorado**. Universidade Nacional de Brasília. 110p.

Giardina, P.; Palmieri, G.; Scaloni, A.; Fontanella, B.; Faraco, V.; Cennamo, G.; Sannia, G. (1999). Protein and gene structure of a blue laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Biochem. J.** 341:655-663.

Glazer, A. N.; Nikaido, H. (1995). **Microbial Biotechnology: fundamentals of applied microbiology**. New York, W.H. Freeman and Company Editors. 662p.

Gogly, B., Groult, N.; Hornebeck, W.; Godeau, G.; Pellat, B. (1998). Collagen zymography as a sensitive and specific technique for the determination of subpicogram levels of interstitial collagenase. **Anal. Biochem.** 255: 211-216.

Griffiths, H. R.; Mistry, P.; Herbert, K. E.; Lunec, J. (1998). Molecular and cellular effects of ultraviolet light-induced genotoxicity. **Crit. Ver. Clin. Lab. Sci.** 35: 189-237.

Gu, Y. H.; Ko, W. H. (2000). Occurrence of parasexual cycle in *Phytophthora parasitica* following protoplast fusion. **Bot. Bull. Acad. Sinica.** 41: 225-30.

Guillén, F.; Muñoz, C.; Gómez-Toribio, V.; Martínez, T. A.; Martínez J. M. (2000). Oxygen activation during oxidation of methoxyhydroquinones by laccase from *Pleurotus eryngii*. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 170-175.

Hawksworth, D. L.; Kirk, P. M.; Sutton, B. C.; Pegler, D. N. (1995). Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. 8 ed. Wallingford, United Kingdom: **CAB International**; p. 616.

Hegedus, D. D.; Khachatourians, G. G. (1994): Isolation and characterization of conditional lethal mutants of *Beauveria bassiana*. **Can. J. Microbiol.**, 40: 766-775.

Higuchi, T. (1985). **Biosynthesis of Lignin.** In: Higuchi, T. (ed.). Biosynthesis and biodegradation of wood components. San Diego: Academic Press. 141-160.

Hirasawa, M.; Shouji, N.; Neta, T.; Fukushima, K.; Takada, K. (1999). Three kinds of bacterial substances from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Shiitake, an edible mushroom). **Int. J. Antimicrob. Ag.** 11: 151-157.

Hocart, M. J.; Lucas, J. A.; Peberdy, J. F. (1987). Production and regeneration of protoplast from *Pseudocercospora heterotrichoides* (Fron) Deighton. **J. Phytopathology.** 119: 193-205.

Hofrichter, M. (2002). Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme Microb. Tech.** 30: 454-466.

Iwalokun, B. A.; Usen, U. A.; Otunba, A. A.; Olukoya, D. K. (2007). Comparative phytochemical evolution, antimicrobial and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus*. **Afr. J. Biotechnol.** 6: 1732-1739.

Jatinder, K.; Harpreet, S.; Shammi, K. K.; Pradeep K. K.; Jaswal Ravinder, K. J. (2011). Strain improvement of specialty mushroom, *Calocybe indica*, through mutagenesis. **Appl. Biol. Res.** 13: 62- 69.

Jayakumar, T.; Thomas, P. A.; Geraldine, P. (2009). In-vitro antioxidant activities of an ethanolic extract of the oyster mushroom, *Pleurotus ostreatus*. **Innov. Food. Sci.** 10: 228-234.

Johannes, C.; Majcherczyk, A.; Huttermann, A. (1998). Oxidation of acenaphthene and acenaphthylene by laccase of *Trametes versicolor* in a laccase-mediator system, **J. Biotechnol.** 61: 151-156.

Jørgensen, H.; Møkeberg, A.; Krogh, K.; Olsson, L. (2005). Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evolution of cellulose adsorption by capillary electrophoresis. **Enzyme Microb. Tech.** 36: 42-48.

Kashangura, J., Hallsworth, J.E., Mswaka, A.Y. (2006). Phenotypic diversity amongst strains of *Pleurotus sajor-caju*: implications for cultivation in arid environments. **Mycol. Res.** 110: 312-317.

Keizer, G. J. (2001). **La enciclopedia de las setas**. 1 ed. Madrid, LIBSA.

Kelkar, H. S.; Shankar, V.; Deshpande, M. V. (1990). Rapid isolation and regeneration of *Sclerotium rolfsii* protoplasts and their potential application for starch hydrolysis. **Enzyme Microb. Tech.** 12: 510-514.

Kersten, P. J.; Tien, M.; Kalyanaraman, B.; Kirk, T. k. (1985). The ligninases of *Phanaerochaete chrysosporum* generates cation radicals from methoxybenzenes. **J. Biol. Chem.** 260: 2609-2612.

Kim, B. K.; Kang, J. H.; Jin, M.; Kim, H. W.; Shim, M. J.; Choi, E. C. (2000). Mycelial protoplast isolation and regeneration of *Lentinus lipideus*. **Life Sci.** 66: 1359-1367.

Kinugawa, K.; Tanesaka, E. (1990). Changes in the rate of carbon dioxide release from cultures of three basidiomycetes during cultivation. **T. Mycol. Soc. Jpn.** 31: 489-500.

Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W. & Stalpers, J. A. (2008). **Dictionary of fungi**. 10 ed., CABI Bioscience, Wallingford.

Kirk, T. K.; Tien, M.; Faison, B. D. (1984). Biochemistry of the oxidation of lignin by *Phanerochaete chrysosporium*. Review Article. **Biotechnol. Adv.** 2: 183-199.

Kirk, T.K. (1993). Lignin degradation: basic research progress, and applications in soil remediation and biopulping. Inn: **Cellulosics: Pulp, fibre and environmental aspects**. Kennedy, J.F.; Phillips, G.O.; Williams, P.A. (eds.). New York: Ellis Horwood. 63: 421-430.

Krugner, T. L.; Bacchi, L. M. A. (1995). Fungos. In: Bergamin Filho, A; Kimati, H Amorin, L (Eds). **Manual de Fitopatologia**. Volume I. Princípios e Conceitos. São Paulo, SP. p. 46-95.

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: 2470-250.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** 3: 227-680.

Lalithakumari, D. (2000). **Fungal protoplasts - a biotechnological tool**. New Delhi, India: Oxford & IBH Publishing Company Private Limited.

Lantto, R.; Schonberg, C.; Buchert, J.; Heine, E. (2004). Effects of laccase-mediator combinations on wool. **Text. Res. J.** 74: 713-717.

Lee, Y. K.; Chang, H. H.; Kim, J. S.; Kim, J.K.; Lee, K. S. (2000). Lignocellulolytic mutants of *Pleurotus ostreatus* induced by gamma-ray radiation and their genetic similarities. **Radiat. Phys. Chem.** 57: 145-150.

Lee, Y. L.; Huang, G. W.; Liang, Z. C.; Mau, J. L. (2007). Antioxidant properties of three extracts from *Pleurotus citrinopileatus*. **LWT-Food Science and Technology.** 40: 823-833.

Leonowicz, A.; Matuszewska, A.; Luterek, J.; Ziegenhagen, D.; WojtásWasilewska, M.; Cho, N.; Hofrichter, M. (1990). Review: Biodegradation of lignin by white rot fungi. **Fungal Genetics and Biology**. 27:175-185.

Levitin, M. M.; Kirsanova, R. V.; Yurchenko, L. V. (1971): Genetics and selection of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassian* (Bals.) Vuill., Communication I. Lethal and mutagenic effects of ultraviolet and X- rays. **Genetika**. 7: 73-79.

Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schmidell, W. (2001). **Biotecnologia Industrial – Volume 3 – Processos Fermentativos e Enzimáticos**. Editora Edgard Blücher, São Paulo.

Longvah, T.; Deosthale, Y. G. (1998). Composition and nutritional studies on edible wild mushroom from northeast Índia. **Food Chem**. 63: 331-334.

Lopes, C.R. (1984). Estudos sobre as relações filogenéticas entre algumas espécies de *Coffea*. **Tese-Professor-UNESP**. Botucatu, 169p.

Maciel, M. J. M.. (2011). Influência e parâmetros físicos na atividade oxidativa do fungo *Hexagonia Glabra* (P.Beauv) Ryvardeen. **Dissertação De Mestrado**. Universidade Do Estado Do Amazonas. 124p.

Magae, Y.; Kakimoto, Y.; Kashiwagi, Y.; Sasaki, T. (1985). Fruiting body formation from regenerated mycelium of *Pleurotus ostreatus* protoplasts. **Appl. Enviro. Microb**. 49: 441-442.

Manzi, P.; Gambelli, L.; Marconi, S.; Vivanti, V.; Pizzoferrato, L. (1999). Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. **Food Chem**. 65: 477-482.

Manzi, P.; Pizzoferrato, L. (2000). Beta-glucans in edible mushrooms. **Food Chem**. 68: 315-318.

Mattila, P.; Konko, K.; Eurola, M.; Pihlava, J. M.; Astola, J.; Vahteristo, L.; Hietaniemi, V.; Kumpulainen, J.; Valtonen, M.; Piironen V. (2001). Contents of vitamins, mineral elements, and phenolic compounds in cultivated mushrooms. **J. Agr. Food Chem**. 49: 2343-2348.

Mcguirl, M. A; Dooley, D. M. (1999). Copper-containing oxidases. **Curr. Opin. Chem. Biol**. 3: 138-144.

Medina Filho, H.P. (1983). Eletroforese em gel de amido: aplicações em genética e melhoramento de plantas. **Circular. IAC**, Campinas. 121: 1-15.

Memillin, D. R.; Eggleston, M. K. (1997). Bionorganic chemistry of laccase in: A.Messerschmidt (ED). Multi-Copper Oxidases. **Word Scientific**. 129p.

Mizuno, T.; Zhuang, C. (1995). Houbitake, *Pleurotus sajor-caju*: antitumor activity and utilization. **Food Rev. Int.** 11: 185-187.

Moda, E. M.; Spoto, M. H. F.; Horii, J.; Zocchi, S. S. (2005). Uso de peróxido de hidrogênio e ácido cítrico na conservação de cogumelos *Pleurotus sajo-caju in natura*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 25: 291-296.

Moreira-Neto, S. L. (2006). Enzimas ligninolíticas produzidas por *Psilocybe castanella* CCB444 em solo contaminado com hexaclorobenzeno. Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica, São Paulo. 124p

Mukherjee, M.; Sengupta, S. (1988). Isolation and regeneration of protoplasts from *Termitomyces clypeatus*. **Can. J. Microbiol.** 34: 1330–2.

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.

Najafpour, G. D. (2007). **Bioch. Engineering and Biotechnology**. 1 ed. Elsevier, 421 p.

Nappi, B. P.; Moretto, E. (1998). Valor nutricional de corpos de frutificação e biomassas dos cogumelos comestíveis *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes* e *Auricularia auricula-fuclae*. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Santa Catarina.

Nardim, M. S. Conservação de cogumelos comestíveis (*P. sajor-caju*) por acidificação e processamento térmico e por desidratação. Piracicaba, 1999. 134p. **Dissertação de Mestrado**. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

Niku, P. M. L.; Viikari, L. (2000). Enzymatic oxidation of alkenes. **J. Mol. Catal. B-Enzym.** 10: 435-444.

Obodai, M.; Cleland-Okine, J.; Vowotor, K. A. (2003). Comparative study on the growth and yield of *Pleurotus ostreatus* mushroom on different lignocellulosic by products. **J. Ind. Microbiol. Biot.** 30: 146-149.

Ohga, S.; Kitamoto, Y. (1997). Future of mushroom production and biotechnology. **Food Rev. Int.** 13: 461-469.

Pandey, A.; Selvakumar, P.; Soccol, C.; Nigam, P. (1999). Solid state fermentation for the production of the industrial enzymes. **Curr. Sci.** 77: 149-162.

Pascholati, S. F.; Stangarlin, J. R.; Piccinin, E. (1998). Cogumelos: Cultivo e Comercialização (Shiitake e Cogumelo do Sol), Cuiabá, MT: SEBRAE/ MT, **Coleção Agroindústria.** 85p.

Peberdy, J. F. *et al.* (1976). Factors affecting protoplast release in some filamentous fungi. **T. Brit. Mycol. Soc.** 67: 23-26.

Pelczar, M. J., Chang, E. C.S., Krieg, N. R. (1996). Microbiologia: conceitos e aplicações, Volume II, 2 ed. São Paulo: **Makron Books.** 524p.

Pfeifer, G. P.; You, Y. H.; Besaratinia, A. (2005). Mutations induced by ultraviolet light. **Mutat. Res.** 571: 19-31.

Pimentel, M. A. (1988). Utilização da técnica da eletroforese em genética florestal. **Sér. Téc. - IPEF Piracicaba.** 5: 1-27.

Pires, C.L. da S. (1983). Estudo do polimorfismo enzimático em esterases de *Eucalyptus grandis*. **Tese de Mestrado.** UNICAMP, Campinas. 138p.

Prabavathy, V. R.; Mathivanan, N.; Sagadevan, E.; Murugesan, K.; Lalithakumari, D. (2006). Self-fusion of protoplasts enhances chitinase production and biocontrol activity in *Trichoderma harzianum*. **Bioresource Technol.** 97: 2330-4.

Qiu, A.; Li, W.; Zheng, Y.; Fan, X.; Ye, Y.; Meng, Y. (2011). Breeding and characterization of laccase-producing *Phanerochaete chrysosporium* mutant resistant to nutritional repression. **Wei Sheng Wu Xue Bao.** 51:352-359.

Rajan, S. Sundara. (2001). **Introduction to fungi.** New Delhi: Anmol Publications PVT. LTD. 299 p.

Rajarathnam, S.; Bano, Z. (1987). *Pleurotus* mushrooms, part1 A. Morfology, life cicle, taxonomy, breeding and cultivation. **Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.** 26: 157-223.

Ramasamy, S.; Muthukumarasamy, E. (2012). Nutrient Use Efficiency and Yield Potential of UV-Mutants, Hybrids and Fusant Strains of *Pleurotus Spp.* **J. Theor. Exper. Bio.** 8: 121-126, 2012.

Ranzani, M. R. T. C.; Sturion, G. L. (1988). Avaliação da composição em aminoácidos de *Pleurotus spp.* cultivados em folha de bananeira. **Arch. Latino Am. Nut.** 48: 339-48.

Refaie, F. M.; Esmat, A. Y.; Daba, A. S.; Taha, S. M. (2009). Characterization of polysaccharopeptides from *Pleurotus ostreatus* mycelium: assessment of toxicity and immunomodulation *in vivo*. **Micol. Apl. Int.** 21: 67-75.

Regina, M.; Broetto, F. (2005). Atividade de enzimas lignocelulolíticas no crescimento de *Lentinula edodes* em subprodutos energéticos. **Energ. Agric. Botucatu.** 20: 47-61.

Regina, M.; Broetto, F.; Giovannozzi-Sermanni, G; Marabotini, R.; Peranni, C.; Linde, A. G.; Colauto, B. N.; Paccola-Meirelles, D. L. (2009). Atividade de enzimas oxidativas do *Lentinula edodes* em substratos agroindustriais. **Semina: Ciências Agrárias.** 30: 881-888.

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.

Rosatto, S. S.; Freire, R. S.; Durán, N.; Kubota, L. T. (2001). Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Quím. Nova,** 24: 77-86.

Rouessac, F.; Rouessac. (2000). **A chemical analysis, modern instrumentation methods and techniques**. John Wiley & Sons. 189p.

Rowan, N. J.; Smith, J. E.; Sullivan, R. (2002). Medicinal mushroom: their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments. **Cancer. Research UK**. 256p.

Sales-Campos, C.; Andrade, M. C. N. (2010). Temperatura e meio de cultura mais favoráveis ao crescimento micelial de uma linhagem de *Lentinus strigosus* de ocorrência na amazônia. **Arq. Inst. Biol.**, 77: 539-543.

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.

Schlosser, D.; R. Grey; W. Fritsche. (1997). Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor*. Distribution of extra- and intracellular enzyme activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 4: 7412-418.

Schmitt, S.; Souza, R.; Bettin, F.; Dillon, P. J. A. Valle, B. A. J.; Andraus, J. (2012). Decolorization of aqueous solutions of disperse textile dyes by oxidoreductases. **Biocatal Biotransfor.** 30: 48-56.

Schoemaker, H. E; Harvey, P.J.; Bowen, R. M.; Palmer, J. M. (1985). On the mechanism of enzymatic lignin breakdown. **FEBS Letters.** 183: 7-12.

Shearer, C. A. Fungal competition. **Can. J. Bot.** 73: 1259-1264.

Silva, E. G.; Souza Dias, E.; Siqueira, F. G.; Schwan, R. F. (2007). Análise química de corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju* cultivado em diferentes concentrações de nitrogênio. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 27: 72-75.

Silva, E. M.; Machuca, A.; Milagres, A. M. (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. O.; Costa, S. M. G.; Clemente, E. (2002). Chemical composition of *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quél., substrates and residue after cultivation. **Braz. Arch. Biol. Tech.** 45: 531-535.

Silveira, M. L. L. (2003). Comparação entre o desempenho do inoculo sólido e inoculo líquido para o cultivo de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Santa Catarina.

Smânia, E. F. A. (2003). Esteróis e triterpenos isolados de espécies de ganoderma karsten e sua atividade antimicrobiana. **Tese de Doutorado**. Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina.

Smith, J. F.; Fermor, T. R.; Zadrazil, F. (1988). Pretreatment of lignocellulosics for edible fungi. In: Zadrazil F, Reiniger P (eds) **Treatment of lignocellulosics with white rot fungi**. Elsevier. 3-13.

Snoek-Van Beurden, P. A. M; Von Den Hoff, J. W. (2005). Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **Biotechniques**. 38: 73-83.

Soo, C. (2002). Mechanisms of Ozone Toxicity. **Dissertation**. University of Cincinnati.

Stamets, P. (1993). **Growing gourmet & medicinal mushrooms**. Berkely: Speed Press. 554p.

Stamets, P.; Chilton, J.S. (1983). **The mushroom cultivator**. Washington: Agarikon Press Olimpia. 415 p.

Tam, S. C.; Yip, K. P.; Chang, F.; Chang, S. T. (1986). Hypotensive and renal effects of extract of the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. **Life Sciences**. 38: 1155-1161.

Tanesaka, E.; Masuda, H.; Kinugawa, K. (1993). Wood degrading ability of basidiomycetes that are wood decomposers, litter decomposers, or mycorrhizal symbionts. **Mycologia**. 81: 347-354.

Tavares, A. P. M. (2006). Produção de lacase para potencial aplicação como oxidante na indústria papelreira. **Tese de doutorado**. Universidade de Aveiro.

Tien, M.; Kirk, K. T. (1988). Lignin peroxidase of *Phanerochaetes chrysosporium*. In: Wood, K.; Kellogg, S. T. **Method. Enzymol.** 161: 238-249.

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.

Tokimoto, K.; Fukuda, M. (1997). Changes in enzyme activities in bedlogs of *Lentinula edodes* accompanying fruit body development. **Mokuzai Gakkaishi**, 43: 444–449.

Tortora, G. J.; Funke, B. R.; Case, A. L. (2006). **Microbiologia**. 8 ed, reimpressão, Artmed, Porto Alegre. 894p.

Tuomela, M.; Vikman, M.; Hatakka, A.; Itavaara, M. (2000). Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Biores. Technol.** 72: 169-183.

Vilas-Boas, A. M.; Paccola-Meirelles, L. D.; Luna-Alves Lima, E.A. (1992). Desenvolvimento e aperfeiçoamento de inseticidas biológicos para o controle de pragas. **Arq. Biol. Tecnol.** 35: 749-761.

Wasser, S.P. (2002). Medicinal mushrooms as source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 60: 258–274.

White, P. J.; Bradshaw, J. E.; Dale, M. F. B.; Ramsay, G.; Hammond, J. P. E Broadley, M. R. (2009). Relationships between yield and mineral concentrations in potato tubers. **Hort. Sci.** 44: 6-11.

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.** 2: 805-812.

Wolff, E. R. S.; Wisbeck, E.; Silveira, M. L. L.; Gern, R. M. M.; Pinho, M. S. L.; Furlan, S. A. (2008). Antimicrobial and antineoplastic activity of *Pleurotus ostreatus*. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 151: 402-412.

Wong, J. H.; Ng, T. B.; Jiang, Y.; Liu F, Sze SC, Zhang KY. (2010). Purification and characterization of a Laccase with inhibitory activity toward HIV-1 reverse transcriptase and tumor cells from an edible mushroom (*Pleurotus cornucopiae*). **Protein Pept. Lett.** 17 :1040-1047.

Wood, R. D.; Mitchell, M.; Sgouros, J.; Lindahl, T. Human DNA repair genes. (2001) **Science.** 291 :1284-1289.

Xu, L. J.; Wang, H. X.; Ng, T. B. (2012). A Laccase with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the broth of mycelial culture of the mushroom *Lentinus tigrinus*. **J. Biomed. Biotechnol.** 1-6.

Yang, J.; Lin, H.; Mau, J. (2002). Antioxidant properties of several commercial mushrooms. **Food Chem.** 77: 229-235.

Yasui, A.; Eker, A. P. M. (1999) in DNA Damage and Repair: DNA Repair in Higher Eukaryotes (Nickoloff, J. A., and Hoekstra, M. F., eds). **Humana Press.** 672p.

Yildiz, S.; Yildiz, Ü.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.

Yoon, J. H.; Lee, C. S.; O'Connor, T. R.; Yasui, A.; Pfeifer, G.P. (2000). The DNA damage spectrum produced by simulated sunlight. **J. Mol. Biol.** 302: 1019-1020.

Zadrazil, F. (1980). Influence of ammonium nitrate and organic supplements on the yield of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer. **Eur. J. Appl. Microbiol. Biot.** 9: 31-35.

Zaha, A. (1996). **Biologia Molecular Básica.** Cap. 6 . Porto Alegre: Mercado Aberto, 336 p.

Zanuncio, A. J. V.; Colodette, J. L. (2011). Teores de lignina e ácidos urônicos na madeira e polpa celulósica de eucalipto. **Revista Árvore**. 35: 341-347.

Zhao, J.; Chang, S. T. (1993). Monokaryotization by protoplasting heterothallic species of edible mushrooms. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 9: 538-543.