

# Formulação de substratos na produção de biomassa micelial e de lacase de *Pleurotus ostreatus*

## Substratum formulation for laccase and mycelial biomass production of *Pleurotus ostreatus*

Talita Rafaele D'Agostini Mantovani<sup>1</sup>; Luzia Doretto Pacolla Meirelles<sup>2</sup>; Juliana Silveira do Valle<sup>3</sup>; Giani Andrea Linde<sup>4</sup>; Nelson Barros Colauto<sup>4\*</sup>

### Resumo

*Pleurotus ostreatus* é um produtor de biomassa e lacase, enzima utilizada em processos fermentativos para a hidrólise de substratos lignocelulósicos, com potencial de utilização na produção de biocombustíveis e na alimentação animal. Desta forma, há a necessidade de buscar substratos regionais mais apropriados para a produção de biomassa micelial e de lacase. Assim o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito das características físico-químicas de subprodutos da agroindústria na formulação de substratos para o crescimento micelial e a produção de lacase por *P. ostreatus*. O experimento foi realizado com as matérias-primas: fibra de soja, farelo de trigo, farelo de arroz, grãos de milho e sabugo de milho que foram separadas em função da granulometria e analisadas quanto à relação carbono/nitrogênio (C/N). O crescimento micelial foi avaliado em meio de cultivo sólido particulado em tubos cilíndricos de borossilicato. Em seguida a produção de lacase foi avaliada utilizando um planejamento fatorial fracionário 2<sup>6-2</sup> com as variáveis: granulometria do meio de cultivo e adição de minerais (cobre, zinco, ferro, cádmio e magnésio) no meio de cultivo. A produção de lacase foi determinada pela oxidação do ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico). Os resultados indicam que o fator mais importante para o crescimento micelial é a capacidade de retenção de oxigênio do meio de cultivo. Para o crescimento micelial de *P. ostreatus* o sabugo de milho e o farelo de trigo são os melhores componentes do substrato. As demais matérias-primas reduziram o crescimento micelial. Entretanto o fator mais importante para a indução da produção de lacase é a redução do tamanho da partícula, com aumento da área de contato entre o micélio e o substrato.

**Palavras-chave:** Subprodutos agrícolas, micélio, substrato, lacase, *Pleurotus ostreatus*

### Abstract

*Pleurotus ostreatus* is a producer of biomass and laccase, an enzyme used in fermentation processes for the hydrolysis of lignocellulosic substrata, with potential use in biofuel production and animal feed. Thus, there is a need to seek more appropriate regional substrata for the production of mycelial biomass and laccase. Hence, the aim of this study was to evaluate the effect of physical and chemical characteristics of agro-industrial byproducts in a substratum formulation for the mycelial growth and laccase production

<sup>1</sup> Bióloga, Mestre em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Universidade Paranaense, UNIPAR, Umuarama, PR. E-mail: talita.rd@gmail.com

<sup>2</sup> Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Associada, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, PR. E-mail: pacolla@uel.br

<sup>3</sup> Prof<sup>ª</sup> MSc. Adjunta, Curso de Farmácia, Laboratório de Biologia Molecular, UNIPAR, Umuarama, PR. E-mail: jsvalle@unipar.br

<sup>4</sup> Profs. Drs. Titular, Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Laboratório de Biologia Molecular, UNIPAR, Umuarama, PR. E-mail: gianilinde@unipar.br; nbc@unipar.br

\* Autor para correspondência

by *P. ostreatus*. The experiment was conducted with the milled raw materials: soy fiber, wheat bran, rice bran, corn grain and corn cob that were separated according to size and analyzed for carbon/nitrogen (C/N) ratio. Mycelial growth was evaluated on substratum in cylindrical tubes of borosilicate. Then laccase production was assessed using a  $2^{6-2}$  fractional factorial design with the variables: raw material granulometry and addition of minerals (copper, zinc, iron, cadmium and magnesium) in the substratum. The production of laccase was determined by oxidation of ABTS (2,2'-bis-azin-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid). The results indicate that the most important factor for mycelial growth is the holding capacity of oxygen in the substratum. For mycelial growth of *P. ostreatus* the corn cob and wheat bran are the best components for the substratum. The other raw materials reduced the mycelial growth. However the most important factor for the induction of laccase production is the reduction of particle size, increasing the contact area between the mycelium and the substratum.

**Key words:** Agricultural byproduct, mycelium, substrate, laccase, *Pleurotus ostreatus*

## Introdução

O Brasil está entre os maiores produtores mundiais de soja (*Glycine max*), arroz (*Oryza sativa*) e trigo (*Triticum aestivum*), sendo grande parte da produção nacional proveniente do estado do Paraná (BRASIL, 2007). Após o processamento destes produtos diversos subprodutos como fibras, farelos, bagaços, cascas e outros materiais lignocelulósicos são gerados (HOSENEY, 1991; CEREDA, 2001). A utilização destes subprodutos no crescimento de basidiomicetos é uma alternativa de bioconversão da celulose e lignina em produtos de interesse econômico (SILVA; MACHUCA; MILAGRES, 2005).

Os basidiomicetos produzem diversos bioprodutos de interesse medicinal (SOUZA-PACCOLA et al., 2004; MOURÃO et al., 2009; JUMES et al., 2010; MOURÃO et al., 2011) e são importantes produtores de lacases (COLAUTO; EIRA; MINHONI, 1998; REGINA et al., 2009). A lacase é uma enzima amplamente utilizada para a hidrólise da lignina, facilitando assim a exposição e acesso de celulose por celulasas. A lignina é um composto recalcitrante, covalentemente ligada a cellulose, que forma uma barreira física a hidrólise deste carboidrato (ANDERSON; MERRILL; KLOPFENSTEIN, 1988). O uso de lacase para a hidrólise de compostos lignocelulósicos pode aumentar a biodisponibilidade de carbono para a alimentação animal e em processos de sucessão microbiana para a produção de biocompostos como enzimas e/ou biocombustíveis (D'AGOSTINI et al., 2011).

Os diferentes biocompostos produzidos por basidiomicetos podem ser extraídos diretamente do micélio não necessitando o desenvolvimento do corpo de frutificação. Este processo pode viabilizar economicamente a produção de biocompostos por basidiomicetos, pois diminui o tempo e custo do processo de produção, além de aumentar o grau de controle do produto obtido (MIZUNO; MINATO; ITO, 1998; MSHANDETE; MGONJA, 2009). Contudo a produção de enzimas e de biomassa é afetada pelas propriedades físicas do meio de cultivo como a natureza cristalina e amorfa, porosidade, tamanho da partícula e presença de metais (PANDEY, 2003). Desta forma, a análise do crescimento micelial e do meio de cultivo são fundamentais para o processo de produção de princípios ativos terapêuticos e enzimas em escala industrial.

O gênero *Pleurotus* é um produtor natural de lacase (D'AGOSTINI et al., 2011), sendo que a síntese de enzimas são fortemente afetadas pela linhagem do fungo, composição do substrato, principalmente pela concentração de nitrogênio no meio de cultivo (STAJIĆ et al., 2006; MANTOVANI; LINDE; COLAUTO, 2007; ELISASHVILI et al., 2008; ELISASHVILI; KACHLISHVILI, 2009). Devido à capacidade de produzir enzimas os basidiomicetos do gênero *Pleurotus* são potenciais agentes da digestão de compostos recalcitrantes. Este fungo adapta-se bem às condições brasileiras de clima tropical e apresenta produtividade até três vezes superior ao gênero *Agaricus*. É adaptado

aos diversos tipos de resíduos ou subprodutos agrícolas e agroindustriais, além de possuir valor terapêutico devido a produção de compostos bioativos, vitaminas e proteínas (COLAUTO; EIRA; MINHONI, 1998).

Na busca de substratos mais apropriados ao crescimento micelial para produção de biomassa e de biocompostos, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito das características físico-químicas de subprodutos da agroindústria utilizados na formulação de substratos para o crescimento micelial e produção de lacase de *P. ostreatus*.

## Material e Métodos

Utilizou-se da micoteca da Universidade Paranaense a linhagem U6/8 de *P. ostreatus*. Os fungos foram mantidos por transferência periódica em meio batata-dextrose-ágar (BDA) (39 g/L) a 25 °C no escuro. Após a recuperação do vigor de crescimento, micélio com ramificação homogênea e sem setoriamento foi selecionado como inóculo.

### Matérias-primas

As matérias-primas utilizadas para compor os meios de cultivo foram: fibra de soja (FS), farelo de trigo (FT), farelo de arroz (FA) e sabugo de milho (SM). A FS (Fibrarich FN) foi fornecida pela empresa Solae do Brasil e as demais matérias-primas foram obtidas de cooperativas agrícolas regionais.

As matérias-primas foram analisadas quanto ao teor de nitrogênio total, determinado pelo método de Kjeldahl, a umidade em estufa a 105 °C até massa constante, e as cinzas em mufla a 550 °C. A relação carbono/nitrogênio (C/N) foi calculada conforme Griensven (1988), considerando que 50% da matéria orgânica é composta por carbono (MANTOVANI; LINDE; COLAUTO, 2007).

A partir destes resultados as matérias-primas com maiores concentrações de nitrogênio foram misturadas àquelas com menores concentrações de nitrogênio a fim de obter relação C/N de 30 que são ideais para o crescimento de *P. ostreatus* (WU et al., 2004).

### Crescimento em meio de cultivo sólido particulado (MCSP)

As matérias-primas foram estratificadas em duas faixas granulométricas e cada faixa foi analisada quanto ao conteúdo de nitrogênio, carbono, cinzas e umidade. A faixa com partículas entre 1,7 e 5 mm foi identificada como “>” e a faixa menor que 1,7 mm como “<”. Para a formulação dos MCSP misturou-se matérias-primas com diferentes granulometrias (Tabela 1), mantendo fixa a relação C/N de 30 para *P. ostreatus* (WU et al., 2004).

As formulações do MCSP foram autoclavadas a 121 °C por 10 min em excesso de água. A água residual foi removida e carbonato de cálcio (1%) foi adicionado para ajuste de pH para 6,0. Os MCSP foram transferidos para tubos de borosilicato (300 x 30 mm) e novamente autoclavados a 121 °C por 40 min com posterior mensuração da densidade do substrato. Os MCSP foram inoculados com discos de BDA de 30 mm de diâmetro, tomando-se o cuidado para que o micélio ficasse em contato com o MCSP dos tubos. Ambas as extremidades do tubo foram fechadas com tampões de algodão. O crescimento foi realizado a 25 °C, com 70% de umidade, no escuro, por 21 dias. O crescimento micelial longitudinal foi medido em quatro pontos do tubo utilizando-se um paquímetro. Todos os tratamentos foram realizados em quadruplicata e as correlações entre as matérias-primas utilizadas nas formulações dos MCSP e o crescimento do micélio analisados no programa Statistica 6.0 ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 1.** Análise físico-química das matérias-primas (% de base seca) utilizadas no MCSP para o crescimento de *Pleurotus ostreatus*.

MP	G	Resultado de análise (%)			
		Nitrogênio	Carbono	Cinzas	Umidade
SM	Bruto	0,530 ± 0,008	42,850 ± 0,677	2,230 ± 0,035	12,070 ± 0,191
	>	0,453 ± 0,011	44,712 ± 1,109	1,766 ± 0,044	8,810 ± 0,218
	<	1,028 ± 0,015	43,842 ± 0,649	2,916 ± 0,043	9,400 ± 0,139
FA	Bruto	1,760 ± 0,028	38,380 ± 0,606	12,220 ± 0,193	11,030 ± 0,174
	<	2,378 ± 0,051	41,309 ± 0,888	8,321 ± 0,179	9,060 ± 0,195
FT	Bruto	2,600 ± 0,090	42,310 ± 1,460	5,040 ± 0,174	10,340 ± 0,357
	<	3,565 ± 0,083	42,162 ± 0,980	4,452 ± 0,104	11,223 ± 0,261
FS	Bruto	4,330 ± 0,056	44,100 ± 0,568	3,830 ± 0,049	7,990 ± 0,103
	<	4,981 ± 0,079	43,646 ± 0,692	3,788 ± 0,060	8,920 ± 0,141

**Legenda=** MP: matéria-prima, G: granulometria, SM: sabugo de milho, FA: farelo de arroz, FT: farelo de trigo, FS: fibra de soja, >: granulometria entre 1,7 e 5 mm, <: granulometria menor que 1,7 mm, Bruto: sem separação granulométrica (natural), \*Carbono calculado segundo Griensven (1988).

**Fonte:** Elaboração dos autores.

### Produção de lacase

As variáveis estudadas no planejamento fatorial fracionário 2<sup>6-2</sup> (Tabela 3) foram a granulometria do MCSP com a formulação do substrato (Tabela 2) com composição físico-química semelhante e granulometria diferente (Tabela 1), e presença de minerais cobre, zinco, ferro, cádmio e magnésio.

Os MCSP foram autoclavados e as soluções de minerais, previamente filtradas (filtro de 0,22 µm), foram adicionadas. As soluções de minerais utilizadas foram: CuSO<sub>4</sub> (2 mM), ZnSO<sub>4</sub> (1 mM), Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (2 mM), MnSO<sub>4</sub> (1 mM) e Fe(SO<sub>4</sub>) (1 mM). Em seguida os meios foram inoculados com micélio e mantidos a 25 °C por 21 dias no escuro.

**Tabela 2.** Percentual em base seca das matérias-primas utilizadas para formulações dos meios de cultivo sólido particulado (MCSP) para *Pleurotus ostreatus*.

Formulação	Matéria-prima (%)		Nitrogênio (% bs)	Relação C/N
T1	FS<(26)	SM>(74)	1,63	30
T2	FS<(19)	SM<(81)	1,77	30
T3	FT<(40)	SM>(60)	1,70	30
T4	FT<(30)	SM<(70)	1,78	30
T5	FA<(57)	SM>(43)	1,55	30
T6	FA<(48)	SM<(52)	1,67	30
TC1	FA<(20)	SM>(80)	0,84	30
TC2	FA<(20)	SM<(80)	1,30	30

**Legenda=** FS: fibra de soja, FT: farelo de trigo, FA: farelo de arroz, SM: sabugo de milho, >: granulometria entre 1,7 e 5 mm, <: granulometria menor que 1,7 mm, T1-6: formulações de MCSP, TC1-2: MCSP controles, C/N: carbono/nitrogênio, bs: base seca.

**Fonte:** Elaboração dos autores.

**Tabela 3.** Planejamento fatorial fracionário 2<sup>6-2</sup>, com as variáveis do meio de cultivo sólido particulado (MCSP): granulometria (TC1 e TC2) com e sem adição de minerais, para verificar o efeito da produção de lacase por *Pleurotus ostreatus*.

	<b>Cu</b>	<b>Zn</b>	<b>Fe</b>	<b>Cd</b>	<b>Mn</b>	<b>Meio</b>
	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	TC1
	1,103	0,000	0,000	0,000	0,882	TC1
	0,000	0,588	0,000	0,000	0,882	TC2
	1,103	0,588	0,000	0,000	0,000	TC2
	0,000	0,000	1,324	0,000	0,882	TC2
	1,103	0,000	1,324	0,000	0,000	TC2
	0,000	0,588	1,324	0,000	0,000	TC1
	1,103	0,588	1,324	0,000	0,882	TC1
	0,000	0,000	0,000	0,368	0,000	TC2
	1,103	0,000	0,000	0,368	0,882	TC2
	0,000	0,588	0,000	0,368	0,882	TC1
	1,103	0,588	0,000	0,368	0,000	TC1
	0,000	0,000	1,324	0,368	0,882	TC1
	1,103	0,000	1,324	0,368	0,000	TC1
	0,000	0,588	1,324	0,368	0,000	TC2
	1,103	0,588	1,324	0,368	0,882	TC2
<b>Variável codificada</b>	<b>Cu</b>	<b>Zn</b>	<b>Fe</b>	<b>Cd</b>	<b>Mn</b>	<b>Meio</b>
	<b>Concentração de minerais (ppm)</b>					
-1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	TC1
+1	1,103	0,588	1,324	0,368	0,882	TC2

**Legenda:** TC1: MCSP composto por 20% de farelo de arroz (granulometria menor que 1,7 mm) e 80% de sabugo de milho (granulometria entre 1,7 e 5 mm); TC2: MCSP composto por 20% de farelo de arroz (granulometria menor que 1,7 mm) e 80% de sabugo de milho (granulometria menor que 1,7 mm).

**Fonte:** Elaboração dos autores.

Após este período o extrato bruto foi preparado com tampão acetato de sódio (10 mM, pH 4,2) na proporção de 1:4. O meio de cultivo e o tampão foram mantidos em banho de gelo por 1 h com agitação a cada 15 min. A seguir a mistura foi centrifugada a 15000 g, a 4 °C, por 2 min, sendo o sobrenadante considerado o extrato bruto. Para a atividade de lacase uma mistura contendo 400 µL do extrato bruto, 1400 µL de água, 900 µL de tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0) e 300 µL de 1 mM de ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) foi mantida a 30 °C por 10 min. Após este período, a reação foi paralisada com a adição de 100 µL de ácido tricloroacético (5%), adicionado 8,5 mL de água ultrapura e realizada a leitura da absorvância a 420 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como 1 µmolar de

ABTS oxidado por minuto. Para calcular a atividade enzimática foi utilizado o coeficiente de absorção de  $3,6 \cdot 10^4 / \text{M cm}$ .

## Resultados e Discussão

Na Tabela 1 são apresentados os resultados de análise físico-química das matérias-primas, em diversas granulometrias, para formulação dos MCSP (Tabela 2). Pode se observar que proteínas e minerais, devido à menor tensão de ruptura, concentram-se nas frações de menor granulometria alterando assim as frações orgânicas e inorgânicas das matérias-primas estratificadas. A fração orgânica é responsável pelo fornecimento de carbono e nitrogênio, enquanto que a fração inorgânica exerce importante papel na disponibilização de

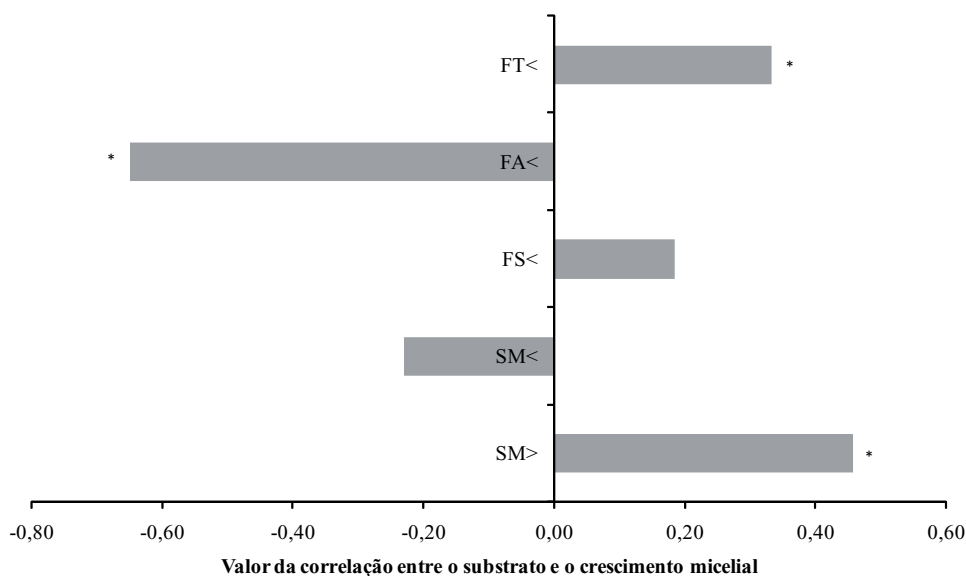
micronutrientes normalmente envolvidos no funcionamento dos sistemas de transporte celular e das reações enzimáticas (HOSENEY, 1991). Desta forma, é importante conhecer a composição química das frações granulométricas do meio de cultivo para compreender o crescimento do fungo em diferentes substratos, evitando a geração de resultados conflituosos.

#### *Crescimento do micélio em meio de cultivo sólido particulado (MCSP)*

A densidade média final do MCSP foi de  $0,69 \pm 0,05 \text{ g/cm}^3$  e os meios TC1 e TC2, tratamentos controles utilizados por produtores locais, apresentaram relação C/N de 53. Para o vigor micelial, não houve diferença entre os tratamentos.

Na correlação entre as matérias-primas e o crescimento micelial em MCSP observa-se que a adição de SM com granulometria entre 1,7 e 5 mm favoreceu ( $p \leq 0,05$ ) o crescimento micelial de *P. ostreatus* (Figura 1). O SM é usualmente utilizado como material volumoso para o cultivo de fungos por possuir alta concentração de lignina e celulose (EIRA; MEIRELLES; PACCOLA-MEIRELLES, 2005) e alta porosidade, que permite a retenção de oxigênio para o processo de respiração do fungo. A importância da manutenção de ar no meio de cultivo foi importante uma vez que apenas a granulometria entre 1,7 e 5 mm de SM apresentou efeito positivo no crescimento. Observa-se que para *P. ostreatus* a granulometria influenciou no aproveitamento da matéria-prima pelo fungo, sendo que um maior tamanho das partículas favoreceu o crescimento micelial em MCSP (Figura 1).

**Figura 1.** Correlação do crescimento micelial (mm) de *Pleurotus ostreatus* em meio de cultivo sólido particulado composto de diferentes matérias-primas (Tabela 1). FT: farelo de trigo, FA: farelo de arroz, FS: farelo de soja, SM: sabugo de milho, >: granulometria entre 1,7 e 5 mm, <: granulometria menor que 1,7 mm, \*diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).



**Fonte:** Elaboração dos autores.

Em substratos contendo FA houve diminuição ( $p \leq 0,05$ ) do crescimento de *P. ostreatus* (Figura 1). Embora o FA seja um subproduto importante do arroz, rico em nutrientes a concentração utilizada causou gelatinização, impedindo a aeração do meio e ocasionando menor crescimento do micélio. Já o FT proporcionou aumento ( $p \leq 0,05$ ) do crescimento micelial (Figura 1). O FT é o principal subproduto da moagem do trigo e, diferentemente das fibras, é constituído de uma mistura heterogênea de fragmentos da camada hialina-aleurona dos grãos, sendo fonte de minerais, vitaminas e outros nutrientes de valor biológico (HOSENEY, 1991). Apesar da quantidade de nutriente ser um fator importante para o crescimento do fungo a presença de cascas do trigo no FT promoveu o aumento da retenção de ar no meio de cultivo, que disponibiliza oxigênio para o crescimento micelial, parecendo ser este o fator mais importante para o crescimento micelial em MCSP.

A relação C/N inicial dos meios de cultivo foi mantida constante em 30. No entanto, a concentração de nitrogênio inicial variou sensivelmente. Isto ocorre devido ao uso de diferentes matérias-primas com composições químicas distintas. Desta forma, a manutenção tanto da relação C/N quanto da concentração de nitrogênio, apenas seria possível pela adição de nitrogênio externo o que implicaria em adição de nova variável ao experimento, fonte de nitrogênio externo. Desta forma, para avaliar o crescimento micelial optou-se pela manutenção da relação C/N e das fontes de nitrogênio naturais existentes nos diferentes meios de cultivo.

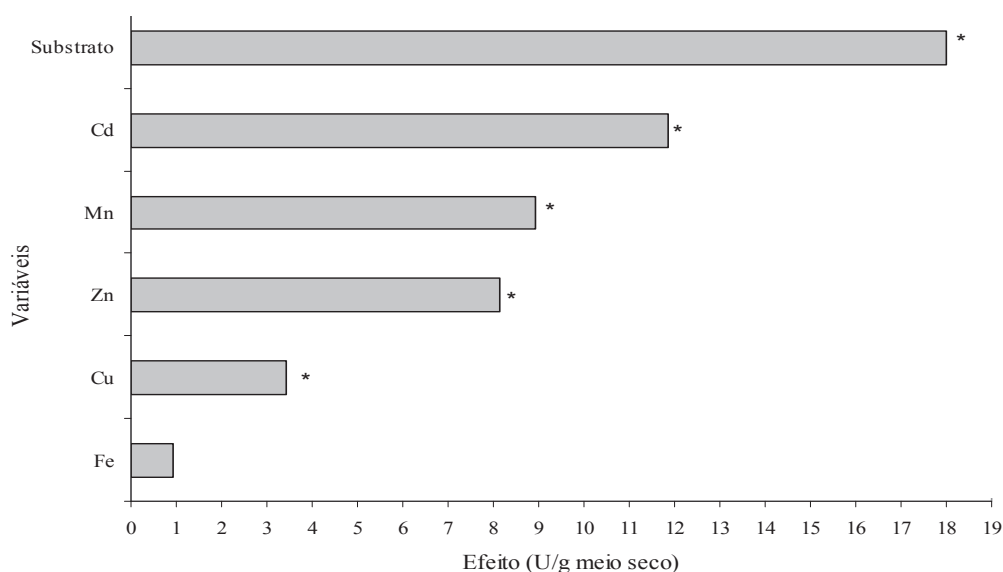
A fim de avaliar o efeito do nitrogênio inicial sobre o crescimento micelial comparou-se os meios TC1 e TC2. Estes meios de cultivo apresentaram as variáveis granulometria do sabugo de milho e a concentração de nitrogênio, sendo que o meio

com sabugo de milho de maior granulometria, apesar de conter o menor nível de nitrogênio (0,84 %), apresentou maior crescimento, demonstrado pelo efeito positivo de SM> (Figura 1). Desta forma, para os meios de cultivo avaliados com C/N inicialmente ajustado para 30 a granulometria e não a concentração inicial de nitrogênio foi a variável mais importante. Isto concorda com Miles e Chang (1997) que relatam a importância da relação C/N sobre a concentração de nitrogênio para o crescimento e produção de basidiomicetos e recomendam relações C/N de 30 para a produção de *P. ostreatus*.

#### *Atividade da lacase*

Na Figura 2 são apresentados os efeitos das variáveis estudadas no planejamento fatorial fracionário  $2^{6-2}$  sobre a resposta da atividade da lacase de *P. ostreatus*. A variável que mais influenciou a produção da lacase foi o substrato, sendo que os indutores avaliados exerceram menor efeito na atividade enzimática, porém ainda significativo ( $p \leq 0,05$ ) para o aumento da atividade da enzima (Figura 2). Observa-se que a produção de lacase aumenta quando utilizado o substrato TC2 e diminui quando utilizado o substrato TC1. Os MCSP TC1 e TC2 possuem composição química semelhante, sendo compostos por 80% de SM e 20% de FA. Porém o meio TC2 tem no substrato SM com granulometria menor que 1,7 mm e o TC1 tem SM com granulometria entre 1,7 e 5 mm. Assim, a maior atividade de lacase no meio TC2 pode estar relacionada à granulometria da matéria-prima. Desta forma, a menor granulometria do meio de cultivo aumenta a área de contato entre o substrato e as enzimas, podendo induzir a síntese destes compostos.

**Figura 2.** Efeito em U/g (base seca) das variáveis: substrato, Cd, Mn, Zn, Cu e Fe no planejamento fatorial fracionário  $2^{6-2}$  (Tabela 3) sobre a resposta da atividade da lacase para *Pleurotus ostreatus*. \*Diferença significativa pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).



Fonte: Elaboração dos autores.

Pandey (2003) cita o tamanho da partícula como propriedade física essencial para a atividade enzimática, outros pontos importantes destacados pelo autor são natureza cristalina, porosidade e área de superfície do substrato. Membrillo et al. (2008) observaram que a razão geométrica e o tamanho das fibras do bagaço da cana-de-açúcar influenciam fortemente o perfil da atividade enzimática do gênero de *Pleurotus*. Isso se deve provavelmente ao perfil da lacase que possui massa molecular alta, não conseguindo penetrar profundamente nos tecidos, hidrolisando a lignina da superfície das partículas do substrato. Desta forma, o aumento da área de contato entre o substrato e a enzima mostrou-se fundamental para a indução da síntese de lacase por *P. ostreatus*.

Além da granulometria, o meio de cultivo TC2, com 1,30% de nitrogênio, apresentou maior atividade de lacase que TC1 com apenas 0,84% de nitrogênio. Diferentes autores relatam a correlação positiva entre produção de lacase e concentração de nitrogênio do meio de cultivo para relações C/N

acima de 40 (ELISASHVILI; KACHLISHVILI, 2009). Para *P. ostreatus* a concentração de nitrogênio pode afetar de forma singular a produção de lacase. Relações C/N acima de 30 estimulam a produção de lacase devido à condição favorável ao crescimento micelial, enquanto C/N abaixo de 30 ativam a síntese celular de lacase (D'AGOSTINI et al., 2011). Kachlishvili et al. (2005) e Mikiashvili et al. (2005) descrevem que o aumento de nitrogênio no meio de cultivo leva a repressão da síntese de enzimas hidrolíticas e induz a produção de lacase. Diferentes genes codificadores de lacase são comuns em fungos, e a produção de várias isoformas de lacase agrupadas em famílias gênicas têm sido relatadas (PEZZELLA et al., 2009). Algumas formas apresentam expressão constitutiva e outras são induzidas por condições fisiológicas e de crescimento (MANSUR; SUÁREZ; GONZÁLEZ, 1998; SODEN; DOBSON, 2003; XIAO et al., 2006). Assim, para *P. ostreatus*, Pezzella et al. (2009) analisando a região promotora de sete genes de lacase, relataram que a presença de nitrogênio



no meio de cultivo, associado a presença de certas sequências gênicas, pode estar relacionada a regulação da expressão de lacase. Apesar do vasto conhecimento sobre a síntese de lacase, as alterações de nitrogênio parecem afetar a síntese desta enzima quando ocorre de forma similar a alteração do balanço entre carbono e nitrogênio. A ativação da síntese enzimática parece estar muito associada pela relação entre a presença de carbono de fácil ou difícil metabolização. Desta forma, é possível que em meios com excesso de nitrogênio, o fungo seja induzido a produzir lacase para liberar carbono que facilitará a recuperação do balanço entre carbono e nitrogênio livres (D'AGOSTINI et al., 2011). Assim, os meios TC1 e TC2, apesar de conterem diferentes concentrações de nitrogênio, possuíam semelhantes fontes de carbono e nitrogênio, igual relação C/N e por consequência semelhante balanço entre carbono e nitrogênio livres. Assim, provavelmente a granulometria e não a concentração de nitrogênio induziu a produção de lacases para estes meios de cultivo, permitindo identifica-la como a variável mais relevante para a produção de lacase por *P. ostreatus*.

Em relação aos indutores avaliados observou-se que apenas o ferro não afetou ( $p \leq 0,05$ ) a produção de lacase (Figura 2). Baldrian et al. (2005) verificaram um aumento na degradação de lignocelulose por *P. ostreatus* na presença de Cu, Mn e Zn. Cu e Mn participam diretamente do processo de degradação da lignina, o primeiro atua como cofator para o centro catalítico da lacase e o segundo participa diretamente do ciclo da peroxidase Mn-dependente, outra enzima envolvida na degradação da lignina. O Cd também é citado como indutor do aumento da atividade da lacase em *P. ostreatus* em concentrações de 1 a 5 mM (BALDRIAN; GABRIEL, 2002). Segundo Singhal e Rathore (2001) o Zn é necessário para o funcionamento do sistema enzimático lignolítico, atuando na mineralização e solubilização da lignina. Apesar do efeito positivo da presença de minerais sobre a produção de lacase, a granulometria do substrato foi o fator mais importante.

## Conclusões

Os resultados indicam que para o crescimento micelial no meio de cultivo sólido particulado o fator mais importante é a capacidade de retenção de oxigênio do meio de cultivo. Para o crescimento micelial de *P. ostreatus* o sabugo de milho e o farelo de trigo são os melhores componentes do substrato. As demais matérias-primas reduziram o crescimento micelial. Já para a indução da produção de lacase em meio de cultivo sólido particulado, o fator mais importante é a redução do tamanho da partícula, com aumento da área de contato entre o micélio e o substrato.

## Agradecimentos

À Universidade Paranaense, CNPq e Fundação Araucária pelo apoio financeiro e pela bolsa de estudos concedida.

## Referências

- ANDERSON, S. J.; MERRILL, J. K.; KLOPFENSTEIN, T. J. Soybean hulls as an energy supplement for the grazing ruminant. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 66, n. 11, p. 2959-2964, 1988.
- BALDRIAN, P.; GABRIEL, J. Copper and cadmium increase activity in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, v. 206, n. 1, p. 69-74, 2002.
- BALDRIAN, P.; VALÁSKOVÁ, V.; MERHAUTOVÁ, V.; GABRIEL, J. Degradation of lignocellulose by *Pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc. *Research in Microbiology*, Amsterdam, v. 156, n. 5-6, p. 670-676, 2005.
- BRASIL, Paraná, Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Paraná. *Relatório da safra 2006/2007*. Disponível em: <[http://www.pr.gov.br/seab/deral/Relat%3rio%20da%20Safra\\_JAN\\_07.pdf](http://www.pr.gov.br/seab/deral/Relat%3rio%20da%20Safra_JAN_07.pdf)>. Acesso em: 21 fev. 2007.
- CEREDA, M. P. Valorização de subprodutos como forma de reduzir custos de produção. In: CEREDA, M. P. (Ed.). *Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca*. São Paulo: Fundação Cargill, 2001. v. 4, p. 305-320.

- COLAUTO, N. B.; EIRA, A. F.; MINHONI, M. T. A. Physical factors on the productivity of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer mushroom. *Científica*, São Paulo, v. 26, n. 1-2, p. 25-43, 1998.
- D'AGOSTINI, E. C.; MANTOVANI, T. R. D.; DO VALLE, J. S.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; COLAUTO, N. B.; LINDE, G. A. Low carbon/nitrogen ratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v. 68, n. 3, p. 295-300, 2011.
- EIRA, F. C.; MEIRELLES, W. F.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Shiitake production on corn cob substrates. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, Sete Lagoas, v. 4, n. 2, p. 141-148, 2005.
- ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E. Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot *Basidiomycetes*. *Journal of Biotechnology*, Amsterdam, v. 144, n. 1, p. 37-42, 2009.
- ELISASHVILI, V.; PENNINCKX, M.; KACHLISHVILI, E.; TSIKLAURI, N.; METREVELI, E.; KHARZIANI, T.; KVESITADZE, G. *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. *Bioresource Technology*, Barking, v. 99, n. 3, p. 457-462, 2008.
- GRIENSVEN, L. J. L. D. *The cultivation of mushrooms*. Horst: Mushroom Experimental Station, 1988. 515 p.
- HOSENEY, R. C. *Principios de ciencia y tecnologia de los cereales*. Zaragoza: Acribia, 1991. 320 p.
- JUMES, F. M. D.; LUGARINI, D.; PEREIRA, A. L. B.; OLIVEIRA, A.; CHRISTOFF, A. O.; LINDE, G. A.; VALLE, J. S.; COLAUTO, N. B. C.; ACCO, A. Effects of *Agaricus brasiliensis* mushroom in Walker-256 tumor-bearing rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, Winnipeg, v. 88, n. 1, p. 21-27, 2010.
- KACHLISHVILI, E.; PENNINCKX, M. J.; TSIKLAURI, N.; ELISASHVILI, V. Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Oxford, v. 22, n. 4, p. 391-397, 2005.
- MANSUR, M.; SUÁREZ, T.; GONZÁLEZ, A. E. Differential gene expression in the laccase gene family from Basidiomycete I-62 (CECT 20197). *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 64, n. 2, p. 771-774, 1998.
- MANTOVANI, T. R. D.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B. Effect of the addition of nitrogen sources to cassava fiber and carbon-to-nitrogen ratios on *Agaricus brasiliensis* growth. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 53, n. 1, p. 139-143, 2007.
- MEMBRILLO, I.; SÁNCHEZ, C.; MENESES, M.; FAVELA, E.; LOERA, O. Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. *Bioresource Technology*, Barking, v. 99, n. 16, p. 7842-7847, 2008.
- MIKIASHVILI, N.; ELISASHVILI, V.; WASSER, S.; NEVO, E. Carbon and nitrogen sources influence the ligninolytic enzyme activity of *Trametes versicolor*. *Biotechnology Letters*, Dordrecht, v. 27, n. 13, p. 955-959, 2005.
- MILES, P. G.; CHANG, S. T. *Mushroom biology*. Singapore: World Scientific, 1997. 194 p.
- MIZUNO, M.; MINATO, K.; ITO, H. Anti-tumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei* Murrill. *Biochemistry and Molecular Biology International*, New York, v. 47, n. 4, p. 704-714, 1998.
- MOURÃO, F.; LINDE, G. A.; MESSA, V.; CUNHA JUNIOR, P. L.; SILVA, A. V.; EIRA, A. F.; COLAUTO, N. B. Antioneoplastic activity of *Agaricus brasiliensis* basidiocarps on different maturation phases. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 40, n. 4, p. 901-905, 2009.
- MOURÃO, F.; UMEO, S. H.; TAKEMURA, O. S.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B. Antioxidant activity of *Agaricus brasiliensis* basidiocarps on different maturation phases. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 197-202, 2011.
- MSHANDETE, A. M.; MGONJA, J. R. Submerged liquid fermentation of some tanzanian basidiomycetes for the production of mycelial biomass, exopolysaccharides and mycelium protein using wastes peels media. *Journal of Agricultural and Biological Science*, Nanning, v. 4, n. 6, p. 1-13, 2009.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, Amsterdam, v. 13, n. 2-3, p. 81-84, 2003.
- PEZZELLA, C.; AUTORE, F.; GIARDINA, P.; PISCITELLI, A.; SANNIA, G.; FARACO, V. The *Pleurotus ostreatus* laccase multi-gene family: isolation and heterologous expression of new family members. *Current Genetics*, Göteborg, v. 55, n. 1, p. 45-57, 2009.
- REGINA, M.; BROETTO, F.; GIOVANNOZZI-SERMANNI, G.; MARABOTINI, R.; PERANNI, C.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B.; PACCOLA-

- MEIRELLES, L. D. Atividade de enzimas oxidativas do *Lentinula edodes* em substratos agroindustriais. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 30, n. 4, p. 881-888, 2009.
- SILVA, E. M.; MACHUCA, A.; MILAGRES, A. M. F. Effect of cereal brans on *Lentinula edodes* growth and enzyme activities during cultivation on forestry waste. *Letters in Applied Microbiology*, Londres, v. 40, n. 4, p. 283-288, 2005.
- SINGHAL, V.; RATHORE, V. S. Effects of Zn<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> on growth, lignin degradation and ligninolytic enzymes in *Phanerochaete chrysosporium*. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, Oxford, v. 17, n. 3, p. 2235-2240, 2001.
- SODEN, D. M.; DOBSON, A. D. W. The use of amplified flanking region-PCR in the isolation of laccase promoter sequences from the edible fungus *Pleurotus sajor-caju*. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v. 95, n. 3, p. 553-562, 2003.
- SOUZA-PACCOLA, E. A.; BOMFETI, C. A.; FÁVARO, L. C. L.; FONSECA, I. C. B.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Antimutagenic action of *Lentinula edodes* and *Agaricus blazei* on *Aspergillus nidulans* conidia. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 311-315, 2004.
- STAJIĆ, M.; PERSKY, L.; FRIESEM, D.; HADAR, Y.; WASSER, S. P.; NEVO, E.; VUKOJEVIĆ, J. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. *Enzyme and Microbial Technology*, Guildford, v. 38, n. 1-2, p. 65-73, 2006.
- WU, J. Z.; CHEUNG, P. C. K.; WONG, K. H.; HUANG, N. I. Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer. Part 2: effect of carbon-to-nitrogen ratio of culture medium on the content and composition of the mycelial dietary fibre. *Food Chemistry*, Barking, v. 85, n. 1, p. 101-105, 2004.
- XIAO, Y. Z.; HONG, Y. Z.; LI, J. F.; HANG, J.; TONG, P. G.; FANG, W.; ZHOU, C. Z. Cloning of novel laccase isozyme genes from *Trametes* sp. AH28-2 and analyses of their differential expression. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v. 71, n. 4, p. 493-501, 2006.

