

JOSÉ MARIA RODRIGUES DA LUZ

**DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS TÓXICOS E DE FATORES
ANTINUTRICIONAIS DA TORTA DE PINHÃO MANSO POR *Pleurotus
ostreatus***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2009**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

L979d
2009

Luz, José Maria Rodrigues, 1977-

Degradação de compostos tóxicos e de fatores antinutricionais da torta de pinhão manso por *Pleurotus ostreatus* / José Maria Rodrigues Luz. – Viçosa, MG, 2009.
xiv, 89f. : il (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Maria Catarina Megumi Kasuya.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Pinhão. 2. Biodiesel. 3. Lignina. 4. Enzimas de fungos.
5. Taninos. 6. Ester de forbol. 7. Ácido fítico. I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 583.69

JOSÉ MARIA RODRIGUES DA LUZ

DEGRADAÇÃO DE COMPOSTOS TÓXICOS E DE FATORES
ANTINUTRICIONAIS DA TORTA DE PINHÃO MANSO POR *Pleurotus*
ostreatus


Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola, para obtenção do título de Magister
Scientiae.

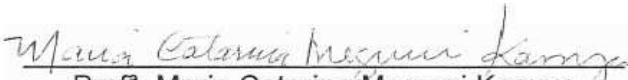
APROVADA: 24 de julho de 2009.


Prof.^a. Flávia Maria Lopes Passos


Prof.^a. Maria Cristina Dantas Vanetti


Prof. Luciano Gomes Fietto


Prof. Antônio Galvão do Nascimento


Prof.^a. Maria Catarina Megumi Kasuya
(orientadora)

Dedico com muito amor
Aos meus pais: Germinio Rodrigues da Luz e Terezinha Lopes do Santos e, a
esposa e filhos que virão.

"NA NATUREZA, NADA SE CRIA, NADA SE PERDE, TUDO SE
TRANSFORMA."
Lavoisier, século XVIII

AGRADECIMENTOS

A Deus que em cada momento esteve presente, mesmo aqueles dias mais difíceis e por colocar em meu caminho tantas pessoas boas.

Aos meus pais e irmãos por acreditarem em meus sonhos, mesmo sabendo que o caminho seria difícil.

À Vaneide Aparecida Santos Rodrigues e Gabriel Santos Rodrigues pela força em todos os momentos.

À minha orientadora Maria Catarina Megumi Kasuya, por todos os ensinamentos, compreensão, dedicação e pela grande amizade.

Aos coorientadores: Prof Hilário Cuquetto Mantovani e Prof. Sebastião Tavares Resende pelos ensinamentos e preciosas sugestões.

Às Prof^a. Denise Mara Soares Bazzoli, Prof^a. Flavia Maria Lopes Passos, Prof^a. Maria Cristina Dantas Vanetti e ao Prof. Luciano Gomes Fietto e Prof. Antônio Galvão do Nascimento por aceitarem fazer parte da banca de defesa.

À Virginia Maria Chaves Alves pelas sugestões e disposição.

Ao Prof. Maurício Dutra Costa pelos ensinamentos, sugestões e companheirismo.

À Daniela Tiago da Silva Campos e Akihiko Manabe pela paciência e empenho em ensinar os trabalhos do laboratório e pelo companheirismo.

À todos os amigos e irmãos do Laboratório de Associações Micorrízicas, em especial à Marliane de Cássia Soares da Silva, Muriel da Silva Folli Pereira e Matheus Loureiro Santos, por transformar o local de trabalho em ambiente familiar, pelo cafezinho, ótimas conversas e ainda, pela saudaaaaaaaaaaaaaaaaade de 1926.

Às minhas abelhinhas: Denise Pereira Torres, por preciosa ajuda na condução dos experimentos; Cintia da Silva Xavier por auxiliar nos experimentos e por todas as vidrarias limpas e, em especial, à Sirlaine Albino Paes. E ainda, meu pulmão agradece estas abelhinhas, por todos os vidros de ácido sulfúrico, metanol, tetrahydrofurano, hidróxido de bário e outros que ajudaram a abrir.

Às minhas queridas amigas e irmãs: Kênia Leite Ferreira, Reininy Ribeiro e as de Oliveira Ferraz, Andréa (Beldade), Drinha e Nanana, por tantos momentos

felizes, pelos os biscoitos de polvilho e por incentivar a continua na busca de pagar 27,5 % de imposto de renda.

À Darlene Aparecida Pena (criola) e a Tarciane Miranda que palavras são poucas para definir nossa amizade, muito mais que irmãs.

À Dona Dora que apesar de ter enrolado a filha dela por tanto tempo (5 anos), me recebeu aqui em Viçosa como filho.

À Delegada Maria Neuza Rodrigues e a Guarda - Mirim de Montes Claros pela formação social e minha primeira oportunidade de trabalho.

Aos amigos de alojamento novíssimo 123: Leornado (Léo BG), Nilton Cesar (Niltão), Weskley da Silva (Cotrim) e Evaldo por tantos momentos juntos, pelas dificuldades superadas e conversas.

A todos os professores, funcionários e estudantes do Departamento de Microbiologia, sem distinção, por estarem sempre prontos a colaborar.

Às Empresas: Fusermann biocombustível pela doação da torta de pinhão manso e a Fungitec pelos reagentes e suporte técnico.

Ao CNPq, FAPEMIG, CAPES e a Universidade Federal de Viçosa pelo apoio técnico e financeiro.

Todos acima descritos e ainda aqueles que um dia disse “você vai conseguir”, o meu muito obrigado!

BIOGRAFIA

JOSÉ MARIA RODRIGUES DA LUZ nasceu em Varzelândia/MG e, desde 1989, escolheu Montes Claros/MG como cidade do coração, onde iniciou e concluiu o ensino básico (1ª a 4ª série na Escola Estadual Irmã Beata e 5ª a 8ª série na Escola Estadual Belvinda Ribeiro) e ensino fundamental (Escola Estadual Dom João Antônio Pimenta). Participou da Guarda-Mirim, o programa de integração de menores a mercado de trabalho, de 1992 a 1995, onde conheceu a Delegada Maria Neuza Rodrigues a qual teve participação importante no ingresso ao ensino superior.

Em 2002, iniciou curso de Graduação em Agronomia e, em 2003, transferiu-se para o curso de Bacharel em Bioquímica, na Universidade Federal de Viçosa – UFV. Nessa mesma instituição iniciou, em 2007, o curso de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola no nível de mestrado.

Durante todo o período de graduação e Pós-graduação trabalhou no Laboratório de Associações Micorrízicas sob orientação da Professora e amiga Maria Catarina Megumi Kasuya. Nesse laboratório trabalhou nas linhas de pesquisa produção de cogumelos comestíveis e destoxificação biológica da torta de pinhão manso.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
REVISÃO DE LITERATURA.....	1
1- O Pinhão manso (<i>Jatropha curcas</i>).....	1
2 - Compostos tóxicos do fruto de pinhão manso.....	1
3 - Fatores antinutricionais presentes no fruto de pinhão manso	4
3.1 - Fitato.....	4
3.2 - Taninos	5
4 – Micro-organismo e enzimas lignocelulolíticas.....	6
5 – Destoxificação de compostos tóxicos por micro-organismo	9
6 – Referências Bibliográficas	12
CAPÍTULO 1: Degradação de compostos lignocelulósicos presentes na torta de pinhão manso pelo fungo <i>Pleurotus ostreatus</i>	25
RESUMO	26
ABSTRACT	27
1- INTRODUÇÃO	28
2 - MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1- Inóculo.....	29
2.2- Composição do substrato e condições de cultivo.....	29
2.3 - Determinação da biomassa fúngica	29
2.4 – Determinação de Lignina.....	31
2.5- Determinação de celulose e hemicelulose	31
2.6 - Medida do pH.....	32
2.7 - Análise estatística.....	32
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4 - CONCLUSÕES	42
5 –REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

CAPITULO 2: Degradação de compostos tóxicos e fatores antinutricionais presentes na torta de pinhão pelo fungo <i>Pleurotus ostreatus</i>	48
RESUMO	49
ABSTRACT	50
1- INTRODUÇÃO	51
2 - MATERIAL E MÉTODOS	52
2.1- Preparo da semente-inóculo	52
2.2 - Substratos utilizados e inoculação	53
2.3- Determinação da proteína e da atividade enzimática.....	53
2.4 - Composição físico-química dos substratos	55
2.4.1 – Determinação de éster de forbol	56
2.4.2 – Determinação de minerais	57
2.4.3 – Determinação do fósforo solúvel.....	57
2.4.4 - Ácido fítico	57
2.4.5 – Determinação de taninos totais.....	58
2.4.6 – Determinação de monossacarídeos redutores.....	58
2.5 – Determinação da biomassa	59
2.6 – Determinação da massa seca dos substratos	59
2.7 - Produção de cogumelos.....	59
2.8 - Análises estatísticas	60
3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
3.1 - Biomassa, massa seca e a degradação de compostos ligninocelulósicos	61
3.2 - Degradação de éster de forbol	69
3.3 - Degradação de fatores antinutricionais	72
3.4 – Produção de cogumelos	76
4 - CONCLUSÕES	80
5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA	PÁGINA
1. Estrutura química dos tipos de éster de forbol: tipo ativo (α) e o tipo inativo (β), segundo Silinsky & Searl (2003).	3
CAPÍTULO 1	
1. Crescimento micelial do isolado PLO 6 de <i>Pleurotus ostreatus</i> inoculado em substratos a base da torta de pinhão manso pura ou em mistura com resíduos agroindustriais e, ou 0,2 % de carbonato de cálcio e sulfato de cálcio 4:1(m/v).	34
2. Biomassa produzida pelo do fungo <i>P. ostreatus</i> PLO 6 quando incubado a 25 °C, por 45 dias, em substrato a base de torta de pinhão manso, conforme tabela 1. Barras seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). O símbolo ($\bar{\square}$) sobre as barras representa o desvio-padrão. Descrição dos substratos conforme tabela 1.	35
3. Biomassa produzida pelo isolado PLO 6 do fungo <i>Pleurotus ostreatus</i> quando incubado a 25 °C, por 45 dias, em substrato a base de torta de pinhão manso pura e, ou com adição de 0,2 % da mistura (4:1) de carbonato de cálcio e sulfato de cálcio . O símbolo ($\bar{\square}$) sobre os pontos representa o desvio-padrão.	36
4. Percentagem de degradação de lignina pelo fungo <i>P. ostreatus</i> PLO 6 quando incubado a 25 °C por 45 dias, em substrato a base de torta de pinhão manso, conforme tabela 1. Barras seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). O símbolo ($\bar{\square}$) sobre as barras representa o desvio-padrão. Substrato 1- To, 2- ToFa20, 3 – ToFa10, 4 – ToSe20, 5 – ToSe10, 6 – ToSeFa30, 7 – ToSeFa10, 8 - ToSm20, 9 – ToSm10, 10 – ToCalcio, 11 – ToCe20, 12 – ToCe10, 13 – ToCeFa30, 14 – ToCc20, 15 – ToCc10, 16 – ToCcFa30 e ToCc50. Descrição dos substratos conforme tabela 1.	37
5. Percentagem de degradação decelulose e hemicelulose pelo fungo <i>P. ostreatus</i> PLO 6 quando incubado a 25 °C por 45 dias, em substrato a base de torta de pinhão manso, conforme tabela 1. Barras seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). O símbolo ($\bar{\square}$) sobre as barras representa o desvio-padrão. Substrato 1- To, 2- ToFa20, 3 – ToFa10, 4 – ToSe20, 5 – ToSe10, 6 – ToSeFa30, 7 – ToSeFa10, 8 - ToSm20, 9 – ToSm10, 10 – ToCalcio, 11 – ToCe20, 12 – ToCe10, 13 – ToCeFa30, 14 – ToCc20, 15 – ToCc10, 16 – ToCcFa30 e ToCc50. Descrição dos substratos conforme tabela 1.	39

CAPÍTULO 2

PÁGINA

1. Crescimento micelial de *P. ostreatus* PLO 6 em substratos a base da torta de pinhão manso pura ou em mistura com resíduos agroindustriais após 15 dias de incubação. S1 – Torta, S5 - Torta + 10 % de serragem de eucalipto, S12 - Torta + 10 % de casca de eucalipto e S16 - Torta + 30 % farelo de arroz + 30 % de casca de café. 63
2. Cogumelos produzidos pelo de *P. ostreatus* PLO 6 crescidos em substratos a base da torta de pinhão manso pura ou em mistura com diferentes resíduos agroindustriais. 63
3. Produção de biomassa (A) e perda da massa seca (B) durante 60 dias de incubação de *Pleurotus ostreatus* PLO 6 em substratos a base da torta de pinhão manso pura ou em mistura com resíduos agroindustriais, conforme tabela 1. 64
4. Percentagem de lignina (A) e atividade de lacase (B) e manganês peroxidase (C), durante 60 dias de incubação de *P. ostreatus* PLO 6 em substratos a base da torta de pinhão manso pura ou em mistura com resíduos agroindustriais, conforme tabela 1. Modelo de regressão significativo ($p < 0,05$). 66
5. Percentagem de celulose (A), atividade de celulase (B) e atividade de xilanse (C) durante 60 dias de incubação do isolado PLO 6 de *Pleurotus ostreatus* em substratos a base da torta de pinhão manso pura ou em mistura com resíduos agroindustriais. Modelo de regressão significativo ($p < 0,05$). 68
6. Degradação de composto tóxico, éster de forbol, presente na torta de pinhão manso pelo *Pleurotus ostreatus* PLO 6, durante 60 dias de incubação. Modelo de regressão significativo ($p < 0,05$). 71
7. Degradação de taninos por *P. ostreatus* PLO 6, durante 60 dias de incubação em substratos a base da torta de pinhão manso, conforme tabela 1. Modelo de regressão significativo ($p < 0,05$). 72
8. Percentagem de fósforo (A), concentração de ácido fítico (B) e atividade de fitase (C) de *Pleurotus ostreatus* PLO 6 durante 60 dias de incubação em substratos a base da torta de pinhão manso, conforme tabela 1. Modelo de regressão significativo ($p < 0,05$). 75
9. Eficiência biológica de *Pleurotus ostreatus* PLO 6, incubado por 60 dias em substrato a base da torta de pinhão manso, conforme tabela 1. Modelo de regressão significativo ($p < 0,05$). 76

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1	PÁGINA
1. Composição do substrato e proporção dos resíduos agroindustriais ou 0,2 % da mistura (4:1) de carbonato de cálcio e sulfato de cálcio ($\text{CaCO}_3 + \text{CaSO}_4$) adicionados à torta de pinhão manso.	30
2. Composição ligninocelulósica dos substratos esterilizados e a produção de ergosterol pelo fungo <i>P. ostreatus</i> PLO 6, por 45 dias de incubação.	34
3. Medida do pH dos substratos autoclavados antes e após 45 dias de inoculação do isolado PLO 6 de <i>Pleurotus ostreatus</i> .	41
 CAPÍTULO 2	
1. Composição do substrato e a proporção dos resíduos agroindustriais adicionados à torta de pinhão manso.	52
2. Condições do HPLC para quantificação de éster de forbol (Makkar et al., 1997).	56
3. Percentagem de compostos químicos, orgânicos e minerais, presentes na torta de pinhão manso pura ou em mistura com resíduos agroindustriais utilizado como substratos para cultivo do fungo <i>Pleurotus ostreatus</i> PLO 6.	62
4. Produtividade de cogumelo <i>P. ostreatus</i> PLO 6 incubado durante 60 dias em substrato a base da torta de pinhão manso.	78
5. Principais nutrientes encontrados nos cogumelos de <i>P. ostreatus</i> PLO 6 produzidos em substrato a base de pinhão manso após 60 dias de incubação.	78
6. Ester de forbol presente nos cogumelos <i>P. ostreatus</i> PLO 6, produzidos em substrato a base de pinhão manso por 60 dias de incubação.	79

RESUMO

LUZ, José Maria Rodrigues da, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2009. **Degradação de compostos tóxicos e de fatores antinutricionais da torta de pinhão manso por *Pleurotus ostreatus***. Orientadora: Maria Catarina Megumi Kasuya. Coorientadores: Hilário Cuquetto Mantovani e Sebastião Tavares de Resende

A produção de biodiesel utilizando o óleo da semente de pinhão manso (*Jatropha curcas*) como matéria-prima libera grande quantidade de resíduos sólidos, denominado de torta. Essa torta apresenta composição diversificada, contendo não só compostos ligninocelulósicos, água e sais minerais, mas também compostos tóxicos e fatores antinutricionais. A destoxificação e o reaproveitamento dessa torta de pinhão manso são de grande interesse da indústria do biocombustível. A utilização desses resíduos como substrato para cultivo de fungos de podridão branca, *Pleurotus ostreatus*, pode ser uma alternativa de baixo custo e que permite a produção de produtos de interesse econômico e industrial como enzimas, proteínas e cogumelos comestíveis. Além disso, esse fungo produz enzimas capazes de degradar diferentes substâncias tóxicas, fatores antinutricionais e compostos ligninocelulósicos. Neste trabalho, a torta de pinhão manso pura, ou em mistura com outros resíduos agroindustriais, foi utilizada como substrato para crescimento micelial de *P. ostreatus* visando à eliminação de compostos tóxicos, fatores antinutricionais e a redução do teor de lignina, celulose e hemicelulose. Inicialmente, para verificar a viabilidade micelial e a degradação compostos ligninocelulósicos presente na torta de pinhão manso. *P. ostreatus* PLO 6 foi inoculado em substratos à base da torta de pinhão manso, adicionado ou não de resíduos agroindustriais. Após 45 dias de incubação, verificou-se elevada produção de biomassa fúngica, 50 % de degradação de lignina e 20 % de consumo de celulose e hemicelulose. Os substratos que apresentaram maior produção de biomassa fúngica e também a maior degradação de compostos ligninocelulósicos foram utilizados para avaliar a capacidade de *P.*

ostreatus formar cogumelos, além de degradar éster de forbol, ácido fítico e taninos. Após 60 dias de incubação, observou-se boa produção de cogumelos e degradação de compostos ligninocelulósicos, com significativa perda da massa seca, redução de 95 % de ácido fítico, 85 % de taninos (equivalente a ácido tânico), 99 % de éster de forbol e alta produtividade de cogumelos. Após o período de incubação, tanto os cogumelos de *P. ostreatus* como os substratos utilizados apresentaram concentrações de éster de forbol menor que o encontrado em variedade de *J. curcas* não tóxicas do México. Conclui-se que *P. ostreatus* tem capacidade de degradar composto tóxico, fatores antinutricionais e compostos ligninocelulósicos presentes na torta de pinhão manso. O uso alternativo de torta de pinhão manso como substrato para cultivo de cogumelos e enzimas, destoxificando-o, agrega valor a esse resíduo, e apresenta um alto potencial do uso dessa torta como alimento, além de diminuir os danos ambientais causados pelo descarte direto.

ABSTRACT

LUZ, José Maria Rodrigues da, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2009. **Degradation of toxic and antinutritional compounds present in the *Jatropha* cake by *Pleurotus ostreatus***. Adviser: Maria Catarina Megumi Kasuya. Co-advisers: Hilário Cuquetto Mantovani and Sebastião Tavares de Resende

The oil extraction from *Jatropha curcas* seeds as raw material to biodiesel production releases a large quantity of solid residue, called cake. This *Jatropha* cake is formed by lignocellulolytic residues, water, minerals salts, but also contains toxic compounds and antinutritional factors. The correct destination of this residue is of great interesting to biofuel industries. The use of these residues as a substrate to grow the white rot fungi, *Pleurotus ostreatus*, may be a low cost alternative to produce the economic and industrial interesting products such as enzymes, proteins and edible mushrooms. Moreover, this fungus produces enzyme capable of degrade different toxic compounds and antinutritional factors. In this study *Jatropha* cake, pure or in mixture with agro-industrial residues, was used as substrate to grow *P. ostreatus* objecting to produce mushrooms, eliminate phorbol ester, antinutritional factors and also, to evaluate the reduce lignin, cellulose and hemicellulose. After 45 days of *P. ostreatus* mycelia inoculation in the substrate, it was observed high production of fungus biomass, and degradation of 50 % of lignin and 20 % of cellulose and hemicellulose. The substrates which present higher fungus biomass production and lignocellulolytic degradation were used to assess the ability of *P. ostreatus* to produce mushroom and to degrade phorbol ester, phytic acid and tannins. After 60 d of incubation, it was observed good production of mushroom, reduction of lignocellulolytic compounds and loss of dry mass, reduction of phytic acid in 95 % and 85 % of tannins (equivalent a tannin acid) and 99 % of phorbol ester. These mushrooms and the substrates after 60 d of colonization by *P. ostreatus* had concentrations of phorbol esters smaller than that found in provenances of non toxic *J. curcas* from México. Therefore, *P. ostreatus* has the ability of degrade toxic compounds, antinutritional factors and

lignocellulosic compounds present in *Jatropha* cake. The alternative of using *Jatropha* cake as substrate to mushroom and enzymes production, add value to this residues, as well as detoxifying it show high potential to use *Jatropha* cake as animal food, beyond decreasing the environmental damage.

REVISÃO DE LITERATURA

1- O Pinhão manso (*Jatropha curcas*)

Jatropha curcas Linnaeus (1753) conhecido popularmente como pinhão manso pertence à família Euphorbiaceae (Gandhi et al., 1995). É uma planta nativa da América Tropical e bastante cultivada na África e na Ásia (Haas et al., 2002). Essa planta vem sendo usada para prevenir e, ou controlar erosões, para formar cerca viva especialmente para conter animais de fazenda (Heller, 1996) e tem, ainda, um considerável potencial na produção de biodiesel (Kumar & Sharma, 2008; Lu et al., 2009) e biogás (Dhanya et al., 2009).

O biodiesel é produzido a partir de óleos vegetais, comestíveis e não-comestíveis e, ou gorduras animais, por meio do processo de trans-esterificação (Openshaw et al., 2000). Esse processo utilizando a polpa do fruto de pinhão manso libera um resíduo sólido denominado de torta (Openshaw et al., 2000; Patil & Deng, 2009). Essa torta obtida como subproduto da extração do óleo é um material complexo e apresenta composição diversificada contendo celulose, hemicelulose, lignina, extrativos, água, sais minerais, proteínas (Giibitz et al., 1999; Sricharoenchaikul et al., 2007), ésteres de forbol e fatores antinutricionais (Makkar et al., 1997). A torta contém ainda curcina, uma proteína altamente tóxica similar à rícina oriunda da extração do óleo da mamona, o que a torna imprópria para a alimentação animal (Goel et al., 2007). Contudo, a destoxificação desses resíduos pode permitir a utilização como suplemento alimentar rico em proteínas na alimentação de aves, suínos, bovinos e peixes (Gubitz et al., 1999; Staubmann et al., 1999). Com isso o obstáculo crucial no estabelecimento de *J. curcas* como uma cultura comercial, seria superado devido à destoxificação das sementes e do próprio óleo (Haas et al., 2002).

2 - Compostos tóxicos do fruto de pinhão manso

A toxicidade das sementes de *J. curcas* é atribuída principalmente, a um grupo de ésteres diterpeno denominado éster de forbol, que estão contidos em concentrações elevadas em variedades tóxicas, mas em baixas concentrações em variedades não tóxicas oriunda do México (Makkar et al., 1998).

Forbol é um termo utilizado para descrever uma família de compostos tetra cíclico diterpenos que ocorrem naturalmente e são referidos como tigliane (Evans 1986 citado por Goel et al., 2007). Ésteres de forbol são definidos como compostos policíclicos em que dois grupos hidroxila vizinhos ao átomo de carbono estão esterificados com ácidos graxos (Goel et al., 2007).

Os ésteres de forbol ativam a proteína quinase C (Silva et al., 1995; Moraes et al., 1996; Slater et al., 2002; Saraiva et al., 2004), uma enzima chave na transdução de sinal em resposta a vários hormônios e a processos de desenvolvimento da maioria das células e tecidos animais. A atividade dessa quinase inclui regulação de canais iônicos, cálcio, proteína calmodulina e receptores de fator de crescimento, estruturais e de controle de proteínas do citoesqueleto (Kikkawa et al., 1989). Assim, a ativação de quinase C por interação prolongada com forbol pode levar a resposta mitogênica e, conseqüentemente, a geração de tumor (Rotenberg & Weinstein, 1991). O possível mecanismo para ativação da proteína quinase C é a substituição do diacilglicerol endógeno, que normalmente é produzido para manter a concentração de inositol fosfolípidos pelo éster de forbol (Mosior & Newton, 1995).

O éster de forbol tipo α é inativo e tem propriedades físicas e químicas similares ao forbol tipo β , mas não são capazes de ativar a proteína quinase C devido a mudanças configuracionais na estrutura desse forbol inativo (Figura 1; Silinsky & Searl, 2003). Os forbóis ativos, tipo β , são 4 β -12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) e 4 β -12-forbol-13-dibutirato (PDB) diferem somente pelas substituições nas posições 12 e 13 do anel aromático.

Estudos da composição química de *J. curcas* levaram à suposição de que as sementes dessa oleaginosa contêm até quatro tipos de ésteres de forbol (Adolf et al., 1984; Wink et al., 2000). Entretanto, devido a baixa concentração e extrema instabilidade desses ésteres, a quantificação têm sido realizadas por apenas um diéster, 12-desoxi-16-hidroxiforbol (Hirota et al., 1988).

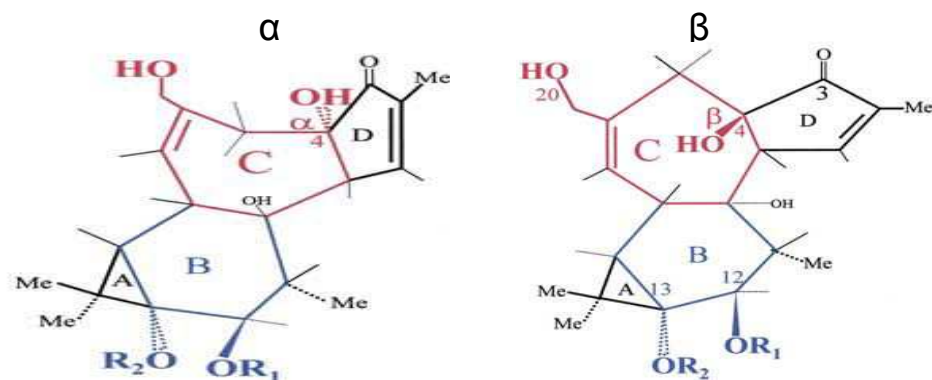


Figura 1: Estrutura química dos tipos de éster de forbol: tipo ativo (α) e o tipo inativo (β), segundo Silinsky & Searl (2003).

Ésteres de forbol ocorrem naturalmente, são instáveis e sensíveis à oxidação, hidrólise, trans-esterificação e epimerização durante o processo de isolamento (Haas et al., 2002). Segundo esses autores, o isolamento desses compostos deve ser realizado em condições livres de oxigênio e a extração sob fluxo contínuo de nitrogênio ou argônio, devido a sensibilidade à oxidação.

Os protocolos de isolamento envolvem a derivatização dos grupos funcionais, principalmente acilação ou esterificação dos grupos hidroxila por agentes químicos (Goel et al., 2007). Depois da derivatização, os forbóis são separados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Hirota et al., 1988; Spadaro et al., 1992). As estruturas destes forbóis são então, determinadas utilizando métodos espectroscópicos e técnicas de ressonância magnética nuclear (Goel et al., 2007). Todavia, para identificar a presença desse composto na semente de *J. curcas* tem sido relatada a extração com metanol, seguida a quantificação por HPLC utilizando como padrão forbol-12-miristato-13-acetato (Makkar et al., 1997).

Os ésteres de forbol não podem ser eliminados pelo tratamento térmico, por serem estáveis e suportar temperaturas elevadas (Aregheore et al., 2003). No entanto, é possível reduzir a concentração desse composto por meio de tratamentos químicos (Makkar et al., 1997; Haas & Mittelbach, 2000) ou associação entre tratamento físico e químico (Aregheore et al., 2003). Segundo esses últimos autores, essa associação parece ser mais benéfica, pois além de

reduzir as concentrações de forbóis, neutraliza também a lectina das sementes de *Jatropha*.

Além dos esteres de forbol na torta de pinhão manso tem ainda uma proteína tóxica, denominada de curcina. Essa proteína tóxica isolada de sementes de *J. curcas*, apresenta duas cadeias polipeptídicas e, em estudos *in vitro*, é capaz de inibir a síntese protéica (Stripe et al., 1976; Kumar & Sharma, 2008). Curcina, também denominada de proteína inativadora de ribossomo, provoca irritação na mucosa gastrointestinal e tem ação hemaglutinante (Barbieri, 1993). E devido a característica de inibir a síntese protéica, a curcina tem sido utilizada para diminuir a proliferação de células cancerígenas (Lin et al., 2003; Muangman et al., 2005; Luo et al., 2006).

3 - Fatores antinutricionais presentes no fruto de pinhão manso

3.1 - Fitato

O ácido fítico ou ácido hexafosfórico mio-inositol são compostos encontrados nas sementes de plantas (Francis et al., 2001), formados durante o processo de maturação (Torre et al., 1991). Esse ácido tem efeito negativo na disponibilidade de alguns minerais, por exemplo, cálcio, ferro, zinco e fósforo (Graf & Eaton, 1984; Ullah & Phillippy, 1994; Liang et al., 2009) e na digestão de amido (Yoon et al., 1983). Devido a ação de quelante, o ácido fítico forma complexos insolúveis com esses minerais (Graf & Eaton, 1984) e também com proteínas e aminoácidos (Ravindran et al., 1999), dificultando a digestão e consequente absorção desses nutrientes. Nas sementes das leguminosas utilizadas na alimentação humana, dois terços do fosfato está na forma de ácido fítico complexado com proteínas e ou minerais (Zhou & Erdman, 1995). Esse ácido é considerado um fator antinutricional por formar complexos insolúvel com proteínas e minerais e ainda ter efeito inibitório sobre as enzimas digestivas (Silva & Silva, 1999). A semente de *J. curcas* tem alta concentração desse ácido que representa até 10 % da massa seca (Makkar et al., 1997). Apesar do ácido fítico ser considerado estável ao calor (Deshpande & Damodaran, 1999), tem sido mostrado à redução significativa do teor desse fator antinutricional presente em alimentos e, ou ração animal, pela temperatura de cozimento e de esterilização em autoclave

por diferentes períodos de tempo (Carlson & Poulsen, 2003; Porres et al., 2004; Rehman & Shah, 2005). Por outro lado, na ração animal, principalmente de peixes e aves, tem sido adicionado a enzima fitase de origem microbiana para a eliminação desse ácido e também aumentar a disponibilidade de minerais, proteínas e aminoácidos (Ravindran et al., 1999; Sohail & Roland, 1999; Ahmad et al., 2000; Denstadli et al., 2007). A enzima fitase pertence à família das enzimas histinas fosfatases ácidas, que catalisam a hidrólise do ácido fítico e gera inositol e fosfato inorgânico (Ullah & Phillippy, 1994). Essa fosfatase tem sido identificada em vários gêneros de fungos (Ullah & Phillippy, 1994; Wyss et al.; 1999; Ahmad et al., 2000; El-Batal & Karem, 2001; Pandey et al.; 2001; Collopy & Royse, 2004; Ramachandran et al.; 2005; Singh & Satyanarayana, 2009) e em vegetais (Phillippy, 1998; Garchow et al., 2006).

3.2 - Taninos

Os taninos são polifenóis de origem vegetal solúveis em água e em solventes polares (Hartish & Kolodziej, 1997; Makkar & Becker, 1998). Esses taninos são considerados um fator antinutricional por inibir a digestão de proteínas (Van der Poel, 1991; Rehman & Shah, 2001). Em razão da capacidade de precipitar proteínas, a adstringência de alguns frutos e plantas, em geral, é provocada pela formação desse complexo (Reed, 1995).

O teor desses taninos no fruto de *J. curcas* é baixo representando apenas 3 % da massa seca (Makkar et al., 1998). Esses compostos também estão presentes em outras espécies de vegetais, por exemplo, em café (Pandey et al., 2000; Barcelos et al., 2001) e eucalipto (Vital et al., 2004; Vázquez et al., 2009).

As concentrações de taninos presentes em alimentos vegetais podem ser reduzidas por tratamento térmico, e ou temperatura de cozimento (Rehman & Shah, 2005; Somsu et al., 2008; Wang et al., 2009). Os taninos também podem ser degradados por fungos (Wong & Wang, 1991; Brand et al., 2000; Fan et al., 2006; Alemawor et al., 2009). Essa degradação biológica pode ser pela atividade da enzima tanino acil hidrolase, denominada de tanase. Essa enzima hidrolisa a ligação éster em taninos, liberando glicose e ácido gálico (Banerjee et al., 2005) e pode ser sintetizada por fungos (Aguilar et al., 2001; Batra & Saxena, 2005;

Battestin & Macedo, 2007; Sharma et al., 2008) e bactérias (Aguilar & Gutiérrez-Sanchez, 2001) na presença de ácido tânico.

4 – Micro-organismo e enzimas lignocelulolíticas

O fungo *P. ostreatus*, pertence à classe Basidiomycete, ordem Agaricales, família Pleorotaceae, e é causador da podridão branca (Rosado et al., 2002; Bonatti et al., 2004). Os cogumelos *Pleurotus* possuem alto valor nutricional e são fontes de proteínas, carboidratos, vitaminas B₁, B₂ e B₃, cálcio e ferro (Schmidt et al., 2003).

O crescimento micelial ou a biomassa fúngica pode ser medida pela quantificação de ergosterol, denominado ergosta-5,7,22-trien-3 β -ol (Richardson & Logendra, 1997; Montgomery et al., 2000, Barajas-Aceves et al., 2002; Cavallazzi et al., 2004; Ballaminut & Matheus, 2007; Niemenmaa et al., 2008). Esse composto faz parte da constituição da membrana lipídica e é encontrado quase que exclusivamente em fungos (Mille-Lindblom et al., 2004; Niemenmaa et al., 2008). O ergosterol pode ser utilizado como indicador do crescimento fúngico devido ser pouco estável e rapidamente degradado depois da morte da hifa (Mille-Lindblom et al., 2004).

Os basidiomicetes lignocelulolíticos produzem várias enzimas pertencentes à classe das oxidorreduções: lignina peroxidases (LiP; EC 1.11.1.14), manganês peroxidases (MnP; EC 1.11.1.13 - Lobos et al., 1994; Saparrat et al., 2002) e versatile peroxidase (EC 1.11.1.16 - Heinfling et al., 1998b; Pérez-Boada et al., 2005) . Essas peroxidases contêm em sua conformação funcional grupo prostético heme (Hofrichter, 2002). Outras oxidases que têm cobre como grupo prostético são as lacases (EC 1.10.3.2). Essas enzimas reduzem o oxigênio dissolvido à água, com oxidação de substratos fenólicos e não fenólicos, formando radicais catiônicos, quinonas ou radicais fenoxi (Lobos et al., 1994; Shan & Nerud, 2002; Baldrian et al., 2005). Além das oxidorreduções, os fungos lignocelulolíticos também produzem um complexo sistema de hidrolases, que atuam na degradação de pectina, hemicelulose e celulose (Ângelo, 2004).

As lacases estão diretamente envolvidas não só na degradação da lignina e de substratos lignocelulolíticos (Becker & Sinitsyn, 1993), mas também na

degradação de vários compostos xenobióticos (Barr & Aust, 1994; Scheibner et al., 1997), incluindo corantes aromáticos (Glenn & Gold, 1983; Pasti-Grigsby et al., 1992; Paszczyński et al., 1992; Spadaro et al., 1992). Além disso, essas enzimas também estão envolvidas na oxidação de muitas substâncias recalcitrantes, como por exemplo, clorofenóis (Roy-Arcand & Archibald, 1991; Ricotta et al., 1996; Grey et al., 1998; Fahr et al., 1999), hidrocarboneto aromático policíclico (Majcherczyk et al., 1998), compostos orgânicos fosfatados (Amitai et al., 1998), compostos não fenólicos da lignina (Kawai et al., 1988; Majcherczyk et al., 1999) e fenóis (Bollag et al., 1988; Xu, 1997).

A lacase catalisa a oxidação de uma variedade de compostos aromáticos como doadora de hidrogênio com a redução concomitante do oxigênio à água (Hofrichter, 2002). Além disso, a lacase não só oxida ácidos fenólicos e metoxifenólicos, mas também promove a descarboxilação desses ácidos e a desmetilação pelo ataque aos grupos metoxi (Wesenberg et al., 2003). Essa enzima tem sido intensivamente estudada com foco na aplicabilidade industrial (Yaropolov et al., 1994; Bajpai, 1999; Gianfreda et al., 1999; Rodríguez et al., 1999), genética molecular (Cullen, 1997; Karahanian et al., 1998; Collins & Dobson, 1997; Ong et al., 1997) e clonagem (Hatamoto et al., 1999).

A produção da enzima manganês peroxidase (MnP) ou peroxidase dependente do manganês é aparentemente limitada a certos fungos basidiomicetes e, até agora, não é conhecido qualquer outro microrganismo capaz de produzir esta enzima (Hofrichter, 2002). MnP é uma glicoproteína contendo ferro como grupo prostético, dependente de peróxido de hidrogênio para sua atividade e que apresenta massa molecular de 38 a 62,5 kDa (Hofrichter, 2002). A oxidação de lignina por MnP é dependente da disponibilidade de íons de manganês (Brown et al., 1991; Hofrichter, 2002). MnP é capaz de oxidar e despolimerizar a lignina, bem como compostos recalcitrantes, xenobióticos como nitroaminotolueno (Scheibner et al., 1997; Aken et al., 1999) e tintas têxteis (Heinfling et al., 1998a). A despolimerização *in vitro* pode ser reforçada com a presença de co-oxidantes tais como ditióis (glutathiona) ou ácidos graxos insaturados (Tween 80 - Hofrichter, 2002).

A lignina peroxidase (LIP) catalisa a oxidação da parte aromática não fenólica da molécula de lignina e tem sido relatada também a clivagem de outros

compostos aromáticos (Umezawa & Higuchi, 1987). Segundo esses autores, a função da LIP seria a transformação de fragmentos da lignina que são inicialmente liberados pela MnP. A LIP tem sido utilizada para mineralização de uma variedade de compostos aromáticos recalcitrantes de quatro ou cinco anéis, tais como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Gramss et al., 1999), bifenil policlorado (Krcma`r & Ulrich, 1998) e tintas (Chivukula & Spadaro, 1995).

A versatile peroxidase (VP) pode ser considerada um híbrido entre MnP e a LIP, uma vez que ela é dependente da disponibilidade do íon manganês e também catalisa a oxidação de compostos aromáticos fenólicos e não fenólicos, incluindo os corantes (Goel et al., 2007). A VP tem sido descrita em espécies de *Pleurotus* e *Bjerkandera* (Heinfling et al., 1998b; Mester & Field, 1998).

As celulasas são responsáveis pela hidrólise da celulose, liberando produtos de baixa massa molecular, tais como hexoses (Lynd et al., 2002). Dentre as várias aplicações de celulasas, pode ser destacada sua utilização na indústria de detergentes e na industrial têxtil e em processo de hidrólise de biomassa para produção de reagentes químicos combustíveis (Cavaco-Paulo, 1998; Kulkarni et al., 1999; Andreaus et al., 2000; Lynd et al., 2002). A completa degradação enzimática da celulose depende da ação do complexo enzimático formado por enzimas hidrolases (Ângelo, 2004). Essas enzimas não conseguem penetrar com facilidade a barreira da lignina das células vegetais e, dessa forma, o difícil acesso destas enzimas às fibras de celulose constitui um dos principais problemas para o desencadeamento desse processo de degradação (Thiemann et al., 1980).

A hemicelulose é constituída de vários polímeros, formados por diferentes resíduos de açúcares, a sua degradação completa também necessita de enzimas específicas, tais como as xilanases (Beg et al., 2001). As xilanases de origem microbiana possuem composição protéica simples e massa molecular entre 8 e 145 kDa (Hofrichter, 2002). Um dos fatores básicos para uma produção eficiente de xilanases por microrganismos refere-se à adequada escolha do substrato e a otimização da composição do meio de cultivo, com isso podem-se definir as características da enzima, bem como controlar a formação de compostos indesejáveis (Kulkarni et al., 1999).

Os processos de degradação de celulose e hemicelulose são de natureza hidrolítica (Wood & Garcia-Campayo, 1990) enquanto a degradação da lignina

representa um processo oxidativo, não específico e estritamente dependente das condições do meio de cultivo do microrganismo (Kirk & Farrell, 1987).

Em trabalho anterior realizado no Laboratório de Associação Biológica Micorrízicas foi determinada a atividade das enzimas ligninocelulolíticas de dois isolados de *P. ostreatus*, PLO 2 e PLO 6, cultivados em diferentes resíduos agroindustriais, tais como casca e, ou serragem de eucalipto e casca de café, suplementados ou não com 20 % de farelo de arroz. Foi visto que produção enzimática de *P. ostreatus* varia de acordo com a composição do substrato, com maiores atividades nos substratos suplementados com farelo de arroz. Esse trabalho mostrou que *P. ostreatus* PLO 6 tinha melhor adaptação aos substratos e maiores atividade das enzimas ligninocelulolíticas e poderia ser utilizado para biorremediação de resíduos ligninocelulósicos, por exemplo a torta de pinhão manso (Luz, 2007). Verificado a produção das enzimas ligninolíticas, lacase e manganês peroxidase, pelo *P. ostreatus* PLO 6 foi proposto a utilização desse fungo para redução e, ou eliminação de compostos tóxicos e fatores antinutricionais, além da degradação de compostos ligninocelulósicos presentes na torta de pinhão manso.

5 – Destoxificação de compostos tóxicos por micro-organismo

Microrganismos ligninocelulolíticos, incluindo os fungos de podridão branca apresentam alto potencial para utilização em processos de destoxificação de compostos aromáticos e não aromáticos. O grupo conhecido como fungos da podridão branca pertencem a classe Basidiomycetes possui um sistema de enzimas ligninocelulolíticas extracelulares capazes de degradar uma grande variedade de poluentes (Sayadi & Ellouz, 1993). Por esta razão, estes fungos têm sido utilizados com êxito para desempenhar a destoxificação de compostos fenólicos fitotóxicos oriundo da água residual do moinho de extração do azeite de oliva (Sayadi & Ellouz, 1995; D'Annibale et al., 1998; Kissi et al., 2001). Foi observado que a água residual da extração de azeite de oliva, contendo fenóis aumentou a produção de oxidases da lignina em *Lentinula edodes* (Vinciguerra et al., 1995), *P. ostreatus* (Martirani et al., 1996) e *Phanerochaete chrysosporium* (Kissi et al., 2001). Além disso, a incubação de compostos fitotóxicos com lacase

isolada do fungo *L. edodes* reduziu parcialmente a fitotoxicidade desses compostos (Casa et al., 2003).

Estudos de destoxificação de corantes industriais, azo e ftalocianina, utilizando os fungos *Bjerkandera adusta* e *Trametes versicolor* demonstraram que a degradação desses corantes resultou em compostos não tóxicos (Heinfling et al., 1997).

Em estudo com *Pleurotus* spp. observou-se a diminuição da fitotoxicidade presente na água residual da extração de azeite de oliva, mas a ausência de correlação entre destoxificação e a remoção de fenol não foi totalmente explicada (Tsioulpas et al., 2002). Isso poderia ser devido ao fato de que os efeitos dos fenóis individuais não foram investigados. Por essa razão, D'Annibale et al. (2004) qualificaram e quantificaram as frações monoméricas e poliméricas aromáticas resultantes do tratamento de compostos fitotóxicos com *L. edodes*. Esses autores observaram a redução de cerca de 70 % da carga orgânica após 240 h de incubação com o fungo. A eliminação de 80 % dos fenóis ocorreu principalmente durante as primeiras 144 h de incubação revelando níveis significativos de atividade lacase produzidos por *L. edodes*.

P. ostreatus, cultivados em resíduos da extração de azeite de oliva com 75 % de água tem uma notável capacidade de secretar a enzima lacase e de eliminar compostos fenólicos (Tsioulpas et al., 2002). Mas, segundo esses autores, em alguns isolados a capacidade de remoção de compostos fenólicos não estava diretamente associada com a atividade de lacase. Entretanto, o tratamento com fenol oxidase de *P. ostreatus* incubado em uma mistura contendo compostos aromáticos extraídos da água residual da extração de azeite de oliva removeu 90 % dos fenóis presentes na mistura. A atividade de destoxificação desse fungo aumentou concomitante com a expressão da enzima fenol oxidase (Martirani et al., 1996).

Na verdade, a toxicidade de alguns fenóis aumenta após sofrerem oxidação (Field & Lettinga, 1989). Entretanto, a toxicidade do metilfenol foi diminuída quando a enzima lacase foi adicionada ao meio de cultura, apesar da polimerização desse composto ter causado inibição no crescimento do fungo (Bollag et al., 1988). Nesse mesmo trabalho foi observada a polimerização dos compostos p-cresol e 2,6-xilenol (2,6-dimetilfenol) na presença e também na

ausência do ácido siríngico no meio de cultura com a enzima lacase. Tem-se especulado que a indução destas enzimas na presença de extratos contendo fenóis poderá ser devido a um eventual mecanismo de defesa que visa converter fenóis em produtos incapazes de penetrar na célula (Tsioulpas et al., 2002).

Pleurotus sajor-caju cultivado em mistura de efluentes têxteis com bagaço de cana-de-açúcar mostrou-se ser capaz de remover a coloração desses efluentes em meio sólido (Kamida et al., 2005).

Fungos causadores da podridão branca isolados a partir de solos contaminados com explosivos industriais, por exemplo, trinitrotolueno (TNT), dinitrotolueno (DNT) e hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina (RDX) mostraram ser capazes de mineralizar esses compostos (Bayman et al., 1995).

Em *P. chrysosporium* a LIP foi a principal enzima responsável pela degradação dos compostos fenólicos presente na água residual do moinho de extração de azeite de oliva (Sayadi & Ellouz, 1995). No entanto, em *Phanerochaete flavid-alba*, as enzimas envolvidas no processo de descoloração foram a MnP e a fenol oxidase (lacase), enquanto a LIP não foi detectada (Perez et al., 1998). Em *P. ostreatus* é a lacase a enzima responsável pela oxidação de compostos fenólicos e aminas aromática, reduzindo o oxigênio molecular a água (Hublik & Schinner, 2000).

A destoxificação do composto 5-hidroxi-1,4-naftoquinona (juglone) por *P. sajor-caju* demonstrou que a degradação oxidativa envolve a produção de peróxido de hidrogênio oriundo de reações enzimáticas e não-enzimáticas promovidas pelo fungo (Curreli et al., 2004). Isso mostra que juglone não é diretamente atacado pelas enzimas oxidativas do sistema ligninocelulolítico, mas a degradação desse composto e de seus derivados ocorre eficientemente como resultado do acoplamento de reações enzimáticas e não enzimáticas.

A avaliação do potencial de destoxificação da torta de pinhão manso por *P. ostreatus*, bem como o entendimento desse processo, abrirá novos rumos para a utilização desses resíduos como substrato para produção de cogumelos ou ração animal, além de contribuir para a redução do impacto ambiental, deste resíduo da cadeia produtiva de biodiesel.

6 – Referências Bibliográficas

- ADOLF, W., OPFERKUCH, H. J., & HECKER, E. Irritant phorbol derivatives from four *Jatropha* species. **Phytochemistry**, v. 23, p. 129-132, 1984.
- AGUILAR, C. N.; AUGUR, C.; FAVELA-TORRES, E. & VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Induction and repression patterns of fungal tannase in solid-state and submerged cultures. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 565–570, 2001.
- AGUILAR, C.N., GUTIERREZ-SANCHEZ, G. Review: sources, properties, applications and potential uses of tannin acyl hydrolase. **Food Science and Technology International**, v. 7, p. 373–382, 2001.
- AHMAD, T.; RASOOL, S.; SARWAR, M.; HAQ, A-UL. & HASAN, Z-UL. Effect of microbial phytase produced from a fungus *Aspergillus niger* on bioavailability of phosphorus and calcium in broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, v. 83, p. 103-114, 2000.
- AKEN, B. V., HOFRICHTER, M., SCHEIBNER, K., HATAKKA, A. I., NAVEAU, H. & AGATHOS, S. N. Transformation and mineralization of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by manganese peroxidase from the white-rot basidiomycete *Phlebia radiata*. **Journal Biodegradation**, v. 10, p. 83-91, 1999.
- ALEMAWOR, F.; DZOGBEFIA, V.P.; ODDOYE, E.O.K. & OLDHAM, J. H. Effect of *Pleurotus ostreatus* fermentation on cocoa pod husk composition: Influence of fermentation period and Mn²⁺ supplementation on the fermentation process. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 1950-1958, 2009.
- AMITAI, G.; ADANI, R.; SOD-MORIAH, G.; RABINOVITZ, I.; VINCZE, A. & LEADER, H. Oxidative biodegradation of phosphorothiolates by fungal laccase. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 438, p. 195-200, 1998.
- ANDREAUS, J.; RAMOS, L. P. & CAVACO-PAULO, A. Dry action of *Trichoderma reesei* cellulases on cotton fabrics. **Coloration Technology**, v. 116, p. 121-125, 2000.
- ÂNGELO, A.S. Enzimas hidrolíticas. In: ESPOSITO e AZEVEDO, J. L. (ed.) Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. **Editora Universidade de Caxias do Sul**, p. 263-285, 2004.
- AREGHEORE, E. M.; BECKER, K. & MAKKAR, H.P.S. Detoxification of a toxic variety of *Jatropha curcas* using heat and chemical treatments, and preliminary nutritional evaluation with rats. **South Pacific Journal of Natural Science**, v. 21, p. 50-56, 2003.
- BAJPAI, P. Application of enzymes in the pulp and paper industry. **Biotechnology Progress**, v.15, p. 147-157, 1999.

- BALDRIAN, P., VALÁŠKOVÁ, V., MERHAUTOVÁ, V. & GABRIEL, J. Degradation of lignocellulose by *Pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc. **Research in Microbiology**, v. 156, p. 670-676, 2005.
- BALLAMINUT, N. & MATHEUS, D.R. Characterization of fungal inoculum used in soil bioremediation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 248-252, 2007.
- BANERJEE, R., MUKHERJEE, G., PATRA, K.C.. Microbial transformation of tannin-rich to gallic acid through co-culture method. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 949–953, 2005.
- BARAJAS-ACEVES, M.; HASSAN, M.; TINOCO, R. & VAZQUEZ-DUHALT, R. Effect of pollutants on the ergosterol content as indicator of fungal biomass. **Journal of Microbiological Methods**, v. 50, p. 227–236, 2002.
- BARBIERI L, BATTELLIM, STIRPE F. Ribosome-inactivating protein from plants. **Acta Biochimica Biophysica**, v. 1154, p. 237-282, 1993.
- BARCELOS, A. F.; PAIVA, P. C. A.; PÉREZ, J. R. O.; SANTOS, V. B. & CARDOSO, R. M. Fatores antinutricionais da casca e da polpa desidratada de café (*Coffea arabica* L.) armazenadas em diferentes períodos. **Revista Brasileira de Zootécnica**, v. 30, p. 1325-1331, 2001.
- BARR, D.P. & AUST, S.D. Mechanisms white-rot fungi use to degrade pollutants. **Environmental Science and Technology**, v. 28, p. 78-87, 1994.
- BATRA, A., SAXENA, R.K. Potential tannase producers from the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1553-1557, 2005.
- BATTESTIN, V. & MACEDO, G.A. Tannase production by *Paecilomyces variotii*. **Bioresource Technology**, v.98, p.1832–1837, 2007.
- BAYMAN, P., RITCHEY, S.D. & BENNETT, J. W. Fungal interactions with the explosive RDX (hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine). **Journal of Industrial Microbiology**, v. 15, p. 418-423, 1995.
- BECKER H.G. & SINITSYN A.P. Mn-peroxidase from *Pleurotus ostreatus*: the action on the lignin. **Biotechnology Letters**, v.15, p. 289-294, 1993.
- BEG, Q.K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L. & HOONDAL, G.S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 56, p. 326-338, 2001.
- BOLLAG, J.M., SHUTTLEWORTH, K. L. & ANDERSON, D. H. Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 3086-3091, 1988.

- BONATTI, M.; KARNOPP, P.; SOARES, H. M. & FURLAN, S. A. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. **Food Chemistry**, v. 88, p. 425-428, 2004.
- BRAND, D.; PANDEY, A.; ROUSSOS, S. & SOCCOL, C. R. Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 127–133, 2000.
- BROWN, J. A., ALIC, M. & GOLD, M. H. Manganese peroxidase gene transcription in *Phanerochaete chrysosporium*: activation by manganese. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 4101-4106, 1991.
- CARLSON, D. & POULSEN, H. D. Phytate degradation in soaked and fermented liquid feed—effect of diet, time of soaking, heat treatment, phytase activity, pH and temperature. **Animal Feed Science and Technology**, v. 103, p. 141–154, 2003.
- CASA, R., ANNIBALE, A. D., PIERUCCETTI, F., STAZI, S.R., SERMANNI, G. G. & CASCIO, B. L. Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatment and its impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. **Chemosphere**, v. 50, p. 959-966, 2003.
- CAVACO-PAULO, A. Mechanism of cellulase action in textile processes. **Carbohydrate Polymers**, v. 37, p. 273-277, 1998.
- CAVALLAZZI, J. R. P.; BRITO, M. S.; OLIVEIRA, M. G. A.; VILLAS-BÔAS, S. G. & KASUYA, M. C. M. Lignocellulolytic enzymes profile of three *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler strains during cultivation on eucalyptus bark-based médium. **Food, Agriculture and Environment**, v. 2, p. 291-297, 2004.
- CHIVUKULA, M. & SPADARO, J. T. Renganathan V. Lignin peroxidase-catalyzed oxidation of sulfonated azo dyes generates novel sulfophenyl hydroperoxides. **Biochemistry**, v. 34, p. 7765-7772, 1995.
- COLLINS, P. J. & DOBSON, A. D. W. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3444- 3450, 1997.
- COLLOPY, P. D. & ROYSE, D. J. Characterization of phytase activity from cultivated edible mushrooms and their production substrates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 7518-7524, 2004.
- CULLEN, D. Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi. **Journal Biotechnology**, v. 53, p. 273-289, 1997.
- CURRELI, N., RESCIGNO, A., RINALDI, A., PISU, B., SOLLAI, F. & SANJUST, E. Degradation of juglone by *Pleurotus sajor-caju*. **Mycological Research**, v. 108, p. 913-918, 2004.

- D'ANNIBALE, A., CASA, R., PIERUC CETTI, F., RICCI, M. & MARABOTTINI, R. *Lentinula edodes* removes phenols from olive-mill wastewater: impact on durum wheat (*Triticum durum* Desf.) germinability. **Chemosphere**, v. 54, p. 887-894, 2004.
- D'ANNIBALE, A., CRESTINI, C., VINCIGUERRA, V. & SERMANNI, G. G. The biodegradation of recalcitrant effluents from an olive mill by a white-rot fungus. **Journal of Biotechnology**, v. 61, p. 209-218, 1998.
- DENSTADLI, V.; STOREBAKKEN, T.; SVIHUS, B. & SKREDE, A. A comparison of online phytase pre-treatment of vegetable feed ingredients and phytase coating in diets for *Atlantic salmon* (*Salmo salar* L.) reared in cold water. **Aquaculture**, v. 269, p. 414-426, 2007.
- DESHPANDE, S.S., DAMODARAN, S. Food legumes: chemistry and technology. **Advances in Cereal Science and Technology**, v.10, p.147-241, 1990.
- DHANYA, M.S.; GUPTA, N.; JOSHI, H.C. & LATA. Biogas Potentiality of Agro-wastes *Jatropha* Fruit Coat. **Proceedings of International Conference on Energy and Environment**, 2009.
- EL-BATAL, A.I. & H. KAREM, A. Phytase production and phytic acid reduction in rapeseed meal by *Aspergillus niger* during solid state fermentation. **Food Research International**, v. 34, p. 715-720, 2001.
- FAHR, K., WETZSTEIN, H.G., GREY, R. & SCHLOSSER, D. Degradation of 2,4-dichlorophenol and pentachlorophenol by two brown rot fungi. **FEMS Microbiology Letter**, v. 175, p. 127-132, 1999.
- FAN, L.; SOCCOL, A. T.; PANDEY, A.; VANDENBERGHE, L. P.S. & SOCCOL, C. R. Effect of caffeine and tannins on cultivation and fructification of *Pleurotus* on coffee husks. **Brazilian Journal of Microbiology**, v 37, p. 420-424, 2006.
- FIELD, J. A. & LETTINGA G. The effect of oxidative coloration on the methanogenic toxicity and anaerobic biodegradability of phenols. **Biological Wastes**, v.29, p. 161-179, 1989.
- FRANCIS, G.; MAKKAR, H.P.S. & BECKER, K. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. **Aquaculture**, v.199, p. 197-227, 2001.
- GANDHI, V. M., CHERIAN, K. M. & MULKY, M. J. Toxicological studies on Ratanjot oil. **Food and Chemical Toxicology**. v. 33, p. 39-42, 1995.
- GARCHOW, B. G.; JOG, S. P.; MEHTA, B. D.; MONOSSO, J. M. & MURTHY, P.P.N. Alkaline phytase from *Lilium longiXorum*: PuriWcation and structural characterization. Alkaline phytase from *Lilium longiXorum*: PuriWcation and structural characterization. **Protein Expression and Purification**, v. 46, p. 221-232, 2006.
- GIANFREDA, L., XU, F. & BOLLAG, J. M.. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. **Bioremediation Journal**, v. 3, p. 1-26, 1999.

- GLENN, J. K. & GOLD, M. H. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, p. 1741-1747, 1983.
- GOEL, G., MAKKAR, H. P. S., FRANCIS, G. & BECKER, K. Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. **International Journal of Toxicology**, v. 26, p. 279-288, 2007.
- GRAF, E.; EATON, W. Effects of phytate on mineral bioavailability in mice. **Journal of Nutrition**, v. 114, p. 1092-1198, 1984.
- GRAMSS, G., KIRSCH, B., VOIGHT, K. D., GUNTHER, T. & FRITSCH, W. Conversion rates of five polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid cultures of fifty-eight fungi and the concomitant production of oxidative enzymes. **Mycological Research**, v. 103, p. 1009-1018, 1999.
- GREY, R., HOFER, C. & SCHLOSSER, D. Degradation of 2-chlorophenol and formation of 2-chloro-1,4-benzoquinone by mycelia and cell-free crude culture liquids of *Trametes versicolor* in relation to extracellular laccase activity. **Journal of Basic Microbiology**, v. 38, p. 371-382, 1998.
- GUBITZ, G.M., MITTELBECH, M., TRABI, M. Exploitation of tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. **Bioresource Technology**, v. 67, p. 73-82, 1999.
- HAAS, W. & MITTELBACH, M. Detoxification experiments with the seed oil from *Jatropha curcas* L. **Industrial Crops and Products**, v. 12, p. 111-118, 2000.
- HAAS, W., STERK, H. & MITTELBACH, M. Novel 12-deoxy-16-hydroxyphorbol diesters isolated from the seed Oil of *Jatropha curcas*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 1434-1440, 2002.
- HARTISH, C. & KOLODZIEJ, H. Galloylhamameloses and proanthocyanidins from *Hamamelis virginiana*. **Phytochemistry**, v.42, n.1, p.191-198, 1997.
- HATAMOTO, O., SEKINE, H., NAKANO, E. & ABE, K. Cloning and expression of a cDNA encoding the laccase from *Schizophyllum commune*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 63, p. 58-64, 1999.
- HEINFLING, A., BERGBAUER, M. & SZEZYK, U. Biodegradation of azo and phthalocyanine dyes by *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, p. 261-266, 1997.
- HEINFLING, A., MARTINEZ, M. J. & MARTINEZ, A. T. Bergbauer M, Szewzyk U. Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 2788-2793, 1998a.
- HEINFLING, A., RUIZ-DUENÑAS, F. J., MARTÍNEZ, M. J. BERGBAUER, H., SZEZYK, U. & MARTÍNEZ, A. T. A study on reducing substrates of manganese-oxidizing peroxidases from *Pleurotus eryngii* and *Bjerkandera adusta*. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 428, p. 141-146, 1998b.

- HELLER, J. Physic nut. *Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. **Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/ International Plant Genetic Resources Institute**, 1996.
- HIROTA, M., SUTTAJIT, M., SUGURI, H., ENDO, Y., SHUDO, K., WONGCHAI, V., HECKER, E. & FUJIKI, H. A new tumor promoter from the seed oil of *Jatropha curcas* L., an intramolecular diester of 12-deoxy-16-hydroxyphorbol. **Cancer Research**, v. 48, p. 5800-5804, 1988.
- HOFRICHTER M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 30, p. 454-466, 2002.
- HUBLIK, G. & SCHINNER, F. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 330-336, 2000.
- KAMIDA, H. M., DURRANT, L. R., MONTEIRO, R. T. R. & ARMAS, E. D. Biodegradação de efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. **Quimica Nova**, v. 28, p. 629-632, 2005.
- KARAHANIAN, E., CORSINI, G., LOBOS, S. & VICUNÃ, R. Structure and expression of a laccase gene from the ligninolytic basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora* gene structure and expression. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1443, p. 65-74, 1998.
- KAWAI, S., UMEZAWA, T., SHIMADA, M. & HIGUCHI, T. Aromatic ring cleavage of 4,6-di(tert-butyl)guaiacol, a phenolic lignin model compound, by laccase of *Coriolus versicolor*. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 236, p. 309-311, 1988.
- KIKKAWA, U., KISHIMOTO, A. & NISHIZUKA, Y. The protein kinase C heterogeneity and its implications. **Annual Review of Biochemistry**, v. 58, p. 31-44, 1989.
- KIRK, T.K. & FARREL, R.L. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. **Annual Review of Microbiology**, v. 41, p. 465-505, 1987.
- KISSI, M., MOUNTADAR, M., ASSOBEI, O., GARGIULO, E., PALMIERI, G., GIARDINA, P. & SANNIA, G. Roles of two white-rot basidiomycete fungi in decolorisation and detoxification of olive mill waste water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 221-226, 2001.
- KRCMA'R, P. & ULRICH, R. Degradation of polychlorinated biphenyl mixtures by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Folia Microbiologica**, v. 43, p. 79-84, 1998.
- KULKARNI, N., SHENDYE, A., RAO, M. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. **FEMS Microbiology Letters**, v. 23, p. 411-456, 1999.
- KUMAR, A. & SHARMA, S. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review. **Industrial Crops and Products**, v. 28, p. 1-10, 2008.

- LIANG, J.; HAN, B. Z.; M.J. NOUT, R. & HAMER, R. J. Effect of soaking and phytase treatment on phytic acid, calcium, iron and zinc in rice fractions. **Food Chemistry**, v. 115, p. 789–794, 2009.
- LIN, J.; YAN, F.; TANG, L & CHEN, F. Antitumor effects of curcin from seeds of *Jatropha curcas*, **Acta Pharmacologica Sinica** , v.24, p.241-246, 2003.
- LOBOS, S., LARRAÍN, J., SALAS, L., CULLEN, D. & VICUNA, R. Isozymes of manganese-dependent peroxidase and laccase produced by the lignin-degrading basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. **Journal of Microbiology**, v. 140, p.1691-1698, 1994.
- LU, H.; LIU, Y.; ZHOU, H.; YANG, Y.; CHEN, M. & LIANG, B. Production of biodiesel from *Jatropha curcas* L. oil. **Computers and Chemical Engineering**, v. 33, p. 1091–1096, 2009.
- LUO, M.J.; YANG, X.Y.; LIU, W.X.; XU, Y.; HUANG, P.; YAN, F & CHEN, F. Expression, purification and anti-tumor activity of curcuma. **Acta Biochimica Biophysica Sinica**, v. 38, p.663-668, 2006.
- LUZ, J.M.R. **Atividade de enzimas ligninocelulolíticas de *Pleurotus ostreatus* crescidos em resíduos agroindustriais**. Viçosa, Brasil, 49 p. (Monografia, Universidade Federal de Viçosa. UFV), 2007.
- LYND, L. R., WEIMER, P. J. VAN ZYL, W. H. & PRETORIUS, I. S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 506-577, 2002.
- MAHANTA, N.; GUPTA, A & KHARE, S.K. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. **Bioresource Technology** , v. 99, p. 1729-1735,2008.
- MAJCHERCZYK, A., JOHANNES, C. & HÜTTERMANN, A. Oxidation of aromatic alcohols by laccase from *Trametes versicolor* mediated by the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) cation radical and dication. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, p. 267-276, 1999.
- MAJCHERCZYK, A., JOHANNES, C. & HÜTTERMANN, A. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 335-341, 1998.
- MAKKAR, H. P. S., ADERIBIGBE, A. O., & BECKER, K. Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. **Food Chemistry**, v. 62, p. 207-215, 1998.
- MAKKAR, H. P. S., BECKER, K., SPORER, F. & WINK, M. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 3152-3157, 1997.
- MAKKAR, H.P.S. & BECKER, K., Do tannins in leaves of trees and shrubs from Africa and Himalayan regions differ in level and activity? **Agroforestry Systems**, v. 40, p. 59-68, 1998.

- MARTIRANI, L., GIARDINA, P., MARZULLO, L. & SANNIA, G. Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill wastewaters with the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. **Water Resources**, v. 30, p. 1914-1918, 1996.
- MESTER, T. & FIELD, J. A. Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera* species strain BOS55 in the absence of manganese. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 15412-15417, 1998.
- MILLE-LINDBLOM, C.; WACHENFELDT, E. V. & TRANVIK, L. J. Ergosterol as a measure of living fungal biomass: persistence in environmental samples after fungal death. **Journal of Microbiological Methods**, v. 59, p. 253– 262, 2004.
- MONTGOMERY, H.J., MONREAL, C.M., YOUNG, J.C., SEIFERT, K.A. Determination of soil fungal biomass from soil ergosterol analyses. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, p. 1207– 1217, 2000.
- MORAES, V. L. G.; RUMJANEK, V. M. & CALIXTO, J.B. Jatrophone and 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate antagonism of stimulation of natural killer activity and lymphocyte proliferation. **European Journal of Pharmacology**, v. 312, p. 333-339, 1996.
- MOSIOR, M. & NEWTON, A. C. Mechanism of interaction of protein kinase c with phorbol esters. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 25526-25533, 1995.
- NIEMENMAA, O.; GALKIN, S. & HATAKKA, A. Ergosterol contents of some wood-rotting basidiomycete fungi grown in liquid and solid culture conditions. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 62, p.125–134, 2008.
- ONG, E., POLLOCK, W. B. R. & SMITH, M. Cloning and sequence analysis of two laccase complementary DNAs from the ligninolytic basidiomycete *Trametes versicolor*. **Gene**, v. 196, p. 113-119, 1997.
- OPENSHAW, K. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. **Biomass and Bioenergy**, v. 19, p. 1-15, 2000.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; BRAND, D.; MOHAN, R. & ROUSSOS, S. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, p. 153–162, 2000.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. ; NIGAM, P.; BRAND, D.; MOHAN, R. & ROUSSOS, S. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, p. 153–162, 2000.
- PANDEY, A.; SZAKACS, G.; SOCCOL, C.R.; RODRIGUEZ-LEON, J.A.& SOCCOL, V.T. Production, purification and properties of microbial phytases. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 203-214, 2001.
- PASTI-GRIGSBY, M.B., PASZCZYNSKI, A., GOSZYNSKI, S., CRAWFORD, D.L. & Crawford, R.L. Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability by *Streptomyces sp.* and *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 3605-3613, 1992.

- PASZCZYNSKI, A., PASTI-GRISGBY, M.B., GOSZYNSKI, S., CRAWFORD, R.L. & CRAWFORD, D.L. Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 3598-3604, 1992.
- PATIL, P. D. & DENG, S. Optimization of biodiesel production from edible and non-edible vegetable oils. **Fuel**, v. 88, p. 1302–1306, 2009.
- PEREZ, J., DE LA RUBIA T., BEN HAMMAN, O., MARTINEZ, J. *Phanerochaete flavido-alba* laccase induction and modification of manganese peroxidase isoenzyme pattern in decolorized olive oil mill wastewaters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 2726-2729, 1998.
- PÉREZ-BOADA, M., RUIZ-DUEÑAS, F. J., POGNI, R. BASOSI, R., CHOINOWSKI, T., MARTÍNEZ, M. J., PIONTEK, K. & MARTÍNEZ, A. T. Versatile peroxidase oxidation of high redox potential aromatic compounds: site-directed mutagenesis, spectroscopic and crystallographic investigation of three long-range electron transfer pathways. **Journal of Molecular Biology**, v. 354, p. 385-402, 2005.
- PHILLIPPY, B. Q. Purification and catalytic properties of a phytase from scallion (*Allium fistulosum* L.) leaves. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 46, p. 3491-3496, 1998.
- PORRES, J.M.; LÓPEZ-JURADO, M.; ARANDA, P. & URBANO, G. Bioavailability of phytic acid–phosphorus and magnesium from Lentils (*Lens culinaris* M.) in growing rats: influence of thermal treatment and vitamin-mineral supplementation. **Nutrition**, v. 20, p. 794–799, 2004.
- RAMACHANDRAN, S.; ROOPESH, K.; NAMPOOTHIRI, K M.; SZAKACS, G. & PANDEY, A. Mixed substrate fermentation for the production of phytase by *Rhizopus* spp. using oilcakes as substrates. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1749–1754, 2005.
- RAVINDRAN, V.; CABAHUG, S.; RAVINDRAN, G. & BRYDEN, W. L. Influence of microbial phytase on apparent ileal amino acid digestibility of feedstuffs for broilers. **Poultry Science**, v.78, p.699-706, 1999.
- REED, J.D. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. **Journal Animal Science.**, v.73, p.1516-1528, 1995.
- REHMAN, Z. & SHAH, W.H. Thermal heat processing effects on antinutrients, protein and starch digestibility of food legumes. **Food Chemistry**, v. 91, p. 327–331, 2005.
- REHMAN, Z. R. & SHAH, W.H. Tannin contents and protein digestibility of black grams (*Vigna mungo*) after soaking and cooking. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 56, p. 265–273, 2001.
- RICHARDSON, M D. & LOGENDRA, S. Ergosterol as an indicator of endophyte biomass in grass seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 3903-3907, 1997.

- RICOTTA, A., UNZ, R. F. & BOLLAG, J. Role of a laccase in the degradation of pentachlorophenol. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 57, p. 560-567, 1996.
- RODRÍGUEZ, E., PICKARD, M.A. & VAZQUEZ-DUHALT, R. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. **Current Microbiology**, v. 38, p. 27-32, 1999.
- ROSADO, F.R., GERMANO, S., CARBONERO, E.R., DA COSTA, S.M., IACOMINI, M., KEMMELMEIER, C. Biomass and exopolysaccharide production in submerged cultures of *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. and *Pleurotus ostreatus* "florida" (Jack.:Fr.) Kummer. **Journal of Basic Microbiology**, v. 43, p. 230-237, 2002.
- ROTENBERG, S.A. & WEINSTEIN, I. B. Two polychlorinated hydrocarbons cause phospholipid-dependent protein kinase C activation in vitro in the absence of calcium. **Molecular Carcinogenesis**, v. 4, p. 477- 481, 1991.
- ROY-ARCAND, L. & ARCHIBALD F. S. Direct dechlorination of chlorophenolic compounds by laccase from *Trametes (Coriolus) versicolor*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 13, p. 194-202, 1991.
- SAPARRAT, M., GUILLÉN, F., ARAMBARRI, A.M., MARTINEZ, A.T. & MARTINEZ, M.J. Induction, isolation, and characterization of two laccases from the white rot basidiomycete *Coriolopsis rigida*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 1534-1540, 2002.
- SARAIVA, L.; FRESCO, P.; PINTO, E. & GONÇALVES, J. Characterization of phorbol esters activity on individual mammalian protein kinase C isoforms, using the yeast phenotypic assay. **European Journal of Pharmacology**, v. 491, p. 101– 110, 2004.
- SAYADI, S. & ELLOUZ, R. Screening of white rot fungi for the treatment of olive mill waste-waters. **Journal Chemical Technology Biotechnology**, v. 57, p. 141-146, 1993.
- SAYADI, S., & ELLOUZ, R. Roles of lignin peroxidase and manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of olive mill wastewaters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1098-1103, 1995.
- SCHEIBNER, K., HOFRICHTER, M., FRITSCHKE, W. Mineralization of 2-amino-4,6-dinitrotoluene by manganese peroxidase of the white-rot fungus *Nematoloma frowardii*. **Biotechnology Letters**, v. 19, p. 835-839, 1997.
- SCHMIDT, P., WECHSLER, F. S., NASCIMENTO J.S., VARGAS, F. M. J. Tratamento do feno de braquiária pelo fungo *Pleurotus ostreatus*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 1866-1871, 2003.
- SHAN, V. & NERUD, F. Lignin degrading system of white-rot fungi and its exploitation for dye decolorization. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 857- 870, 2002.

- SHARMA, S.; AGARWAL, L. & SAXENA, R.K. Purification, immobilization and characterization of tannase from *Penicillium variable*. **Bioresource Technology**, v.99, p. 2544–2551, 2008.
- SILINSKY, E. M. & SEARL, T. J. Phorbol esters and neurotransmitter release; more than just protein kinase C. **British Journal of Pharmacology**, v. 138, p. 1191-1201, 2003.
- SILVA, A. M.; BRUM, R. L. & CALIXTO, J. B. The relaxant action of jatrophone in rat portal vein. A comparison with protein kinase C inhibitors. **Life Sciences**, v. 57, p. 863-871, 1995.
- SILVA, M. R. & SILVA, M. A. A. P. Nutritional aspects of phytates and tannins. **Revista de Nutrição**, v. 12, p. 5-19, 1999.
- SINGH, B. & SATYANARAYANA, T. Characterization of a HAP–phytase from a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2046–2051, 2009.
- SLATER, S. J.; HO, C. & STUBBS, C. D. The use of fluorescent phorbol esters in studies of protein kinase C–membrane interactions. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.116, p. 75–91, 2002.
- SOHAIL, S. S. & ROLAND D. A. SR. Influence of supplemental phytase on performance of broilers four to six weeks of age. **Poultry Science**, v. 78, p. 550–555, 1999.
- SOMSUB, W.; KONGKACHUICHA, R.; SUNGPUAG, P.; CHAROENSIRI, R. Effects of three conventional cooking methods on vitamin C, tannin, myo-inositol phosphates contents in selected Thai vegetables. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 187–197.
- SPADARO, J.T., GOLD, M.H. & RENGANATHAN, V. Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 2397-2401, 1992.
- SRICHAROENCHAikul, V., MARUKATAT, C. & ATONG, D. Fuel production from physic nut (*Jatropha curcas* L.) waste by fixed-bed pyrolysis process. **Thaiscience**, p. 23-25, 2007.
- STAUBMANN, R., NCUBE, I., GÜ BITZ, G.M., STEINER, W., READ, J.S. Esterase and lipase activity in *Jatropha curcas* L. seeds. **Journal of Biotechnology**, v. 75, p. 117-126, 1999.
- STRIPE, F.; PESSION-BRIZZI, A, LORENZONL E, STROCCHI P, MONTANARO L, SPERTI S. Studies on the proteins from the seeds of *Croton tiglium* and of *Jatropha curcas*. **Jounal Biochemical**, v.156, p.1-6, 1976.
- THIEMANN, J. E., XAVIER, M. S. S. P., COLEN, G. & GUIA, M. M. Produção de celulases e hidrólise enzimática de resíduos celulósicos. *in* fermentações industriais e transformações microbianas no solo. **Sociedade Brasileira de Microbiologia**, p. 168-185, 1980.

- TORRE, M., RODRIGUEZ, A.R., SAURA-CALIXTO, F. Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.1, p.1-22, 1991.
- TSIOULPAS, A., DIMOU, D., ICONOMOU, D. & AGGELIS, G. Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus spp.* in respect to their phenol oxidase (laccase) activity. **Bioresource Technology**, v. 84, p. 251-257, 2002.
- ULLAH, A. H. J. & PHILLIPPY, B. Q. Substrate selectivity in *Aspergillus ficuum* phytase and acid phosphatases using myo-inositol phosphates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 423–425, 1994.
- UMEZAWA, T. & HIGUCHI, T. Mechanism of aromatic ring cleavage of β -O-4 lignin substructure models by lignin peroxidase. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 218, p. 255-260, 1987.
- VAN DER POEL, A. F. B., GRAVANDECL, S., & BOER, H. Effect of different processing methods on the tannin content and protein digestibility of Faba bean. **Journal of Animal Feed Science and Technology**, v. 33, p. 49–58, 1991.
- VÁZQUEZ, G., GONZÁLEZ-ALVAREZ, J.; SANTOS, J.; FREIRE, M.S. & ANTORRENA, G. Evaluation of potential applications for chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. **Industrial Crops and Products**, v 29, p. 364–370, 2009.
- VINCIGUERRA, V., D-ANNIBALE, A., DELLE MONACHE, G. & GIOVANNOZZI SERMANNI, G. Correlated effects during the bioconversion of waste olive waters by *Lentinus edodes*. **Bioresource Technology**, v. 51, p. 221-226, 1995.
- VITAL, B. R.; CARNEIRO, A. C. O.; PIMENTA, A. S.; LUCIA, R. M. D. Two eucalypts bark tannin-based adhesive for production of flakeboards. **Revista Árvore**, v.28, p. 571-582, 2004.
- WANG, N.; HATCHER, D.W.; TOEWS R. & GAWALKO, E.J. Influence of cooking and dehulling on nutritional composition of several varieties of lentils (*Lens culinaris*). **Food Science and Technology**, v. 42, p. 842–848, 2009.
- WESENBERG, D., KYRIAKIDES, I. & AGATHOS, S. N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 161-187, 2003.
- WINK, M., GRIMM, C., KOSCHMIEDER, C., SPORER, F., BERGEOT, O. Sequestration of phorbol esters by the aposematically coloured bug *Pachycoris klugii* (Heteroptera: Scutelleridae) feeding on *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae). **Chemoecology**, v. 10, p. 179-184, 2000.
- WONG, Y.-S. & WANG, X. Degradation of tannins in spent coffee grounds by *Pleurotus sajor-caju*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 7, pg. 573-574, 1991.
- WOOD, T.M. & GARCIA-CAMPAYO, V. Enzymology of cellulose degradation. **Journal Biodegradation**, v. 1, p. 147-161, 1990.

- WYSS, M.; BRUGGER, R.; KRONENBERGER, A.; RÉMY, R.; FIMBEL, R.; OESTERHELT, G. LEHMANN, M. & LOON, A. P. G. M. Biochemical characterization of fungal phytases (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 367–373, 1999.
- XU, F. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 924-928, 1997.
- YAROLOPOV, A. I., SKOROBOGATKO, O.V., VARTANOV, S. S. & VARFOLOMEYEV, S. D. Laccase: properties, catalytic mechanism and applicability. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, p. 257-280, 1994.
- YOON, J.H.; THOMPSON, LU & JENKINS, DJ. The effect of phytic acid on in vitro rate of starch digestibility and blood glucose response. **Journal of Clinical Nutrition**, v. 38, p. 835-842, 1983.
- ZHOU, J.R., ERDMAN, J.W. Phytic acid in health and disease. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.35, p. 495-508, 1995.

CAPÍTULO 1: Degradação de compostos ligninocelulósicos presentes na torta de pinhão manso pelo fungo *Pleurotus ostreatus*

RESUMO

A produção de biodiesel utilizando o óleo da polpa do fruto de *Jatropha curcas* como matéria-prima, libera grande quantidade de resíduos sólidos. Esses resíduos apresentam na sua composição química, compostos tóxicos, ligninocelulósicos e fatores antinutricionais. O descarte adequado e o reaproveitamento desses resíduos é um desafio para as indústrias do biocombustível. A utilização dos resíduos de pinhão manso como substrato para cultivo de fungos ligninocelulolíticos pode ser uma alternativa de baixo custo com a formação de produtos de interesse econômico e industrial como enzimas, proteínas e cogumelos comestíveis. Além disso, esses fungos têm a capacidade de degradar compostos ligninocelulósicos, diminuindo os danos ambientais causados por esses resíduos. Neste trabalho foi avaliada a produção de biomassa e a capacidade de degradar lignina, celulose e hemicelulose pelo fungo de podridão branca *Pleurotus ostreatus*. Após 45 dias de incubação em substratos à base da torta de pinhão manso, adicionado de resíduos agroindustriais e, ou carbonato de cálcio e sulfato de cálcio, verificou-se elevada produção de biomassa fúngica, 50 % de degradação de lignina e 20 % de consumo de celulose e hemicelulose. Pode-se concluir que a torta de pinhão manso pura, ou em mistura com resíduos agroindustriais, pode ser utilizada como substratos para cultivo do fungo *P. ostreatus*.

Palavras chave: Pinhão manso, biodiesel, lignina, celulose, cogumelos, ergosterol, biomassa e fungos de podridão branca.

Degradation of lignocellulolytic compounds present in the *Jatropha* seed cake by *Pleurotus ostreatus*

ABSTRACT

Biodiesel production using the seed oil of the *Jatropha curcas* as raw material produces a large quantity of lignocellulolytic residues and toxic compounds. The suitable disposal of that residue is a challenge to the biocombustible industries. The use of these residues as a substrate to grow the lignocellulolytic fungi *Pleurotus ostreatus* may be a low cost alternative to the production of other products of economic and industrial interest, such as enzyme, protein and edible mushrooms. Moreover, this fungus has the capacity to degrade lignocellulolytic compound and therefore reduce environmental damage. In this study, the production of biomass and capacity of *P. ostreatus* to degrade lignin, cellulose and hemicellulose were analyzed. This fungus was cultivated during 45 day in pure seed cake substrate, seed cake plus agroindustrial residues or seed cake plus calcium carbonate and calcium sulphate. In all substrate the biomass was high, evaluated by ergosterol concentration and 50 % of lignin degradation and 20 % cellulose and hemicellulose were degraded. We therefore conclude that *Jatropha* seed cake, pure or added with agroindustrial residues can be used as a substrate to grow *Pleurotus*.

Keywords: physic nut, biodiesel, lignin, cellulose, mushrooms, ergosterol, biomass and root-rot fungi.

1- INTRODUÇÃO

O estabelecimento de uma matriz energética renovável e que cause poucos danos ambientais tem aumentado o plantio de plantas oleaginosas para extração do óleo da semente e a produção de biocombustíveis. Nesse contexto, *Jatropha curcas*, conhecido popularmente como pinhão manso, apresenta as principais características para ser utilizado na produção do biodiesel. *Jatropha* apresenta boa adaptação às condições climáticas do Brasil e ainda, tem alto teor de óleo na semente (Heller, 1996). O óleo originado dessa planta pode ser usado na fabricação de sabão, cosméticos e além da produção do biodiesel. Entretanto, após a prensagem das sementes para extração do óleo, há liberação de grandes quantidades de resíduos ligninocelulósicos, denominado de torta. Essa torta, subproduto sólido da extração do biodiesel, também apresenta compostos tóxicos e fatores antinutricionais (Makkar et al. 1997). O destino desse subproduto é embora limitado, devido ao volume gerado tem sido o de fertilizante orgânico e produção de biogás (Gübitz et al., 1999), entretanto existe um potencial para a produção de enzimas, proteínas e cogumelos comestíveis a partir desse resíduo se considerar sua utilização por fungos ligninocelulolíticos. O tratamento da torta de pinhão manso com esses fungos, além de gerar produtos de interesse econômico, reduz danos ambientais causados pela liberação de resíduos ligninocelulósicos no ambiente. O basidiomiceto, *Pleurotus ostreatus*, causador da podridão branca (Rosado et al., 2002; Bonatti et al., 2004), produz cogumelos comestíveis com alto valor nutricional pois são fontes de proteínas, carboidratos, vitaminas, cálcio e ferro (Schmidt et al., 2003). Esse fungo também produz enzimas capazes de degradar resíduos ligninocelulósicos e compostos poluentes e recalcitrantes (Scheibner et al., 1997; Aken et al., 1999). O objetivo deste trabalho foi analisar a capacidade de *P.ostreatus* produzir biomassa e de degradar compostos ligninocelulósicos pelo fungo, visando estabelecer condições ideais para a destoxificação da torta de pinhão manso e a produção de cogumelos.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Inóculo

Foi utilizado a estripe PLO 6, do fungo *P. ostreatus*, pertencente à coleção de fungos do Laboratório de Associações Micorrízicas/Departamento de Microbiologia/Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária – BIOAGRO/ Universidade Federal de Viçosa – UFV. Inicialmente, o fungo foi cultivado em placas de Petri contendo 20 mL de meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar), pH 5,5 ± 3 e incubados durante 15 dias, em BOD, à 25 °C, no escuro.

2.2- Composição do substrato e condições de cultivo

A torta de pinhão manso, gentilmente cedido pela Fusermann biocombustível, pura ou em mistura com diferentes proporções de resíduos agroindustriais, farelo de arroz e ou 0,2 % da mistura 4:1 de carbonato de cálcio e sulfato de cálcio ($\text{CaCO}_3 + \text{CaSO}_4$) foram utilizados como substrato para cultivo de *P. ostreatus*. Para cada substrato, (Tabela 1), foram pesados 350 g da mistura desses resíduos, acrescentados de 200 mL de água e, depois divididos em 12 frascos erlenmeyer de 125 mL, acomodando-se 45 g por frasco. Os frascos contendo a mistura foram autoclavados a 121 °C, por 20 min. Após o resfriamento, cada frasco foi inoculado com quatro discos de ágar de 8 mm contendo o micélio de PLO 6 e incubado durante 45 dias, em estufa tipo BOD a 25 °C, no escuro. Em intervalos de cinco dias, após 15 dias de incubação, foram retirados dois frascos de cada tratamento para a análise do teor de ergosterol e a degradação de lignina, celulose e hemicelulose, conforme descrito a seguir.

2.3 - Determinação da biomassa fúngica

A biomassa fúngica foi avaliada pelo conteúdo de ergosterol (Richardson & Logendra, 1997). Amostras de 5 g dos substratos foram trituradas com 2 g de areia lavada e autoclavada, por 10 min, em gral de porcelana, previamente lavados com três enxágües sequenciais com solução de etanol (Merck) 95 % (v/v). Em seguida, foram transferidas para tubos de centrifuga e adicionada de 0,3 g de

Tabela 1: Composição do substrato e a proporção dos resíduos agroindustriais ou 0,2 % da mistura (4:1) de carbonato de cálcio e sulfato de cálcio (CaCO_3 + CaSO_4) adicionados à torta de pinhão manso

Substrato	Componentes da mistura	Massa do Substrato (g)	
		Torta	Resíduo Agroindustrial
To	Torta	350	0
ToFa20	Torta + 20 % de farelo de arroz (Fa)	280	70
ToFa10	Torta + 10 % de Fa	315	35
ToSe20	Torta + 20 % de serragem de eucalipto (Se)	280	70
ToSe10	Torta + 10 % de Se	315	35
ToSeFa30	Torta + 30 % de Se + 30 % e Fa	140	210
ToSeFa10	Torta + 10 % de Se + 10 % de Fa	280	70
ToSm20	Torta + 20 % de sabugo de milho (Sm)	280	70
ToSm10	Torta + 10 % de Sm	315	35
ToCalcio	Torta + 0,2 % de CaCO_3 + CaSO_4	343	0
ToCe20	Torta + 20 % de casca de eucalipto (Ce)	280	70
ToCe10	Torta + 10 % Ce	315	35
ToCeFa30	Torta + 30 % Ce + 30 % Fa	140	210
ToCc20	Torta + 20 % de casca de café (Cc)	280	70
ToCc10	Torta + 10 % Cc	315	35
ToCcFa30	Torta + 30 % de Cc + 30 % Fa	140	210
ToCc50	Torta + 50 % de Cc	175	175

polivinilpirrolidona (PVP, Sigma). Aos tubos contendo o triturado foram adicionados 15 mL de etanol 95 %, agitados em agitador de tubos e centrifugados por 20 min a 4.200 g em centrífuga refrigerada a 4 °C (SORVAL RT 6000B). O sobrenadante foi recolhido, filtrado em peneira de teflon (Viatest GmbH – Serial 308919, 200 mm diâmetro por 53 μm) e armazenado a 4 °C no escuro. Posteriormente, uma alíquota de 20 μL do sobrenadante foi injetada diretamente em HPLC (Shimadzu – LC 10 A), coluna Shimadzu fase reversa CLC-ODS 25 cm e detector de UV. As amostras foram eluídas isocraticamente com metanol puro (Sigma, 34885) a 1,0 mL min^{-1} , e a quantidade de ergosterol foi monitorada em detector UV-VIS, a 280 nm. A curva padrão foi feita utilizando ergostatrien-3 β -ol (Sigma, E-6510) dissolvido em etanol 95 % e concentração variando de 1 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$. A biomassa fúngica foi determinada pela relação entre a concentração de ergosterol e a massa seca produzida por PLO 6 cultivado em meio líquido, batata-dextrose, por 15 dias. Para a determinação da massa seca, o meio de cultura colonizado pelo fungo foi filtrado em peneira de teflon (200 mm diâmetro por 53

µm) e o micélio transferido para cadinhos de papel alumínio de massa conhecida. Em seguida, esse material foi levado à estufa (Fanem, Modelo 320 SE) a 60 °C, até a massa constante (Barajas-Aceves et al., 2002).

2.4 – Determinação de Lignina

Para a determinação da porcentagem de lignina total (Van Soest, 1963; Hatfield et al., 1994), pesou-se um grama da amostra de cada substrato esterilizado, conforme a tabela 1, antes e após a colonização pelo PLO 6. Essas amostras foram submetidas a um tratamento preliminar visando obter um material livre de extrativos (cera, mucilagem e álcool). Para esse fim, foram utilizados 10 mL de solução de etanol-tolueno (Sigma) 95 % (v/v) e 10 mL água quente (100 ± 10 °C). O material livre de extrativos foi filtrado, lavado e secado ao ar. Em seguida, foram tratados com 20 mL de solução de ácido sulfúrico (Vetec) 72 % (v/v) por uma hora e submetido à autoclavagem a 121 °C, também por uma hora. Após autoclavagem, o material foi deixado em repouso por 12 h e, em seguida, filtrado em papel filtro em microfibra de vidro (Whatman, GF/D, diâmetro 11 cm) e lavado com água quente até a completa remoção do ácido.

Para a determinação da porcentagem de lignina insolúvel, o material sólido retido no papel filtro foi seco em estufa a 105 °C até massa constante. O teor de lignina solúvel no ácido foi determinado no filtrado recuperado antes da lavagem com água quente. O volume de 10 mL do filtrado foi diluído em 70 mL de água destilada e a leitura foi feita em espectrofotômetro (Thermo, Evolution 60) a 215 e 280 nm. A diferença da leitura entre esses comprimentos de onda foi utilizada para estimar o teor de lignina solúvel no ácido.

2.5- Determinação de celulose e hemicelulose

A porcentagem de celulose e hemicelulose presente nas amostras de cada substrato (Tabela 1) antes e após a colonização pelo PLO 6, foi determinada a partir do filtrado recuperado na determinação do teor de lignina solúvel no ácido sulfúrico (Van Soest, 1963; Hatfield et al., 1994). Para isso, em um tubo de ensaio foi adicionado 1 mL da amostra contendo ácido, 3 mL de solução de hidróxido de sódio (2 M, Sigma), para neutralização completa do ácido sulfúrico, e, ainda, 1 mL

da solução de DNS (proporção: 99,5 ácido dinitro-sacílico: 0,4 fenol: 0,14 metabissulfito de sódio). Essa mistura foi fervida por 5 min no banho-maria a 100 °C. Após resfriamento, completou-se o volume para 5 mL com água deionizada e procedeu a leitura no espectrofotômetro a 540 nm.

A curva-padrão foi preparada a partir da digestão sulfúrica de papel de filtro Whatman nº 1 (Sigma) cortado em tiras (1 cm largura por 8 cm comprimento). A partir do valor de absorvância, proporcional ao teor de monossacarídeos oriundo da quebra dos polissacarídeos pela digestão sulfúrica à quente (Saliba et al., 2001), foi estimada a percentagem de celulose e hemicelulose presente nas amostras.

2.6 - Medida do pH

O pH das amostras de cada substrato antes e depois de 45 dias de inoculação com PLO 6 foi medido conforme descrito por Sodré et al. (2001). Em frasco Erlenmeyer (125 mL), pesou-se 5 g do substrato e adicionou 15 mL de água deionizada. Esses frascos foram agitados a 220 rpm por 12 h em agitador orbital (New Brunswick Scientific). Em seguida, esse material foi deixado em repouso por 1 h e o pH foi aferido no sobrenadante com o pHmetro (Tecnopon, versão 3.0).

2.7 - Análise estatística

Os experimentos foram montados segundo o delineamento inteiramente casualizado. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e, posteriormente, as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade, utilizando o programa SAEG (versão 9.1 – Universidade Federal de Viçosa, 2006).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

A percentagem de compostos ligninocelulósicos variou com o tipo de resíduo agroindustrial e a proporção dos mesmos adicionados à torta de pinhão manso (Tabela 2). Observou-se que a quantidade de farelo de arroz na mistura não afetou o teor de lignina, mas a casca de café diminuiu a percentagem desse polímero nos substratos (Tabela 2). No entanto, a quantidade de celulose e hemicelulose nos substratos foram menores que a encontrada na torta de pinhão manso, com exceção dos substratos com adição conjunta de 10 % de farelo de arroz e serragem de eucalipto e com 10 % de casca de eucalipto (Tabela 2). A percentagem de lignina observada foi maior e a de celulose e hemicelulose menor, que o teor desses polímeros encontrados na casca do fruto seco de *J. curcas* (Dhanya et al., 2009), indicando que a parte do fruto pode ter grande influência na concentração desses compostos. Porém, a percentagem de lignina observada (Tabela 2) foi menor que a encontrada na torta (Gunaseelan, 2009) e na casca do fruto de *J. curcas* (Makkar et al., 1997), indicando também que a origem do fruto, seja ele devido à variedade ou às condições edafoclimáticas pode influenciar nesses teores. A alta relação carbono e nitrogênio (C/N) encontrada no fruto seco de pinhão manso sugere que a percentagem desses compostos ligninocelulósicos em resíduo de *J. curcas* seja igual ou superior a 50 % (Sharma et al., 2009). Portanto, a torta de pinhão manso é um resíduo rico em compostos ligninocelulósicos, com alto teor de lignina (Tabela 2).

Após a inoculação de *P. ostreatus* verificou-se o crescimento micelial em todos os substratos com a formação de primórdios de corpo de frutificação (Figura 1), após o choque frio de 4 °C, realizado no trigésimo dia de incubação.

Durante a colonização dos substratos pelo PLO 6 verificou-se correlação positiva entre a biomassa fúngica e a produção de ergosterol ($r= 0,99$), mostrando realmente que a produção de ergosterol pode ser utilizada para avaliar a biomassa fúngica como apresentada por outros autores (Montgomery et al., 2000; Barajas-Aceves et al., 2002; Cavallazzi et al. 2004; Ballaminut & Matheus, 2007; Niemenmaa et al., 2008).

Tabela 2: Composição ligninocelulósica dos substratos esterilizados e a produção de ergosterol pelo fungo *P. ostreatus* PLO 6, por 45 dias de incubação

Substrato*	Porcentagem		[Ergosterol] µg g ⁻¹ da massa seca fúngica
	Lignina total	Celulose e hemicelulose	
To	33,14 ± 0,70 c	8,63 ± 0,47 a	17,83 ± 0,51 ab
ToFa20	38,30 ± 0,87 b	2,36 ± 0,66 c	9,97 ± 1,83 d
ToFa10	39,88 ± 0,33 b	2,40 ± 0,04 c	9,76 ± 1,64 d
ToSe20	47,72 ± 0,38 a	2,60 ± 0,05 c	14,16 ± 1,35 ab
ToSe10	38,74 ± 0,14 b	2,83 ± 0,31 c	16,29 ± 2,23 ab
ToSeFa30	43,12 ± 0,27 a	3,04 ± 0,63 c	12,41 ± 1,30 c
ToSeFa10	30,21 ± 0,50 c	8,00 ± 0,05 ab	11,22 ± 1,49 d
ToSm20	30,33 ± 2,26 c	2,92 ± 0,37 c	12,40 ± 1,77 c
ToSm10	22,37 ± 0,43 e	3,74 ± 0,57 c	14,01 ± 1,83 ab
ToCalcio	33,14 ± 0,70 c	8,63 ± 0,47 a	14,61 ± 2,33 ab
ToCe20	28,58 ± 1,95 c	4,44 ± 0,40 bc	13,29 ± 1,68 bc
ToCe10	41,75 ± 0,04 ab	5,68 ± 0,86 ab	14,96 ± 1,72 ab
ToCeFa30	33,04 ± 1,85 c	2,06 ± 0,08 c	13,04 ± 1,43 bc
ToCc20	28,29 ± 0,11 d	4,06 ± 0,13 bc	15,87 ± 0,39 ab
ToCc10	28,01 ± 0,62 d	4,04 ± 0,21 bc	13,60 ± 1,24 bc
ToCcFa30	29,21 ± 2,50 d	4,93 ± 0,68 b	17,64 ± 1,08 a
ToCc50	24,43 ± 0,28 e	6,45 ± 0,50 ab	12,22 ± 0,83 c

* componentes do substrato estão descritos na tabela 1.

** na coluna, médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p<0,05).



Figura 1: Crescimento micelial do isolado PLO 6 de *Pleurotus ostreatus* inoculado em substratos a base da torta de pinhão manso pura ou em mistura com resíduos agroindustriais e, ou 0,2 % de carbonato de cálcio e sulfato de cálcio 4:1(m/v).

A produção da biomassa foi afetada pela composição do substrato (Tabela 1 e figura 2), sendo que o teor de ergosterol nos substratos variou de 9,76 a 17,64 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Tabela 2). A produção de biomassa do fungo *Lentinula edodes*, em substratos contendo casca, caule e folhas de eucalipto foi dependente da adição de uma fonte de nitrogênio e oscilou entre 4,30 a 82,9 $\mu\text{g g}^{-1}$ (Silva et al., 2005).

O farelo de arroz é um resíduo rico em nitrogênio, entretanto, a sua adição à torta de pinhão manso não estimulou a produção da biomassa (Figura 2). Por outro lado, a adição de casca de café, resíduo que tem menor disponibilidade de nitrogênios que o farelo de arroz (Barcelos et al., 1997), estimulou a produção da biomassa (Figura 2). No entanto, o fungo demonstrou baixa capacidade de degradar lignina, celulose e hemicelulose nesse substrato (Figuras 3 e 4). Portanto, considerando apenas esses dois resíduos agroindustriais, a melhor composição do substrato foi adição conjunta de 30 % de casca de café e 30 % de farelo de arroz (Tabela 1).

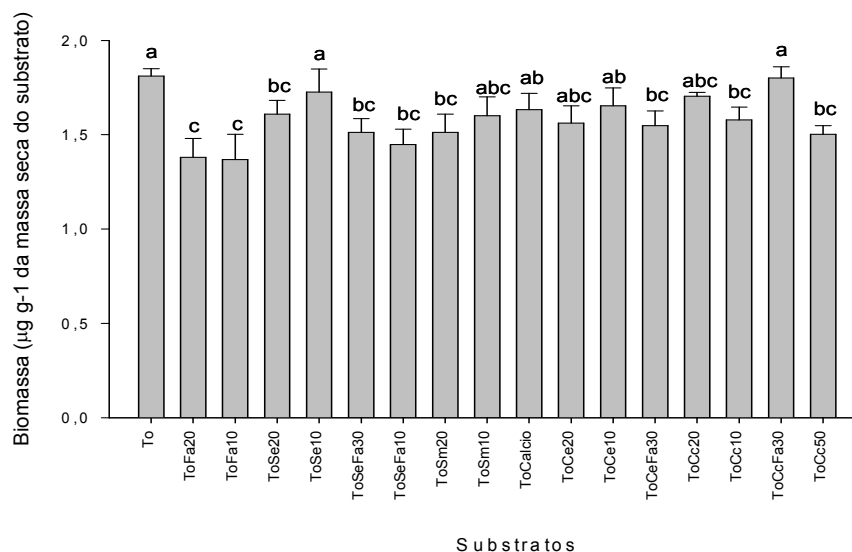


Figura 2: Biomassa produzida pelo do fungo *P. ostreatus* PLO 6 quando incubado a 25 °C, por 45 dias, em substrato a base de torta de pinhão manso, conforme tabela 1. Barras seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). O símbolo (\square) sobre as barras representa o desvio-padrão. Descrição dos substratos conforme tabela 1.

Nos primeiros 20 dias de incubação, com exceção do substrato com adição de 0,2 % da mistura de carbonato de cálcio e sulfato de cálcio, 4:1 ($\text{CaCO}_3 + \text{CaSO}_4$), houve aumento da biomassa fungica, a qual se manteve praticamente inalterada no período de 20 a 30 dias de incubação, e passou a ser crescente após a formação dos primórdios de cogumelos (Figura 3). Comportamento semelhante foi observado por Cavallazzi et al. (2004), com o fungo *L. edodes* cultivado em substrato à base de serragem de eucalipto, onde a biomassa foi crescente até a formação de cogumelos, depois constante, no intervalo de 40 a 60 dias de incubação e novamente crescente até a segunda frutificação. Por outro lado, no substrato com $\text{CaCO}_3 + \text{CaSO}_4$, nos primeiros 30 dias de incubação a produção de biomassa foi crescente, e depois da formação de primórdios decrescente (Figura 3). Essa diferença no perfil de produção de biomassa, pode estar relacionado com a grande variação do pH do meio de 5,86 antes da inoculação a 7,37 depois de 45 dias de incubação no substrato com adição de $\text{CaCO}_3 + \text{CaSO}_4$.

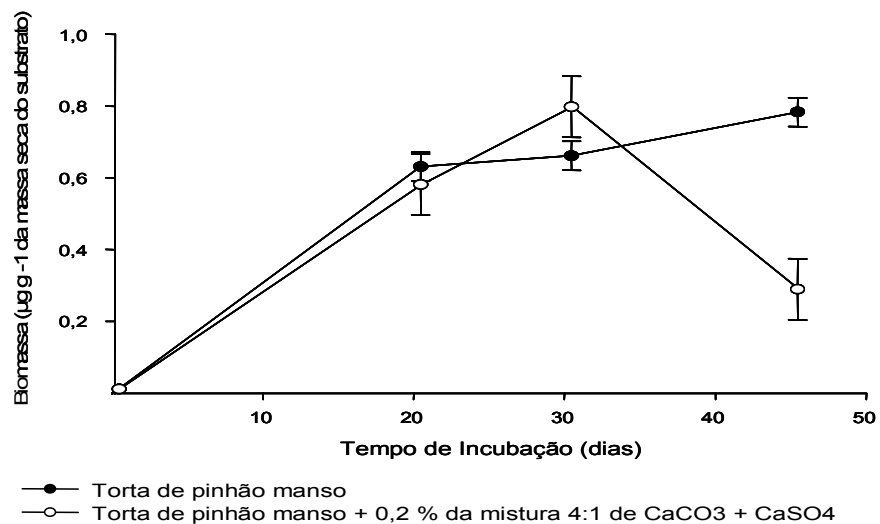


Figura 3: Biomassa produzida pelo isolado PLO 6 do fungo *Pleurotus ostreatus* quando incubado a 25 °C, por 45 dias, em substrato a base de torta de pinhão manso pura e, ou com adição de 0,2 % da mistura (4:1) de carbonato de cálcio e sulfato de cálcio . O símbolo ($\bar{\square}$) sobre os pontos representa o desvio-padrão.

A percentagem de degradação de lignina por PLO 6 variou de acordo com a composição inicial do substrato e a adição de $\text{CaCO}_3 + \text{CaSO}_4$ (Figura 4).

A maior degradação desse polímero foi no substrato com adição conjunta de 30 % farelo de arroz e serragem de eucalipto, seguidos dos substratos com 10 e 20 % de farelo de arroz e na torta pura (Tabela 1 e Figura 4). Por outro lado, a menor degradação de lignina foi nos substratos com adição de casca de café e sabugo de milho (Tabela 1 e Figura 4). A degradação de lignina pode ser afetada pelo substrato de crescimento e também com os isolados ou espécies do fungo. Valores semelhantes ao observado neste trabalho foram também relatados em basidiomicetos isolados de floresta de *Quercus petraea* (Valáskova et al., 2007), fungos do gênero *Pleurotus* sp. cultivados em palha de arroz (Platt et al., 1981), cavacos de madeiras (Piskur et al., 2009) e ainda, *P. chrysosporium* incubados em caule de algodão (Shi et al., 2009).

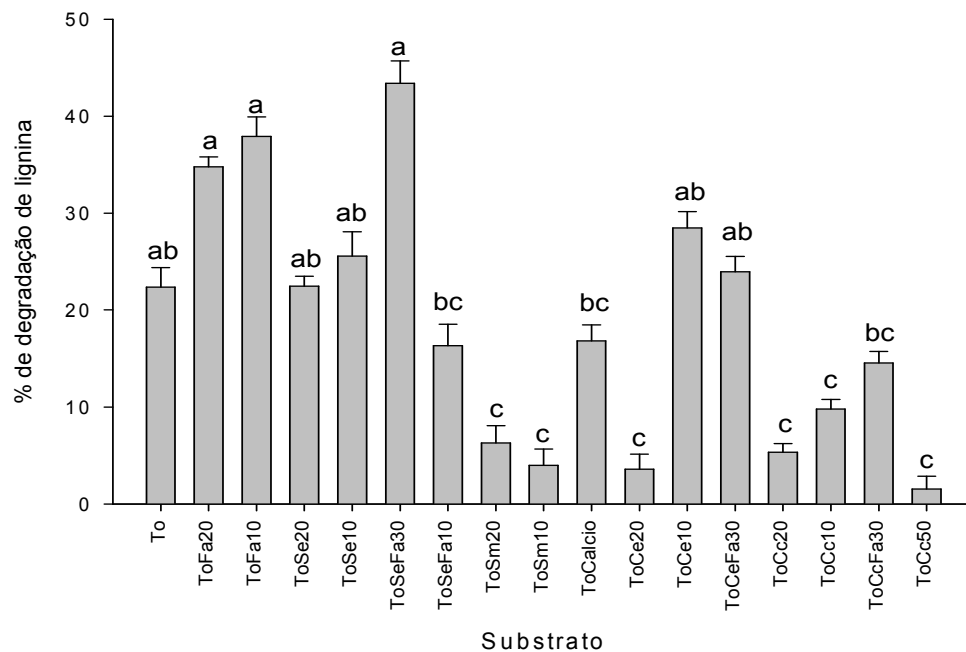


Figura 4: Percentagem de degradação de lignina pelo fungo *P. ostreatus* PLO 6 quando incubado a 25 °C por 45 dias, em substrato a base de torta de pinhão manso, conforme tabela 1. Barras seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). O símbolo ($\bar{\quad}$) sobre as barras representa o desvio-padrão. Descrição dos substratos conforme tabela 1.

As maiores percentagens de degradação de celulose e hemicelulose foram observadas quando o fungo foi cultivado na torta pura e quando a torta foi acrescida de 10 % de sabugo de milho, seguidos da torta com adição de 10 % de casca de eucalipto (Figura 5). Essa percentagem de degradação de celulose ou hemicelulose em substratos a base da torta de pinhão manso foi próximo à observada em micromycetes (Varnaité, 2008), *P. ostreatus* incubado por 30 dias em caule de algodão (Kerem et al., 1992), *Pleurotus eryngii* inoculado em palha de trigo por 180 dias (Camarero et al., 1994) e *Leucocoprinus gongylophorus* cultivado em resíduos de *Aloe vera* (Bacci Jr et al., 1995).

A degradação de celulose e hemicelulose foram dependentes da composição inicial dos substratos e da proporção de resíduos agroindustriais adicionados a torta de pinhão manso (Figura 5). Por exemplo, a adição de 10 % ou 20 % de casca de eucalipto a degradação de celulose e hemicelulose foi acima de 10 %, enquanto a adição desse resíduo junto com o farelo de arroz diminuiu a degradação para cerca de 5 % (Figura 5). Essa redução na degradação de celulose e hemicelulose foi também observada em mistura de diferentes proporções de casca do fruto seco de pinhão manso e esterco bovino colonizados por microrganismo anaeróbico (Dhanya et al., 2009).

A baixa concentração inicial de celulose e hemicelulose no substrato com casca de eucalipto e farelo de arroz (Tabela 2) e, provavelmente, a disponibilidade de monossacarídeos e ou amido no farelo de arroz (Feddern et al., 2007; Dors et al., 2009), pode ter favorecido a redução da degradação de celulose e hemicelulose nesse substrato (Figura 5).

A presença de monossacarídeos e amido pode, também, ter favorecido a alta produção de biomassa (Figura 2) e o baixo consumo de lignina (Figura 4), nos substratos com adição de casca de café (Tabela 1), pois o fungo metaboliza primeiramente fontes de carbono de mais fácil degradação, a exemplo de carboidratos solúveis (Souza et al., 2001; Rocha et al., 2006) disponível na casca de café. Resultado semelhante foi também observado em basidiomicetos de podridão branca cultivados em palha de aveia e resíduo de alfafa (Jung et al. 1992), onde a degradação de lignina ocorreu depois da utilização de glicose, hemicelulose e celulose.

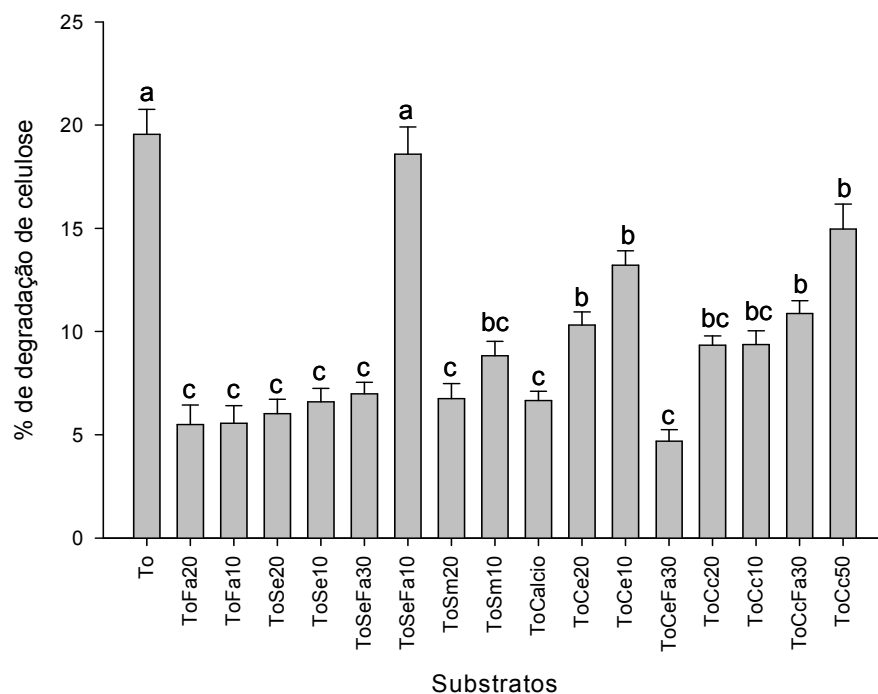


Figura 5: Percentagem de degradação de celulose e hemicelulose pelo fungo *P. ostreatus* PLO 6 quando incubado a 25 °C por 45 dias, em substrato a base de torta de pinhão manso, conforme tabela 1. Barras seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). O símbolo (|) sobre as barras representa o desvio-padrão. Substrato 1- To, 2- ToFa20, 3 – ToFa10, 4 – ToSe20, 5 – ToSe10, 6 – ToSeFa30, 7 – ToSeFa10, 8 - ToSm20, 9 – ToSm10, 10 – ToCalcio, 11 – ToCe20, 12 – ToCe10, 13 – ToCeFa30, 14 – ToCc20, 15 – ToCc10, 16 – ToCcFa30 e ToCc50. Descrição dos substratos conforme tabela 1.

A adição de farelo de arroz não estimulou a produção de biomassa nem a taxa de degradação de compostos celulósicos, mas favoreceu a degradação de lignina (Figura 2, 4 e 5). Ao contrário do observado em *P. ostreatus* quando inoculado em palha de arroz puro umidificado com 75 % de água onde foi observada alta taxa de degradação de celulose e hemicelulose e menor degradação de lignina (Jafari et al., 2007). Isto mostra que a combinação de resíduos agroindustriais com diferentes composições físico-químicas torna o substrato mais balanceado com os principais nutrientes essenciais para o desenvolvimento e metabolismo do fungo.

Com exceção dos substratos com adição de casca de café, a degradação de lignina foi proporcionalmente superior que a da celulose e hemicelulose (Figura 4 e 5). Isso demonstra que entre os compostos ligninocelulósicos, *P. ostreatus* tem maior capacidade de degradação da lignina. Esta característica também foi observada quando essa mesma espécie de fungo foi cultivada em palha de trigo (Adamovic et al. 1998). Porém, em outras espécies de *Pleurotus* foram observadas maior capacidade de degradação de hemicelulose, seguido de lignina e celulose (Moyson & Verachtert, 1991). Ruggeri e Sassi (2003) mostraram que a utilização de lignina como fonte de carbono e energia requer substratos com celulose ou outras fontes adicionais de carbonos. Conclui-se que, para os fungos utilizem fontes de carbono complexas como a lignina precisa também produzir enzimas para degradação de outros compostos, por exemplo, celulose e hemicelulose.

De acordo com o observado em fungos ligninocelulósicos inoculados em resíduo do fruto de *J. curcas* com 2 % de carbonato de cálcio e 4 % de sulfato de cálcio (Sharma et al., 2009), a adição de 0,2 % da mistura de $\text{CaCO}_3 + \text{CaSO}_4$ na torta de pinhão manso não afetou a produção de biomassa (Figura 2) ou a degradação de lignina (Figura 4). Porém, nesse substrato com $\text{CaCO}_3 + \text{CaSO}_4$ houve redução na percentagem de degradação de compostos celulósicos em relação à torta pura (Figura 5). Isso pode ter sido porque as enzimas celulósicas têm maior atividade em pH neutro e, ou alcalino (Goulart et al., 2005), enquanto as maiores atividades de ligninases ocorre em pH neutro ou ácido (Nyanhongo et al. 2002; Rodríguez et al., 2008). Por outro lado, a produção de biomassa total nesses substratos foram iguais, provavelmente porque os fungos crescem ou toleram pH entre 4 e 9 (Papagianni, 2004). Entretanto, o pH ótimo depende da composição do substrato de crescimento e do microrganismo, pois a faixa de pH ótimo para descoloração de vermelho de metila usando *Pleurotus sajor-caju* foi entre 5 e 6 (Sarnthima & Klammung, 2008) enquanto *Pleurotus* sp teve a capacidade de degradar o corante industrial vermelho 40 no pH de 4,5 a 7,2 (Espíndola et al., 2007).

Após 45 dias de incubação, observou-se aumento do pH de todos os substratos (Tabela 3), que pode estar relacionado com a degradação de ácidos orgânicos durante a fase de crescimento dos fungos de podridão branca (Nüske et

al., 2002). Esses fungos produzem a enzima oxalato descarboxilase que previne o acúmulo de oxalato no meio (Galkin et al., 1998). A degradação desse ácido é acoplada à reação de despolimerização da lignina (Akamatsu et al., 1990).

Verifica-se que, em condições de laboratório, a torta de pinhão manso pura pode ser utilizada como substrato para crescimento micelial de *P. ostreatus*, não inibindo seu crescimento. Este fungo foi capaz de degradar lignina, celulose e hemicelulose presentes nesse substrato, acrescido ou não de outros resíduos agroindustriais. *P. ostreatus* apresenta, portanto, potencial para ser utilizado na degradação da torta, oriunda da cadeia produtiva do biodiesel, a partir da extração do óleo da semente de pinhão manso.

Tabela 3: Medida do pH dos substratos autoclavados antes e após 45 dias de inoculação do isolado PLO 6 de *Pleurotus ostreatus*

Substrato*	pH	
	Antes da inoculação	Após 45 dias de inoculação
To	6,91 ± 0,021	7,01 ± 0,084
ToFa20	6,35 ± 0,035	6,81 ± 0,042
ToFa10	6,40 ± 0,261	6,96 ± 0,007
ToSe20	6,20 ± 0,318	6,51 ± 0,042
ToSe10	6,08 ± 0,176	6,80 ± 0,028
ToSeFa30	5,97 ± 0,233	6,42 ± 0,014
ToSeFa10	6,06 ± 0,122	6,72 ± 0,007
ToSm20	6,04 ± 0,120	6,83 ± 0,077
ToSm10	6,06 ± 0,100	6,95 ± 0,007
ToCalcio	5,86 ± 0,049	7,37 ± 0,007
ToCe20	6,02 ± 0,063	7,45 ± 0,070
ToCe10	6,11 ± 0,014	7,36 ± 0,035
ToCeFa30	6,12 ± 0,113	6,32 ± 0,021
ToCc20	6,09 ± 0,077	7,11 ± 0,007
ToCc10	6,20 ± 0,021	6,83 ± 0,049
ToCcFa30	6,19 ± 0,070	6,88 ± 0,007
ToCc50	6,13 ± 0,122	7,01 ± 0,091

* Substrato 1- To, 2- ToFa20, 3 – ToFa10, 4 – ToSe20, 5 – ToSe10, 6 – ToSeFa30, 7 – ToSeFa10, 8 - ToSm20, 9 – ToSm10, 10 – ToCalcio, 11 – ToCe20, 12 – ToCe10, 13 – ToCeFa30, 14 – ToCc20, 15 – ToCc10, 16 – ToCcFa30 e ToCc50. Descrição dos substratos conforme tabela 1.

4 - CONCLUSÕES

- A torta de pinhão manso pura ou em mistura com resíduos agroindustriais constitui-se em substrato adequado para o desenvolvimento micelial de *P. ostreatus*;
- *P. ostreatus* tem capacidade de degradar compostos ligninocelulósicos presentes na torta de pinhão manso;
- A variação do pH inicial no substrato não afetou a produção de biomassa e a degradação de lignina, mas diminuiu a degradação de celulose e hemicelulose;
- *P. ostreatus* apresenta potencial para ser utilizado na biorremediação da torta de pinhão manso.

5 –REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMOVIC, M.; GRUBIC, G. & MILENKOVIC, I. The biodegradation of wheat straw by *Pleurotus ostreatus* mushrooms and its use in cattle feeding. **Animal Feed Science Technology**, v. 71, p. 357-362, 1998.
- AKAMATSU, Y.; MA, D.B.; HIGUCHI, T. & SHIMADA, M. A novel enzymatic decarboxylation of oxalic acid by the lignin peroxidase system of white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters**, v. 269, p. 261-263, 1990.
- AKEN, B. V., HOFRICHTER, M., SCHEIBNER, K., HATAKKA, A. I., NAVEAU, H. & AGATHOS, S. N. Transformation and mineralization of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by manganese peroxidase from the white-rot basidiomycete *Phlebia radiata*. **Journal of Biodegradation**, v.610, p. 836-91, 1999.
- ALEMAW, F.; DZOBEFIA, V.P.; ODDOYE, E.O.K & OLDHAM, J.H. Effect of *Pleurotus ostreatus* fermentation on Cocoa pod husk composition: Influence of fermentation period and Mn²⁺ supplementation on the fermentation process. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 1950-1958, 2009.
- BACCI JR, M.; ANVERSA, M.M.; PAGNOCCA, F.C. Cellulose degradation by *Leucocoprinus gongylophorus*, the fungus cultured by the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa*. **Kluwer Academic Publishers**, v. 67, p. 385-386, 1995.
- BALLAMINUT, N. & MATHEUS, D.R. Characterization of fungal inoculum used in soil bioremediation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 248-252, 2007.
- BARAJAS-ACEVES, M.; HASSAN, M.; TINOCO, R. & VAZQUEZ-DUHALT, R. Effect of pollutants on the ergosterol content as indicator of fungal biomass. **Journal of Microbiological Methods**, v. 50, p. 227–236, 2002.
- BARCELOS, A.F., ANDRADE, I.F., VON TIESENHAUSEN, I.M.E.V. . Aproveitamento da casca de café na alimentação de novilhos confinados - resultados do segundoano. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 26, p.1215-1221, 1997.
- BONATTI, M.; KARNOPP, P.; SOARES, H. M. & FURLAN, S. A. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajor-caju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. **Food Chemistry**, v.88, p. 425-428, 2004.
- CAMARERO, S.; GALLETTI,G.C.& MARTINEZI,A.T. Preferential degradation of phenolic Lignin units by white rot fungi. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 4509-4516, 1994.
- CAVALLAZZI, J. R. P.; BRITO, M. S.; OLIVEIRA, M. G. A.; VILLAS-BÔAS, S. G. & KASUYA, M. C. M. Lignocellulolytic enzymes profile of three *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler strains during cultivation on eucalyptus bark-based médium. **Food, Agriculture and Environment**, v. 2, p. 291-297, 2004.

- DHANYA, M.S.; GUPTA, N.; JOSHI, H.C. & LATA. Biogas Potentiality of Agro-wastes *Jatropha* Fruit Coat. **Proceedings of International Conference on Energy and Environment**, v. 1, p. 136-140, 2009.
- DORS, G. C.; PINTO, R. H. & BADIALE-FURLONG, E. Influence of the conditions of the parboiling process in the chemical composition of rice. **Ciência Tecnologia Alimentos**, v. 29, p. 221-226, 2009.
- ESPÍNDOLA, L.H.S.; ESPINDOLA, F. S.; FREITAS, G.R. & BRANDEBURGO, M.A .M. Biodegradation of red 40 dye by the mushroom *Pleurotus* sp florida. **Bioscience Journal**, v. 23, p. 90-93, 2007.
- FEDDERN, V.; FURLONG, E. B. & SOARES, L. A. S. Effects of fermentation on the physicochemical and nutritional properties of rice bran. **Ciência Tecnologia Alimentos**, v.27(4), p. 800-804, 2007.
- GALKIN, S.; VARES, T.; KALSI, M. & HATAKKA, A. Production of organic acids by different white-rot fungi as detected using capillary zone electrophoresis. **Biotechnology Techniques**, V. 12, p. 267–271, 1998.
- GOULART, A. J.; CARMONA, E. C. & MONTI, R. Partial Purification and Properties of Cellulase-Free Alkaline Xylanase Produced by *Rhizopus stolonifer* in Solid-State Fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, p.327-333, 2005.
- GUNASEELAN, V.N. Biomass estimates, characteristics, biochemical methane potential, kinetics and energy flow from *Jatropha curcas* on dry lands. **Biomass and Bioenergy**, v.33, p. 589 – 596, 2009.
- HATFIELD, R.D., JUNG, H.J.G., RALPH, J., BUXTON, D.R. AND WEIMER, P.J. A comparison of the insoluble residues produced by Klason lignin and acid detergent lignin procedures. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.65, p.51-58, 1994.
- HELLER, J. Physic nut. *Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. **Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/ International Plant Genetic Resources Institute**, 1996.
- JAFARI, M.A.; NIKKHAH, A.; SADEGHI, A.A. & CHAMANI, M. The effect of *Pleurotus spp.* fungi on chemical composition and in vitro digestibility of rice straw. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 10, p. 2460-2464, 2007.
- JUNG, H.G.; VALDREZ, F.R.; ABAD, A.R. BLANCHETTE, R.A. & HATFIELD, R. D. Effect of white rot basidiomycetes on chemical composition and in vitro digestibility of oat straw and alfalfa stems. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 1928-1935, 1992.
- KEREM, Z.; FRIESEM, D. & HADAR, Y. Lignocellulose Degradation during Solid-State Fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p.1121-1127, 1992.

- MAKKAR, H. P. S., BECKER, K., SPORER, F. & WINK, M. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p.3152-3157, 1997.
- MONTGOMERY, H.J.; MONREAL, C.M.; YOUNG, J.C. & SEIFERT, K.A. Determination of soil fungal biomass from soil ergosterol analyses. **Soil Biology and Biochemistry**, v.32, p.1207±1217, 2000.
- MOYSON, E. & VERACHTERT, H. Growth of higher fungi on wheat straw and their impact on the digestibility of the substrate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 421-424, 1991.
- NIEMENMAA, O.; GALKIN, S. & HATAKKA, A. Ergosterol contents of some wood-rotting basidiomycete fungi grown in liquid and solid culture conditions. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 62, p.125–134, 2008.
- NÜSKE, J.; SCHEIBNER, K.; DORNBERGER, U.; ULLRICH, R. & HOFRICHTER, M. Large scale production of manganese-peroxidase using agaric white-rot fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 556–561, 2002.
- NYANHONGO, G.S.; GOMES, J; GÜBITZ, G; ZVAUYA, R; READ, J.S. & STEINER, W. Production of laccase by a newly isolated strain of *Trametes modesta*. **Bioresource Technology**, v. 84, p.259–263, 2002.
- PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 189–259, 2004.
- PISKUR, B.; ZULE,J.; PISKUR,M; JURC, D. & POHLEVEN, F. Fungal wood decay in the presence of fly ash as indicated by gravimetrics and by extractability of low molecular weight volatile organic acids. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, p. 594–599, 2009.
- PLATT, M.; CHET, I. & HENIS, Y. Ligninocellulose degradation during growth of the mushrooms *Pleurotus sp.* Florida on cotton straw. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 13, p. 194-201, 1981.
- RICHARDSON, M D. & LOGENDRA, S. Ergosterol as an indicator of endophyte biomass in grass seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 3903-3907, 1997.
- ROCHA, F. C.; GARCIA, R.; FREITAS, A. W. P.; BERNARDINO, F. S.; VALADARES, S. C. F. & ROCHA, G. C. Valor energético de dietas contendo diferentes níveis de casca de café para bovinos e ovinos. **Acta Scientiarum Animal Science**, v. 28, p. 81-87, 2006.
- RODRÍGUEZ, E.; RUIZ-DUEÑAS, F. J.; KOOISTRA, R., RAM, A.; MARTINEZ, A.T. & MARTINEZ, M.J. Isolation of two laccase genes from the white-rot fungus *Pleurotus eryngii* and heterologous expression of the *pe13* encoded protein. **Journal of Biotechnology**, v. 134, p. 9-19, 2008.

- ROSADO, F.R., GERMANO, S., CARBONERO, E.R., DA COSTA, S.M., IACOMINI, M., KEMMELMEIER, C. Biomass and exopolysaccharide production in submerged cultures of *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. and *Pleurotus ostreatus* "florida" (Jack.:Fr.) Kummer. **Journal of Basic Microbiology**, v. 43 p. 230-237, 2002.
- RUGGERI, B., SASSI, G., 2003. Experimental sensitivity analysis of a trickle bed bioreactor for lignin peroxidase production by *Phanerochaete chrysosporium*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1669–1676, 2003.
- SALIBA, E. O. S.; RODRIGUEZ, N. M.; MORAIS, S. A. L. & VELOSO, D. P. Lignins – Isolation Methods and Chemical Characterization. **Ciência Rural**, v.31, p. 917-928, 2001.
- SARNTHIMA, R. & KLAMMUNG, S. Evaluation of dyes decolourisation by the crude enzyme from *Pleurotus sajor-caju* grown on Sorghum seed media. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 11, p. 62-67, 2008.
- SCHEIBNER, K., HOFRICHTER, M., FRITSCH, W. Mineralization of 2-amino-4,6-dinitrotoluene by manganese peroxidase of the white-rot fungus *Nematoloma frowardii*. **Biotechnology Letters**, v. 19, pg. 835-839, 1997.
- SCHMIDT, P., WECHSLER, F. S., NASCIMENTO J.S., VARGAS, F. M. J. Tratamento do feno de braquiária pelo fungo *Pleurotus ostreatus*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, p. 1866-1871, 2003.
- SHARMA, D.K.; PANDEY, A.K. & LATA. Use of *Jatropha curcas* hull biomass for bioactive compost production. **Biomass and Bioenergy**, v.33, p.159-162, 2009.
- SHI, J.; SHARMA-SHIVAPPA, R. R. & CHINN, M. S. Microbial pretreatment of cotton stalks by submerged cultivation of *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioresource Technology**, v.100, p. 4388–4395, 2009.
- SILVA, E.M.; MACHUCA, A. & MILAGRES, A.M.F. Evaluating the growth and enzyme production from *Lentinula edodes* strains. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 161–164, 2005.
- SODRÉ, F. F.; LENZI, E. & COSTA, A. C. S. Utilização de Modelos Físico-Químicos de Adsorção no Estudo do Comportamento do Cobre em Solos Argilosos. **Química Nova**, v. 24, p. 324-330, 2001.
- SOUZA, A. L.; GARCIA R.; PEREIRA, O. G.; CECON, P. R.; VALADARES, S. C. F. & PAULINO, M. F. Chemical-bromatologia composition of coffee peel treated with anhydrous ammonia and sodium sulphide. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p. 983-991 (Suplemento 1), 2001.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - UFV. **Sistema de análises estatísticas e genéticas - SAEG**. Versão 9.1. Viçosa, MG, 2006. 142p.

- VALÁSKOVA, V.; SNAJDR, J.; BITTNER, B.; CAJTHAMAL, T.; MERHAUTOVÁ, V.; HOFRICHTER, M. & BALDRIAN, P. Production of lignocellulose-degrading enzymes and degradation of leaf litter by saprotrophic basidiomycetes isolated from a *Quercus petraea* forest. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, p. 2651-2660, 2007.
- VAN SOEST, P. J. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. **Journal of the Association of the Official Analytical Chemists**, v.46, p. 829-35, 1963.
- VARNAITÉ, R.; PASKEVICIUS, A. & RAUDONIENÉ, V. Cellulose degradation in rye straw by micromycetes and their complexes. **Ekologia**, v. 54, p. 29-31, 2008.

CAPITULO 2: Degradação de compostos tóxicos e fatores antinutricionais presentes na torta de pinhão pelo fungo *Pleurotus ostreatus*

RESUMO

A destoxificação da torta de pinhão manso é de grande interesse da indústria do biocombustível para agregar valor a esse resíduo e, ainda, diminuir os danos ambientais causado pelo seu descarte inadequado. Neste contexto, o tratamento desse resíduo com fungo de podridão branca, *Pleurotus ostreatus*, pode ser uma alternativa viável. Esse fungo produz enzimas capazes de degradar diferentes substâncias tóxicas, fatores antinutricionais e compostos ligninocelulósicos, diminuindo assim, a ação poluente desses compostos. Neste trabalho, a torta de pinhão manso pura, ou em mistura com resíduos agroindustriais, foi utilizada como substrato para crescimento micelial de *P. ostreatus*, visando à eliminação compostos tóxicos e fatores antinutricionais, além da produção de cogumelos. Sessenta dias após a inoculação, observou-se alta produção de biomassa, degradação de compostos ligninocelulósicos e significativa perda da massa seca dos substratos, redução de 95 % de ácido fítico, 85 % de taninos (equivalente a ácido tânico), 99 % de éster de forbol e boa produtividade de cogumelos. Esses cogumelos e os substratos depois de 60 dias de colonização pelo fungo tiveram concentrações de éster de forbol menor que o encontrado em variedade de *J. curcas* não tóxicas originárias do México. Conclui-se, portanto, que *P. ostreatus* tem a capacidade de degradar composto tóxico e fatores antinutricionais presentes na torta de pinhão manso agregando valor a esse resíduo, servindo de substrato para produção de enzimas e cogumelos, além de diminuir os danos ambientais.

Palavras chave: destoxificação, pinhão manso, ácido fítico, taninos, éster de forbol, biodiesel e fungos.

Degradation of toxic compounds and antinutritional factors present in the cake *Jatropha curcas* by *Pleurotus ostreatus*

ABSTRACT

The detoxification of *Jatropha curcas* cake is the interesting to the biofuel industries to add value to this residue and also to reduce damage to the environment. In this context, the treatment of this residue using white-rot fungus, *Pleurotus ostreatus*, can be a viable alternative. This fungus produces enzymes that degrade different toxic compounds, antinutritional factors and lignocellulosic compounds. In this study, *Jatropha* cake or this cake plus agroindustrial residues was used as substrate to grown *P. ostreatus* and evaluate the potential to eliminate toxic compounds and antinutritional factors, beyond of the mushrooms production. Sixty days after inoculation, high production of biomass was observed, degradation of lignocellulosic compounds and antinutritional factors and significant decrease of dry mass of the substrates, reduction of 95 % of phytic acid, 85 % of tannins (equivalent a tannin acid), 99 % of phorbol esters and good productivity of the mushrooms. These mushrooms and the substrates after of 60 days of colonization by *P. ostreatus* had concentrations of phorbol esters smaller than that found in provenances of non toxic *J. curcas* from México. Therefore, we can conclude that *P. ostreatus* has the capacity of degrade toxic compounds and antinutritional factors of *J. curcas* cake adding value to this residue, which can be used as substrate to production of enzymes and edible mushrooms, beyond decrease environmental damage.

Keywords: detoxication, physic nut, phytic acid, tannins, phorbol esters, biofuel, mushrooms and fungi.

1- INTRODUÇÃO

A presença de compostos tóxicos e fatores antinutricionais na torta de pinhão manso oriunda da cadeia produtiva do biodiesel tornam esse resíduo impróprio para o consumo animal, além dos possíveis danos ambientais que podem ser causados pelo descarte inadequado desse resíduo. Os ésteres de forbol presentes na semente e também no óleo foram identificados como os principais agentes tóxicos de *Jatropha curcas* (Makkar et al., 1998). A ingestão de forbóis por bovinos, caprinos, ovinos e eqüinos causam diarréia severa, irritações nos olhos e inflamação do trato gastrointestinal, podendo levar à morte dos animais (Makkar & Becker, 1997). O ácido fítico tem efeito negativo com a absorção de proteínas e minerais, principalmente o fósforo (Liang et al., 2009; Ravindran et al., 1999). Devido à ação quelante, esse ácido forma complexos insolúveis com cátions bi e trivalentes e proteínas no trato gastrointestinal do homem e animais (Sohail & Roland, 1999). Os taninos têm também a alta capacidade de formar complexos e precipitar proteínas, inibindo assim, a digestibilidade de proteínas e aminoácidos (Van der Poel, 1990). Contudo, a destoxificação desses resíduos pode permitir a utilização da torta como suplemento alimentar rico em proteínas na alimentação de animais, a exemplo de aves, suínos, bovinos e peixes. A destoxificação e a redução dos fatores antinutricionais poderá ser realizada por fungos de podridão branca que são capazes de crescer e degradar diversos compostos tóxicos pela ação de diversas enzimas (Akhtar et al., 1997; Heinfling et al., 1997). Entre essas enzimas destacam-se as ligninocelulolíticas, tanases e fitases. Além disso, o tratamento da torta com esses fungos poderá resultar na produção de cogumelos comestíveis, de enzimas e de ração animal, além de reduzir impactos ambientais causados pelo descarte inadequado desses resíduos. Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a capacidade de *Pleurotus ostreatus*, um fungo de podridão branca, produtor de enzimas ligninocelulolítica, fitase e formador de cogumelo comestível, destoxificar a torta de pinhão manso.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

A partir do resultado do experimento anterior intitulado “Degradação de compostos ligninocelulósicos presentes na torta de pinhão manso pelo fungo *Pleurotus ostreatus*”, foram selecionados, para destoxificação da torta de pinhão manso, os substratos com torta pura (To) ou com adição de 10 % de serragem de eucalipto (ToSe10), 10 % de casca de eucalipto (ToCe10) e 30 % de casca de café e 30 % de farelo de arroz (ToCcFa30) conforme tabela 1. Nesses substratos o isolado PLO 6 apresentou, em 45 dias de incubação, a melhor produção de biomassa fúngica em conjunto com a degradação de compostos ligninocelulósicos.

Tabela 1: Composição do substrato e a proporção dos resíduos agroindustriais adicionados à torta de pinhão manso

Substrato	Componentes da mistura	Massa do Substrato (kg)	
		Torta	Resíduo Agroindustrial
To	Torta	20	0
ToSe10	Torta + 10 % de serragem de eucalipto	18	2
ToCe10	Torta + 10 % de casca de eucalipto	18	2
ToCcFa30	Torta + 30% de casca de café + 30 % de farelo de arroz	8	12

Os substratos com adição de farelo de arroz não foram selecionados, pois neste trabalho além de objetivar a destoxificação de compostos tóxicos e, ou fatores antinutricionais presentes na torta de pinhão manso, visa também a redução de impacto ambientais causado pelos resíduos agroindustriais, a exemplo de serragem e casca de eucalipto, casca de café e a torta de pinhão manso.

2.1- Preparo da semente-inóculo

Foi definido como semente-inóculo para cultivo do PLO 6 de *P. ostreatus*, o micélio fúngico cultivado em grãos de arroz com casca, previamente cozidos e esterilizados. Foram pesados 3 kg de grãos de arroz com casca e adicionado 10 L de água para cozimento por 1 h. Em seguida, retirou-se o excesso de água e

adicionou 105 g de carbonato de cálcio e sulfato de cálcio (4:1, m:m). Setenta e cinco gramas dessa mistura foram colocados em frasco de vidro de 250 mL de capacidade. Os frascos contendo a mistura foram autoclavados, por duas vezes, a 121 °C, com intervalo de 48 h. Após esterilização e resfriamento, esses frascos foram inoculados com PLO 6, conforme descrito no capítulo anterior (Item 2.2). Os frascos inoculados foram incubados em BOD com temperatura controlada a 25 °C, durante 20 dias, para colonização dos grãos de arroz pelo fungo.

2.2 - Substratos utilizados e inoculação

Os substratos a base da torta de pinhão manso e resíduos agroindustriais foram preparados, conforme mistura apresentada na tabela 1, com teor de umidade em 75 % da capacidade de retenção. De cada substrato foram pesados 1,5 kg e colocados em sacos de polipropileno com capacidade de 2 kg. Em seguida, os substratos contidos nos sacos foram autoclavados a 121 °C por 2 h, por duas vezes, em intervalo de 24 h. Após esterilização e resfriamento, esses substratos foram inoculados com 75 g de semente-inóculo do isolado PLO 6 e incubados a 25 °C. Em intervalos de 15 dias após incubação e ainda após a primeira frutificação, foram retidas amostras para as outras análises descritas a seguir. Essas amostras foram constituídas de quatro sacos de polipropileno contendo o substrato colonizado pelo fungo.

Após 45 dias de incubação, para induzir frutificação uniforme, foi feita uma raspagem superficial dos substratos com a espátula, previamente flambada no bico Bunsen com álcool (70 %, v/v), e adicionado 5 mL de água destilada em cada saco com os substratos totalmente tomados com o micélio fúngico.

2.3- Determinação da proteína e da atividade enzimática

Após 15, 30, 33, 45 e 60 dias de incubação, 10 g de cada substrato foram colocadas em frascos Erlenmeyer (125 mL), contendo 25 mL de tampão citrato de sódio (50 mM e pH 4,8) e agitado a 150 rpm por 30 min (Cavallazzi et al., 2004a). Em seguida, a suspensão foi filtrada em funil de plástico (4 cm de diâmetro) contendo papel de filtro Whatman nº 1 e colocados em tubos de ensaio com tampa de rosca. Esse filtrado contido em tubo de ensaio foi designado de extrato

protéico bruto (EPB). Os ensaios enzimáticos foram feitos em triplicata e a atividade foi calculada pela diferença dos valores obtidos antes e após inoculação.

A atividade de lacase foi realizada conforme descrito por Buswell et al. (1995), utilizando como substrato 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazol-6-sulfônico (ABTS) a 30 °C. A reação para um volume total de 1 mL continha 300 µL de tampão acetato de sódio (0,1 M, pH 5,0), 100 µL de ABTS (1 mM) e 600 µL do EPB. Essa reação foi incubada no banho-maria a 37 °C por 10 min. A leitura da absorvância foi realizada antes e depois da incubação da reação a 37 °C e atividade de lacase foi calculada por essa diferença. O branco da reação continha todos os reagentes exceto o extrato protéico bruto que foi substituído pelo tampão acetato de sódio.

A atividade da enzima manganês peroxidase (MnP) foi determinada utilizando, como substrato, o vermelho de fenol (1 g L⁻¹) de acordo com o método descrito por Kuwahara et al. (1984). A absorvância foi medida a 610 nm e para garantir a dependência do manganês na atividade da enzima foi realizado um tratamento sem adição de sulfato de manganês o qual foi substituído por lactato de sódio. A reação foi realizada com 500 µL do EPB, 100 µL de vermelho de fenol, 100 µL de lactato de sódio (250 mM, pH 4,5), 50 µL de sulfato de manganês (2 mM), 200 µL de soro albumina bovino (1 % p/v) e 50 µL de água oxigenada em tampão succinato de sódio (20 mM, pH 5). Essa reação foi incubada no banho-maria a 37 °C por 15 min e, em seguida, foi adicionado 40 µL de hidróxido de sódio (2 M).

A atividade de xilanase foi realizada conforme descrito por Bailey et al. (1992) pela determinação do teor de açúcares redutores utilizando o reagente de DNS. A reação continha 250 µL do EPB, 500 µL de tampão acetato de sódio (50 mM, pH 4,8) e 250 µL de solução de xilana brich (1 % p/v). A reação foi incubada no banho-maria a 50 °C por 20 min e, em seguida, foi adicionado 1 mL do reagente de DNS. Após isso, essa reação foi fervida por 5 min e adicionado 8 mL de água deionizada. A leitura da absorvância foi realizada a 540 nm e a quantificação de açúcares redutores foi determinada utilizando a curva padrão de xilose (Sigma) nas concentrações de 0,5 a 1,5 g L⁻¹.

A atividade da celulase foi determinada conforme descrito por Mandels et al. (1976) pela quantificação de açúcares redutores utilizando como padrão, D-

glicose (Meck). Foi utilizado como substrato, papel Whatman nº 1, cortado em tiras de 10 cm de comprimento por 2 cm de largura e a reação foi incubada no banho-maria a 50 °C por 12 horas.

A atividade de fitase foi determinada utilizando o reagente Taussky-Schoor (1 % de molibdato de amônio: 49 % de ácido sulfúrico 10 N e 5 % de sulfato ferroso) conforme descrito por Harland & Harland (1980). Para a extração da enzima fitase, pesou-se 3 gramas dos substratos em fracos erlenmeyer e adicionou-se 10 mL de cloreto de sódio (1 % p/v). Em seguida, esses fracos foram agitados por 1 hora, em agitador rotatório, a 100 rpm e filtrados em papel filtro Whatman nº 1. O filtrado foi centrifugado a 2000 g por 10 min. A reação para atividade de fitase continha 100 µL do filtrado, 1 mL de solução de ácido fítico (0,5 % p/v, Sigma - código P9539). Essa reação foi incubada no banho-maria a 60 °C por 10 min e, em seguida, adicionou 1 mL de ácido tricloroacético (10 % p/v) e 5 mL do reagente de Taussky-Schoor. Após isso, foi realizada a leitura a 500 nm no espectrofotômetro (Thermo, Evolution 60). A curva padrão para dosagem de fósforo foi realizada utilizando fosfato dibásico de potássio (Sigma) de concentração variando de 0,400 a 2,000 mg L⁻¹ e leitura da absorvância a 725 nm.

A determinação das proteínas solúveis foi feita segundo método colorimétrico de Bradford (1976). A curva-padrão foi preparada com soro albumina bovino (1 % p/v) de concentração entre 0,025 a 0,450 mg mL⁻¹. A reação continha 1 mL do reagente de Bradford (Sigma, código B6916), 1 mL do extrato protéico bruto e 1 mL solução salina (0,15 M). Essa reação foi incubada por 10 min a 25 °C e logo após foi realizada a leitura da absorvância em 595 nm.

2.4 - Composição físico-química dos substratos

Os teores de lignina, celulose e hemicelulose foram determinados conforme descrito no capítulo 1. Foram analisados, também, os teores de compostos ligninocelulósicos, éster de forbol, fósforo solúvel, ácido fítico, taninos, monossacarídeos redutores e minerais, como descrito a seguir.

2.4.1 – Determinação de éster de forbol

A presença de compostos tóxicos, éster de forbol foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), conforme metodologia descrita por Hirota et al. (1988) e Makkar et al. (1997). Foram pesados 3 g dos substratos antes e após inoculação do PLO 6. Esse material foi triturado em gral de porcelana por 10 min. Em seguida, os gral foram lavados por 4 vezes com 5 mL de metanol puro (Sigma, código 34885). As amostras dos substratos maceradas juntamente com 20 mL de metanol foi centrifugados a 4000 g por 10 min a 4 °C (centrifuga refrigerada – SORVAL 6000 RP). O sobrenadante foi filtrado em papel filtro de microfibras de vidro (Whatman GF/D, grau 2,5 cm). No material sólido retido no filtro foram adicionados 10 mL de metanol, o qual foi novamente centrifugado e filtrado. Os sobrenadantes da primeira e da segunda filtração foram misturados e transferidos para erlenmeyer (125 mL). Esses sobrenadantes foram secados à vácuo (40 °C) no rota vapor (BÜCHI, 461 Water Bath) e ressuspensos em 5 mL de tetrahidrofurano (Sigma, código 2041). Em seguida, 20 µL desse material foi injetado no HPLC (Shimadzu) e eluído com gradiente acetonitrila pura e 0,175 % de ácido ortofosfórico. O ácido ortofosfórico foi filtrado por duas vezes em papel filtro Whatman nº 1 e outra vez, em microfibras de vidro (Whatman GF/C). Esse ácido filtrado juntamente com acetonitrila foi degaseificado por 5 min no sonicador (Branson 1510) a 30 °C, conforme recomendado por Makkar et al. (1997). As condições para eluição foram conforme mostrados na tabela 2 (Makkar et al., 1997), com fluxo de 1 mL por min durante 1 h, em coluna C18 fase reversa, detector de UV a 280 nm e injetor automático.

Tabela 2: Condições do HPLC para quantificação de éster de forbol (Makkar et al., 1997)

Tempo (min)		Reagentes (%)	
Eluição	Duração	Acetonitrila	Ácido ortofosfórico
0	5	60	10
5	10	50	50
15	30	25	75
45	15	0	100

O teor de éster de forbol foi comparado com padrões e o tempo de retenção entre 41 a 52 minutos (Hirota et al., 1988). A curva padrão para quantificação de éster de forbol das amostras dos substratos foi preparada de concentração de 0,005 a 0,5 mg mL⁻¹ de forbol, 20 oxo-20 desoxi-12-miristato-13-acetato (Sigma, P9893 e lote 24H0965) dissolvido em tetrahidrofurano.

2.4.2 – Determinação de minerais

O teor de minerais presentes na torta de pinhão manso antes da inoculação de PLO 6 foi realizado pelo Laboratório de Análises de Solo Viçosa Ltda. Estes minerais foram determinados no extrato ácido (nitríco:perclórico), sendo a quantificação de ferro, manganês e cobre por espectrofotometria de absorção atômica e nitrogênio pelo método de Kjeldahl.

2.4.3 – Determinação do fósforo solúvel

O fósforo solúvel foi determinado em todos os substratos antes e após a inoculação de PLO 6, pelo método descrito por Braga & Defelipo (1974). Para cada reação, pipetou-se 100 µL do extrato protéico bruto (descrito no item 2.3) e 4,9 mL do reagente de trabalho (0,5 % de subcarbonato de bismuto, 70 % de ácido sulfúrico (96 %), 10% de molibdato de amônio e 1 % de ácido ascórbico). Após 20 min de reação, esse material foi diluído com 4 mL de água deionizada e em seguida, a leitura da absorvância realizada no espectrofotômetro (Thermo Evolution 60) a 725 nm. A curva padrão feita com fosfato de potássio dibásico nas concentrações de 0,4 a 3,2 mg L⁻¹.

2.4.4 - Ácido fítico

O teor de ácido fítico foi determinado pelo método colorimétrico conforme descrito por Gao et al. (2007). A cada 3 g da amostra dos substratos (tabela 1) adicionou 25 mL de ácido clorídrico (4 % v/v). Esse material foi colocado no agitador rotatório 220 rpm por 16 h. Depois desse período, aguardou-se que ocorresse a decantação e transferiu-se o sobrenadante para um tubo de centrifuga (50 mL) contendo 1 g de cloreto de sódio (Vetec). O material foi centrifugado a 1000 g por 20 min e congelado a -20 °C pelo mesmo tempo. Repetiu-se a centrifugação nas mesmas condições e o sobrenadante foi filtrado em papel filtro

de microfibra de vidro (Whatman GF/D, grau 4.7 cm). Do material filtrado, 1 mL foi diluído em 24 mL de água deionizada contida em tubo de centrifuga (50 mL). Em seguida, 3 mL da amostra diluída foram colocados em outro tubo de centrifuga (50 mL) contendo 1 mL do reagente de Wage (0,03 % de cloreto férrico hexahidratado, 0,3 % de ácido sulfosalicílico, 2,4 % de ácido clorídrico 0,65 N). A mistura foi então centrifugada (1000 g) a 10 °C por 10 min e a leitura realizada no espectrofotômetro a 500 nm conforme Latta & Eskin (1980). A curva padrão foi feita com fitato de sódio (Sigma, código P9539) de concentração variando de 3 a 160 mg L⁻¹.

2.4.5 – Determinação de taninos totais

Os taninos totais foram determinados com reagente de Folin-Ciocalteu conforme descrito por Makkar et al. (1995). A cada 3 g de cada substrato (tabela 1) adicionou-se 10 mL metanol puro (Sigma, código 34885) e 0,5 g de polivinilpirrolidona. Esse material foi homogeneizado no agitador rotatório a 220 rpm por uma hora. Em seguida, para clarificação do material, adicionou 5 mL de hidróxido de bário (0,1 M) e 5 mL de sulfato de zinco (5 % p/v). Esse material foi novamente homogeneizado em agitador rotatório por 10 min. Para a quantificação de taninos, a reação contendo 2 mL do sobrenadante clarificado, 5 mL de carbonato de sódio (2 % p/v) em hidróxido de sódio (0,1M) e 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (1:2), foi incubada no banho-maria a 37 °C por 10 min e, em seguida, a leitura foi realizada no espectrofotômetro a 765 nm. A curva padrão foi preparada com ácido tânico, concentração de 1 a 100 mg L⁻¹, dissolvido em água deionizada.

2.4.6 – Determinação de monossacarídeos redutores

A quantidade de açúcares redutores em todos os substratos foi determinado pelo método de DNS (99,5 % de ácido dinitrossalicílico, 0,4 % de fenol e 0,14 % de metabissulfito de sódio) e a curva padrão de glicose (Merck) de concentração variando de 0,5 a 1,5 g L⁻¹. Pipetou-se 250 µL do extrato protéico bruto (item 2.3) e adicionou-se 500 µL de tampão acetato de sódio e 1 mL de solução de DNS. Essa mistura foi fervida a 100 °C por 5 minutos no banho maria e, em seguida, foram adicionado 8 mL de água deionizada. Dessa mistura, 1 mL

foi transferida para tubo de ensaio contendo 4 mL de água deionizada. A leitura foi realizada no espectrofotômetro a 540 nm.

2.5 – Determinação da biomassa

O crescimento micelial foi determinado pelo teor de ergosterol produzido pelo fungo *P. ostreatus* PLO 6 incubados em substratos conforme tabela 1. A quantificação desse composto foi realizada conforme descrito no capítulo anterior (item 2.3).

2.6 – Determinação da massa seca dos substratos

O peso dos substratos úmido antes da inoculação de PLO 6 foi de 1,5 kg. Para determinação da massa seca, esse material foi colocado em bandejas de alumínio (10 cm de comprimento por 8 cm de largura) secas e previamente pesadas. Essas bandejas contendo os substratos foram colocadas na estufa a 105 °C até atingir a massa constante.

2.7 - Produção de cogumelos

Os sacos de polipropileno contendo os substratos com crescimento micelial; após 28, 43 e 58 dias de incubação, foram colocados na câmara fria a 10 °C por 48 h. A frutificação foi realizada em ambiente refrigerado com temperatura controlada em 18 °C.

A percentagem da eficiência biológica (EB) foi determinada pela razão entre a massa dos cogumelos fresco e massa seca dos substratos, multiplicado por 100 (Wang et al., 2001). A produtividade foi obtida pela razão entre a EB e o tempo de incubação requerido para colheita (Oliveira et al., 2007).

Todas as análises feitas nos substratos, antes a após colonização por *P. ostreatus*, exceto a determinação de compostos ligninocelulósicos e atividades enzimáticas, foram também determinados nos cogumelos. Para isso, os cogumelos produzidos no mesmo bloco de substrato foram misturados e, dessa mistura, foram separados 200 g de cogumelos frescos. Os cogumelos foram

tritutados por 10 min no liquidificador (Walita) com adição de 5 mL de água deionizada. Para cada análise foi utilizada 10 g do homogenato.

2.8 - Análises estatísticas

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado com duas repetioes. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, posteriormente, análise de regressão, a 5 % de probabilidade, utilizando-se o programa SAEG (versão 9.1 – Universidade Federal de Viçosa, 2006).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição química dos substratos, antes e depois do tratamento térmico a 121 °C, e os principais minerais presentes na torta de pinhão manso estão apresentados na tabela 3. A composição dos substratos foi bastante alterada depois do tratamento térmico, e em geral houve uma significativa redução da composição, principalmente de lignina, celulose, éster de forbol e fatores antinutricionais (Tabela 3). Vários autores mostram a redução de compostos ligninocelulósicos pelo tratamento térmico (Kifani-Sahban et al., 1997; Jandura et al., 2000; Xiao et al., 2001; Li et al., 2002; Alvarez & Vázquez, 2004).

Após 15 dias de inoculação, verificou-se a completa colonização dos substratos contido nos sacos de polipropileno por *P. ostreatus* PLO 6 (Figura 1) e a formação de cogumelos depois de 33, 45 e 60 dias de incubação (Figura 2).

3.1 - Biomassa, massa seca e a degradação de compostos ligninocelulósicos

A manutenção de aumento contínuo da biomassa fúngica de *P. ostreatus* ao longo dos 60 dias de incubação no substrato contendo 30 % de casca de café e 30 % farelo de arroz (Figura 3A) pode ser em razão da maior concentração inicial de monossacarídeos neste substrato (Tabela 3). Este perfil de crescimento de *P. ostreatus* foi observado por Robertson et al. (2008) após incubado, por 80 dias, em substratos com palha de trigo. Entretanto, o mesmo comportamento não foi observado quando os substratos utilizados para *P. ostreatus* PLO 6 foram a torta de pinhão manso adicionada ou não de serragem ou casca de eucalipto (Figura 3A). É provável que a raspagem e a adição de água nos substratos depois de 45 dias de incubação pode ter promovido a retomada de crescimento da biomassa fúngica (Figura 3A).

A perda da massa seca (Figura 3B) teve correlação positiva com a percentagem de degradação de lignina (significância= 0,154) e negativa com a biomassa (significância= 0,354). Essa correlação entre a degradação da lignina e

Tabela 3: Percentagem de compostos químicos, orgânicos e minerais, presentes na torta de pinhão manso pura ou em mistura com resíduos agroindustriais utilizado como substratos para cultivo do fungo *Pleurotus ostreatus* PLO 6

Compostos	Teores nos substratos (mg g ⁻¹)							
	Autoclavagem							
	Antes				Depois			
	To	ToSe10	ToCe10	ToCcFa30	To	ToSe10	ToCe10	ToCcFa30
Lignina	37,59 ± 3,76	34,80 ± 4,11	29,28 ± 3,41	29,12 ± 4,16	30,34 ± 2,56	31,41 ± 1,65	27,12 ± 2,80	25,15 ± 4,88
Celulose	5,62 ± 1,02	9,47 ± 0,55	12,91 ± 0,95	18,08 ± 0,59	4,93 ± 0,60	7,99 ± 0,50	8,21 ± 0,38	9,98 ± 0,26
Monossacarídeos	8,25 ± 1,14	7,51 ± 0,11	6,30 ± 0,67	12,79 ± 0,33	25,88 ± 5,64	14,96 ± 3,16	17,91 ± 1,49	33,80 ± 1,65
Taninos*	2,50 ± 0,12	0,95 ± 0,44	3,01 ± 0,70	2,81 ± 0,38	1,24 ± 0,34	0,56 ± 0,09	1,49 ± 0,11	1,37 ± 0,13
Ácido fítico	3,08 ± 0,28	2,31 ± 0,02	2,33 ± 0,17	2,24 ± 0,08	1,08 ± 0,007	0,77 ± 0,009	0,77 ± 0,001	0,80 ± 0,001
Fósforo	4,57 ± 0,44	2,66 ± 0,35	3,30 ± 0,44	7,65 ± 0,52	8,93 ± 1,66	9,49 ± 0,56	10,54 ± 0,59	11,45 ± 0,45
Éster de forbol	0,10 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,004	0,07 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,001	0,06 ± 0,01
Proteína solúvel	0,51 ± 0,07	0,64 ± 0,13	0,74 ± 0,13	0,62 ± 0,19	0,22 ± 0,02	0,57 ± 0,02	0,56 ± 0,02	0,22 ± 0,02
Proteína Total	21,50	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Nitrogênio	3,44	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Manganês	0,044	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ferro	0,35	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Cobre	0,022	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Zinco	0,036	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

*Teores equivalente a ácido tânico.

nd – não determinado.

To – Torta de pinhão manso pura, ToSe10 – Torta de pinhão manso + 10 % de serragem de eucalipto, ToCe10 – Torta de pinhão manso + 10 % de casca de eucalipto e ToCcFa – Torta de pinhão manso + 30 % de casca de café + 30 % de farelo de arroz, conforme descrito na tabela 1.

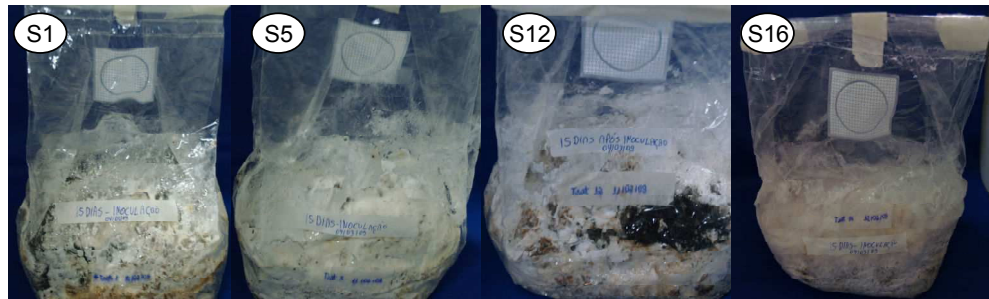


Figura 1: Crescimento micelial de *P. ostreatus* PLO 6 em substratos a base da torta de pinhão manso pura ou em mistura com resíduos agroindustriais após 15 dias de incubação. S1 – Torta, S5 - Torta + 10 % de serragem de eucalipto, S12 - Torta + 10 % de casca de eucalipto e S16 - Torta + 30 % farelo de arroz + 30 % de casca de café.



Figura 2: Cogumelos produzidos pelo de *P. ostreatus* PLO 6 crescidos em substratos a base da torta de pinhão manso pura ou em mistura com diferentes resíduos agroindustriais.

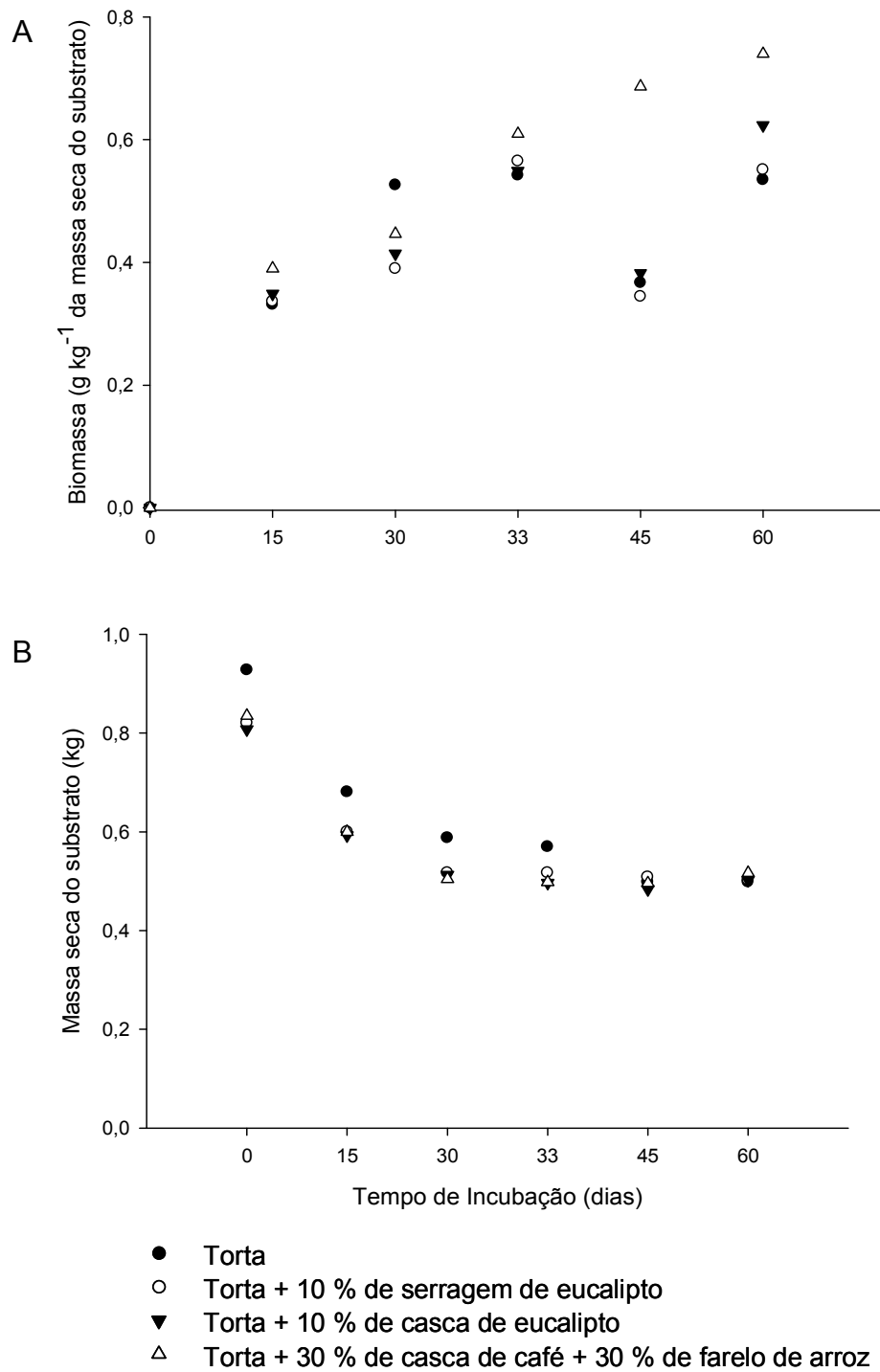


Figura 3: Produção de biomassa micelial (A) e perda da massa seca (B) durante 60 dias de incubação de *Pleurotus ostreatus* PLO 6 em substratos a base da torta de pinhão manso pura ou em mistura com resíduos agroindustriais, conforme tabela 1.

a perda da massa seca também foi relatada por Berg (2000). Todavia, na degradação de folhas de *Quercus petraea* pelos basidiomicetes *Hypholoma fasciculare* e *Rhodocollybia butyracea*, essa correlação foi entre a massa seca e a atividade das enzimas ligninocelulolíticas (Valáskova et al., 2007). A perda da massa seca foi crescente até o 45º dia de incubação e, depois permaneceu constante até o final do experimento (Figura 3B). Resultado semelhante foi obtido por Valáskova et al. (2007) utilizando o fungo *H. fasciculare* para degradação de folhas secas de carvalho. Nesse trabalho, as folhas foram umidificadas com água destilada e autoclavadas por duas vezes a 121 °C.

A perda da massa seca total nos substratos foi em média 46 % na torta pura, seguido de 39 % no substrato com adição de serragem de eucalipto e 38 % nos outros substratos. Porém, essa perda total da massa seca foi pouco menor que o obtido por *P. ostreatus* inoculado em palha de trigo, por 50 dias de incubação (Baldrian & Gabriel, 2003) e também em resíduos ligninocelulósicos na presença de cobre, manganês, chumbo e zinco, por 98 dias de cultivo (Baldrian et al., 2002). Estes resultados demonstram que ocorre uma alta atividade ligninocelulolítica e que a presença de cobre, manganês e zinco presentes na torta de pinhão manso (Tabela 3) podem favorecer essa atividade.

Maiores atividades das enzimas ligninolíticas, lacase e MnP durante 60 dias de colonização por *P. ostreatus* PLO 6 foram observadas quando os fungos foram cultivados na torta pura, seguida do substrato com adição de serragem de eucalipto (Figura 4B e 4C). Consequentemente ocorreram maiores percentagem de degradação de lignina (Figuras 4A) e maior perda da massa seca (Figuras 3B). A atividade de ligninases em diversos substratos por espécies do gênero *Pleurotus* já foi amplamente notificada na literatura (Kerem et al., 1992, Baldrian et al., 2007, Robertson et al., 2008, Liu et al., 2009, Piskur et al., 2009) e em outros fungos de podridão branca (Kerem et al., 1992, Jung et al., 1992, Arora et al., 2002, Cavallazzi et al., 2004b, Chi et al., 2007, Shi et al., 2009). A degradação elevada de lignina associada com a maior atividade das ligninases (Figuras 4) sugere que esse polímero foi a principal fonte de carbono utilizada para a

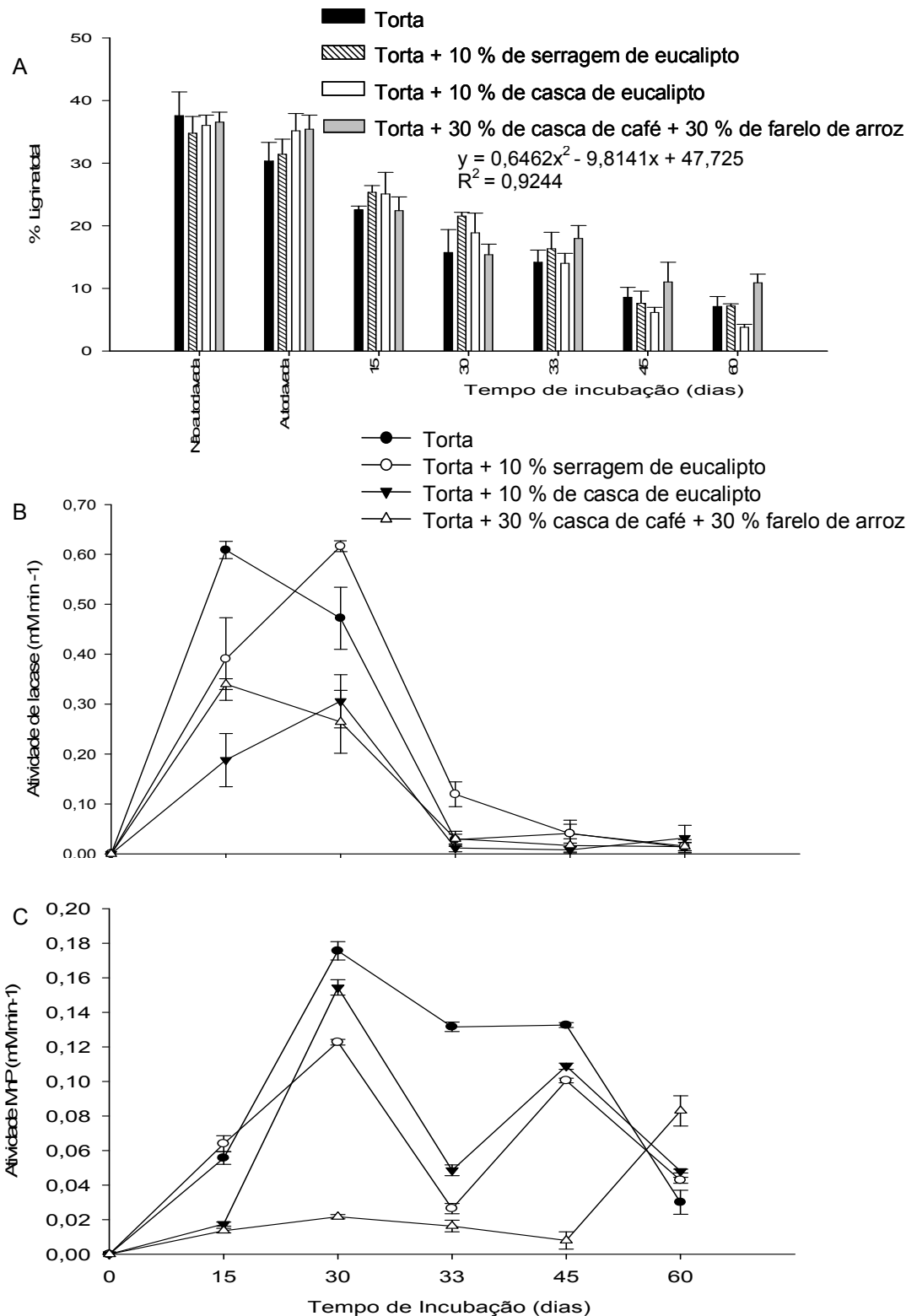


Figura 4: Percentagem de lignina (A) e atividade de lacase (B) e manganês peroxidase (C), durante 60 dias de incubação de *P. ostreatus* PLO 6 em substratos a base da torta de pinhão manso pura ou em mistura com resíduos agroindustriais, conforme tabela 1. Modelo de regressão significativo ($p < 0,05$).

produção de biomassa pelo PLO 6 na torta de pinhão e no substrato adicionado de serragem de eucalipto (Figura 3A). Este resultado pode ser atribuído maior concentração inicial de lignina em relação a celulose e monossacarídeos (Tabela 3). Atividades elevadas de lacase e manganês peroxidase que resultaram na maior degradação de lignina podem ser também explicada pela disponibilidade dos cofatores enzimáticos, manganês e cobre nos substratos utilizados (Figuras 4 e tabela 3). A lacase possui no centro de ligação íons cobre (Koroleva et al., 2001; Scherer & Fischer, 2001) que além de estimular a atividade enzimática em substrato à base da torta de pinhão manso, também aumentou a atividade dessa enzima como observado em *P. ostreatus* (Baldrian & Gabriel, 2002), *Funalia trogii* ATCC 200800 e *Trametes versicolor* ATCC 200801 (Birhanli & Yesilada, 2006) cultivados em meio suplementados com esse elemento. A alta atividade de MnP na presença de manganês também foi mostrada em *P. ostreatus* cultivado em serragem de álomo, abeto ou castanheira com adição de manganês (Giardina et al., 2000) e ainda, em *L. edodes* (Buswell et al., 1995) e *Phanerochaete favido-alba* (Hamman et al., 1999) cultivados em meio de cultura com diferentes concentrações de manganês.

A maior degradação de compostos celulósicos (Figura 5A) e também maior atividade das celulasas (Figura 5B e 5C) foram observadas nos substratos com adição de casca de café e farelo de arroz seguida do substrato com adição de serragem de eucalipto. A produção de biomassa por PLO 6 nesses substratos foi principalmente devido a disponibilidade de monossacarídeos (Tabela 3) e à atividade de xilanase (Figura 5C), pois a atividade de celulase (Figura 5B) e ligninases (Figura 4) foram baixas. A baixa atividade dessas enzimas pode ser devida alta concentração inicial de monossacarídeos (Tabela 3) que pode ter influenciado na expressão diferenciada das enzimas ligninocelulolíticas. Essa expressão diferenciada, bem como a função que cada enzima desempenha no complexo enzimático de degradação de lignina, celulose e hemicelulose foram mostradas em *L. edodes* e *P. ostreatus* cultivados em resíduos de diferentes composições (Elisashvili et al. 2008).

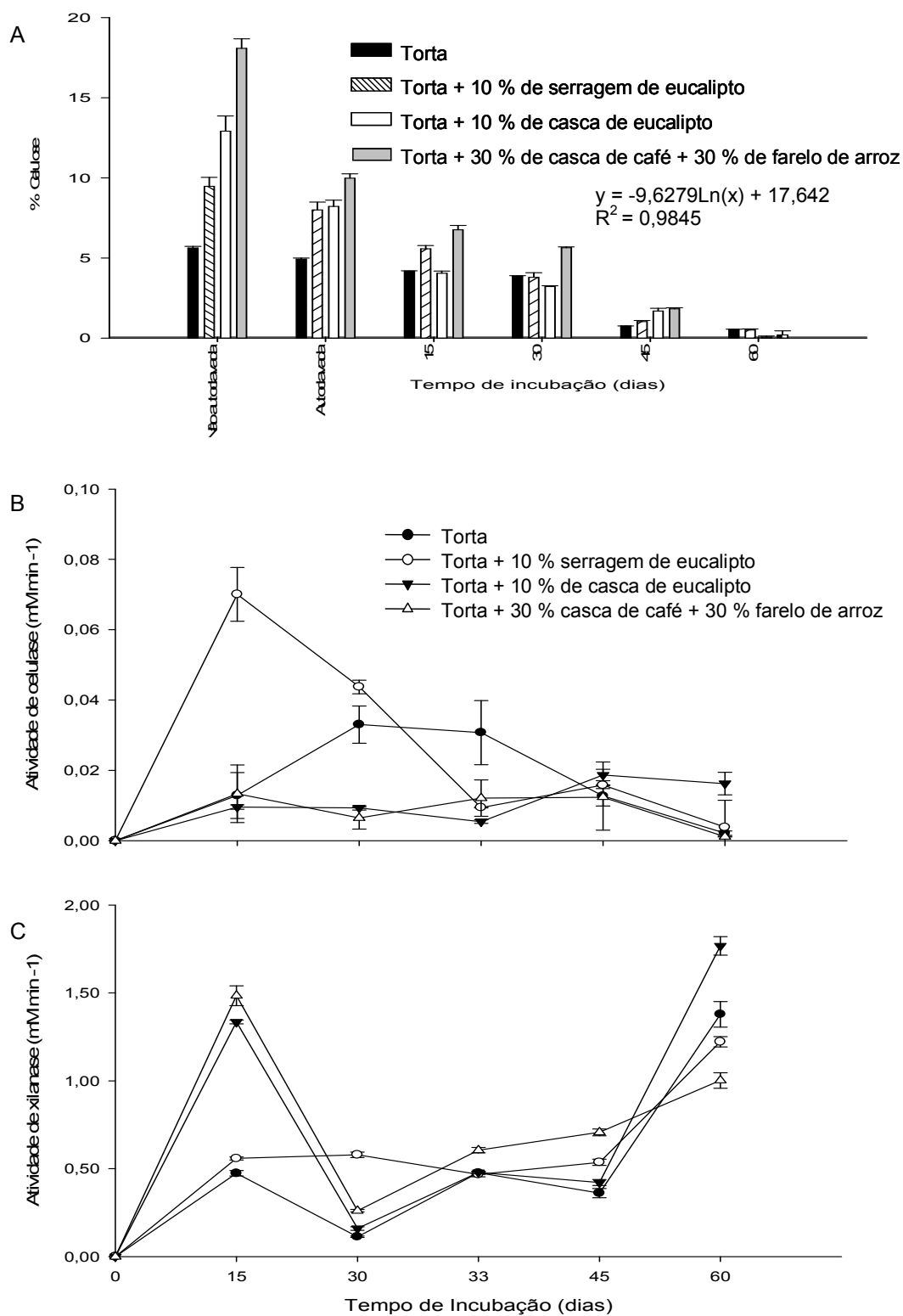


Figura 5: Percentagem de celulose (A), atividade de celulase (B) e atividade de xilanase (C) durante 60 dias de incubação do isolado PLO 6 de *Pleurotus ostreatus* em substratos a base da torta de pinhão manso pura ou em mistura com resíduos agroindustriais. Modelo de regressão significativo ($p < 0,05$).

A alta atividade de celulase nos substratos com adição de serragem de eucalipto e na torta de pinhão manso pura mostra uma sinergia dessa enzima com as ligninases (Figura 4 e 5). Este fato pode ser atribuído que a utilização de lignina como fonte de carbono e energia, requer substratos com celulose e, ou outras fontes de carbono (Ruggeri & Sassi, 2003).

Portanto, *Pleurotus ostreatus* PLO 6 inoculado em substratos à base da torta de pinhão manso durante 60 dias de incubação tem alta produção de biomassa e a capacidade de degradar compostos ligninocelulósicos, com redução significativa da massa seca, apesar da presença de compostos tóxicos e fatores antinutricionais (Tabela 1).

3.2 - Degradação de éster de forbol

Para todos os padrões de éster de forbol usados foram encontrados picos e tempo de retenção entre 40 e 52 minutos no HPLC. Por essa técnica foi possível quantificar o teor de éster de forbol presentes na torta de pinhão manso e nos substratos contendo a torta de pinhão manso e resíduos agroindustriais (Figura 6). A concentração inicial de forbol, que na torta de pinhão manso representa 0,1 % da massa seca (Tabela 3), foi entre 0,63 a 1,03 mg g⁻¹ nos substratos utilizados (Figura 6). Essa concentração está de acordo com a encontrada em frutos de *J. curcas* (Makkar et al., 1997, Basha et al., 2009), porém, em concentração maior que na variedade não tóxica do México (Makkar et al., 1997 e 1998), mas menor que as variedades de Cabo Verde, Nicarágua e México (Makkar e Becker, 1997; Martínez-Herrera, 2006). Este resultado demonstra que a concentração de forbol nas sementes de pinhão manso pode ser dependente da variedade e da região de cultivo.

A dupla autoclavagem dos substratos a 121 °C reduziu em média 20 % o teor de éster de forbol (Tabela 3). No entanto, esses compostos não foram eliminados pelo tratamento térmico a 160 °C durante 30 minutos (Aregheore et al., 2003). Por outro lado, a adição de hidróxido de sódio e, ou de hipoclorito de sódio combinado com tratamento térmico é capaz de reduzir a concentração desse composto em até 25 % (Goel et al., 2007).

Neste trabalho, a degradação de éster de forbol por *P. ostreatus* PLO 6 foi de até 99 %, após 60 dias de incubação (Figura 6). Esta alta percentagem de degradação foi maior que obtidos em processos químicos de desodorização, desacidificação e branqueamento aplicado no óleo e na semente de *J. curcas* (Hass & Mittelbach, 2000; Rakshit et al., 2008). Esses mesmos processos químicos, com exceção do branqueamento (Ahmed & Salimon, 2009) e tratamentos com diferentes produtos químicos (Aregheore et al., 2003) aplicados na semente de *J. curcas* não foram eficiente na redução desse composto. A alta percentagem de degradação de lignina nos substratos acompanhada pela atividade das enzimas lacase e MnP, mostra a maior capacidade de *P. ostreatus* PLO 6 em despolimerizar a lignina e concomitante, a degradação dos forbóis ocorre em consequência dessa reação de despolimerização. Isso também pode ter ocorrido na degradação de outros compostos orgânicos como, por exemplo, clorofenóis e hidrocarbonetos aromáticos (Barr & Aust, 1994; Scheibner et al., 1997; Majcherczyk et al., 1998).

A máxima eliminação de forbóis ocorreu até o 33º dia de incubação (Figura 6) e coincidiu com intervalo de maior atividade de lacase e manganês peroxidase (Figuras 4B e 4C). A atividade dessas enzimas de *Phanerochaete* sp (Perez et al., 1998; Harazono & Nakamura, 2005), *Trametes* sp (Maalej-Kammoun et al., 2009), *Irpex lacteus* (Svobodová et al., 2008), *Ganoderma lucidum* (Murugesan et al., 2008) e *P. ostreatus* (Hublik & Schinner, 2000; Tsioulpas et al., 2002; Palmieri et al., 2005; Iamarino et al., 2009) foram também relatados na descoloração de diversos corantes da indústria têxteis e na eliminação de diferentes compostos poluentes.

No entanto, as enzimas celulasas e xilanases (Figuras 5B e 5C) tiveram altas atividades no 15º e 45º dia de incubação quando a degradação de forbóis chegou a 37 e 60 %, respectivamente. Foi também relatada a atividade de celulasas na degradação de fenóis e compostos furfural (Hongqiang & Hongzhang, 2008). O procedimento de raspagem e adição de água nos substratos depois de 45 dias de incubação, apesar de aumentar a produção de biomassa e a atividade de xilanase, não estimulou a redução de éster de forbol (Figuras 3A, 5C e 6). No substrato com adição de casca de eucalipto constatou-se menor percentagem de redução de forbóis no 15º dia de incubação e as mais baixas

atividades de lacase e MnP (Figuras 4B, 4C e 6). Estas evidências fortalecem a hipótese de que a degradação desse composto tóxico acontece por co-metabolismo com as enzimas responsáveis pela despolimerização da lignina.

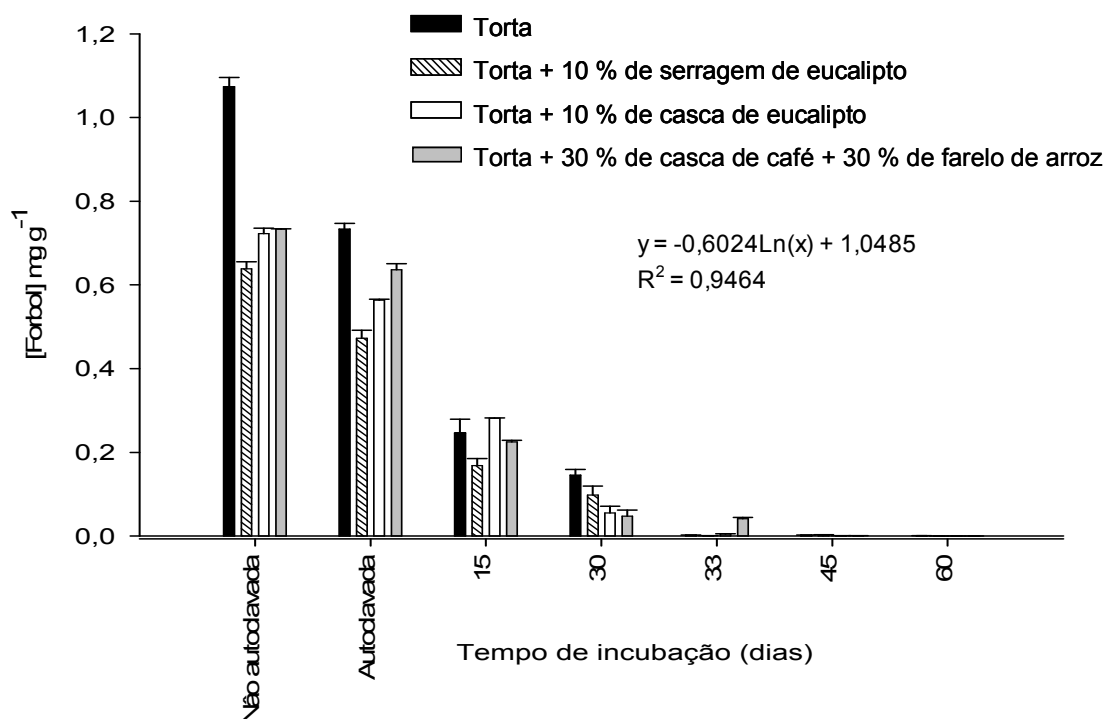


Figura 6: Degradação de composto tóxico, éster de forbol presente na torta de pinhão manso pelo isolado PLO 6 de *Pleurotus ostreatus*, durante 60 dias de incubação. Modelo de regressão significativo ($p < 0,05$).

Finalmente, depois de 60 dias de incubação com PLO 6, a concentração residual de éster de forbol foi em média $2 \times 10^{-4} \text{ mg g}^{-1}$ da massa seca (Figura 6). Esta concentração é menor que o nível tolerável que é de $0,09 \text{ mg g}^{-1}$ (Aregheore et al., 2003). Portanto, *P. ostreatus* tem a capacidade de degradar éster de forbol oriundo da torta de pinhão manso, e assim, destoxificar esse resíduo da fabricação do biodiesel.

3.3 - Degradação de fatores antinutricionais

A maior concentração inicial de taninos foi encontrada nos substratos com adição de casca de eucalipto, casca de café e na torta de pinhão manso pura (Tabela 3). Essa concentração presente na torta está de acordo com o valor encontrado na casca do fruto de *J. curcas* (Makkar et al., 1998). A presença de taninos já foi relatado na casca de eucalipto (Vital et al., 2004; Vázquez et al., 2009) e na casca de café (Pandey et al., 2000; Barcelos et al., 2001). O tratamento térmico nos substratos reduziu em 46 % o teor inicial de taninos (Figura 7). Este resultado é consistente com a degradação desse fator antinutricional presente em legumes, por cozimento ou por autoclavagem a 121 e 128 °C, por diferentes períodos de tempo (Rehman & Shah, 2005).

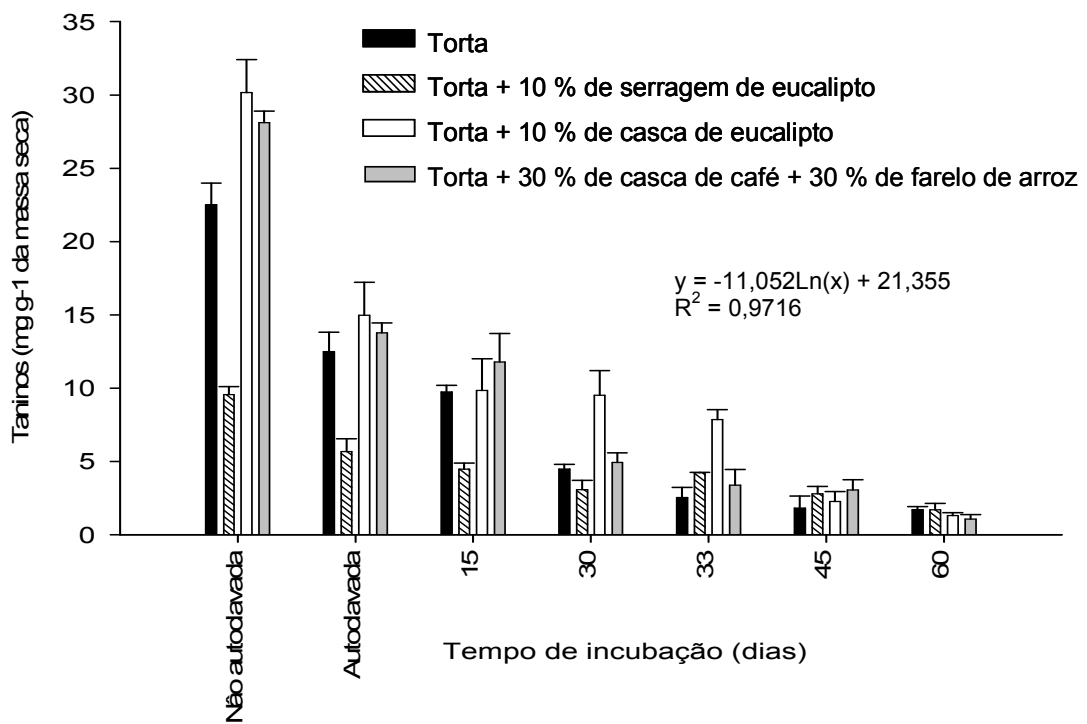


Figura 7: Degradação de taninos por *P. ostreatus* PLO 6, durante 60 dias de incubação em substratos a base da torta de pinhão manso, conforme tabela 1. Modelo de regressão significativo ($p < 0,05$).

Independente do substrato, a degradação de taninos por *P. ostreatus* PLO 6 foi crescente em função do tempo de incubação, com maior percentagem de redução (90 %) entre 15 e 30 dias de incubação nos substratos com adição de casca de café e casca de eucalipto (Figura 7). A alta capacidade de degradação desses compostos foi também mostrada em *Pleurotus* sp cultivado em cascas de café por 60 dias de incubação (Fan et al., 2006), *P. sajor-caju* em resíduos de café (Wong & Wang, 1991) e *P. ostreatus* em casca de cacau (Alemawor et al., 2009). A degradação de taninos pode estar relacionada à atividade de tanase, cuja presença já foi relatada em diferentes gêneros fúngicos, a exemplo de *Aspergillus* (Batra & Saxena, 2005; Aguilar et al., 2001), *Penicillium* (Batra & Saxena, 2005; Sharma et al., 2008) e *Paecilomyces* (Battestin & Macedo, 2007). Portanto, *P. ostreatus* PLO 6, mostrou-se capaz de degradar taninos presentes na torta pinhão manso e também nos outros substratos utilizados.

Sessenta e sete por cento do teor de fósforo presente na torta de pinhão manso está na forma orgânica de ácido fítico (Tabela 3). A percentagem desse ácido na torta de pinhão manso (Tabela 3) foi menor que a encontrada em resíduos da semente de *J. curcas* (Makkar et al., 1997). Apesar de esse ácido ser considerado estável ao calor (Deshpande & Damodaran, 1990), a esterilização dos substratos reduziu, em média, 20 % do teor inicial. Redução semelhante também foi observada no tratamento térmico da farinha de lentilha, a 120 °C, por 30 min (Porres et al., 2004). Além disso, em sementes de leguminosas submetidas à autoclavagem a 121 °C, por 90 min, a concentração desse fator antinutricional foi reduzida em até 50 % (Rehman & Shah, 2005). O ácido fítico nos substratos é degradado pela ação da enzima fitase, liberando inositol e fosfato inorgânico (Ullah & Phillippy, 1994). A presença dessa enzima já foi mostrada em diferentes gêneros de fungos, como *Aspergillus* (Ullah & Phillippy, 1994, Wyss et al., 1999), *Agaricus*, *Lentinula*, *Pleurotus* (Collopy & Royse, 2004) e *Rhizopus* (Ramachandran et al., 2005).

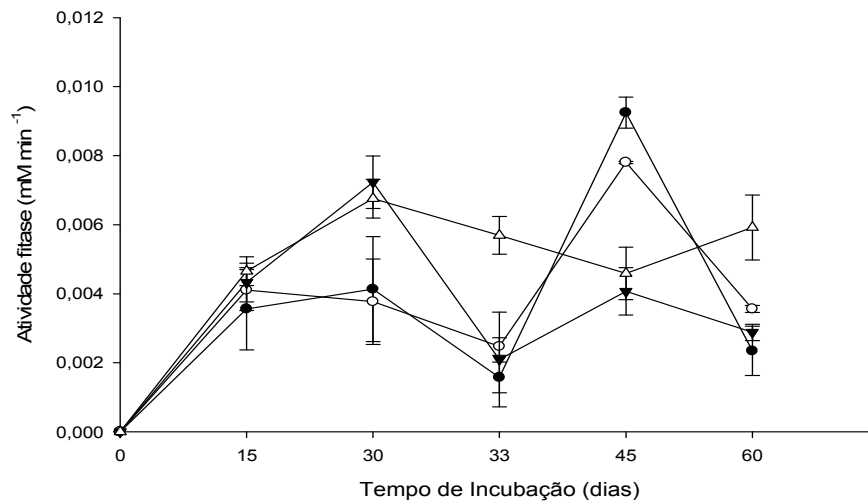
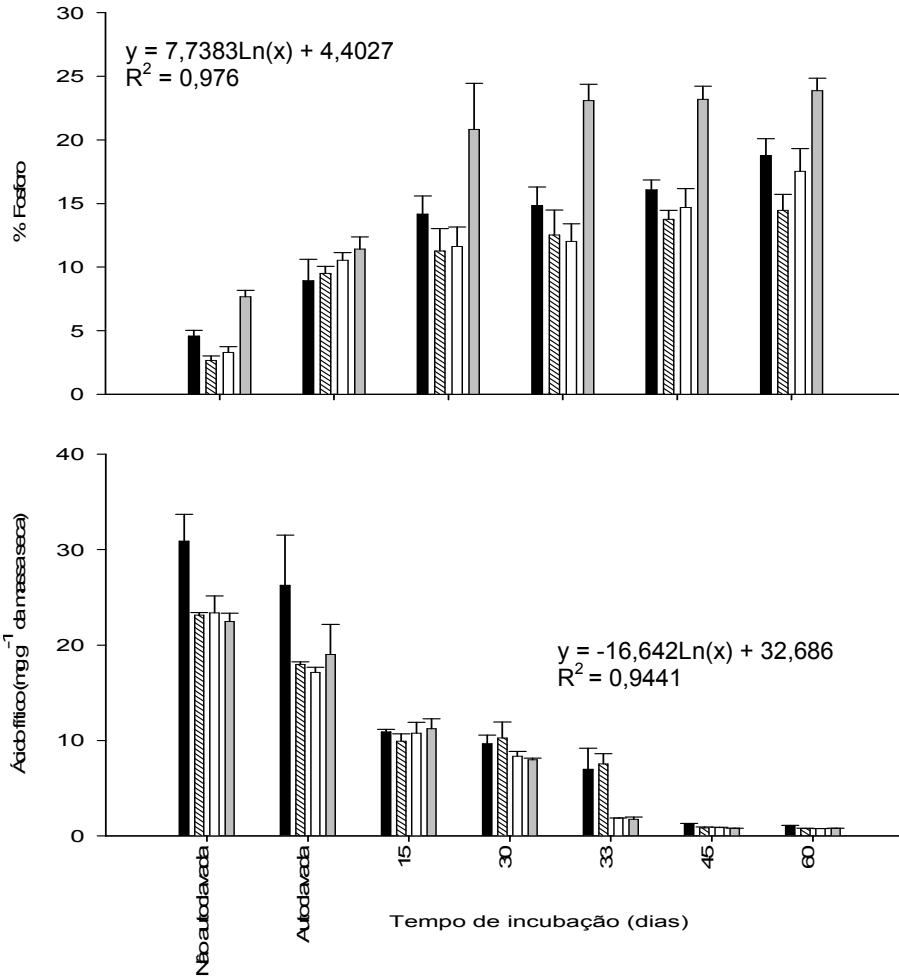
A concentração de fósforo foi crescente (Figura 8A) e a de ácido fítico decrescente (Figura 8B) em função do tempo de incubação, obtendo uma correlação negativa (11,32; $R^2 = 0,72$). A degradação desse ácido com a liberação de fósforo no meio foi acompanhada pela atividade da enzima fitase ao longo do período de incubação (Figura 8C).

A atividade de fitase foi capaz de reduzir em 95 % a concentração de ácido fítico. Este alto nível de degradação desse fator antinutricional pela atividade de fitase microbiana foi também mostrado em meio de cultura com adição de resíduos de colza (El-Bata & Karem, 2001) e também em diferentes alimentos (Carlson & Poulsen, 2003, Liang et al., 2009). Além da redução de ácido fítico, a adição de fitase em rações animais, objetiva a maior disponibilidade de minerais, tais como fósforo, cálcio, zinco, ferro (Ahmad et al., 2000; Liang, 2009), pois esse ácido forma complexos insolúveis com cátions di e polivalentes, comprometendo a biodisponibilidade desses minerais (Liu et al., 2008, Liang et al., 2009).

Pode-se concluir que *P. ostreatus* PLO 6 tem a capacidade de degradar fatores antinutricionais, como taninos e ácido fítico, presentes na torta de pinhão manso e nos outros substratos, possibilitando a utilização desses resíduos na ração animal. Além disso, a possibilidade da produção e da extração da enzima fitase para ser utilizada em alimentos ou como suplemento na ração de animais é promissora.

Figura 8: Percentagem de fósforo (A), concentração de ácido fítico (B) e atividade de fitase (C) de *Pleurotus ostreatus* PLO 6 durante 60 dias de incubação em substratos a base da torta de pinhão manso, conforme tabela 1. Modelo de regressão significativo ($p < 0,05$).

- Torta
- ▨ Torta + 10 % de serragem de eucalipto
- Torta + 10 % de casca de eucalipto
- ▤ Torta + 30 % de casca de café + 30 % de farelo de arroz



- Torta
- Torta + 10 % serragem de eucalipto
- ▼ Torta + 10 % de casca de eucalipto
- △ Torta + 30 % casca de café + 30 % farelo de arroz

3.4 – Produção de cogumelos

A produção de cogumelo de *P. ostreatus* PLO 6 nos substratos avaliados ocorreu após 30, 43 e 58 dias de incubação (Figura 2). A eficiência biológica foi influenciada pela composição do substrato e pelo tempo de incubação (Figura 9). Essa influência foi também mostrada em cultivo de *Grifola frondosa* em substrato à base de carvalho vermelho com suplementação de farelo de trigo, milho e centeio (Shen & Royse, 2001); *L. edodes* em bagaço de cana-de-açúcar adicionado de farelo de arroz e melaço (Rossi et al., 2003); *Pleurotus pulmonarius* em palha de arroz, sabugo de milho e casca de amendoim (Oliveira et al., 2007) e *P. ostreatus* em casca de café (Hernández et al., 2003) e em resíduos de madeira do Hawaii (Tisdale et al., 2006). A percentagem dessa eficiência biológica variou de 31 a 89 % na torta de pinhão manso e no substrato com casca de eucalipto, respectivamente (Figura 9).

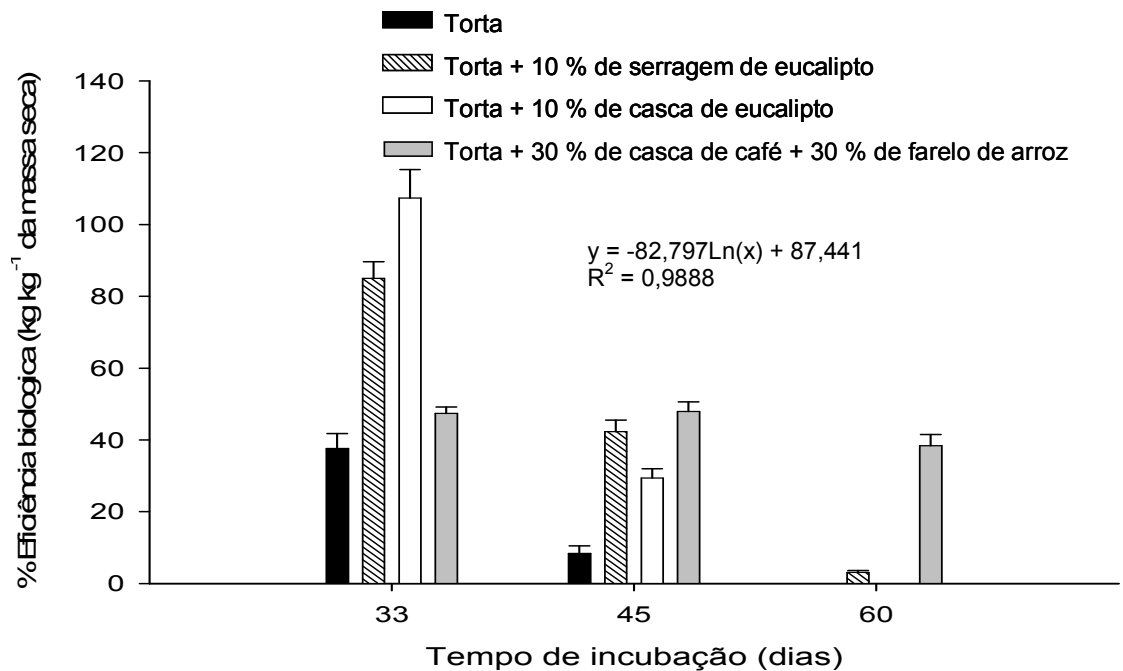


Figura 9: Eficiência biológica de *Pleurotus ostreatus* PLO 6, incubado por 60 dias em substrato a base da torta de pinhão manso, conforme tabela 1. Modelo de regressão significativo ($p < 0,05$).

Porcentagem dentro da mesma amplitude foi observada em fungos do gênero *Pleurotus* incubado em diferentes substratos (Wang et al., 2001; Curvetto et al., 2002, Yildiz et al., 2002; Hernández et al., 2003).

A raspagem e a adição de água nos substratos não estimularam a eficiência biológica (Figura 9) ou a produtividade (Tabela 4). Independente do substrato observou-se alta produtividade de cogumelos durante 60 dias de incubação, com a maior produção nos substratos com serragem e casca de eucalipto (Tabela 4). A produtividade total nesses substratos foi maior que cogumelos *P. pulmonarius* - CCB19 incubados, por 39 dias, em sabugo de milho, palha de arroz e casca de amendoim (Oliveira et al., 2007) e semelhante à produtividade de *P. ostreatus* cultivado em casca da semente de girassol, por 30 e 50 dias de incubação (Curvetto et al., 2002).

A composição nutricional dos cogumelos produzidos por *P. ostreatus* PLO 6 em substratos a base da torta pinhão manso (Tabela 1), mostra que esses cogumelos são alimentos ricos em proteínas, carboidratos, fósforo e pró-vitamina D (Tabela 5). Os teores de nutrientes encontrados estão de acordo com relato por Tewari (1986). Segundo esse autor, os cogumelos contêm de 85 a 95 % de água, 3 % de proteínas, 4 % carboidratos, 1 % de minerais e vitaminas. Porém, o teor desses nutrientes, principalmente proteínas, depende do substrato (Dundar et al., 2009). Dentre os minerais presentes nos cogumelos destaca-se potássio, fósforo, cobre, ferro e cálcio (Wang et al., 2001; Tisdale et al., 2006; Mikiashvili & Isikhuemhen, 2009). Os cogumelos *P. ostreatus* também são ricos em aminoácidos; fibras e vitaminas como tiamina, riboflavina, piridoxina e niacina (Wang et al., 2001; Dundar et al., 2009; Mikiashvili & Isikhuemhen, 2009). O teor de ergosterol presente nos cogumelos *P. ostreatus* PLO 6 incubados em substrato a base da torta de pinhão manso (Tabela 5) foi maior que cogumelos comerciais, desse mesmo gênero, obtidos em supermercados da região de Cingapura no sudeste Asiático (Jasinghe & Perera, 2005). Apesar de ter encontrado ácido fítico e baixo níveis de taninos em cogumelos comestíveis *Pleurotus tuber-regium* (Akindahunsi & Oyetayo, 2006), não foi determinado a presença desses fatores antinutricionais nos cogumelos *P. ostreatus* PLO 6 produzidos neste trabalho.

Tabela 4: Produtividade de cogumelo *P. ostreatus* PLO 6 incubado durante 60 dias em substrato a base da torta de pinhão manso

Tempo de incubação (dia)	Produtividade (g kg ⁻¹ da massa seca dia ⁻¹)			
	Substrato			
	1	5	12	16
33	9,491	21,456	27,121	11,969
45	1,545	7,838	5,438	8,884
60	0	0,433	0	5,340
Total	11,036	29,727	32,559	26,193

Tabela 5: Principais nutrientes encontrados nos cogumelos de *P. ostreatus* PLO 6 produzidos em substrato a base de pinhão manso após 60 dias de incubação

Compostos	mg 100 g ⁻¹ de cogumelo fresco
Proteína solúvel	37,27 ± 6,25
Monossacarídeos	41,22 ± 7,49
Fosfato	1,89 ± 0,62
Ácido fítico	nd
Taninos*	nd
Ergosterol	6,04 ± 0,24

nd – não determinado; * equivalente a ácido tânico

Foi evidenciada a presença de éster de forbol nos cogumelos de *P. ostreatus* PLO 6 e a presença desse composto foi decrescente em função do tempo de incubação (Tabela 6). Este resultado mostra que, ao aumentar o tempo de frutificação com a re-inoculação do fungo pode evitar a absorção pelos cogumelos. Porém, a concentração de forbol absorvida pelos cogumelos, independente do tempo de incubação (Tabela 6), foi menor que a concentração desses compostos encontrada em variedade de *J. curcas*, não tóxicas do México (Makkar et al., 1998). A variedade de *J. curcas* cultivada no México apresenta concentração de 0,11 mg g⁻¹ e não foi tóxica para peixes, ratos e frangos (Makkar

& Becker, 1997). Segundo esses autores, as sementes dessas variedades não tóxicas são consumidas por humanos e frangos. E ainda, em ratos alimentados com torta de *J. curcas* com concentração de 0,09 mg g⁻¹ não foi observado nenhum sintoma de doença ou perda de peso nos animais (Aregheore et al., 2003). Porém, concentrações maiores ou iguais a 0,8 mg g⁻¹ causou diarreia em porcos (Chivandi et al., 2006); redução do apetite, diarreia, atividade motora reduzida em ratos (Rakshit et al., 2008) e irritação e necrose na pele de ratos, coelhos e camundongo (Gandhi et al., 1995). A alta concentração desse composto causa também inibição da proteína quinase C em ratos (Silva et al., 1995; Moraes et al., 1996), em células do fibroblasto (Slater et al., 2002) e em células de levedura que expressam isoforma da proteína a kinase C de mamíferos (Saraiva et al., 2004). Portanto, os cogumelos *P. ostreatus* PLO 6 produzidos na torta de pinhão manso devem ser utilizados em experimentos com animais para comprovar a ausência de toxicidade.

Tabela 6: Compostos ésteres de forbol presentes nos cogumelos *P. ostreatus* PLO 6, produzidos em substrato a base de pinhão manso por 60 dias de incubação

Tempo de incubação (dia)	Forbol (µg g ⁻¹ de cogumelo fresco)
30	0,0813
43	0,00946
58	0,00945

4 - CONCLUSÕES

- *P. ostreatus* tem capacidade de degradar éster de forbol, ácido fítico e compostos ligninocelulósicos;
- *P. ostreatus* apresenta produtividade e eficiência biológica elevadas em substratos à base da torta de pinhão manso;
- Os cogumelos produzidos na torta de pinhão manso apresentam teor de éster de fobol em concentrações níveis consideradas não tóxicos, podendo ser indicado para o consumo, mas testes biológicos devem ser efetuados para comprovar a inexistência dos compostos tóxicos ou antinutricionais.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR, C. N.; AUGUR, C.; FAVELA-TORRES, E. & VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Induction and repression patterns of fungal tannase in solid-state and submerged cultures. **Process Biochemistry**, v. 36 , p. 565–570, 2001.
- AHMAD, T.; RASOOL, S.; SARWAR, M.; HAQ, A-UL & HASAN, Z-UL. Effect of microbial phytase produced from a fungus *Aspergillus niger* on bioavailability of phosphorus and calcium in broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, v.83, p. 103±-114, 2000.
- AHMED, W. A. & SALIMON, J. Phorbol ester as toxic constituents of tropical *Jatropha curcas* seed oil. **European Journal of Scientific Research**, v.31, p. 429-436, 2009.
- AKINDAHUNSI, A.A.& OYETAYO, F.L. Nutrient and antinutrient distribution of edible mushroom, *Pleurotus tuber-regium* (fries) singer. **Food Science and Technology**, v. 39, p. 548–553, 2006.
- ALEMAWOR, F.; DZOGBEFIA, V.P.; ODDOYE, E.O.K. & OLDHAM, J. H. Effect of *Pleurotus ostreatus* fermentation on cocoa pod husk composition: Influence of fermentation period and Mn²⁺ supplementation on the fermentation process. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 1950-1958, 2009.
- ALVAREZ, V.A. & VÁZQUEZ A. Thermal degradation of cellulose derivatives/starch blends and sisal fibre biocomposites. **Polymer Degradation and Stability**, v. 84, p. 13–21, 2004.
- AREGHEORE, E. M., BECKER, K. & MAKKAR, H.P.S. Detoxification of a toxic variety of *Jatropha curcas* using heat and chemical treatments, and preliminary nutritional evaluation with rats. **South Pacific Journal of Natural Science**, v. 21, p. 50-56, 2003.
- ARORA, D. S.; CHANDER, M. & GILL, P. K. Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase in degradation and selective ligninolysis of wheat straw. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 50, p. 115 – 120, 2002.
- BAILEY, M..J.; BIELY, P.; PANTONEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 257-270. 1992.
- BALDRIAN, P. & GABRIEL, J. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 206, p. 69-74, 2002.
- BALDRIAN, P. & GABRIEL, J. Lignocellulose degradation by *Pleurotus ostreatus* in the presence of cadmium. **FEMS Microbiology Letters**, v. 220, p. 235-240, 2003.
- BALDRIAN, P.; VALÁŠKOVÁ, V.; MERHAUTOVÁ, V. & GABRIEL, J. Degradation of lignocellulose by *Pleurotus ostreatus* in the presence of copper, manganese, lead and zinc. **Research in Microbiology**, v. 156, p. 670–676, 2005.

- BARCELOS, A. F.; PAIVA, P. C. A.; PÉREZ, J. R. O.; SANTOS, V. B. & CARDOSO, R. M. Fatores antinutricionais da casca e da polpa desidratada de café (*Coffea arabica* L.) armazenadas em diferentes períodos. **Revista Brasileira de Zootécnica**, v. 30, p. 1325-1331, 2001.
- BARR, D.P. & AUST, S.D. Mechanisms white-rot fungi use to degrade pollutants. **Environmental Science and Technology**, v. 28, p. 78-87, 1994.
- BASHA, S.D.; FRANCIS, G.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K.; & SUJATHA, M. A comparative study of biochemical traits and molecular markers for assessment of genetic relationships between *Jatropha curcas* L. germplasm from different countries. **Plant Science**, v. 176, p. 812–823, 2009.
- BATRA, A. & SAXENA, R.K. Potential tannase producers from the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. **Process Biochemistry**, v. 40, p.1553–1557, 2005.
- BATTESTIN, V. & MACEDO, G.A. Tannase production by *Paecilomyces variotii*. **Bioresource Technology**, v.98, pg.1832–1837, 2007.
- BERG, B. Litter decomposition and organic matter turnover in northern forest soils. **Forest Ecology and Management**, v. 133, p.13±22, 2000.
- BIRHANLI, E. & YESILADA, O. Increased production of laccase by pellets of *Funalia trogii* ATCC 200800 and *Trametes versicolor* ATCC 200801 in repeated-batch mode. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 1286–1293, 2006.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRAGA, J.M.; DEFELIPO, B.V. Determinação espectofotométrica de fósforo em extratos de solos e planta. **Revista Ceres**, Viçosa, v.21, (n.113), p.73-85, 1974.
- BUSWELL, J.; CAI, Y. J. e CHANG, S.T. Effect of nutrient nitrogen and manganese or manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. **Fems Microbiology Letter**, v.128, p. 81-88, 1995.
- CARLSON, D. & POULSEN, H. D. Phytate degradation in soaked and fermented liquid feed—effect of diet, time of soaking, heat treatment, phytase activity, pH and temperature. **Animal Feed Science and Technology**, v, 103, p. 141–154, 2003.
- CAVALLAZZI, J. R. P.; BRITO, M. S.; OLIVEIRA, M. G. A.; VILLAS-BÔAS, S. G. & KASUYA, M. C. M. Lignocellulolytic enzymes profile of three *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler strains during cultivation on eucalyptus bark-based médium. **Food, Agriculture and Environment**, v. 2, p. 291-297, 2004a.
- CAVALLAZZI, J.R.P.; OLIVEIRA, M.G.A. & KASUYA, M.C.M. Laccase production by *Lepista sordida*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p.261-263, 2004b.

- CHI, Y.; HATAKKA, A. & MAIJALA, P. Can co-culturing of two white-rot fungi increase lignin degradation and the production of lignin-degrading enzymes?. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 59, p. 32–39, 2007.
- CHIVANDI, E.; ERLWANGER, K.H.; MAKUZA, S.M.; READ, J.S. & MTIMUNI, J.P. Effects of dietary *Jatropha curcas* meal on percent packed cell volume, serum glucose, cholesterol and triglyceride concentration and alpha-amylase activity of weaned fattening pigs. **Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v. 1(1), p.18-24, 2006.
- COLLOPY, P. D. & ROYSE, D. J. Characterization of phytase activity from cultivated edible mushrooms and their production substrates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 7518-7524, 2004.
- CURVETTO, N.R.; FIGLAS, D., DEVALIS, R. & DELMASTRO S. Growth and productivity of different *Pleurotus ostreatus* strains on sunflower seed hulls supplemented with N-NH₄⁺ and/or Mn(II). **Bioresource Technology**, v.84, p. 171–176, 2002.
- DESHPANDE, S.S., DAMODARAN, S. Food legumes: chemistry and technology. **Advances in Cereal Science and Technology**, v.10, p.147-241, 1990.
- DUNDAR, A.; ACAY, H. & AND YILDIZ, A. Effect of using different lignocellulosic wastes for cultivation of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. On mushroom yield, chemical composition and nutritional value. **African Journal of Biotechnology**, v. 8 (4), p. 662-666, 2009.
- EL-BATAL, A.I. & H. KAREM, A. Phytase production and phytic acid reduction in rapeseed meal by *Aspergillus niger* during solid state fermentation. **Food Research International**, v. 34, p. 715–720, 2001.
- ELISASHVILI, V.; PENNINGCKX, M.; KACHLISHVILI, E.; TSIKLARI, 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**, v. 99, p. 457–462, 2008.
- FAN, L.; SOCCOL, A. T.; PANDEY, A.; VANDENBERGHE, L. P. S. & SOCCOL, C. R. Effect of caffeine and tannins on cultivation and fructification of *Pleurotus* on coffee husks. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 420-424, 2006.
- GANDHI, V. M., CHERIAN, K. M. & MULKY, M. J. Toxicological Studies on Ratanjyot Oil. **Food Chemical Toxicology**, v. 33, p. 39-42, 1995.
- GAO, Y., SHANGA, C., MAROOF, M.A.S., BIYASHEV, R.M., GRABAU, E.A., KWANYUEN, P., BURTON, J.W. & BUSS, G.R. A modified colorimetric method for phytic acid analysis in soybean. **Crop Science**, v. 47, p. 1797-1803, 2007.
- GIARDINA, P.; PALMIERI, G.; FONTANELLA, B.; RIVIECCIO, V. & SANNIA, G. Manganese peroxidase isoenzymes produced by *Pleurotus ostreatus* grown on wood sawdust. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 376, p. 171–179, 2000.

- GOEL, G., MAKKAR, H. P. S., FRANCIS, G. & BECKER, K. Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. **International Journal of Toxicology**, v. 26, p. 279-288, 2007.
- HAAS, W. & MITTELBACH, M. Detoxification experiments with seed oil from *Jatropha curcas* L. **Industrial Crops and Products**, v. 12, p. 111–118, 2000.
- HAMMAN, O. B.; RUBIA, T.L. & MARTÍNEZ, J. The effect of manganese on the production of *Phanerochaete favido-alba* ligninolytic peroxidases in nitrogen limited cultures. **FEMS Microbiology Letters**, v. 177, p. 137-142, 1999.
- HARAZONO, K.; NAKAMURA, KAZUNORI. Decolorization of mixtures of different reactive textile dyes by the white-rot basidiomycete *Phanerochaete sordida* and inhibitory effect of polyvinyl alcohol. **Chemosphere**, v. 59, p. 63–68, 2005.
- HARLAND, B. F., & HARLAND, J. Fermentative reduction of phytate in rye, white, and whole wheat breads. **Cereal Chemistry**, v. 57(3), pg. 226±229, 1980.
- HEINFLING, A., BERGBAUER, M. & SZEWZYK, U. Biodegradation of azo and phthalocyanine dyes by *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, p. 261-266, 1997.
- HERNÁNDEZ, D.; SÁNCHEZ, J. E. & YAMASAKI, K. A simple procedure for preparing substrate for *Pleurotus ostreatus* cultivation. **Bioresource Technology**, v. 90, p. 145–150, 2003.
- HIROTA, M., SUTTAJIT, M., SUGURI, H., ENDO, Y., SHUDO, K., WONGCHAI, V., HECKER, E. & FUJIKI, H. A new tumor promoter from the seed oil of *Jatropha curcas* L., an intramolecular diester of 12-deoxy-16-hydroxyphorbol. **Cancer Research**, v. 48, p. 5800-5804, 1988.
- HONGQIANG, L. & HONGZHANG, C. Detoxification of steam-exploded corn straw produced by an industrial-scale reactor. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 1447–1451, 2008.
- HUBLIK, G. & SCHINNER, F. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 330-336, 2000.
- IAMARINO, G.; RAO, M.A. & GIANFREDA, L. Dephenolization and detoxification of olive-mill wastewater (OMW) by purified biotic and abiotic oxidative catalysts. **Chemosphere**, v. 74, p. 216–223, 2009.
- JANDURA, P.; RIEDL, B. & KOKTA, B. V. Thermal degradation behavior of cellulose fibers partially esterified with some long chain organic acids. **Polymer Degradation and Stability**, v. 70, p. 387-394, 2000.
- JASINGHE, V.J. & PERERA, C.O. Distribution of ergosterol in different tissues of mushrooms and its effect on the conversion of ergosterol to vitamin D2 by UV irradiation. **Food Chemistry**, v. 92, p. 541–546, 2005.

- JUNG, H. G.; VALDEZ, F. R.; ABAD, A. R.; BLANCHETTE, R. A. & HATFIELD, R. D. Effect of white rot basidiomycetes on chemical composition and in vitro digestibility of oat straw and alfalfa stems. **Journal Animal Science**, v. 70, p. 1928-1935, 1992.
- KEREM, Z.; FRIESEM, D. & HADAR, Y. Lignocellulose degradation during solid-state fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p. 1121-1127, 1992.
- KIFANI-SAHBAN, F; KIFANI, A.; BELKBIR, L.; ZOULALIAN, A.; ARAUZO, J. & CARDERO, T. A physical approach in the understanding of the phenomena accompanying the thermal treatment of lignin. **Thermochimica Acta**, v. 298, p. 199-204, 1997.
- KOROLEVA, O.V.; STEPANOVA, E. V.; BINUKOV, V.I.; TIMOFEEV, V. P. & PFEI, W. Temperature-induced changes in copper centers and protein conformation of two fungal laccases from *Coriolus hirsutus* and *Coriolus zonatus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1547, p. 397-407, 2001.
- KUWAHARA, M., GLENN, J. K., MORGAN, M. A. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **FEMS Microbiology Letters**, v.169, p. 247-250, 1984.
- LATTA, M. & ESKIN, M. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.28, p. 1313-1315, 1980.
- LI, J.; LI, B. & ZHANG, X. Comparative studies of thermal degradation between larch lignin and manchurian ash lignin. **Polymer Degradation and Stability**, v.78, p. 279-285, 2002.
- LIANG, J.; HAN, B. Z.; M.J. NOUT, R. & HAMER, R. J. Effect of soaking and phytase treatment on phytic acid, calcium, iron and zinc in rice fractions. **Food Chemistry**, v. 115, p. 789-794, 2009.
- LIU, Z.; WANG, H.; WANG, X-E.; XU, H.; GAO, D.; ZHANG, G.; CHEN, P. & LIU, D. Effect of wheat pearling on flour phytase activity, phytic acid, iron, and zinc content. **Food Science and Technology**, v. 41, p. 521-527, 2008.
- LIU, L.; LIN, Z.; ZHENG, T.; LIN, L.; ZHENG, C.; LIN, Z.; WANG, S. & WANG, Z. Fermentation optimization and characterization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* strain 10969. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, p. 426-433, 2009.
- MAALEJ-KAMMOUN, M.; ZOUARI-MECHICHI, H.; BELBAHRI, L.; WOODWARD, S. & MECHICHI, T. Malachite green decolourization and detoxification by the laccase from a newly isolated strain of *Trametes* sp.. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, p. 600-606, 2009.
- MAJCHERCZYK, A., JOHANNES, C. & HÜTTERMANN, A. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 335-341, 1998.

- MAKKAR, H. P. S., BECKER, K., SPORER, F. & WINK, M. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 3152-3157, 1997.
- MAKKAR, H.P.S & BECKER, K. Potencial of *J. curcas* seed meal as a protein supplement to Livestock feed, constraints to its utilization and possible strategies to overcome constraints. Capítulo 4, In: GÜBITZ, G.M; MITTELBACH, M. & TRABI, M. **Biofuels and Industrial Products from *Jatropha curcas***. Nicarragua, 1997.
- MAKKAR, H.P.S, BECKER, K. & SCHMOOK, B. Edible provenances of *Jatropha curcas* from Quintana Roo state México and effect of roasting on antinutrient and toxic factors in seeds. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 52, p. 31-36, 1998.
- MAKKAR, H.P.S., BLUEMMEL, M. & BECKER, K., Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidone and polyethylene glycol with tannins and their implications in gas production and true digestibility in *in vitro* techniques, **British Journal Nutrition**, v. 73, p. 897–913, 1995.
- MANDELS, M.; ANDREOTTI, R. e ROCHE, C. Measurement of saccharifying cellulase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 6, p. 21-33, 1976.
- MARTÍNEZ-HERRERA, J.; SIDDHURAJU, P.; FRANCIS, G. DÁVILA-ORTÍZ, G. & BECKER, K. Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from México. **Food Chemistry**, v. 96, p. 80–89, 2006.
- MIKIASHVILI, N. A. & ISIKHUEMHEN, O. S. Productivity and Nutritional Content of Culinary-Medicinal Oyster Mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) P. Kumm. (Agaricomycetidae) Fruit Bodies Cultivated on Substrates Containing Solid Waste from Anaerobic Digested Poultry Litter. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 11(2), p. 207–213, 2009.
- MORAES, V. L. G.; RUMJANEK, V. M. & CALIXTO, J.B. Jatrophone and 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate antagonism of stimulation of natural killer activity and lymphocyte proliferation. **European Journal of Pharmacology**, v. 312, p. 333-339, 1996.
- MURUGESAN, K.; NAM, I-H.; KIM, Y-M. & CHANG, Y-S. Decolorization of reactive dyes by a thermostable laccase produced by *Ganoderma lucidum* in solid state culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p.1662–1672, 2007.
- OLIVEIRA, M. A.; DONEGA, M. A.; PERALTA, R. M. & SOUZA, C. G. M. Produção de inóculo do cogumelo comestível *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quélet - CCB19 a partir de resíduos da agroindústria. **Ciência Tecnologia Alimentos**. v. 27, p. 84-87, 2007.
- PALMIERI, G.; CENNAMO, G. & SANNIA, G. Remazol Brilliant Blue R decolourisation by the fungus *Pleurotus ostreatus* and its oxidative enzymatic system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, p.17–24, 2005.

- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. ; NIGAM, P.; BRAND, D.; MOHAN, R. & ROUSSOS, S. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, p. 153–162, 2000.
- PEREZ, J., DE LA RUBIA T., BEN HAMMAN, O., MARTINEZ, J. *Phanerochaete flavido-alba* laccase induction and modification of manganese peroxidase isoenzyme pattern in decolorized olive oil mill wastewaters. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 2726-2729, 1998.
- PISKUR B.; ZULE, J.; PISKUR, M. ; JURC, D.& POHLEVEN, F. Fungal wood decay in the presence of fly ash as indicated by gravimetrics and by extractability of low molecular weight volatile organic acids. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, p. 594–599, 2009.
- PORRES, J. M.; LÓPEZ-JURADO, M.; ARANDA, P. & URBANO, G. Bioavailability of Phytic Acid–Phosphorus and Magnesium From Lentils (*Lens culinaris* M.) in Growing Rats: Influence of Thermal Treatment and Vitamin–Mineral Supplementation. **Nutrition**, v. 20, p. 795-799, 2004.
- RAKSHIT, K.D.; DARUKESHWARA, J.; RAJ, K. R.; NARASIMHAMURTHY , K.; SAIBABA, P. & BHAGYA, S. Toxicity studies of detoxified *Jatropha* meal (*Jatropha curcas*) in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 3621–3625, 2008.
- RAMACHANDRAN, S.; ROOPESH, K.; NAMPOOTHIRI, K M.; SZAKACS, G. & PANDEY, A. Mixed substrate fermentation for the production of phytase by *Rhizopus* spp. using oilcakes as substrates. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1749–1754, 2005.
- RAVINDRAN, V.; CABAUG, S.; RAVINDRAN, G. & BRYDEN, W. L. Influence of Microbial Phytase on Apparent Ileal Amino Acid Digestibility of Feedstuffs for Broilers. **Poultry Science**, v.78, p. 699-706, 1999.
- REHMAN, Z. & SHAH, W.H. Thermal heat processing effects on antinutrients, protein and starch digestibility of food legumes. **Food Chemistry**, v. 91, p. 327–331, 2005.
- ROBERTSON, S. A.; MASON, S. L.; HACK, E. & Abbott, G. D. A comparison of lignin oxidation, enzymatic activity and fungal growth during white-rot decay of wheat straw. **Organic Geochemistry**, v. 39, p. 945–951, 2008.
- ROSSI, I. H.; MONTEIRO, A. C.; MACHADO, J. O.; ANDRIOLI, J. L. & BARBOSA, J. C. Shiitake (*lentinula edodes*) production on a sterilized bagasse substrate enriched with rice bran and sugarcane molasses. **Brazilian. Journal of Microbiology**, v.34, p. 66-71, 2003.
- RUGGERI, B., SASSI, G., 2003. Experimental sensitivity analysis of a trickle bed bioreactor for lignin peroxidase production by *Phanerochaete chrysosporium*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1669–1676, 2003.

- SARAIVA, L.; FRESCO, P.; PINTO, E. & GONÇALVES, J. Characterization of phorbol esters activity on individual mammalian protein kinase C isoforms, using the yeast phenotypic assay. **European Journal of Pharmacology**, v. 491, p. 101–110, 2004.
- SCHEIBNER, K., HOFRICHTER, M., FRITSCHKE, W. Mineralization of 2-amino-4,6-dinitrotoluene by manganese peroxidase of the white-rot fungus *Nematoloma frowardii*. **Biotechnology Letters**, v. 19, p. 835-839, 1997.
- SCHERER, M. & FISCHER, R. Molecular characterization of a blue-copper laccase, TILA, of *Aspergillus nidulans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 199, p. 207-213, 2001.
- SHARMA, S.; AGARWAL, L. & SAXENA, R.K. Purification, immobilization and characterization of tannase from *Penicillium variable*. **Bioresource Technology**, v.99, p. 2544–2551, 2008.
- SHEN, Q. & ROYSE, D. J. Effects of nutrient supplements on biological efficiency, quality and crop cycle time of maitake (*Grifola frondosa*). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, p. 74–78, 2001.
- SHI, J.; SHARMA-SHIVAPPA, R. R. & CHINN, M. S. Microbial pretreatment of cotton stalks by submerged cultivation of *Phanerochaete chrysosporium*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4388–4395, 2009.
- SILVA, A. M.; BRUM, R. L. & CALIXTO, J. B. The relaxant action of jatrophone in rat portal vein. A comparison with protein kinase C inhibitors. **Life Sciences**, v. 57, p. 863-871, 1995.
- SLATER, S. J.; HO, C. & STUBBS, C. D. The use of fluorescent phorbol esters in studies of protein kinase C–membrane interactions. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.116, p. 75–91, 2002.
- SOHAIL, S. S. & ROLAND D. A. SR. Influence of Supplemental Phytase on Performance of Broilers Four to Six Weeks of Age. **Poultry Science**, v. 78, p. 550–555, 1999.
- SVOBODOVÁ, K.; MAJCHERCZYK, A.; NOVOTNÝ, C. & KÜES, U. Implication of mycelium-associated laccase from *Irpex lacteus* in the decolorization of synthetic dyes. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 463–471, 2008.
- TEWARI, R.P., 1986. Mushroom cultivation. Extension Bulletin. Indian Institute of Horticulture Research, v.8, p. 36, 1986.
- TISDALE, T. E.; MIYASAKA, S. C. & HEMMES, D. E. Cultivation of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on wood substrates in Hawaii. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 201–206, 2006.
- TSIOULPAS, A., DIMOU, D., ICONOMOU, D. & AGGELIS, G. Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus spp.* in respect to their phenol oxidase (laccase) activity. **Bioresource Technology**, v. 84, p. 251-257, 2002.

- ULLAH, A. H. J. & PHILLIPPY, B. Q. Substrate Selectivity in *Aspergillus ficuum* Phytase and Acid Phosphatases Using myo-Inositol Phosphates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 423–425, 1994.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - UFV. **Sistema de análises estatísticas e genéticas - SAEG**. Versão 9.1. Viçosa, MG, 2006. 142p.
- VALÁSKOVA, V.; SNAJDR, J.; BITTNER, B.; CAJTHAMAL, T.; MERHAUTOVÁ, V.; HOFRICHTER, M. & BALDRIAN, P. Production of lignocellulose-degrading enzymes and degradation of leaf litter by saprotrophic basidiomycetes isolated from a *Quercus petraea* forest. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, p. 2651-2660, 2007.
- VAN DER POEL, A. F. B. . Effect of processing on antinutritional factors and protein nutritional value of dry beans. **Journal of Animal Feed Science and Technology**, v. 2, p. 179–208, 1990.
- VÁZQUEZ, G., GONZÁLEZ-ALVAREZ, J.; SANTOS, J.; FREIRE, M.S. & ANTORRENA, G. Evaluation of potential applications for chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. **Industrial Crops and Products**, v 29, p. 364–370, 2009.
- VITAL, B. R.; CARNEIRO, A. C. O.; PIMENTA, A. S.; LUCIA, R. M. D. Two Eucalypts Bark Tannin-Based Adhesive for Production of Flakeboards. **Revista Árvore**, v.28, p. 571-582, 2004.
- WANG, D.; SAKODA, A.; SUZUKI, M. Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. **Bioresource Technology**, v.78, p. 293-300, 2001.
- WONG, Y. S. & WANG, X. Degradation of tannins in spent coffee grounds by *Pleurotus sajor-caju*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 7, p. 573-574, 1991.
- WYSS, M.; BRUGGER, R.; KRONENBERGER, A.; RÉMY, R.; FIMBEL, R.; OESTERHELT, G. LEHMANN, M. & LOON, A. P. G. M. Biochemical Characterization of Fungal Phytases (*myo*-Inositol Hexakisphosphate Phosphohydrolases): Catalytic Properties. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 367–373, 1999.
- XIAO, B.; SUN, X.F. & SUN, R. Chemical, structural, and thermal characterizations of alkali-soluble lignins and hemicelluloses, and cellulose from maize stems, rye straw, and rice straw. **Polymer Degradation and Stability**, v.74, p. 307–319, 2001.
- YILDIZ, S.; YILDIZ, U.C.; GEZER, E. D. & TEMIZ, A. SOME lignocellulosic wastes used as raw material in cultivation of the *Pleurotus ostreatus* culture mushroom. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 301- 306, 2002.