

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BIOTECNOLOGIA

***Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720: AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO,  
PRODUÇÃO DE BASIDIOMA E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE  
PROTEOLÍTICA EM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

**TAMIRIS RIO BRANCO DA FONSECA**

MANAUS  
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BIOTECNOLOGIA

TAMIRIS RIO BRANCO DA FONSECA

***Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720: AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO,  
PRODUÇÃO DE BASIDIOMA E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE  
PROTEOLÍTICA EM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Professora Doutora Maria Francisca Simas Teixeira

MANAUS  
2013

Ficha Catalográfica  
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Fonseca, Tamiris Rio Branco da

F676p *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720: avaliação do crescimento, produção de basidioma e determinação da atividade proteolítica em resíduos agroindustriais / Tamiris Rio Branco da Fonseca. - Manaus: UFAM, 2013.

77 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Francisca Simas Teixeira

1. Cogumelos comestíveis - Cultivo 2. Fermentação – Biotecnologia 3. Produção de enzimas 4. Resíduos agroindustriais I. Teixeira, Maria Francisca Simas (Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU (2007): 635.82:663.15(043.3)

TAMIRIS RIO BRANCO DA FONSECA

***Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720: AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO,  
PRODUÇÃO DE BASIDIOMA E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE  
PROTEOLÍTICA EM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Aprovado em 02 de Maio de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Dr<sup>a</sup>. Maria Francisca Simas Teixeira

Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Dr<sup>a</sup>. Ormezinda Celeste Fernandes

Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Dr<sup>a</sup>. Ani Beatriz Jackisch Matsuura

Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Dedico esta dissertação a *meus pais* que em nenhum momento mediram esforços para garantir meus estudos, sem eles jamais chegaria aonde cheguei e a todos os que fizeram que eu seguisse sempre em frente, nunca pensando em desistir.

## **Agradecimentos**

À Universidade Federal do Amazonas, UFAM, que foi minha segunda, quase primeira casa durante essa fase e pela estrutura dos laboratórios.

Ao CNPq pela bolsa concedida durante esses dois anos, permitindo a participação em congressos e conseqüentemente à ampliação dos meus conhecimentos e horizontes.

A PPGBIOTEC pela oportunidade de aprender com seus professores e alunos.

À minha orientadora Dra. Maria Francisca Simas pelo incentivo, competência, profissionalismo e sugestões.

A Deus e a seus intercessores que permitiram a conclusão de mais essa fase da minha vida e que ao meu lado sempre estiveram nos momentos de dificuldades e de glórias.

A toda a minha família que me apoiou nos momentos difíceis, à minha mãe pelas palavras de incentivo, ao meu pai que mesmo em silêncio torceu por mim e à minha irmã pelos incentivos mesmo sem entender muito bem a minhas escolhas.

A Jéssica Barroncas que inúmeras vezes me ajudou nas atividades de laboratório e quando necessário me apoiou, incentivou e esteve do meu lado .

Ao Christiano Silva que ao me lado sempre esteve quando precisei, sendo um grande amigo e companheiro.

A todos do laboratório de Micologia, companheiras de trabalho, com os quais compartilhei momentos de alegria, estresse, tristeza e muitas risadas, tornando assim a minha vida de mestranda muito mais divertida.

Um agradecimento em especial a Nelly Vinhote e Larissa Kirsch que leram meus trabalhos sugerindo melhoras e ajudando quando precisei.

A Leonanda Albuquerque que em orações e pensamentos me deu forças para seguir em frente e não desistir na presença de um obstáculo.

## O Menestrel

Depois de algum tempo você aprende a diferença, a sutil diferença entre dar a mão e acorrentar uma alma. E você aprende que amar não significa apoiar-se. E que companhia nem sempre significa segurança. Começa a aprender que beijos não são contratos e que presentes não são promessas.

Começa a aceitar suas derrotas com a cabeça erguida e olhos adiante, com a graça de um adulto e não com a tristeza de uma criança.

Aprende a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do amanhã é incerto demais para os planos e o futuro tem o costume de cair em meio ao vão.

Depois de um tempo você aprende que o sol queima se ficar exposto por muito tempo.

E aprende que, não importa o quanto você se importe, algumas pessoas simplesmente não se importam... E aceita que não importa quão boa seja uma pessoa, ela vai feri-lo de vez em quando e você precisa perdoá-la por isso. Aprende que falar pode aliviar dores emocionais.

Descobre que se levam anos para construir confiança e apenas segundos para destruí-la... E que você pode fazer coisas em um instante das quais se arrependará pelo resto da vida.

Aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias. E o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida. E que bons amigos são a família que nos permitiram escolher.

Aprende que não temos de mudar de amigos se compreendemos que os amigos mudam...

Percebe que seu melhor amigo e você podem fazer qualquer coisa, ou nada, e terem bons momentos juntos. Descobre que as pessoas com quem você mais se importa na vida são tomadas de você muito depressa... Por isso sempre devemos deixar as pessoas que amamos com palavras amorosas; pode ser a última vez que as vejamos.

Aprende que as circunstâncias e os ambientes têm influência sobre nós, mas nós somos responsáveis por nós mesmos.

Começa a aprender que não se deve comparar com os outros, mas com o melhor que pode ser.

Descobre que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser, e que o tempo é curto.

Aprende que não importa aonde já chegou, mas para onde está indo... mas, se você não sabe para onde está indo, qualquer caminho serve.

Aprende que, ou você controla seus atos, ou eles o controlarão... e que ser flexível não significa ser fraco, ou não ter personalidade, pois não importa quão delicada e frágil seja uma situação, sempre existem, pelo menos, dois lados.

Aprende que heróis são pessoas que fizeram o que era necessário fazer, enfrentando as consequências.

Aprende que paciência requer muita prática.

Descobre que algumas vezes a pessoa que você espera que o chute quando você cai é uma das poucas que o ajudam a levantar-se.

Aprende que maturidade tem mais a ver com os tipos de experiência que se teve e o que você aprendeu com elas do que com quantos aniversários você celebrou.

Aprende que há mais dos seus pais em você do que você supunha. Aprende que nunca se deve dizer a uma criança que sonhos são bobagens... Poucas coisas são tão humilhantes e seria uma tragédia se ela acreditasse nisso.

Aprende que quando está com raiva tem o direito de estar com raiva, mas isso não te dá o direito de ser cruel. Descobre que só porque alguém não o ama do jeito que você quer que ame não significa que esse alguém não o ama com tudo o que pode, pois existem pessoas que nos amam, mas simplesmente não sabem como demonstrar ou viver isso.

Aprende que nem sempre é suficiente ser perdoado por alguém... Algumas vezes você tem de aprender a perdoar a si mesmo.

Aprende que com a mesma severidade com que julga você será em algum momento condenado.

Aprende que não importa em quantos pedaços seu coração foi partido, o mundo não vai parar para que você o conserte. Aprende que o tempo não é algo que possa voltar. Portanto, plante seu jardim e decore sua alma, em vez de esperar que alguém lhe traga flores.

E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida! Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar se não fosse o medo de tentar.

*William Shakespeare*



"Armas de fogo o meu corpo não alcançarão, facas e lanças se quebrarão sem o meu corpo tocar, cordas e correntes se arrebentarão sem o meu corpo amarrar. Eu estou vestido e armado com as armas de Jorge. Salve Jorge!".

## Resumo

Os cogumelos despertam interesse por apresentar alto valor nutricional e medicinal. Os representantes do gênero *Pleurotus* são capazes de crescer em diferentes resíduos agrícolas e agroindustriais, pois secretam inúmeras enzimas que hidrolisam os substratos elaborados a partir dos resíduos disponibilizando nutrientes. A busca por substratos alternativos cresceu nos últimos anos em virtude da disponibilidade de resíduos regionais pouco ou nunca utilizados na produção de cogumelos comestíveis. O uso de resíduos na fermentação semi-sólida vem despontando também na produção de enzimas. As proteases são o grupo de enzimas mais exploradas comercialmente, no entanto o uso de Basidiomicetos como produtores de proteases ainda é um tema pouco explorado. O objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento micelial, bem como investigar a produção e caracterizar parcialmente proteases extracelulares de *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720 em diferentes resíduos agroindustriais, selecionar uma mistura para produção dos basidiomas e verificar sua qualidade microbiológica e valor nutricional. As culturas foram preparadas em ágar batata dextrose acrescido de extrato de levedura 0,5% (p/v). O crescimento micelial vertical e a produção de proteases de *P. ostreatoroseus* foram realizados em resíduos agroindustriais (semente de açaí, serragem, casca de cupuaçu, farelo de arroz, casca e coroa de abacaxi) durante 15 dias, sob duas condições de cultivo (presença e ausência de luz). A produção do basidioma foi realizada no substrato que apresentou crescimento micelial satisfatório e micélio vigoroso. A partir desse bioprocessos foi avaliada a formação e desenvolvimento dos primórdios, tempo total de cultivo, eficiência biológica, produtividade, taxa de produção, perda de matéria orgânica, qualidade microbiológica e valor nutricional dos basidiomas. *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 cresceu em todos os resíduos agroindustriais testados, também servindo como fontes para a produção de proteases. Em casca de cupuaçu adicionado de farelo de arroz o micélio foi fortemente vigoroso e o crescimento micelial satisfatório, por isso selecionado para produção de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720. Nas condições experimentais a atividade proteolítica foi determinada nos extratos brutos provenientes dos substratos miceliados do crescimento micelial vertical com máxima atividade proteolítica (7,89 U/mL) em casca de cupuaçu adicionado de farelo de arroz na presença de luz. Este substrato foi o mais eficiente para a produção das proteases com atividade em pH 6,0 e temperatura ótima a 40°C. Os basidiomas apresentaram ausência de contaminantes, baixo teor de lipídios, alto teor de fibras e proteínas, macro e microminerais, aminoácidos essenciais e não essenciais, podendo assim ser inserido na alimentação como um alimento saudável e nutritivo.

Palavras-chave: cogumelo comestível, crescimento micelial vertical, protease

## Abstract

Mushrooms arouse interest for presenting high nutritional and medicinal value. The representatives of the genus *Pleurotus* are able to grow in different agricultural and agro-industrial waste, since they secrete numerous enzymes that hydrolyze the substrates prepared from waste providing nutrient. The search for alternative substrates increased in recent years due to the availability of regional waste little or never used in the production of edible mushrooms. The use of waste in solid-state fermentation has emerged also in the production of enzymes. Proteases are a group of enzymes commercially exploited, however the use of Basidiomycetes as producers of proteases is still a relatively unexplored. The aim of this study was to evaluate the mycelial growth as well as to investigate the production and partially characterize extracellular proteases from *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720 in different agro-industrial waste, selecting a mixture for the production of the mushroom and check their microbiological quality and nutritional value. Cultures were prepared in potato dextrose added yeast extract 0.5% (w/v). The vertical mycelial growth and production of proteases from *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 were performed in agro-industrial waste (acai seed, sawdust, cupuassu bark, rice bran, bark and pineapple crown) for 15 days under two growing conditions (presence and absence of light). The production of basidiomata was performed in the substrate which presented satisfactory mycelial growth and vigorous mycelium. From this bioprocess evaluated the formation and development of early basidiomata, total time of cultivation, biological efficiency, productivity, production rate, loss of organic matter, microbiological and nutritional value of the mushroom. *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 grew in all industrial residues also tested serving as sources for the production of proteases. In bark cupuaçu added rice bran mycelium was strongly vigorous and the mycelial growth satisfactory, therefore selected for the production of *P. ostreatoroseus* DPUA 1720. Under the experimental conditions the proteolytic activity was determined in crude extracts from the substrates of vertical mycelial growth with maximum proteolytic activity (7.89 U/mL) in bark cupuassu added rice bran in the presence of light. This substrate was the most efficient for the production of proteases with activity at pH 6.0 and optimum temperature at 40 °C. The basidiomata showed no contaminants, low in fat, high in fiber and protein, macro and micro minerals, essential and non-essential amino acids, may therefore be inserted into the feed as a safe and nutritious food.

Keywords: edible mushroom, mycelial vertical growth, protease.

## Lista de ilustrações e tabelas

Figura 1. Diversidade de cores do gênero <i>Pleurotus</i> .....	20
Figura 2. Características macroscópicas de <i>Pleurotus ostreatoroseus</i> . A – Basidioma sem presença de véu e lamelas não intervenosas; B – Conjunto de basidiomas.....	21
Tabela 1. Substratos utilizados para avaliar o crescimento micelial vertical: (1) substrato base (Sac = Semente de açaí, CC = casca de cupuaçu, SER = serragem) e (2) substrato suplementar (CsAb = casaca de abacaxi triturada. CrAb = coroa de abacaxi triturada, FA = farelo de arroz) .....	26

## CAPÍTULO I

Tabela 1. Substratos utilizados para avaliar o crescimento micelial vertical: (1) substrato base, semente de açaí (Sac); serragem (SER); casca de cupuaçu (CC) e (2) substrato suplementar, casca de abacaxi (CsAb); coroa de abacaxi (CrAb); farelo de arroz (FA).....	36
Tabela 2. Média da velocidade do crescimento micelial vertical e vigor micelial de <i>P. ostreatoroseus</i> em resíduos agroindustriais na presença e ausência de luz.....	41
Tabela 3. Média da composição centesimal dos substratos agroindustriais utilizados na fermentação semi-sólida de <i>P. ostreatoroseus</i> .....	43
Tabela 4. Parâmetros analisados durante a produção de <i>P. ostreatoroseus</i> em casca de cupuaçu suplementado com 20% de farelo de arroz.....	43
Tabela 5. Análise físico-química dos basidiomas de <i>P. ostreatoroseus</i> produzidos em casca de cupuaçu suplementado com 20% de farelo de arroz.....	45
Tabela 6. Concentração de aminoácidos presentes nos basidiomas de <i>P. ostreatoroseus</i> .....	46

## CAPÍTULO II

Tabela 1. Substratos agroindustriais e porcentagens utilizadas na fermentação semi-sólida para crescimento e produção de proteases por *P. ostreatoroseus*..... 57

Figura 1. Média da atividade de proteases produzida por *P. ostreatoroseus* em substratos agroindustriais durante 15 dias por fermentação semi-sólida, em duas condições de cultivo, presença e ausência de luz. CC+FA (casca de cupuaçu+farelo de arroz); Sac+CsAb (semente de açaí+casca de abacaxi); Sac+CrAb (semente de açaí+coroa de abacaxi); SER+CsAb (Serragem+casca de abacaxi); SER+CrAb (Serragem+ coroa de abacaxi)..... 60

Figura 2. Efeito da temperatura na atividade das proteases de *P. ostreatoroseus* produzidas por fermentação semi-sólida em substratos agroindustriais durante 15 dias na presença (A) e ausência de luz (B). CC+FA (casca de cupuaçu+farelo de arroz); Sac+CsAb (semente de açaí+casca de abacaxi); Sac+CrAb (semente de açaí+coroa de abacaxi); SER+CsAb (Serragem+casca de abacaxi); SER+CrAb (Serragem+ coroa de abacaxi)..... 61

Figura 3. Efeito do pH na atividade das proteases de *P. ostreatoroseus* produzidas por fermentação semi-sólida em substratos agroindustriais durante 15 dias na presença (A) e ausência de luz (B). CC+FA (casca de cupuaçu+farelo de arroz); Sac+CsAb (semente de açaí+casca de abacaxi); Sac+CrAb (semente de açaí+coroa de abacaxi); SER+CsAb (Serragem+casca de abacaxi); SER+CrAb (Serragem+ coroa de abacaxi)..... 62

## Sumário

1. Introdução .....	15
2. Revisão bibliográfica.....	17
2.1. Cogumelos.....	17
2.2. Industrialização e consumo dos cogumelos .....	17
2.3. Fermentação em estado sólido ou semi-sólida.....	18
2.4. Gênero <i>Pleurotus</i> .....	20
2.5. Enzimas .....	21
3. Objetivos.....	24
3.1. Objetivo Geral .....	24
3.2. Objetivos Específicos.....	24
4. Material e Métodos .....	25
4.1. Cogumelo e preparação de cultura matriz.....	25
4.2. Fermentação Semi-Sólida .....	25
4.2.1. Aquisição e preparo do substrato .....	25
4.2.2. Avaliação do crescimento micelial vertical .....	25
4.3. Atividade proteolítica.....	26
4.3.1. Extração das enzimas .....	26
4.3.2. Ensaio enzimático: determinação da atividade proteolítica.....	26
4.3.3. Determinação do efeito do pH e da temperatura .....	27
4.4. Produção do basidioma em resíduo agroindustrial .....	27
4.4.1. Preparação do substrato para produção do <i>spawn</i> .....	27
4.4.2. Produção de <i>spawn</i> .....	27
4.4.3. Produção de basidiomas de <i>P. ostreatoroseus</i> DPUA 1720 em resíduo agroindustrial .....	28
4.5. Determinação da perda de matéria orgânica do substrato (PMO) .....	28
4.6. Determinação da característica físico-química dos resíduos agroindustriais e dos basidiomas de <i>Pleurotus ostreatoroseus</i> DPUA 1720 .....	29

4.7.	Determinação de minerais do basidioma de <i>P. ostreatoroseus</i> DPUA 1720.....	29
4.8.	Determinação de aminoácidos do basidioma de <i>P. ostreatoroseus</i> DPUA 1720 .....	30
4.9.	Análise microbiológica do basidioma desidratado de <i>P. ostreatoroseus</i> DPUA 1720..	30
4.9.1.	Determinação de bolores e leveduras .....	30
4.9.2.	Determinação do Número Mais Provável (NMP.g <sup>-1</sup> ) de coliformes totais e termotolerantes .....	31
4.9.3.	Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp. ....	31
4.9.4.	Quantificação de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulase positiva .....	31
4.9.5.	Quantificação de <i>Bacillus cereus</i> .....	32
4.10.	Análise Estatística.....	32
CAPÍTULO I .....		33
CARACTERIZAÇÃO DO CRESCIMENTO E POTENCIAL NUTRICIONAL DE <i>Pleurotus ostreatoroseus</i> DPUA 1720 .....		33
CAPÍTULO II.....		55
PRODUÇÃO EM MATRIZ SÓLIDA E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS PROTEASES DE COGUMELO COMESTÍVEL DA FLORESTA AMAZONICA.....		55
4.	Conclusão .....	67
Referências Bibliográficas .....		68
ANEXO 1.....		77

## 1. Introdução

Os fungos do gênero *Pleurotus*, conhecidos por causar a podridão branca da madeira, apresentam a capacidade de se desenvolver em vários resíduos agroindustriais que contenham celulose, hemicelulose, lignina, amido, pectina e proteínas. (FIGUEIRÓ e GRACIOLLI, 2011; MINOTTO et al., 2011). *Pleurotus ostreatoroseus* Sing., assim como outros representantes do gênero ocorre em áreas tropicais, crescendo bem em temperaturas superiores a 20 °C. Trata-se de uma espécie que apresenta véu ausente, lamelas não intervenosas, metulóides ausentes, camada cortical de píleo com elementos de parede lisa, esporos geralmente cilíndricos e basidioma carnoso, destacando-se principalmente por sua coloração rósea e excelente sabor do corpo de frutificação (PUTZKE, 2002; ROSADO et al., 2002; MENOLLI JUNIOR et al., 2010; OMARINI et al., 2010).

A fermentação semi-sólida desempenha um papel de destaque no aproveitamento de resíduos sólidos como palhas, gramíneas, serragens, cascas de frutas, sabugo de milho, bagaço de cana-de-açúcar e outros de natureza orgânica. Essa metodologia vem sendo aplicada no enriquecimento protéico de resíduos agroindustriais para alimentação humana e animal, na detoxificação de resíduos, eliminando substâncias recalcitrantes e na produção de compostos de alto valor agregado para as indústrias a partir de matéria-prima de baixo ou nenhum custo, como no cultivo de cogumelos comestíveis, produção de enzimas e outros metabólitos (PINTO et al., 2005; SALES-CAMPOS et al., 2010; AGUIAR et al., 2011; PALHETA et al., 2011; REGINA et al., 2012).

No Brasil, os cogumelos são cultivados tradicionalmente em bagaço de cana-de-açúcar, porém em virtude da escassez eminente desse resíduo, a busca por substratos alternativos para serem utilizados na fermentação semi-sólida cresceu bastante nos últimos anos. A literatura descreve o uso de diversos resíduos agroindustriais no cultivo de *P. ostreatoroseus* como resíduo de algodão, bagaço de cana-de-açúcar, palha de soja, sabugo de milho, capim-elefante, aveia, azevém, girassol, serragem de eucalipto, ligustre, entre outros, suplementados ou não, assim como em diferentes concentrações de suplemento. As finalidades são direcionadas para o conhecimento das melhores condições de crescimento, cultivo e produtividade da espécie (ROSADO et al., 2002; DONINI et al., 2005; BERNARDI et al., 2007; MINOTTO et al., 2008; CEITA et al., 2009; REIS et al., 2010).

Além do potencial nutricional e medicinal, os cogumelos também são fontes de enzimas, sintetizadas e secretadas durante a degradação do substrato para obtenção de nutrientes e



presentes também no basidioma. As enzimas apresentam natureza altamente seletiva e elevada atividade em concentrações muito baixas, mas um alto custo de produção. Nos últimos anos este problema foi solucionado com o uso de resíduos agrícolas, florestais e agroindustriais, tornando o bioprocesso economicamente viável e limpo (AMARAL, 1995; CARVALHO et al., 2012; STROPARO et al., 2012).

As proteases, assim denominadas por catalisar a hidrólise de proteínas, representam um dos três maiores grupos de enzimas com histórico nas indústrias de alimento e detergentes, sendo também utilizadas na indústria têxtil, cosméticos e medicamentos, assim atraindo a atenção mundial para explorar suas aplicações fisiológicas e biotecnológicas (RAO et al., 1998; GENÇKAL, 2004; NASCIMENTO et al., 2007; ZIMMER et al., 2009; DABOOR et al., 2010; ORLANDELLI et al., 2012).

Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento micelial, selecionar uma mistura para produção dos basidiomas, verificar a qualidade microbiologia e valor nutricional, bem como investigar a produção e caracterizar parcialmente proteases extracelulares de *Pleurotus ostreatoroseus* em diferentes resíduos agroindustriais.

## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1. Cogumelos

Os cogumelos têm ocupado um papel primordial na alimentação humana por serem ricos em proteínas, fibras, vitaminas, minerais e baixo teor de lipídios, também apresentam aroma e textura agradável. Inclusive podem ser utilizados como uma alternativa para suprir a deficiência protéica na alimentação humana (GENÇCELEP et al., 2009; LEMOS, 2009; REIS et al., 2010; PALHETA et al., 2011; SALES-CAMPOS et al., 2011). A sua utilização na medicina preventivo-curativa ocorre há milhares de anos. Algumas espécies com potencial medicinal são fontes de diversos compostos que expressam atividade antioxidante, antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória, imunomodulatória, antiviral, hipocolesterolêmica e efeitos positivos sobre hipoglicemia e funções cardíacas (HI e BACH, 2006; TAVEIRA e NOVAES, 2007; BARROS et al., 2008; FERDINANDI e ROSADO, 2008; GERN et al., 2008; MEHTA et al., 2011).

O número estimado de espécies de cogumelos no mundo é de 140.000, sendo 700 conhecidas por suas propriedades farmacológicas e 2.000 comestíveis, apenas 25 são normalmente utilizadas na alimentação humana e um número ainda menor é produzido para comercialização (FURLANI e GODOY, 2007).

### 2.2. Industrialização e consumo dos cogumelos

A produção mundial de cogumelos foi estimada, no ano de 2011, em cerca de 7,7 milhões de toneladas, destacando-se como maiores produtores a China e a União Européia (FAO, 2013). Entre as espécies cultivadas e comercializadas em larga escala podemos citar: *Pleurotus ostreatus*, *Agaricus brasiliensis*, *Agaricus brunescens*, *Agaricus bisporus*, *Agaricus bitorquis*, *Lentinula edodes*, *Volvariella volvacea*, *Flamulina velutipes* e *Ganoderma lucidum* (FURLANI e GODOY, 2007; TAVEIRA e NOVAES, 2007; MARINO e ABREU, 2009; COLAUTO et al., 2010; REIS et al., 2010; UDDIN et al., 2011).

No mercado mundial, o shiitake (*Lentinus edodes*) detém o terceiro lugar em volume de produção, ou seja, 10% do total produzido no mundo; em segundo lugar, as várias espécies de *Pleurotus*, representando 25% da produção mundial, devido aos seus valores nutricionais e medicinais, em primeiro lugar, o champignon (*Agaricus bisporus*) representando cerca de 38% dos cogumelos produzidos no mundo (STURION e RANZANI, 2000; VILELA, 2003; SAMPAIO e QUEIROZ, 2006; FIGUEIRÓ, 2009).

No Brasil, a maior área produtora localiza-se em São Paulo com uma produção de aproximadamente 6 mil toneladas segundo o Censo Agropecuário do IBGE (2006). Outro estado

com grande potencial é o Paraná que vem aumentando a produção, abastecendo 5% do mercado nacional (LEMOS, 2009). Para que esta produção possa ser aumentada, muitas pesquisas têm sido realizadas a fim de promover o aperfeiçoamento de técnicas que possibilitem a redução dos custos de produção e que resultem em menor custo ao consumidor, estimulando assim o consumo e a comercialização (FERDINANDI e ROSADO, 2008; REIS et al., 2010).

O consumo de cogumelos no Brasil é baixo e restrito ao champignon (*Agaricus bisporus*), devido à falta de hábito do consumidor, ao custo elevado e à pequena disponibilidade do produto no mercado. Contudo, o consumo vem crescendo significativamente devido à busca por alimentos saudáveis e com a popularização do cultivo e industrialização. No entanto as maiores barreiras encontradas na comercialização de cogumelos no Brasil estão ligadas à crença popular quanto à sua natureza venenosa, preço alto, hábito alimentar e ao cultivo com baixa produtividade (DIAS et al., 2003; REFFATTI et al., 2006; TAVEIRA e NOVAES, 2007; LEMOS, 2009).

As condições climáticas favoráveis para o cultivo de cogumelos no Brasil lhe garantem o *status* de maior produtor mundial do cogumelo nativo *Agaricus blazei*, porém os mais consumidos ainda são o *champignon* de Paris (*Agaricus bisporus*), shiitake (*Lentinus edodes*) e o shimeji ou hiratake (*Pleurotus* spp.), sendo 95% da produção exportada para o Japão (FURLANI e GODOY, 2007; CEITA et al., 2009).

### **2.3. Fermentação em estado sólido ou semi-sólida**

A fermentação semi-sólida (FSS), também chamada de fermentação sólida ou em estado sólido, é um processo em que o micro-organismo se desenvolve na superfície de materiais sólidos, que apresentam a propriedade de absorver ou de conter água, com ou sem nutrientes solúveis. Esse processo, atualmente, destaca-se no aproveitamento de resíduos agrícolas e/ou agroindustriais e florestais, pois melhora o saneamento do ambiente e gera indústrias secundárias. A FSS é aplicada comercialmente na compostagem de resíduos, valorização de produtos lignocelulósicos e fibras alimentares, assim como um método para a produção de enzimas de importância industrial como de outros metabólitos (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004; SANTOS et al., 2006).

Alguns aspectos importantes devem ser considerados para o desenvolvimento de qualquer bioprocessamento em FSS como a escolha adequada do micro-organismo, do substrato e a otimização dos parâmetros físico-químicos (umidade inicial, tamanho das partículas do substrato, temperatura de incubação, entre outros). Para o cultivo de cogumelos, inúmeros trabalhos são

realizados visando esses aspectos para obtenção de bons resultados quanto à velocidade de crescimento, vigor do micélio, produção, disponibilidade e custo dos resíduos, além da redução de riscos de contaminação por outros fungos e bactérias (PANDEY, 2003; DONINI et al., 2006; SANTOS et al., 2006; BERNARDI et al., 2007; AGUIAR et al., 2011).

O *Agaricus bisporus* (*champignon* de Paris), a primeira espécie cultivada no Brasil, é também a primeira consumida mundialmente. Um estudo realizado por Peil et al. (1995) mostra que o seu cultivo é realizado em compostos formulados com dois tipos de palhas (arroz e trigo), estes diferindo apenas quanto ao tempo de compostagem.

Os fungos do gênero *Pleurotus* apresentam algumas vantagens de cultivo em relação ao gênero *Agaricus* e outros cogumelos comestíveis, principalmente por não serem exigentes quanto ao substrato. A casca da banana como substrato no cultivo de *Pleurotus* spp. apresenta maior média de crescimento radial durante o desenvolvimento micelial frente à casca do abacaxi, a do maracujá e a serragem. Substratos ácidos, como a casca do abacaxi, retardam ou inibem o crescimento micelial (RIVAS et al., 2010).

Segundo Bernardi et al. (2007), o crescimento varia de acordo com o substrato. Para *Pleurotus ostreatoroseus* a maior velocidade de crescimento pode ser observada em casca de arroz ou em resíduo de algodão e ligustre, mas com um micélio pouco vigoroso baseado na densidade visual das hifas (BERNARDI et al., 2007; RIVAS et al., 2009).

O meio de cultivo a base de capim-elefante favorece o crescimento micelial de *Pleurotus ostreatus* (linhagem BF24) e *Pleurotus ostreatoroseus* (DONINI et al., 2005) e também o aumento da massa micelial quando suplementado a 20% de farelo de soja e arroz. O tipo e a quantidade de farelo, adicionado ao substrato pode interferir na massa e no crescimento do micélio (Minotto et al., 2008) como apresentado na pesquisa realizada por Dias et al. (2003) onde a suplementação da palha de feijão tornou o tempo de crescimento de *Pleurotus sajor-caju* duas vezes maior. Já Gonçalves et al. (2010) verificam a suplementação do resíduo de algodão com 20% de farelo de trigo necessário para o melhor crescimento de *P. sajor-caju*.

Yildiz et al. (2002) testou vários substratos lignocelulósicos para a produção de *Pleurotus ostreatus* em diferentes concentrações e com ou sem suplementação. As combinações mais adequadas para o alto rendimento foram folhas de *Populus tremula* suplementada com resíduo de papel a 50% e palha de trigo suplementada, respectivamente, com 50% de resíduo de papel e 50% de folhas de avelã com 20% de resíduo de papel. Outros substratos como serragem de marupá, serragem de pau de balsa, bagaço de cana-de-açúcar e estipe de pupunheira, também

possuem alta eficiência biológica para o cultivo de *P. ostreatus*, com destaque para estipe de pupunheira com 100% de eficiência (SALES-CAMPOS et al., 2010).

#### 2.4. Gênero *Pleurotus*

Os cogumelos do gênero *Pleurotus*, conhecidos popularmente como cogumelos ostra, são encontrados em florestas tropicais e subtropicais. Diversas linhagens apresentam uma grande variedade de cores (Figura 1), que vão do branco ao cinza-escuro, marrom, amarelo, salmão, entre outras, que variam de acordo com a espécie, incidência de luz durante a frutificação, necessidades nutricionais, tempo de incubação e temperatura (MARINO et al., 2008; OMARINI et al., 2010; REIS et al., 2010).

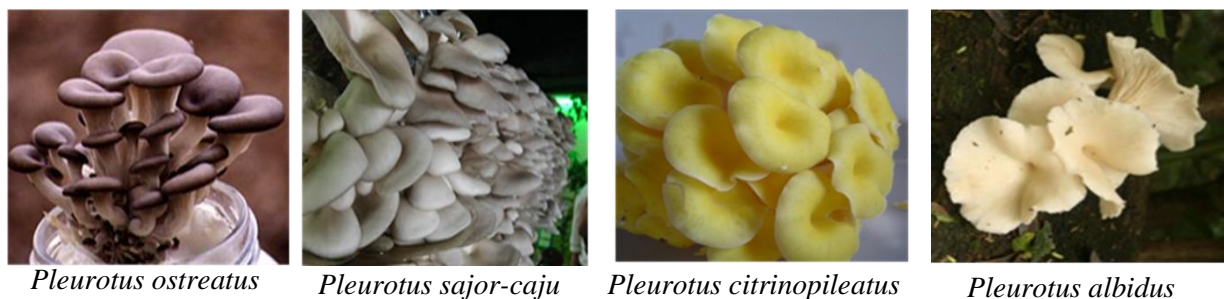


Figura 1. Diversidade de cores do gênero *Pleurotus*.

Os cogumelos ostras são de fácil cultivo e processo de produção a baixo custo, pois secretam enzimas (celulases, hemicelulases, lignases) eficientes na decomposição de resíduos agrícolas e agroindustriais como gramíneas, sabugo de milho, palhas e casca de cereais, polpa e casca de frutas, caule e folhas de bananeira, bagaço de cana-de-açúcar, serragens e outros aproveitando a disponibilidade de cada região (MINOTTO et al., 2008; MARINO e ABREU, 2009; AGUIAR et al., 2011; PALHETA et al., 2011) para a obtenção de nutrientes, carbono e nitrogênio para o seu crescimento (FERDINANDI e ROSADO, 2008; MINOTTO et al., 2008; JAFARPOUR et al., 2010; AGUIAR et al., 2011; KARAM et al., 2011; MINOTTO et al., 2011).

Essa capacidade de colonizar diferentes substratos é bastante explorada por ser uma alternativa para o aproveitamento de resíduos, diminuindo assim a poluição do ambiente (RIVAS et al., 2009; SALES-CAMPOS et al., 2011). A adaptação de linhagens de *Pleurotus* spp., inclusive das selvagens a novos substratos possibilita um maior conhecimento sobre suas exigências de cultivo, proporcionando o estabelecimento de novas técnicas.

*Pleurotus ostreatoroseus* Sing., assim como outros representantes do gênero ocorre em áreas tropicais, crescendo bem em temperaturas superiores a 20 °C. Trata-se de uma espécie com véu ausente, lamelas não intervenosas, metulóides ausentes, camada cortical de píleo com elementos de parede lisa, esporos geralmente cilíndricos e basidioma carnoso, destacando-se principalmente por sua coloração rósea e excelente sabor do corpo de frutificação (Figura 2) (PUTZKE, 2002; ROSADO et al., 2002; MENOLLI JUNIOR et al., 2010; OMARINI et al., 2010).

A literatura descreve o uso de diversos resíduos agroindustriais no cultivo de *P. ostreatoroseus* como resíduo de algodão, bagaço de cana-de-açúcar, palha de soja, sabugo de milho, capim-elefante, aveia, azevém, girassol, serragem de eucalipto, ligustre, entre outros suplementados ou não, assim como em diferentes concentrações de suplemento. As finalidades são direcionadas para o conhecimento das melhores condições de crescimento, cultivo e produtividade da espécie (ROSADO et al., 2002; DONINI et al., 2005; BERNARDI et al., 2007; MINOTTO et al., 2008; REIS et al., 2010).

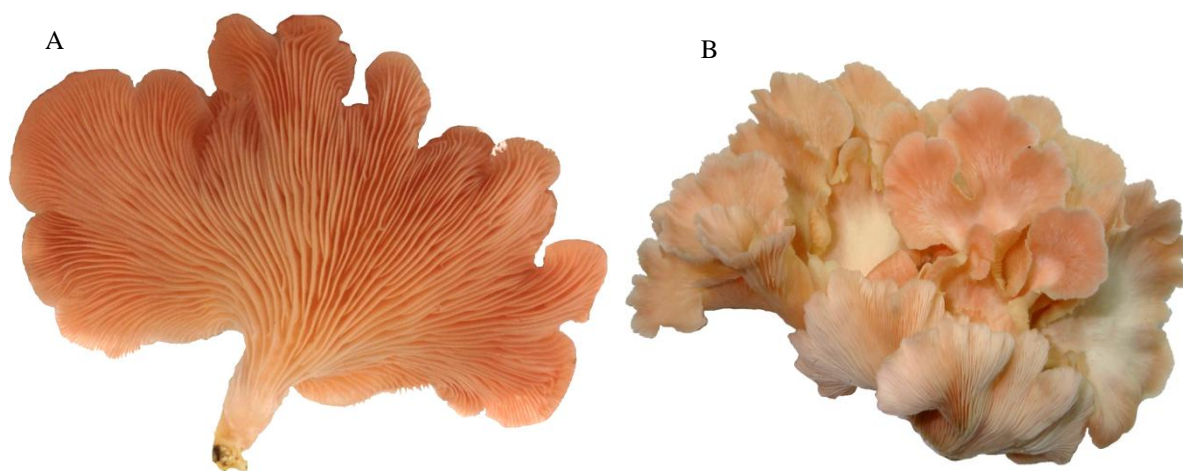


Figura 2. Características macroscópicas de *Pleurotus ostreatoroseus*. A – Basidioma sem presença de véu e lamelas não intervenosas; B – Conjunto de basidiomas.

## 2.5. Enzimas

As enzimas são biocatalisadores bastante específicos quanto a sua função, sendo capazes de aumentar várias vezes algumas reações, sem requerer condições extremas de pH, pressão e temperatura. Atualmente, é um importante ramo de pesquisa em Biotecnologia, por conta de seu importante papel nos mecanismos celulares e também por seu potencial de aplicação na substituição de processos químicos convencionais (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004; OLIVEIRA et al., 2006; SENA et al., 2006).

As enzimas ocorrem amplamente em plantas e animais, mas as de origem microbiana são principalmente utilizadas na indústria, uma vez que possuem ampla diversidade bioquímica, baixo custo na produção de metabólito e susceptibilidade a manipulação genética. O uso de micro-organismos também permite o cultivo em meio líquido ou sólido, produção em larga escala, tempo relativamente curto e uso de matéria prima pouco dispendiosa como resíduos agroindustriais, florestais e agrícolas (OLIVEIRA et al., 2006; BON et al., 2008; ZIMMER et al., 2009).

Os fungos produzem uma grande variedade de enzimas hidrolíticas, necessárias para o crescimento e manutenção do organismo, ativas em uma ampla faixa de pH (4 a 11) e com melhor desempenho em temperaturas entre 30 °C e 70 °C. As proteases são o grupo mais explorado comercialmente, sendo as de origem microbiana responsáveis por quase 40% da venda mundial de enzimas em virtude da larga aplicação nas indústrias de detergentes, alimentos (laticínios, carnes, panificação), têxtil, manufatura de couros, fármacos, entre outras (RAO et al., 1998; ESPOSITO e AZEVEDO, 2004; ORLANDELLI et al., 2012).

Diversos fungos são descritos como produtores de proteases, mas o uso de basidiomicetos comestíveis não é muito explorado. Alguns trabalhos têm estudado enzimas de modo geral provenientes do basidioma, excretadas durante e após o cultivo em resíduos agroindustriais, florestais e agrícolas.

Proteases dos basidiomas de *Pleurotus eryngii* foram isoladas e caracterizadas quanto a suas propriedades bioquímicas e enzimáticas. A atividade proteolítica variou de 184 U/mg a 9364 U/mg de acordo com o estágio de purificação, o peso molecular foi de 11,5 kDa, apresentando assim uma pequena similaridade com aspártico protease (WANG e NG, 2001; CHA et al., 2010). Cui et al. (2007) determinou a sequência N-terminal, massa molecular, temperatura e pH ótimo de uma protease de *Pleurotus citrinopileatus*, sendo esta uma serino protease alcalina de 28 kDa com termoestabilidade moderada.

Trabalhos da literatura descrevem a purificação e caracterização de proteases provenientes do basidioma de *Hypsizigus marmoreus* (ZHANG et al., 2010) com pH ótimo de 7,0 a 8,0 e temperatura em torno de 50 °C. O mesmo foi realizado para a enzima fibrinolítica de *Cordyceps militaris* (CHOI et al., 2011), que apresentou atividade ótima em pH 7,0 e a 40 °C com sequência N-terminal diferente a de outros cogumelos. A protease purificada do cogumelo comestível *Pholiota nameko* apresentou pH ótimo 8,8 a 50 °C (GUAN et al., 2011).

Sabotic et al. (2007) investigou a presença de protease em extratos de 43 basidiomicetos das ordens Agaricales, Boletales, Cantharellales, Phallales, Polyporales, Russulales e Thelephorales e Campos et al. (2011) nos gêneros *Lentinula*, *Pleurotus*, *Trametes*, *Sparassis*, *Schizophyllum*, *Agaricus*, *Lycoperdon*, *Flamulina*, onde os maiores produtores de enzima foram *Lentinula edodes* e *Pleurotus* sp.

O uso de resíduos para a produção de enzimas é observado nos trabalhos de Ravikumar et al. (2012) e Liang et al. (2006), onde *Pleurotus sajor-caju* foi cultivado em diferentes resíduos para seleção do melhor para a produção de protease e *Monascus purpureus* em meio composto por casca de camarão e caranguejo.



### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar o crescimento micelial, a produção de basidiomas e proteases extracelulares de *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720 em diferentes resíduos agroindustriais.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar o crescimento micelial vertical de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 em diferentes resíduos agroindustriais na presença e ausência de luz com base na velocidade média de crescimento e o vigor do micélio;
- Investigar a produção e caracterizar parcialmente proteases extracelulares do micélio de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 em diferentes resíduos agroindustriais na presença e ausência de luz;
- Avaliar a eficácia do resíduo agroindustrial selecionado no crescimento micelial vertical na produção de basidiomas;
- Determinar a composição nutricional dos substratos e dos basidiomas de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 produzidos em condições axênicas;
- Verificar a qualidade microbiológica dos basidiomas.

## **4. Material e Métodos**

### **4.1. Cogumelo e preparação de cultura matriz**

A espécie utilizada neste estudo foi *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720, cedida pela Micoteca DPUA e classificada segundo Putzke (2002). Para obtenção da forma micelial inoculou-se o fragmento em ágar Batata Dextrose adicionado de extrato de levedura 0,5% [p/v (BDA+YE)] para a obtenção da cultura pura e viável. Da cultura obtida foi transferido um disco micelial de 8 mm de diâmetro para superfície de BDA+YE em placas de Petri medindo de 90 mm x 12 mm. As culturas foram mantidas a 25 °C, na ausência de luz, por oito dias, observando-se a cada 24 horas.

### **4.2. Fermentação Semi-Sólida**

#### **4.2.1. Aquisição e preparo do substrato**

Os resíduos agroindustriais foram adquiridos em feiras livres da cidade de Manaus ou/e com produtores locais, em marcenaria ou/e serraria, com exceção do farelo de arroz que foi obtido na cidade de Boa Vista. Primeiramente foram tratados com solução desinfetante para hortifrutícolas conforme as recomendações do fabricante, quando necessário triturados em partículas de 2 a 3 cm [semente de açaí (Sac), casca de abacaxi (CsAb), coroa de abacaxi (CrAb) e casca de cupuaçu (CC)] e ajustados para pH 6,0 com solução de HCl 0,1M, segundo protocolo de desinfecção padrão do Laboratório de Micologia – UFAM.

Os substratos utilizados nos experimentos (serragem, semente de açaí e casca de cupuaçu) suplementados com farelo de arroz (FA), casca de abacaxi (CsAb) e coroa de abacaxi (CrAb) foram acondicionados em tubos de ensaio (200 mm x 25 mm) contendo algodão umedecido com água destilada no fundo até a formação de uma coluna de 150 mm. Depois de vedados com algodão e identificados os tubos foram esterilizados a 121 °C por 60 minutos por três dias consecutivos. Em cada tubo foram coladas três fitas milimetradas medindo 150 mm x 5 mm.

#### **4.2.2. Avaliação do crescimento micelial vertical**

Para avaliação do crescimento micelial vertical de *P. ostreatoroseus* da cultura (item 3.1) foram retirados três discos medindo 8 mm de diâmetro para inoculação na superfície do substrato esterilizado e resfriado. A fermentação foi conduzida a 25 °C, na ausência e presença de luz, determinando-se a velocidade de crescimento micelial vertical (VMC) em centímetros de acordo

com a equação I (ISRAEL, 2005; PALHETA et al., 2011), a cada 24 horas durante 15 dias e o vigor micelial classificado pelo método subjetivo de notas, nota 1 - fracamente adensado, nota 2 - mediamente adensado e nota 3 - fortemente adensado (MARINO et al., 2008).

Equação I:

$$VMC = \frac{\text{Crescimento micelial final (Vf)} - \text{Crescimento micelila inicial (Vi)}}{\text{Tempo final (Tf)}}$$

Para este experimento foram utilizados os substratos base e suplementos para selecionar a mistura de substrato adequada para o desenvolvimento micelial de *P. ostreatoroseus* (Tabela 1). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 1. Substratos utilizados para avaliar o crescimento micelial vertical: (1) substrato base (Sac = Semente de açaí, CC = casca de cupuaçu, SER = serragem) e (2) substrato suplementar (CsAb = casaca de abacaxi triturada, CrAb = coroa de abacaxi triturada, FA = farelo de arroz).

Experimentos	Substratos	(%)	Suplemento	(%)
1	Sac	80	CsAb	20
2	Sac	80	CrAb	20
3	SER	80	CsAb	20
4	SER	80	CrAb	20
5	CC	80	FA	20

### 4.3. Atividade proteolítica

#### 4.3.1. Extração das enzimas

As enzimas foram extraídas em água destilada esterilizada na proporção 1:10 (resíduo miceliado/mL de água destilada) em frascos de Erlenmeyer de 125mL. Os frascos foram mantidos a 30 °C, 180 rpm. Após 30 minutos os extratos brutos foram recuperados por filtração em tecido de algodão e filtrados em membrana de polietersulfônica (0,22µm) para determinação da atividade das proteases (CHUTMANOP et al., 2008).

#### 4.3.2. Ensaio enzimático: determinação da atividade proteolítica

No tubo de reação foi adicionado 0,15 mL do extrato bruto adicionado e 0,25 mL de azocaseína 1% (p/v), em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,2. As amostras e os brancos foram preparados em triplicada e incubados a 25 °C por 1 hora em câmara escura. A reação foi

interrompida com 1,2 mL de TCA [ácido tricloroacético 10% (p/v)] seguido de centrifugação por 10 minutos a 4 °C para a precipitação de resíduos. Posteriormente, do sobrenadante foi retirado 0,8 mL e adicionado a 1,4 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 1M. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorvância a 440 nm de 0,1 em 1 hora (MOREIRA et al., 2001; KIRSCH et al., 2012).

#### **4.3.3. Determinação do efeito do pH e da temperatura**

O efeito do pH foi determinado na faixa de 5,0 a 10,0 utilizando-se o sistema de reação formulado com azocaseína 1% em tampão: citrato, fosfato e carbonato-bicarbonato a 0,1M. Os sistemas foram incubados durante uma hora na ausência de luz e, em seguida foi determinada a atividade proteolítica. O branco e os sistemas de reação foram preparados em triplicata. O efeito da temperatura na atividade proteolítica foi avaliado na faixa de 25 °C a 60 °C por 1 hora. Ao término do período de incubação, a atividade enzimática foi determinada conforme descrito anteriormente (KIRSCH et al., 2012).

#### **4.4. Produção do basidioma em resíduo agroindustrial**

##### **4.4.1. Preparação do substrato para produção do *spawn***

O *spawn* foi produzido segundo o método desenvolvido por Rollan (2003), modificado. Os grãos de trigo foram lavados e deixados em imersão em água por 12 h. O excesso da água foi retirado e em seguida foram lavados com solução de hipoclorito 1% (v/v) por 30 minutos. Ao término do tratamento, os grãos foram pré-cozidos por 15 minutos. Seguida a retirada do excesso de água adicionou-se carbonato de cálcio ( $3,5\text{g.kg}^{-1}$  de grão, em relação ao peso dos grãos desidratados). Os grãos foram acondicionados em frascos de vidro, fechados com tampão de algodão hidrofóbico e esterilizado a 121 °C por 60 minutos.

##### **4.4.2. Produção de *spawn***

Após o resfriamento, em condições assépticas, em cada frasco foram inoculados superficialmente, 12 discos da matriz primária, medindo 8 mm de diâmetro. A fermentação foi realizada a 25 °C, sem luminosidade até completa miceliação dos grãos, em condições estacionárias (ROLLAN, 2003).

#### 4.4.3. Produção de basidiomas de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 em resíduo agroindustrial

Para produção de *P. ostreatoroseus* foi utilizado como substrato o resíduo agroindustrial selecionado no item 3.2.2. As cascas foram tratadas com carbonato de cálcio a 1% por 12 horas enquanto o farelo de arroz e a serragem com duas gotas de hipoclorito 2,5% por litro de água (ROLLAN, 2003). Os substrato (1000 g), em embalagens de polipropileno de alta densidade foram esterilizados durante 60 minutos, a 121 °C por três dias consecutivos. Após resfriamento, em condições assépticas, o *spawn* foi inoculado, superficialmente e lateralmente no substrato, pH 6,0, fazendo um total de cinco réplicas.

A fermentação no semi-sólida foi realizada em dois ciclos: no primeiro, a 25 °C para o desenvolvimento do micélio, na ausência de luz até completa miceliação em ambiente com umidade ambiental equivalente a 60%. No segundo ciclo, para a indução dos corpos de frutificação a 25 °C, com umidade ambiental a 80%, na sala de cultivo, em condições assépticas.

Neste bioprocessos foi avaliada a formação e desenvolvimento dos primórdios e tempo total de cultivo. Ao término da cada colheita, os basidiomas foram pesados e submetidos à secagem a 40 °C, em estufa de ar circulante. Ao término da desidratação, o produto foi triturado e embalado em recipientes de vidro fechado para a determinação da eficiência biológica, produtividade e taxa de produção, equação II, III e IV (DIAS et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2007).

$$\text{Equação II: Eficiência biológica (EB)} = \frac{\text{massa do cogumelo (base úmida)}}{\text{massa do substrato (base seca)}} \times 100$$

$$\text{Equação III: Produtividade(P)} = \frac{\text{massa do cogumelo (base seca)}}{\text{massa do substrato(base seca)}} \times 100$$

$$\text{Equação IV: Taxa de Produção (TP)} = \frac{\text{eficiência biológica}}{\text{número total de dias de cultivo}} \times 100$$

#### 4.5. Determinação da perda de matéria orgânica do substrato (PMO)

A determinação da PMO foi realizada com base no peso seco dos resíduos não degradados, como recomendado por Holtz et al. (2009):

$$\text{Equação V: PMO} = \frac{\text{Peso do substrato miceliado (g)}}{\text{Peso inicial substrato (g)}} \times 100$$

#### **4.6. Determinação da característica físico-química dos resíduos agroindustriais e dos basidiomas de *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720**

O resíduo agroindustrial e os basidiomas desidratados foram triturados para determinação da composição físico-química no Laboratório de Tecnologia do Pescado da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como descrito a seguir:

- **Umidade:** determinada por dessecação em estufa com circulação de ar (método gravimétrico), os resíduos foram desidratados a 100 °C e os basidiomas a 40 °C até obtenção de peso constante da matéria desidratada (A.O.A.C.,1997).
- **Proteína:** determinada pela concentração de nitrogênio (%) segundo o método micro *Kjeldahl* e aplicando o fator de conversão 6,25 para os substratos e 4,28 para os cogumelos por apresentarem componente nitrogenado não protéico (SCARIOT et al., 2000; SILVA et al., 2007).
- **Cinzas (resíduo mineral fixo):** determinado por incineração do material em mufla a 550-660 °C até obtenção de peso constante (A.O.A.C., 1997).
- **Lipídios:** obtido com misturas de solventes a frio segundo o método *Bligh and Dyer*.
- **Fibra:** obtida pela digestão ácido-base, segundo o método de Weende (A.O.A.C., 1997).
- **Carboidratos totais:** estimados por diferença (100% – gramas totais de umidade, proteína, lipídios, cinzas e fibra alimentar) (LATINFOODS, 2002; NEPA, 2006).
- **Energia:** a energia total metabolizável, expressa em kilocalorias (kcal), foi calculada pelo fator de conversão de Atwater: (4 g proteína) + (4 g carboidratos totais) + (9 g de lipídios), preconizados pelo Latinfoods (2002) e NEPA (2006).

#### **4.7. Determinação de minerais do basidioma de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720**

A determinação dos minerais foi realizada em colaboração com o Laboratório de Análise de Solos e Plantas – Embrapa Amazônia Ocidental, segundo os métodos de Silva et al. (2009). As amostras foram desidratadas em estufa de circulação de ar forçada a 40 °C, em seguida submetidas à digestão úmida HNO<sub>3</sub> + HCl O<sub>4</sub> (3:1). O teor de fósforo foi determinado por espectrofotometria com azul de molibdênio e o teor de cálcio, magnésio, potássio, sódio, cobre, ferro, manganês e zinco por espectrofotometria de absorção atômica (EAA). Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os valores de macronutrientes (Ca, P, Mg, K) foram calculados em g.kg<sup>-1</sup> e os dos micronutrientes (Na, Fe, Cu, Mn e Zn) em mg.kg<sup>-1</sup>.

#### **4.8. Determinação de aminoácidos do basidioma de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720**

A determinação dos teores de aminoácidos foi realizada em colaboração com o Laboratório de Fontes Proteicas da UNICAMP por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). As amostras passaram por hidrolisação prévia com ácido clorídrico (HCl) 6N, seguida de derivação dos aminoácidos com fenilisotiocianato (PITC), e a separação dos derivativos fenil-tio-carbamil aminoácidos em coluna de fase reversa com detecção por UV a 254 nm. A quantificação foi feita por calibração interna multinível, com auxílio do ácido  $\alpha$ -aminobutírico (AAAB) como padrão interno para aminoácidos totais (WHITE et al., 1986). A determinação de triptofano foi realizada após hidrólise enzimática com pronase e reação colorimétrica com p-dimetil amino benzaldeído (DAB), segundo Spies (1967).

#### **4.9. Análise microbiológica do basidioma desidratado de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720**

As análises foram realizadas nos Laboratórios de Microbiologia e Micologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Para determinação das condições higiênico-sanitárias do basidioma de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720, segundo a legislação brasileira (BRASIL, 2001) foram analisados a presença dos seguintes micro-organismos: Coliformes totais e termotolerantes, de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, *Salmonella* sp., *Bacillus cereus*. Embora não seja exigido pela legislação brasileira determinou-se também a presença de bolores e leveduras, segundo WHO (1998).

Na análise utilizou-se 25 g de basidioma desidratado, retirados assepticamente e homogeneizados com 225 ml de água peptonada 0,1% (p/v), em vortex por 2 minutos. A partir dessa diluição foi preparada uma série de diluições sucessivas até  $10^{-3}$ , em tubo contendo 9 mL de água peptonada 0,1% (p/v). Das diluições  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$  foram retirados 100  $\mu$ L e 200  $\mu$ L para determinação dos micro-organismos.

##### **4.9.1. Determinação de bolores e leveduras**

Para contagem de bolores e leveduras, foi utilizado o método de plaqueamento direto em superfície das diluições  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ , de cada diluição foram retirados 200  $\mu$ L e semeados em ágar Sabouraud acrescido de Rosa Bengala e cloranfenicol 0,001% (p/v) até completa absorção no meio. As placas foram incubadas a 25 °C por 5 dias e os resultados expressos pelo número de Unidades Formadoras de Colônia por grama de material (UFC/g) conforme descrito por Silva et al. (2007).

#### **4.9.2. Determinação do Número Mais Provável (NMP.g<sup>-1</sup>) de coliformes totais e termotolerantes**

De cada diluição foram retirados 1000 µL e inoculados em séries de três tubos contendo 9 mL de caldo Brila (Himedia®, Mumbai-India), com tubo de Duhran invertido (teste presuntivo). Os tubos foram incubados a 37 °C por 24-48 horas. A partir dos tubos com leitura positiva (formação de gás), foram realizados os testes confirmativos para coliformes totais em caldo Brila (Himedia®, Mumbai-India) a 35 °C por 24-48 horas e coliformes termotolerantes em caldo *Escherichia coli* (EC) (Himedia®, Mumbai-India) a 45 °C por 24 horas. Os valores de NMP.g<sup>-1</sup> foram calculados de acordo com Silva et al. (2007).

#### **4.9.3. Pesquisa de *Salmonella* sp.**

Na determinação da presença de *Salmonella* sp. de cada diluição 1000 µL foram inoculados em séries de três tubos contendo 9 mL de caldo Brila (Himedia®, Mumbai-India), com tubo de Duhran invertido. Os tubos foram incubados a 35 °C por 24-48 horas. Os tubos com formação de gás foram novamente inoculados em caldo Brila (Himedia®, Mumbai-India). Permanecendo a formação de gás com auxílio de alça de platina foram inoculados em Ágar Verde Brilhante (VB) (Himedia®, Mumbai-India) a 35 °C por 24 horas. As colônias suspeitas foram submetidas a testes bioquímicos (SILVA et al., 2007).

#### **4.9.4. Quantificação de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva**

Das diluições 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-3</sup> das amostras do basidioma de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 foram transferidos 100 µL para placas de Petri e vertidos 15 mL de Ágar Manitol Salgado, fundido e resfriado até 45 °C em triplicata. Após a homogeneização e solidificação, as placas foram incubadas a 37 °C por 24-48 horas. Após a incubação o resultado positivo foi determinado pela mudança da coloração do meio de vermelho para amarelo (fermentadoras de manitol).

A confirmação das colônias coagulase positiva foi a partir da seleção de 3 colônias típicas e 3 atípicas para o teste de coagulase. As colônias foram transferidas para tubos contendo 2 ml de Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) e mantidas a 37 °C por 24 horas. Após esse período, 300 µL desse Caldo BHI fermentado foram transferidos para 300 µL de plasma de coelho, em tubos esterilizados incubados a 37 °C por 6 horas. O resultado positivo foi determinado pela formação do coágulo (REIS, 2010).



#### **4.9.5. Quantificação de *Bacillus cereus***

Das diluições  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$  das amostras do basidioma de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720, em triplicata, foram transferidos 100  $\mu$ L para placas de Petri esterilizadas e vertidos 15 mL de meio de enriquecimento seletivo - caldo soja triptona adicionado de polimixina B (REZENDELAGO et al., 2007), fundido e resfriado até 45 °C. Após a homogeneização e solidificação, as placas foram incubadas a 37 °C por 24-48 horas.

#### **4.10. Análise Estatística**

Os dados obtidos foram analisados através da estatística descritiva, Teste de Tukey e ANOVA, com nível de significância de 5% utilizando-se o software Minitab versão 16.0.

## CAPÍTULO I

### CARACTERIZAÇÃO DO CRESCIMENTO E POTENCIAL NUTRICIONAL DE *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720

Tamiris Rio Branco da Fonseca<sup>1</sup>, Taciana de Amorim Silva<sup>2</sup>, Raimundo Felipe da Cruz Filho<sup>3</sup>,  
Maria Francisca Simas Teixeira<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Amazonas – UFAM – Manaus – Brasil- tamirisrbf@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal do Amazonas – UFAM – Manaus – Brasil - tacionadeamorim@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal do Amazonas – UFAM – Manaus – Brasil - mteixeira@ufam.edu.br

<sup>4</sup>Universidade Federal do Amazonas – UFAM – Manaus – Brasil - rfilho@ufam.edu.br

#### Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização de resíduos agroindustriais no crescimento micelial vertical do cogumelo comestível *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 para selecionar uma mistura de substrato para produção de basidiomas e verificar o seu valor nutricional. O crescimento micelial foi realizado na ausência e presença de luz, tendo como substrato base os resíduos agroindustriais casca de cupuaçu, semente de açaí e serragem, e os respectivos suplementos farelo de arroz, coroa e casca de abacaxi para a seleção do substrato para produção do basidioma levando em consideração vigor e densidade do micélio. A partir da produção do basidioma no substrato selecionado determinou-se eficiência biológica, produtividade, taxa de produção e perda de matéria orgânica, bem como a qualidade microbiológica e o valor nutricional dos basidiomas. *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 cresceu em todas as misturas testadas no crescimento micelial vertical, no entanto casca de cupuaçu adicionada com farelo de arroz foi o substrato selecionado para a produção do basidioma por apresentar micélio fortemente adensado, sendo este também eficiente para a produção de um basidioma rico nutricionalmente e com condições sanitárias satisfatórias.

Palavras-chave: basidioma, cogumelo comestível, resíduos agroindustriais

#### Abstract

The aim of this study was to evaluate the use of agro-industrial waste in vertical mycelial growth of *Pleurotus ostreatoroseus* an edible mushroom to select a mixture of substrates for growing the mushroom and check their nutritional value. The mycelial growth was conducted in

the absence and presence of light as substrate based the agroindustrial waste bark cupuassu, açai seeds and sawdust, and their supplements rice bran, pineapple crown and bark for selection of a substrate for the production of fruiting body considering strength and the mycelium density. From the production of fruiting body in the substrate selected was determined biology efficiency, productivity, production rate and loss of organic matter, as well as the microbiological quality and nutritional value of the mushroom. *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 grew in all mixtures tested vertical mycelial growth, however cupuassu bark added with rice bran was the substrate selected for production the fruiting body for the highly dense mycelium and this is also effective for the production of a fruiting body nutritionally rich and with satisfactory sanitary conditions.

Key-words: basidiomata, edible mushroom, agroindustrial wastes

## 1. Introdução

A importância dos cogumelos comestíveis vem crescendo nos últimos anos, principalmente, pelo seu valor gastronômico, potencial nutricional, propriedades medicinais e capacidade de degradar e reciclar resíduos agroindustriais (Bonatti et al., 2004; Cheung e Cheung, 2005; Furlani e Godoy, 2005; Pedra et al., 2009).

Dentre os cogumelos destaca-se o gênero *Pleurotus* que apresenta elevado teor de proteínas, carboidratos, minerais (cálcio, fósforo e ferro) e vitaminas (tiamina, riboflavina e niacina), assim como, baixo teor de gorduras. Os representantes desse táxon tem habilidade de colonizar e degradar uma grande variedade de resíduos lignocelulósicos, com ciclo relativamente curto em comparação a outros gêneros comestíveis, além de alta adaptabilidade de crescimento em uma variedade de resíduos agrícolas e/ou agroindustriais (Justo et al., 1998; Manzi et al., 1999; Eira, 2004; Bonatti et al., 2004; Shashirekha et al., 2005; Pedra e Marino, 2006; Toro et al., 2006; Pedra et al., 2009; Menolli Junior et al., 2010; Omarini et al., 2010).

Entre os *Pleurotus* comestíveis, tem destaque *P. ostreatoroseus* por produzir compostos bioativos com ação redutora de triglicerídeos no organismo humano e pelo excelente sabor do basidioma carnoso de coloração rosada (Nascimento et al., 2008). Esta espécie tem distribuição mundial e pode ser encontrado em floresta tropical ou subtropical (Guerrero e Homrich, 1999; Putzke, 2002; Rosado et al., 2002). Em cultivos *in vitro*, este cogumelo comestível já foi produzido em diversos substratos agroindustriais, sendo que o rendimento variou de acordo com a qualidade de nutrientes de cada um dos seguintes resíduos: casca de mamona, palha de arroz, bagaço de cana-de-açúcar, resíduo de algodão, palha de soja, sabugo de milho, capim elefante, aveia, azevém, semente de girassol, serragem de eucalipto, vinhaça e ligustre (Rosado et al.,

2002; Donini et al., 2005; Bernardi et al., 2007; Minotto et al., 2008; Nascimento et al., 2008; Aguiar et al., 2010; Reis et al., 2010).

O cultivo de cogumelos comestíveis em resíduos agroindustriais tem se revelado como uma alternativa para melhor aproveitamento dessa matéria orgânica, uma vez que ao final da produção obtém-se a biomassa que pode ser consumida como alimento devido ao elevado valor nutricional. O resíduo miceliado, um subproduto desse cultivo também tem grande potencial para uso como ração para animais e adubo na agricultura (Bonatti et al., 2003; Shibata e Demiate, 2003).

A floresta amazônica que dispõe de uma riqueza incalculável em diversidade de organismos, recursos hídricos, minérios, espécies vegetais e animais é fonte de um grande volume de resíduos que podem ser utilizados como substrato para o crescimento de fungos macro e microscópicos em fermentação para produção de biomassa e/ou compostos com atividade biológica. Com base na disponibilidade de diversos resíduos agroindustriais provenientes de madeiras e da fruticultura amazônica, o objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização de resíduos agroindustriais no crescimento micelial vertical do cogumelo comestível *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 para selecionar uma mistura de substrato para produção de basidiomas e verificar o seu valor nutricional e qualidade microbiológica.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Cogumelo e Cultura matriz**

A espécie selecionada *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720, do acervo da Micoteca DPUA, foi mantido em ágar Batata Dextrose adicionado de extrato de levedura 0,5% (p/v), BDA+YE, a 25 °C. Esta espécie foi cultivada no mesmo meio e incubado a 25 °C por 8 dias, na ausência de luz.

### **2.2. Determinação do crescimento micelial vertical**

O cogumelo foi cultivado em substratos agroindustriais, casca de cupuaçu (CC), semente de açaí (SAc) e serragem (SER) 80% (p/v), fragmentados em partículas de 2 a 3 cm, cada um suplementado com farelo de arroz, casca ou coroa de abacaxi 20% (p/v) em base seca, respectivamente (Tabela 1). Os substratos foram tratados com solução desinfetante para hortifrutícolas, conforme as recomendações do fabricante. O excesso de água foi drenado, a umidade ajustada para 60% e o pH 6,5.

Para uso como meio de cultura as formulações foram armazenadas em tubos de ensaio de 200 mm x 25 mm, formando uma coluna de 15 cm. A esterilização foi realizada a 121 °C, 60 minutos, por três dias consecutivos, procedendo ao resfriamento por 24 horas. Da cultura matriz foram retirados três discos medindo 8 mm de diâmetro e inoculados na superfície dos substratos agroindustriais em tubo. Em cada tubo foram colocadas três fitas milimetradas de 150 mm. Os cultivos foram incubados a 25 °C, umidade 60%, na ausência (experimento 1) e presença de luz (experimento 2). O crescimento micelial vertical foi determinado em milímetros, a cada 24 horas durante 15 dias.

Para selecionar o substrato adequado para o desenvolvimento micelial de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 os cultivos foram realizados utilizando a mistura de substratos citada na Tabela 1. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 1. Substratos utilizados para avaliar o crescimento micelial vertical: (1) substrato base - semente de açaí (Sac); serragem (SER); casca de cupuaçu (CC) e (2) substrato suplementar - casca de abacaxi (CsAb); coroa de abacaxi (CrAb); farelo de arroz (FA).

Experimentos	(1) Substratos base (%)	(2) Substrato suplementar (%)
1	Sac 80	CsAb 20
2	Sac 80	CrAb 20
3	SER 80	CsAb 20
4	SER 80	CrAb 20
5	CC 80	FA 20

O vigor micelial foi avaliado pelo método subjetivo de notas, nota 1 (fracamente adensado); nota 2 (mediamente adensado); e nota 3 (fortemente adensado) (Marino et al., 2008). A velocidade média de crescimento micelial ao dia (VMC) foi calculada em cm/dia, conforme Equação I (Israel, 2005; Palheta et al., 2011).

$$VMC = \frac{V_f - V_i}{T_f} \quad \text{Equação I}$$

Onde:

VMC = Velocidade média do crescimento micelial ao dia;

Vf = medida do crescimento micelial no tempo final (cm);

Vi = medida do crescimento micelial no tempo inicial (cm);

Tf = Tempo final (dias).

## **2.3. Produção de *P. ostreatoroseus* em substrato agroindustrial**

### **2.3.1. Preparação do *spawn* e cultivo em grãos de trigo**

O *spawn* foi preparado segundo o método citado por Rollan (2003). Os grãos de trigo foram lavados e deixados em imersão em água por 12 h. O excesso da água drenado e os grãos lavados com solução de hipoclorito 1% (v/v) por 30 minutos. Ao término do tratamento, os grãos foram pré-cozidos por 15 minutos e depois de drenado o excesso dessa solução foi adicionado carbonato de cálcio 0,3% (p/v), em base seca. Os grãos em frascos de vidro, tamponados com algodão cardado foram esterilizado a 121 °C por 60 minutos. Após o resfriamento, em condições assépticas, em cada frasco, 12 discos da matriz primária de 8 mm de diâmetro foram inoculados superficialmente. A fermentação foi realizada a 25 °C, sem luminosidade até completa miceliação dos grãos, em condições estacionárias.

### **2.3.2. Condições de cultivo para produção de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720**

O substrato selecionado ao término do crescimento micelial vertical foi utilizado para produção dos basidiomas de *P. ostreatoroseus*. Para produção, os resíduos foram tratados de forma similar ao realizado para o crescimento micelial do cogumelo e a umidade ajustada para 60% e o pH 6,5. Os basidiomas foram produzidos em 1000g de substrato, misturados na proporção 80:20 (% casca:farelo), em embalagens de polipropileno e espessura de 50 µ. As amostras foram esterilizadas durante 60 minutos a 121 °C por três dias consecutivos. Após o resfriamento, em condições assépticas, o *spawn* foi inoculado, superficialmente e lateralmente, em cada substrato fazendo um total de cinco réplicas.

A fermentação semi-sólida foi realizada em dois ciclos, o primeiro para completa miceliação a 25 °C e umidade 60% na ausência de luz. O segundo ciclo, para a indução dos primórdios a 15°C por 24 horas e formação dos basidiomas a 25 °C, umidade 90%. Durante o ciclo de crescimento, as culturas do cogumelo permaneceram em ambiente com controle automático de temperatura, iluminação (12 h/dia), umidade e troca de ar no ambiente. Neste bioprocessos foi avaliada a formação e desenvolvimento dos primórdios e tempo total de cultivo. Ao término de cada colheita, os basidiomas foram pesados e desidratados a 40 °C em estufa com ar circulante. A avaliação do desempenho da produção foi feita atendendo a quatro parâmetros: a determinação da eficiência biológica (EB), produtividade (P), taxa de produção (TP) e determinação da perda de matéria orgânica do substrato (PMO) (Dias et al., 2003; Oliveira et al.,

2007; Holtz et al., 2009), equação II, III, IV e V. O produto desidratado foi armazenado em recipientes de vidro fechados com tampa rosqueável.

$$\text{Eficiência biológica (EB)} = \frac{\text{massa do cogumelo (base úmida)}}{\text{massa do substrato (base seca)}} \times 100 \quad \text{Equação II}$$

$$\text{Produtividade (P)} = \frac{\text{massa do cogumelo (base seca)}}{\text{massa do substrato (base seca)}} \times 100 \quad \text{Equação III}$$

$$\text{Taxa de Produção (TP)} = \frac{\text{eficiência biológica}}{\text{número total de dias de cultivo}} \times 100 \quad \text{Equação IV}$$

$$\text{Perda da matéria orgânica (PMO)} = \frac{\text{Massa do substrato residual (base seca)}}{\text{massa do substrato inicial (base seca)}} \times 100 \quad \text{Equação V}$$

#### **2.4. Determinação da composição centesimal dos substratos agroindustriais e basidiomas de *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720**

Os resíduos agroindustriais e os basidiomas foram desidratados e triturados para a determinação dos seguintes parâmetros: teor de umidade, proteína, cinzas, lipídios, carboidratos, fibra e valor calórico no Laboratório Tecnologia de Pescado – Universidade Federal do Amazonas. O teor de proteína bruta foi calculado através da multiplicação do teor de nitrogênio total pelos fatores de correção, sendo 4,38 para o basidioma e de 6,25 para os substratos (A.O.A.C., 1997; Furlani e Godoy, 2005; Silva et al., 2007; Pauli, 2010).

#### **2.5. Determinação de minerais basidiomas de *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720**

A determinação dos minerais foi realizada em colaboração com o Laboratório de Análise de Solos e Plantas – Embrapa Amazônia Ocidental, segundo os métodos de Silva et al. (2009). As amostras foram desidratadas em estufa de circulação de ar forçada a 40 °C, em seguida submetidas a digestão úmida HNO<sub>3</sub> + HCl O<sub>4</sub> (3:1). O teor de fósforo foi determinado por espectrofotometria com azul de molibdênio e o teor de cálcio, magnésio, potássio, sódio, cobre, ferro, manganês e zinco por espectrofotometria de absorção atômica (EAA). Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os valores de macronutrientes (Ca, P, Mg, K) foram calculados em g.kg<sup>-1</sup> e os dos micronutrientes (Na, Fe, Cu, Mn e Zn) em mg.kg<sup>-1</sup>.

## **2.6. Determinação de aminoácidos da biomassa de basidiomas de *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720**

A determinação dos teores de aminoácidos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) no Laboratório de Fontes Proteicas - UNICAMP. As amostras foram previamente hidrolisadas com ácido clorídrico (HCl) 6N, seguida de derivação dos aminoácidos com fenilisotiocianato (PITC) e, a separação dos derivativos fenil-tio-carbamil aminoácidos em coluna de fase reversa com detecção por UV a 254 nm. A quantificação foi feita por calibração interna multinível, com auxílio do ácido  $\alpha$ -aminobutírico (AAAB) como padrão interno para aminoácidos totais (White et al., 1986). A determinação de triptofano foi realizada após hidrólise enzimática com pronase e reação colorimétrica com p-dimetil amino benzaldeído (DAB), segundo Spies (1967).

## **2.7. Análise microbiológica do basidioma desidratado de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720**

As condições higiênico-sanitárias da biomassa desidratada de *P. ostreatoroseus* foram realizadas em conformidade com os parâmetros exigidos pela legislação brasileira (BRASIL, 2001). Também foi feita a análise para verificação da presença de bolores e leveduras, embora não seja exigida pela legislação (WHO, 1998).

Na análise microbiológica, 25 g de basidioma desidratado foi homogeneizada com 225 ml de água peptonada, em vortex por 2 minutos. A partir dessa diluição foi preparada uma série de diluição sucessiva até  $10^{-3}$ , em tubo contendo 9 mL de água peptonada 0,1% (p/v). Destas diluições  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$  foram retirados diferentes volumes (100  $\mu$ L e 200  $\mu$ L) para determinação de bolores e leveduras, coliformes totais, termotolerantes e *Salmonella* sp.

### **2.7.1. Determinação de Bolores e Leveduras**

Para a determinação de bolores e leveduras, de cada diluição foi retirado 200  $\mu$ L para ser semeado por toda superfície de ágar Rosa Bengala adicionado de cloranfenicol 0,001% até total absorção no meio. As placas em triplicata foram incubadas a 25 °C por sete dias. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônia por grama de produto (UFC/g) (Silva et al., 2007).

### **2.7.2. Análise para verificação a presença de coliformes totais, termotolerantes, *Salmonella* sp. e *Staphylococcus aureus***

Na determinação do Número Mais Provável (NMP.g<sup>-1</sup>) de coliformes totais, termotolerantes e *Salmonella* sp, de cada diluição foi retirado 1000  $\mu$ L para inoculação em séries de três tubos contendo 9 mL de caldo Brila (Himedia®, Mumbai-India), com tubo de Duhran



invertido. Os tubos foram incubados a 37 °C por 24-48 horas. A partir dos tubos com leitura positiva (formação de gás) foram realizados os testes confirmativos para coliformes totais em caldo Brila (Himedia®, Mumbai-India) a 35 °C por 24-48 horas e coliformes termotolerantes em caldo *Escherichia coli* (EC) (Himedia®, Mumbai-India) a 45°C por 24 horas. Os valores de NMP.g<sup>-1</sup> foram calculados de acordo com Silva et al. (2007).

A análise para verificação da presença de *Salmonella* sp., dos tubos com formação de gás mantidos a 35 °C, com auxílio de uma alça de plantina foi tirada uma alíquota e inoculado em Ágar Verde Brilhante (VB) (Himedia®, Mumbai-India) a 35°C por 24 horas. As colônias suspeitas foram submetidas a testes bioquímicos para identificação de *Salmonella* (Silva et al., 2007).

Para a quantificação de *Staphylococcus aureus* coagulase positiva, das diluições 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-3</sup> foi retirado 100 µL e inoculado em 15 mL de Ágar Manitol Salgado, fundido e resfriado até 45°C. Após a homogeneização e solidificação do meio, as placas foram incubadas a 37 °C. A leitura foi realizada após 24 e 48 horas a incubação. O resultado positivo foi determinado pela mudança da coloração do meio de vermelho para amarelo (fermentadoras de manitol). Para a confirmação das colônias coagulase positiva, três colônias que promoveram a mudança de coloração do meio foram selecionadas conjuntamente com 3 colônias atípicas para o teste de coagulase.

Com alça de platina estas colônias foram transferidas, separadamente, para 2 ml de Caldo Infusão Cérebro Coração (BHI), em tubos de ensaio com tampa rosqueável e mantidas a 37 °C. Após 24 horas, 300 µL desse Caldo BHI fermentado foram transferidos para 300 µL de plasma de coelho, em tubos esterilizados. Estes tubos-teste foram incubados a 37 °C por 6 horas. O resultado positivo foi determinado pela presença do coágulo (Reis, 2010)

## **2.8. Análise Estatística**

Em todos os experimentos os dados foram submetidos à análise estatística descritiva (Tabelas, gráficos e distribuição de frequência em classes), de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5% de significância), utilizando o programa Minitab versão 16.

## **3. Resultados e Discussão**

Na tabela 2 está apresentada a velocidade média do crescimento micelial vertical (VMC) e o vigor micelial de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 em substratos agroindustriais revelando a influência da luz no crescimento. Nos cultivos mantidos na ausência de luz em semente de açaí

misturado a coroa de abacaxi (Sac + CrAb) o desenvolvimento micelial foi significativo (VMC =  $0,75 \pm 0,02$  cm/dia) e o vigor do micélio se apresentou mediamente adensado. Nos demais substratos, apenas em semente de açaí com casca de abacaxi [Sac + CrAb ( $0,52 \pm 0,05$ )] e serragem com coroa de abacaxi [SER + CrAb ( $0,50 \pm 0,06$ )], em presença e ausência de luz, o cogumelo expressou o segundo maior valor de VMC ( $0,50 \pm 0,06$  cm/dia), todavia o vigor micelial foi do tipo mediamente e fracamente adensado, respectivamente.

O crescimento fortemente adensado e micélio com aspecto vigoroso foi observado somente em CC + FA (casca de cupuaçu e farelo de arroz), nas duas condições de cultivo (Tabela 2). Dados semelhantes foram obtidos por Palheta et al.(2011) para *P. florida* e *P. ostreatus* também cultivados em CC + FA 20% (p/p). Assim sendo, as cascas de frutos como substrato base ou suplementos usados para cultivo foram as de maior eficiência para crescimento de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 por proporcionar vigor micelial satisfatório. A habilidade de crescimento de uma espécie de fungo, assim como, reproduzir e desenvolver basidiomas em substratos lignocelulósicos está associado ao vigor do micélio e a capacidade de ativar mecanismos fisiológicos durante o ciclo de desenvolvimento (Albuquerque et al., 2012).

Provavelmente o desenvolvimento micelial resultante dos experimentos aqui apresentados não esteja associado somente às condições de cultivo do cogumelo, mas também a outros fatores interferentes como altas concentrações de CO<sub>2</sub> que comprometem a atividade enzimática, o substrato usado como suplemento que pode alterar a estrutura do meio, o tamanho das partículas que podem dificultar as trocas gasosas e retardar o crescimento apical da hifa, modificando a velocidade de formação do micélio na parte inferior do substrato (Bernardi et al., 2007).

Tabela 2. Média da velocidade do crescimento micelial vertical e vigor micelial de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 em resíduos agroindustriais na presença e ausência de luz.

Tratamento	Presença de luz		Ausência de luz	
	Média VMC (cm/dia)	Vigor	Média VMC (cm/dia)	Vigor
Sac + CsAb	$0,27 \pm 0,06^{ef}$	2	$0,41 \pm 0,04^{bcd}$	2
Sac + CrAb	$0,52 \pm 0,05^b$	2	$0,75 \pm 0,02^a$	2
SER + CsAb	$0,25 \pm 0,02^f$	1	$0,37 \pm 0,001^{de}$	1
SER + CrAb	$0,33 \pm 0,03^{def}$	1	$0,50 \pm 0,06^{bcd}$	1
CC + FA	$0,38 \pm 0,02^{cde}$	3	$0,41 \pm 0,07^{bcd}$	3

Sac + CsAb=semente de açaí + casca de abacaxi; Sac + CrAb= semente de açaí + coroa de abacaxi; SER + CsAb= serragem + casca de abacaxi; SER + CrAb= serragem + coroa de abacaxi; CC + FA= casca de cupuaçu + farelo de arroz. Médias seguidas por letras iguais não são diferentes significativamente pelo Teste de Tuky (p ≤ 5%). Nota 1- fracamente adensado; nota 2 - mediamente adensado e nota 3 - fortemente adensado.

Conforme Minotto et al. (2011), os micro-organismos se adaptam aos meios de cultivo em função da disponibilidade de nutrientes, principalmente em relação às fontes de carbono, nitrogênio e do seu potencial genético. Nesta investigação *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 se desenvolveu nos substratos expressando valores distintos da velocidade micelial vertical e com vigor micelial similar nas condições de crescimento, com e sem luz. Em ordem crescente de valores, o vigor da massa micelial teve destaque nos cultivos preparados com casca e caroços da fruticultura amazônica. Resultado semelhante foi apresentado por Rivas et al (2010) na avaliação dos parâmetros que corroborassem sobre a viabilidade de utilização de substratos pectocelulósicos (cascas de banana e maracujá) e lignocelulósico (serragem) para o cultivo de *Pleurotus* spp. Em conclusão os autores confirmaram apenas a viabilidade dos resíduos pectocelulósicos para o cultivo dos macrofungos.

No trabalho de Marino et al. (2008) consta que a suplementação da serragem de casca de coco com farelo de trigo e arroz favoreceu o crescimento e o vigor micelial de três isolados de *Pleurotus ostreatus*. Em outro estudo a suplementação com farelo de arroz forneceu altos teores de lipídios e o crescimento micelial de *Lentinula edodes* (Song et al., 1989). Quando Bernardi et al. (2007) analisou um isolado de *Pleurotus ostreatoroseus* em aveia preta suplementada com 20% de farelo de trigo foi expressiva a colonização do substrato, provavelmente devido a relação entre as fontes de carbono e nitrogênio.

Como mostra a tabela 3, de acordo com os resultados da análise da composição centesimal dos substratos agroindustriais, a maior porcentagem de proteína e lipídios foi determinada em farelo de arroz, 17,37% e 19,41%, respectivamente. Dentre os substratos, coroa de abacaxi (15,73%) e casca de cupuaçu (12,42%) foram a segunda e a terceira maior fonte de proteína, respectivamente. Serragem, semente de açaí e casca de abacaxi foram as mais pobres fontes proteicas, com variação aproximada de 5 a 7%.

O teor de fibra só predominou em serragem (63,53%) e coroa de abacaxi (28,36%), nos demais substratos esse parâmetro foi inferior (0,37% a 9,2%). Valores inferiores também foram determinados para cinzas, na faixa de 1,0% a 9,0%, com maior conteúdo em farelo de arroz (9,14%), seguido de casca de cupuaçu (4,53%), coroa e casaca de abacaxi, respectivamente 3,96% e 3,45%. O teor de carboidrato nos resíduos semente de açaí, casca de cupuaçu e casca de abacaxi foram 85,69%, 71,09% e 67,96%, destacando-se frente aos outros resíduos. Os substratos de maior valor energético foram farelo de arroz (415,25 kcal) e semente de açaí (391,18 kcal), destacando que nos demais substratos os valores variaram de 134,03 kcal (serragem) a 351,85 kcal (casca de cupuaçu).

Dados apresentados em outras pesquisas mostraram valores diferenciados da composição centesimal de substratos, como serragem, farelo de arroz, resíduos da cadeia produtiva do abacaxi e do processamento do cupuaçu (Costa et al., 2007; Sales-Campos et al., 2010; Jafarpour et al., 2010; Souza et al., 2011).

Tabela 3. Media da composição centesimal dos substratos agroindustriais utilizados na fermentação semi-sólida de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720.

Parâmetros	Serragem	Semente de açaí	Casca de cupuaçu	Coroa de abacaxi	Casca de abacaxi	Farelo de arroz
Umidade*	3,42	0,79	9,61	1,56	9,93	9,24
Cinzas*	1,33	1,68	4,53	3,96	3,45	9,14
Nitrogênio*	0,87	1,26	1,99	2,58	1,28	2,78
Proteína* (N x 6,25)	5,44	7,85	12,42	16,14	7,99	17,37
Lipídios*	1,43	1,89	1,98	2,28	1,47	19,41
Fibra*	63,53	2,1	0,37	28,36	9,2	2,07
Carboidratos*	24,85	85,69	71,09	47,7	67,96	42,76
Valor Calórico (kcal)	134,03	391,18	351,85	275,88	317,01	415,25

\* porcentagem (%)

*P. ostreatoroseus* DPUA 1720, um Agaricales do bioma amazônico, ao ser cultivado para produção de basidiomas em CC + FA 20% (p/p), substrato selecionado no crescimento micelial vertical, o período de miceliação, a formação de primórdios e o tempo total de cultivo ocorreu, respectivamente, em média durante 15,2 dias; 4,2 dias e 42,2 dias (Tabela 4). Vega et al. (2006) cita que no cultivo de *P. djamor*, a miceliação total do substrato e a formação dos primórdios ocorreu de 13 a 20 dias e a produção dos basidiomas de 42 a 51 dias.

*P. florida* quando cultivado em diferentes resíduos agrícolas, aproximadamente, em 21 dias foi observada a miceliação total do substrato, em 4 dias a formação dos primórdios e tempo total de cultivo em 30 dias. *P. florida*, também quando cultivado em resíduo de algodão suplementado com 5% de farelo de arroz o crescimento micelial foi registrado em 20 dias com tempo total de cultivo de 43,4 dias e 41,5 dias quando não suplementado. *P. ostreatoroseus* quando cultivado em resíduo de algodão apresentou crescimento micelial de 20 dias, frutificação em 11 dias e tempo total de cultivo de 35,6 dias e 36,8 dias quando suplementado com farelo de arroz (Reis et al., 2010; Figueiró e Graciolli, 2011).

Tabela 4. Parâmetros analisados durante a produção de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 em casca de cupuaçu suplementado com 20% de farelo de arroz.

Parâmetros	Média
Miceliação (dias)	15,2 ± 1,3
Formação de primórdios (dias)	4,2 ± 0,84
Tempo total de cultivo (dias)	42,2 ± 2,77
Eficiência biológica (%)	22,90 ± 2,27
Taxa de produção (%)	54,33 ± 4,95
Produtividade (%)	3,55 ± 0,61
Perda da matéria orgânica (%)	37,68 ± 1,39

Na tabela 4, o rendimento da produção para *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 foram estimados como eficiência biológica (EB), taxa de produção (TP) e produtividade (P), cujos valores obtidos atingiram em média 22,90%, 54,33%, 3,55% em CC+FA (800g:200g) de farelo de arroz, com umidade 60% em base seca. Dados aproximados foram obtidos por Oliveira et al. (2007) para *P. pulmonarius* em casca de amendoim, a eficiência biológica foi em torno de 23% e produtividade de 4,58%, este valor inferior devido ao número de dias de cultivo.

Os dados apresentados por outros autores mostram a eficiência biológica de 104% e 92,5% para *P. ostreatoroseus* produzido em resíduo de algodão suplementado ou não com 5% de farelo de arroz (Reis et al., 2010). Sales-Campos et al. (2010) determinou altos valores de eficiência biológica para *P. ostreatus* (64,6% e 125,6%) nos cultivos usando como substrato estipe da pupunheira e na serragem de pau balsa, resíduos amazônicos. A baixa eficiência biológica pode ser reflexo da genética do isolado, às condições de cultivo e do substrato, incluindo também a composição e proporção do substrato usado no bioprocessamento. Além desses parâmetros, na eficiência biológica podem interferir fatores ambientais, como temperatura, umidade, luminosidade e pH (Oliveira et al., 2007).

A porcentagem de matéria orgânica degradada no substrato CC + FA foi de 37,68% nos cultivos de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 (Tabela 4). No trabalho de Holtz et al. (2009), apenas 24,10% da matéria orgânica do resíduo da fiação de algodão foi degradada após o cultivo de *P. ostreatus*, no entanto, quando cultivado em serragem de pau balsa e em estipe de pupunheira os valores de PMO foram de 59,91% a 71,83% e 53,58 a 58,75%. Para *Pleurotus* spp. a degradação dos substratos foram de 16,63%, 18,59% e 39,79% para casca de maracujá, casca de banana e serragem, respectivamente (Sales-Campos et al., 2010; Rivas et al., 2010).

Na análise microbiológica do basidioma o resultado foi ausente para bolores e leveduras, *Salmonella* sp., coliformes totais 37°C, *Escherichia coli* ou coliformes termotolerantes, *Staphylococcus* coagulase positiva, bactérias mesófilas e *Bacillus cereus*, assim sendo um

alimento seguro dentro do determinado pelo regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos.

Na Tabela 5, a análise da composição centesimal dos basidiomas de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720, analisado neste estudo, mostra teor de proteína equivalente a 23,53% valor que está dentro do registrado para *Pleurotus* (10,5 a 30,4%) (Furlani e Godoy, 2005). O shimeji (*P. ostreatus*) comercializado em Campinas apresentou 22,22% de proteína e os basidiomas de *P. ostreatus* e duas linhagens de *P. sajor-caju* cultivados em capim-elefante valores de 22,59%, 29,24% e 25,51%, próximos ao determinado nos basidiomas de *P. ostreatoroseus* (Bernardi et al., 2009; Furlani e Godoy, 2007).

Tabela 5. Análise físico-química dos basidiomas de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 produzidos em casca de cupuaçu suplementado com 20% de farelo de arroz.

Parâmetros	%
Umidade	7,15 ± 0,01
Proteína	23,53 ± 0,13
Lipídios	3,08 ± 0,35
Cinza	6,49 ± 0,01
Fibra	12,79 ± 0,09
Carboidratos totais	46,98 ± 0,57

Os cogumelos de habitat natural no sul da Nigéria apresentam basidiomas jovens e maduros com teor de proteína de 5,1 a 34,1%. Destes, os basidiomas jovens de *P. florida* e *P. atroumbonata*, o conteúdo de proteínas foi superior aos determinados nos maduros, 15,3% e 18,5% (Gbolagade et al., 2006). Rampinelli et al. (2010) determinou a composição físico-química dos basidiomas do 1° e 2° fluxo de *P. djamor* cultivado em palha de bananeira, o teor de proteína foi de 20,5% e 19,8% e o teor de lipídios igual a 1,12% e 1,09%. Assim como *P. djamor* outras espécies apresentaram um baixo teor de gordura como *P. ostreatus* (0,88%), *P. sajor-caju* (0,30% e 0,54%) e *P. florida* (0,9% e 1,2%).

No entanto, *P. ostreatoroseus* DPUA 1720, o isolado amazônico apresenta 3,08% de lipídios, valor dentro do observado para biomassa de cogumelos em base seca (1,1 e 8,3%) e próximo ao determinado no shimeji (*P. ostreatus*) comercializado em São Paulo (4,30%) (Gbolagade et al., 2006; Furlani e Godoy, 2007; Bernardi et al., 2009). Para o mesmo cogumelo, o teor de cinzas e fibra bruta foi 6,49% e 12,79% (Tabela 5), valores próximos ao encontrando por Mshandete e Cuff (2007), 6,1% de cinzas e 11% de fibra, em basidiomas de *P. flabellatus* cultivado em resíduo de sisal e em basidiomas do 2° fluxo de produção de *P. djamor* cultivado em palha de bananeira, 6,34% de cinzas e 12,69% de fibra bruta. O conteúdo de fibra bruta em

*P. ostreatus* BF24 (18,25%) e *P. sajor-caju* PSC96/03 e PSC01/06 (10,32% e 15,43%) mostram-se próximo ao observado neste estudo (Bernardi et al., 2009; Rampinelli et al., 2010).

Nota-se na tabela 5 que os carboidratos são o principal constituinte do basidioma de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 com teor de 46,98%. Outros cogumelos como *P. ostreatus*, *P. flabellatus*, *P. sajor-caju* e *P. djamor* apresentam teor médio de 25,69% a 60%, variando de acordo com a espécie e o substrato de cultivo. Quanto à energia total, os basidiomas de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 apresentam em média 309,7 kcal, enquanto *P. flabellatus* apresenta 302 kcal e *Volvariella volvaceae* 305 kcal (Mshandete e Cuff, 2007; Bernardi et al., 2009; Rampinelli et al., 2010).

A concentração dos macrominerais ( $\text{g.kg}^{-1}$ ), cálcio, fósforo, magnésio e potássio dos basidiomas de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 foi 0,21, 10,39, 1,46 e 24,19, e os microminerais ( $\text{mg.kg}^{-1}$ ), cobre, ferro, manganês, sódio e zinco, 12,47, 72,34, 13,17, 30, 85 e 78, 06, respectivamente. No basidioma de *P. flabellatus*, 16,2  $\text{g.kg}^{-1}$  e 15,37  $\text{g.kg}^{-1}$  foi o conteúdo de fósforo e potássio, em base seca. *P. ostreatoroseus* proveniente de São Paulo apresenta 91  $\text{mg.kg}^{-1}$  de ferro, 25591  $\text{mg.kg}^{-1}$  de potássio, 51,5  $\text{mg.kg}^{-1}$  e 93,4  $\text{mg.kg}^{-1}$ , com relação ao teor de cobre e manganês o obtido para *P. eryngii* foi de 16,7  $\text{mg.kg}^{-1}$  e 20,3  $\text{mg.kg}^{-1}$  (Mshandete e Cuff, 2007; Moura, 2008; Gençcelep et al., 2009).

Tabela 6. Concentração de aminoácidos presentes nos basidiomas de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720.

Aminoácidos (g/100g de basidioma)	
Lisina (Lys)	1,298
Metionina (Met)	0,298
Valina (Val)	1,134
Triptofano (Trp)	0,330
Treonina (Thr)	0,937
Isoleucina (Ile)	0,751
Leucina (Leu)	1,304
Fenilalanina (Fen)	0,805
Histidina (Hys)*	0,379
Arginina (Arg)*	1,891
Tirosina (Tyr)	0,743
Aspartato (Asp)	2,061
Serina (Ser)	1,466
Glicina (Gly)	1,037
Prolina (Pro)	0,772
Cisteína (Cys)	0,040
Glutamato (Glu)	3,592
Alanina (Ala)	1,432
Total	20,27 g

Segundo Bender (2004), *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 contém oito aminoácidos essenciais, dentre esses os mais abundantes são valina, lisina e leucina, variando de 1,134 a 1,304 g/100g (Tabela 6). Dentro dos aminoácidos não essenciais destacam-se o glutamato e o aspartato com 3,592 g e 2,061 g/100g, ambos exercem papéis fundamentais como neurotransmissores estimuladores do cérebro e realçando o sabor dos alimentos (Rodrigues et al., 2004).

Os valores obtidos para *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 estão próximos aos valores obtidos para histidina e alanina em *Agrocybe chaxingu*, 0,30 g/100g e 1,03 g/100g, no entanto, as concentrações de aminoácidos em *P. ostreatus* e *Flammulina velutipes* foram inferiores, assim como nos basidiomas de *P. ostreatus* cultivado em talos de milho, trigo, algodão e soja (Dundar et al., 2009; Lee et al., 2011).

#### 4. Conclusão

*P. ostreatoroseus* DPUA 1720 cresceu em todos os substratos com densidade micelial vertical dominante em CC + FA, influenciada pela luz. A combinação entre os resíduos originou um substrato de condições sanitárias satisfatórias e com disponibilidade de nutrientes o que favoreceu a produção de basidiomas contendo altos teores de fibras, proteínas e baixo teor de lipídios, além de sais minerais e aminoácidos.

#### Referências

Aguiar, M. M.; Ferreira, L. F. R.; Monteiro, R. T. R. Use of vinasse and sugarcane bagasse for the production of enzymes by lignocellulolytic fungi. **Braslian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 5, p. 1245-1254, 2010.

Albuquerque, M. P.; Peil, R. M. N.; Nascimento, J. S. Crescimento micelial de *Lentinus sajor caju* (Fr.) Fr. e *Pleurotus* spp. em diferentes resíduos agrícolas. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 5, p. 895-902, 2012.

Association of official analytical chemists. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 16<sup>a</sup> ed., Estados Unidos da América: Arlington, 1997, 1141p.



Bender, A. E. **Dicionário de nutrição e tecnologia de alimentos**. 4. Edição. São Paulo: Editora Roca Ltda, 212 p., 2004.

Bernardi, E.; Donini, L. P.; Minotto, E.; Nascimento, J. S. Utilização de diferentes substratos para a produção de inóculo de *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. **Revista Ciência Agronômica**, v.38, n.1, p.84-89, 2007.

Bernardi, E.; Donini, L. P.; Minotto, E.; Nascimento, J. S. Cultivo e características nutricionais de *Pleurotus* em substrato pasteurizado. **Bragantia**, v.68, n.4, p.901-907, 2009.

Bonatti, M.; Karnopp, P.; Soares, H. M.; Furlan, S. A. Estudo da composição de cogumelos das espécies *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus sajor-caju* cultivados em palha de bananeira. **Revista Saúde e Ambiente**, v.4, n.1., p.31-35, 2003.

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, n.3, p.425-428, 2004.

Brasil. Resolução RDC n. 12, 2 de janeiro de 2001. **Estabelece padrões microbiológicos de alimentos**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Ministério da Saúde, 17 p., 2001.

Cheung, L. M.; Cheung, P. C. K. Mushroom extracts with antioxidant activity against lipid peroxidation. **Food Chemistry**, v.89, n.3, p.403-409, 2005.

Costa, J. M. C.; Felipe, É. M. F.; Maia, G. A.; Brasil, I. M.; Hernandez, F. F. H. Comparação dos parâmetros físico-químicos e químicos de pós-alimentícios obtidos de resíduos de abacaxi. **Revista Ciência Agronômica**, v.38, n.2, p.228-232, 2007.

Dias, E. S.; Koshikumo, E. M. S.; Schwan, R. F.; Silva, R. Cultivo do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* em diferentes resíduos agrícolas. **Ciência e Agrotecnologia**, v.27, n.6, p.1363-1369, 2003.

Donini, L. P.; Bernardi, E.; Minotto, E.; Nascimento, J. S. Desenvolvimento *in vitro* de *Pleurotus* spp. sob a influência de diferentes substratos e dextrose. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.3, p. 331-338, 2005.

Dundar, A.; Acay, H.; 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, n.4, p.662-666, 2009.

Eira, A. F. Fungos comestíveis. In: Espósito, E.; Azevedo, J.L. (Ed.). **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EducS, 2004. 510p.

Figueiró, G. G.; Graciolli, L. A. Influência da composição química do substrato no cultivo de *Pleurotus florida*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.5, p. 924-930, 2011.

Furlani, R. P. Z.; Godoy, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.64, n. 2, p.149-154, 2005.

Furlani, R. P. Z.; Godoy, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n.1, p.154-157, 2007.

Gbolagade, J.; Ajayi, A.; Oku, I.; Wankasi, D. Nutritive value of common wild edible mushrooms from Southern Nigeria. **Global Journal of Biotechnology & Biochemistry**, v.1, n.1, p.16-21, 2006.

Gençcelep, H.; Uzun, Y.; Tuncurk, Y.; Demirel, K. Determination of mineral contents of wild-grown edible mushrooms. **Food Chemistry**, v.113, p.1033–1036, 2009.

Guerrero, R. T.; Homrich, M. H. **Fungos Macroscópicos Comuns no Rio Grande do Sul**. 2ª edição. Porto Alegre: UFRGS, 126p., 1999.

Holtz, M.; Borges, G. M.; Furlan, S. A.; Wisbeck, E. Cultivo de *Pleurotus ostreatus* utilizando resíduos de algodão da indústria têxtil. **Revista de Ciências Ambientais**, v.3, n.1, p. 37 a 51, 2009.

Israel, C. M. Utilização do resíduo do processamento do palmito para a produção de enzimas hidrolíticas por fungos do gênero *Polyporus*. 2005. 136 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2005.

Jafarpour, M.; Zand, A. J.; Dehdashtizadeh, B.; Eghbalsaiied, S. Evaluation of agricultural wastes and food supplements usage on growth characteristics of *Pleurotus ostreatus*. **African Journal of Agricultural Research**, v.5, n.23, p. 3291-3296, 2010.

Justo, M. B.; Guzmán, G. A.; Mejía, E. G.; Díaz, C. L. G.; Martínez, G.; Corona, E. B. Composition química de tres cepas mexicanas de setas (*Pleurotus ostreatus*). **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v.48, n.4, p.359-363, 1998.

Lee, K. J.; Yun, I. J.; Kim, K. H.; Lim, S. H.; Hamb, H. J.; Eumc,W. S.; Joo, J. H. Amino acid and fatty acid compositions of *Agrocybe chaxingu*, an edible mushroom. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.24, p.175-178, 2011.

Manzi, P.; Gambelli, L.; Marconi, S.; Vivanti, V.; Pizzoferrato, L. Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. **Food Chemistry**, v.65, n.1, p.477-482, 1999.

Marino, R. H.; Abreu, L. D. de; Mesquita, J. B.; Ribeiro, G. T. Crescimento e cultivo de diferentes isolados de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer em serragem da casca de coco. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.75, n.1, p.29-36, 2008.

Menolli Junior, N.; Asai, T.; Capelari, M.; Paccola-Meirelles, L. D. Morphological and molecular identification of four brazilian commercial isolates of *Pleurotus* spp. and cultivation on corncob. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, n.2, p. 397-408, 2010.

Minotto, E.; Bernardi, E.; Donini, L.P.; do Nascimento, J.S. Crescimento miceliano *in vitro* de *Pleurotus ostreatoroseus* e colonização do substrato capim-elefante (*Pennisetum purpureum* schum.) suplementado com diferentes farelos. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v.75, n.3, p. 379-383, 2008.

Minotto, E.; Bernardi, E.; Rosa, F. O.; Nascimento, J. S. Desenvolvimento micelial *in vitro* de *Pleurotus* sp. em palha de arroz suplementada com serragem de couro. **Arquivo do Instituto Biológico**, v.78, n.4, p.609-613, 2011.

Moura, P. L. C. **Determinação de elementos essenciais e tóxico em cogumelos comestíveis por análise por ativação com nêutrons**. 2008. 117 p. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear-Aplicações) Ipen: Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Mshandete, A. M.; Cuff, J. Proximate and nutrient composition of three types of indigenous edible wild mushrooms grown in Tanzania and their utilization prospects. **African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development**, v.7, n.6, 2007.

Nascimento, J. S.; Moraes, V. S.; Bernardi, E.; Silva, S. D. A. Cultivo de *Pleurotus ostreatus* em substratos formulados com casca de mamona, bagaço de cana-de-açúcar e palha de arroz. In: Congresso Brasileiro de Mamona, 3., 2008, Salvador. Energia e ricinoquímica: resumos. Salvador: SEAGRI: Embrapa Algodão, 2008. 1 CD-ROM.

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 e Tecnologia de Alimentos**, v.27, p.84-87, 2007.

Omarini, A.; Nepote, V.; Grosso, N. R.; Zygadlo, J. A.; Albertó, E. Sensory analysis and fruiting bodies characterisation of the edible mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Polyporus tenuiculus* obtained on leaf waste from the essential oil production industry. **International Journal of Food Science and Technology**, v.45, p.466-474, 2010.

Palheta, R. A.; Vieira, J. N.; Neves, K. C. S.; Teixeira, M. F. S. Crescimento micelial vertical de duas espécies de *Pleurotus* em resíduo agroindustrial da Amazônia utilizando planejamento fatorial. **Caderno de Pesquisa Série Biologia**, v. 23, n. 3, p.52-60, 2011.

Pauli, P. A. **Avaliação da composição química, compostos bioativos e atividade antioxidante em cogumelos comestíveis**. 2010. 73 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2010.

Pedra, W. N.; Carnelossi, M. A. G.; Silva, G. F.; Yagui, P.; Lira, M. L.; Gonçalves, G. B.; Marino, R. H. Análise química e sensorial de *Pleurotus ostreatus* cultivado em casca de coco suplementada com farelo de trigo e/ou de arroz. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.76, n.1, p.91-98, 2009.

Pedra, W. N.; Marino, R. H. Cultivo axênico de *Pleurotus* spp. em serragem da casca de coco (*Cocos nucifera* Linn.) suplementada com farelo de arroz e/ou de trigo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, n.2, p.219-225, 2006.

Putzke, J. Os gêneros *Pleurotus* e *Lentinus* (Agaricales, Basidiomycota, Fungos) no Brasil - I: lista de espécies e chaves de identificação. **Caderno de Pesquisas Série Biologia**, v.14, n.1, p.67-75, 2002.

Rampinelli, J. R.; Silveira, M. L. L.; Gern, R. M. M.; Furlan, S. A.; Ninow, J. L.; Wisbeck, E. Valor nutricional de *Pleurotus djamor* cultivado em palha de bananeira. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.21, n.2, p.197-202, 2010.

Reis, D. L. **Avaliação da qualidade microbiológica de carnes moídas “in natura” comercializada em supermercados de Brasília**. 2010. 56 p. Trabalho monográfico (Pós-graduação *Lato sensu* em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal) Instituto Qualittas, Universidade Castelo Branco, Brasília, 2010.

Reis, M. F.; Ducca, F.; Ferdinandi, D. M.; Zonetti, P. C.; Rosado, F. R. Análise de substratos alternativos para o cultivo de *Pleurotus ostreatoroseus* e *Pleurotus florida*. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.3, n.2, p. 79-91, 2010.

Rivas, P. M. S.; Pereira Filho, A. A.; Santos, F. A. S.; Rosa, I. G. Avaliação de substratos pectocelulósicos para o cultivo de cogumelos comestíveis do gênero *Pleurotus sp.* (Agaricales). **Cadernos de Pesquisa (UFMA)**, v.17, n.3, 2010.

Rodrigues, A. S.; Livrari, M. B.; Trindade, E. B. S. M.; Sartor, C. F. P.; Calderelli, V. Avaliação do consumo de alimentos contendo aditivos alimentares com possíveis propriedades mutagênicas pelos acadêmicos do curso de nutrição do centro universitário de Maringá-PR. **CESUMAR**, v.6, n.2, p.126- 37, 2004.

Rollan, M. G. **Cultivo de Setas y Trufas**. 4ª Ed. España: Artes Gráficas Cuesta, S.A. 239 pp., 2003.

Rosado, F. R.; Kimmelmeier, C.; Costa, S. M. G. Alternative method of inoculum and spawn production for the cultivation of the edible Brazilian mushroom *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. **Journal of Basic Microbiology**, v.42, n.1, p.37-44, 2002.

Sales-Campos, C. ; Minhoni, M. T. A. ; Andrade, M. C. N. Produtividade de *Pleurotus ostreatus* em resíduos da Amazônia. **Interciencia (Caracas)**, v.35, p.198-201, 2010.

Shibata, C. K. R.; Demiate, I. M. Cultivo e análise da composição química do cogumelo do sol (*Agaricus blazei* Murril). **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, v.9, n.2, p.21-32, 2003.

Shashirekha, M. N.; Rajarathnam, S.; Bano, Z. Effects of supplementing rice straw growth substrate with cotton seed on the analytical characteristics of the mushroom, *Pleurotus florida* (Block & Tsao). **Food Chemistry**, v.92, n.2, p.255-259, 2005.

Silva, N.; Junqueira, V. C. A.; Silveira, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo-SP: Editora Livraria Varela, 552 p., 2007.

Silva, F. C. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2<sup>a</sup> edição. Brasília, Embrapa Informações Tecnológicas, 627p., 2009.

Song, C. H.; Cho, K. Y.; Nair, N. G. Growth stimulation and lipid synthesis in *Lentinus edodes*. **Mycologia**, v. 81, n. 04, p. 514-522, 1989.

Sousa, M. S. B.; Vieira, L. M.; Silva, M. J. M.; Lima, A. Caracterização nutricional e compostos antioxidantes em resíduos de polpas de frutas tropicais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 3, p. 554-559, 2011.

Spies, J. R. Determination of tryptophan in proteins. **Analytical Chemistry**, v. 39, n. 12, p. 1412-1415, 1967

Toro, G. V.; Vega, R. C.; Garin-Aguilar, M. E.; Lara, H. L. Biological quality of proteins from three strains of *Pleurotus* spp. **Food Chemistry**, v.94, n.4, p.494-497, 2006.

Vega, A.; Mata, G.; Salmenes, D.; Caballero, R. E. Cultivo de cepas nativas de *Pleurotus djamor* em Panamá, em paja de arroz y pulpa de café. **Revista Mexicana de Micologia**, v.23, p.93-97, 2006.

White, J. A.; Hart, R. J.; Fry, J. C. An evaluation of the waters pico-tag system for the amino-acid-analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 170-177, 1986.

WHO. Quality control methods for medicinal plant materials. Geneva, 122p., 1998.

### **PRODUÇÃO EM MATRIZ SÓLIDA E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS PROTEASES DE COGUMELO COMESTÍVEL DA FLORESTA AMAZONICA**

### **PRODUCTION IN SOLID MATRIX AND PROTEASES PARTIAL CHARACTERIZATION OF EDIBLE MUSHROOM FROM AMAZON RAIN FOREST**

Tamiris Rio Branco da Fonseca<sup>1</sup>; Jéssica Ferreira Barroncas<sup>2</sup>; Maria Francisca Simas Teixeira<sup>3</sup>  
<sup>1</sup>Universidade Federal do Amazonas – UFAM – Manaus – Brasil- tamirisrbf@hotmail.com;  
jessicabarroncas@gmail.com; mteixeira@ufam.edu.br

#### **Resumo**

*Enzimas proteolíticas constituem um dos mais importantes grupos catalisadores, tem ampla utilização comercial e industrial. Entre essas, as proteases de origem fúngica apresentam vantagens como, alta diversidade, fácil produção em larga escala e recuperação. O objetivo deste estudo foi avaliar a produção e caracterizar parcialmente proteases do extrato bruto de Pleurotus ostreatoroseus cultivado em substratos agroindustriais. A cultura matriz foi preparada em ágar batata dextrose acrescida de extrato de levedura 0,5% (p/v). A produção das enzimas proteolíticas foi realizada por fermentação semi-sólida utilizando substratos agroindustriais. A fermentação foi conduzida durante 15 dias, sob duas condições de cultivo (presença e ausência de luz). Para determinação da atividade e caracterização parcial das proteases, o extrato bruto foi filtrado sucessivamente em tecido de algodão e membrana polietersulfônica de 0,22 µm. Os resultados demonstraram que os resíduos foram fontes para a produção proteases com pH variando de levemente ácido a alcalino e temperatura ótima a 25°C e 40°C.*

**Palavras-chave:** *Pleurotus ostreatoroseus*; fermentação em estado sólido; enzimas.

#### **1. Introdução**

No mercado mundial de enzimas as proteases predominam na indústria de detergentes, farmacêutica, cerveja, couro, alimentos, como coagulante na fabricação de queijo e para recuperação da prata usada no filme de raios-X (GENÇKAL, 2004; CUI et al., 2007; SABOTIC et al., 2007; DABOOR et al., 2010). Proteases também participam da síntese e degradação de proteínas, da conidiogênese e descarga conidial, germinação, modificação enzimática, nutrição e



regulação da expressão gênica (CUI et al., 2007; NAKAMURA et al., 2011; ZHENG et al., 2011).

As enzimas proteolíticas têm origem de diversas fontes, vegetal, animal e micro-organismos procariontes e eucariontes, entre estes, os fungos são produtores eficientes, predominando espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* (SANDHYA et al., 2005). Entre os fungos, os cogumelos estão se tornando uma fonte atraente de compostos bioativos, além de usado tipicamente como alimento. Nos últimos anos, diversos cogumelos comestíveis são também citados como fontes de enzimas, incluindo proteases fibrinolíticas, a exemplo de *P. eryngii* (CHA et al., 2010), *Flammulina velutipes*, *Pleurotus ostreatus*, *Grifola frondosa*, *Tricholoma saponaceum*, *Armillaria mellea* e *Cordyceps militaris* estão relatadas nas citações de Park et al. (2007) e Nakamura et al. (2011). Outras proteases já foram detectadas nos extratos oriundos do cultivo de *P. ostreatus* (SHIN e CHOI, 1998; PALMIEIRI et al., 2001; SHABA e BABA, 2012), *P. citrinopileatus* (CUI et al., 2007), *Pleurotus sajor-caju* (RAVIKUMAR et al., 2012;).

Já que cogumelos crescem na natureza sob condições de estado sólido, esse hábito se tornou vantajoso para utilização no desenvolvimento de bioprocessos utilizando resíduos agrícolas como substrato (REDDY et al., 2003). Esta tecnologia denominada de fermentação semi-sólida (FSS) continua sendo um processo para produção de proteases extracelulares por ser apropriada para o crescimento de fungos que exigem umidade baixa para crescimento quando comparados às bactérias. A FSS, economicamente oferece certas vantagens, produtividade volumétrica superior, uso de equipamentos simples e de substratos de baixo custo, assim como, gasto de energia reduzido comparado a fermentação submersa (PANDEY, 2003; PINTO et al., 2005; SANTOS et al., 2006; RAVIKUMAR et al., 2012) .

O objetivo deste trabalho foi investigar a produção de proteases extracelulares por *Pleurotus ostreatoroseus* cultivado em resíduos agroindustriais na presença e ausência de luz para caracterização parcial dessas enzimas no extrato bruto.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Cultivo e Manutenção de *Pleurotus ostreatoroseus***

O cogumelo avaliado neste estudo foi *P. ostreatoroseus* cedido pela Coleção de Cultura DPUA da Universidade Federal do Amazonas. As culturas estoque foram mantidas por 8 dias, a

25°C em ágar batata dextrose com extrato de levedura 0,5% [p/v (BDA+YE)], em placas de Petri. Para manutenção de cultura viável, a cada 30 dias foram preparados novos subcultivos.

## 2.2. Inóculo

Do subcultivo de *P. ostreatoroseus* foram retirados três discos miceliais medindo 8 mm de diâmetro e transferidos para BDA+YE, em placa de Petri. As culturas foram incubadas a 25 °C por 8 dias, na ausência de luz para serem utilizadas como inóculo na fermentação semi-sólida (KIRSCH et al., 2011).

## 2.3. Preparo do Substrato, Inoculação e Condições de Fermentação Semi-Sólida

Os substratos agroindustriais foram adquiridos na cidade de Manaus, Amazonas com exceção do farelo de arroz que foi obtido na cidade de Boa Vista, Roraima. Para fermentação semi-sólida, no laboratório, a casca de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Willd Ex-Spreng Schum), a casca e coroa de abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merrill) e a semente de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) foram fragmentadas e tratadas com solução desinfetante para hortifrutícolas, conforme as recomendações do fabricante. A casca de cupuaçu foi suplementada com farelo de arroz e a serragem e semente de açaí, ambas suplementadas com casca e coroa de abacaxi (Tabela 1). A umidade foi ajustada para 60% e o pH 6,5.

Tabela 1. Substratos agroindustriais e porcentagens utilizadas na fermentação semi-sólida para crescimento e produção de proteases por *P. ostreatoroseus* DPUA 1720.

Substratos	Concentração	
	80%	20%
SER + CsAb	Serragem	Casca de abacaxi
SER + CrAb	Serragem	Coroa de abacaxi
Sac + CsAb	Semente de açaí	Casca de abacaxi
Sac + CrAb	Semente de açaí	Coroa de abacaxi
CC + FA	Casca de cupuaçu	Farelo de arroz

Na parte inferior de cada tubo de ensaio, medindo 200 mm x 25 mm foi colocado algodão umedecido com água destilada, em seguida os resíduos foram colocados nos tubos até preencher 15 cm de altura (PALHETA et al, 2011). Todos os tubos foram tamponados com algodão, identificados e esterilizados a 121 °C por 45 minutos. Após resfriamento, o inóculo (três discos miceliais de 8 mm de diâmetro) foi semeado na superfície dos substratos esterilizados. A

fermentação semi-sólida foi conduzida a 25 °C, em ambiente com umidade a 60%, na presença ou ausência de luz durante 15 dias. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

#### **2.4. Extração das Enzimas**

As enzimas foram extraídas em água destilada esterilizada na proporção 2:20 g (resíduo miceliado/mL de água destilada) em frascos de Erlenmeyer de 125mL. Os frascos foram mantidos a 30 °C, 180 rpm. Após 30 minutos os extratos brutos foram recuperados por filtração em tecido de algodão e filtrados em membrana de polietersulfônica com porosidade de 0,22µm para determinação da atividade das proteases (CHUTMANOP et al., 2008).

#### **2.5. Determinação da atividade de proteases**

A atividade proteolítica foi determinada em 0,15 mL do extrato bruto adicionado a 0,25 mL de azocaseína 1% (p/v), em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,2. As amostras e os brancos foram preparados em triplicada e incubados a 25 °C por 1 hora em câmara escura. A reação foi interrompida com 1,2 mL de TCA [ácido tricloroacético 10% (p/v)] seguido de centrifugação por 10 minutos a 4 °C. Do sobrenadante foi retirado 0,8 mL e acrescentado a 1,4 mL NaOH 1M. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorbância a 440 nm de 0,1 em 1 hora (MOREIRA et al., 2001; KIRSCH et al., 2012).

#### **2.6. Determinação do efeito da temperatura e do pH na atividade das proteases**

O efeito do pH foi determinado na faixa de 5,0 a 10,0 em tampão citrato, fosfato e carbonato-bicarbonato a 0,1M. O efeito da temperatura na atividade proteolítica foi avaliado na faixa de 25 °C a 60 °C. A atividade das proteases foi determinada conforme citado no item 2.5.

#### **2.7. Análise estatística**

Os resultados foram submetidos à análise estatística descritiva (média e desvio padrão), análise de variância (ANOVA) e a comparação das médias foram realizadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05\%$ ) utilizando o software Minitab 16.

### 3. Resultados e Discussão

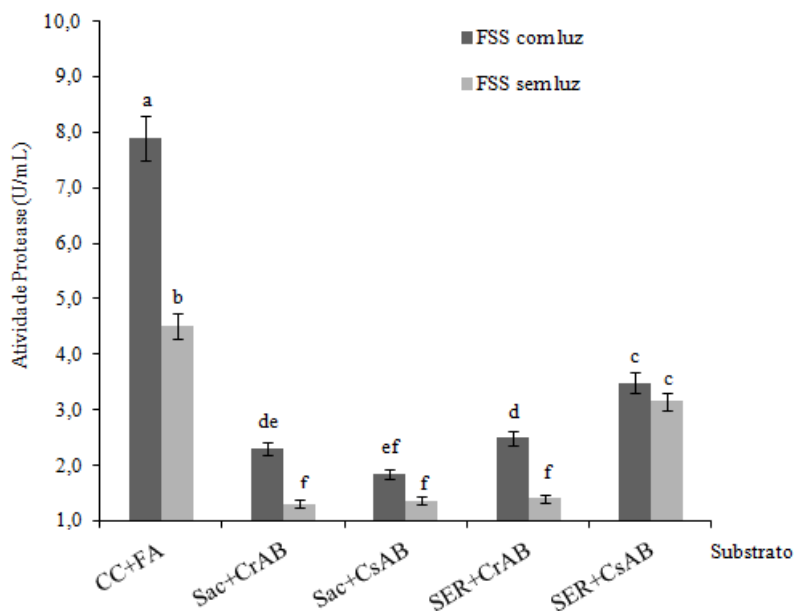
A figura 1 mostra a produção de proteases por *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 em casca de cupuaçu, semente de açaí, serragem, casca e coroa de abacaxi e farelo de arroz, substratos agroindustriais utilizados na fermentação semi-sólida. As enzimas foram produzidas em todos os substratos, cujas médias de atividade proteolítica (7,89 U/mL) de valores significativos foram determinadas no cultivo onde o substrato foi casca de cupuaçu suplementado com farelo de arroz (CC+FA), na presença de luz. No mesmo substrato, na ausência de luz foi determinado o segundo maior valor de atividade proteolítica (4,50 U/mL).

Do total de substratos utilizados na fermentação semi-sólida, CC+FA e SER+CsAb foram os melhores substratos para produção das proteases. Os resultados indicaram ainda que o valor da atividade proteolítica variou de acordo com o tipo de substrato agroindustrial, predominando nos cultivos mantidos na presença de luz e no substrato contendo farelo de arroz (Figura 1). Além disso, na ausência de luz, a redução da atividade proteolítica em todos os substratos foi aproximadamente de 43% quando comparado aos valores da atividade na presença de luz.

Proteases são produzidas por diferentes fungos filamentosos, leveduras e bactérias em cultivo submerso ou em matriz sólida (RAO et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2006). Porém, para o desenvolvimento de modelos apropriados o alvo está no estabelecimento das relações entre a fisiologia dos fungos e os fatores físico-químicos, considerando que as diversas espécies exigem para crescimento umidade em torno de 40-60%. Além disso, a seleção do substrato para uso na fermentação semi-sólida depende de vários fatores, compreendendo principalmente a natureza, o custo e a disponibilidade do substrato (SINGHANIA et al., 2009).

Entre os fungos filamentosos são inúmeros os trabalhos que citam diversas espécies anamórficas como produtoras de proteases, com predominância *Aspergillus* e *Penicillium*. Em contrapartida os estudos que referem cogumelos como fontes dessas enzimas são raros, uma vez que, as propriedades que sempre despertaram o interesse por esses fungos são o valor nutricional e o medicinal (WANI et al., 2010).

Figura 1. Média da atividade de proteases produzida por *P. ostreatoroseus* em substratos agroindustriais durante 15 dias por fermentação semi-sólida, em duas condições de cultivo, presença e ausência de luz. CC+FA (casca de cupuaçu+farelo de arroz); Sac+CsAb (semente de açaí+casca de abacaxi); Sac+CrAb (semente de açaí+coroa de abacaxi); SER+CsAb (Serragem+casca de abacaxi); SER+CrAb (Serragem+ coroa de abacaxi). Médias seguidas por letras iguais não são diferentes significativamente pelo Teste de Tuke (p≤ 5%).



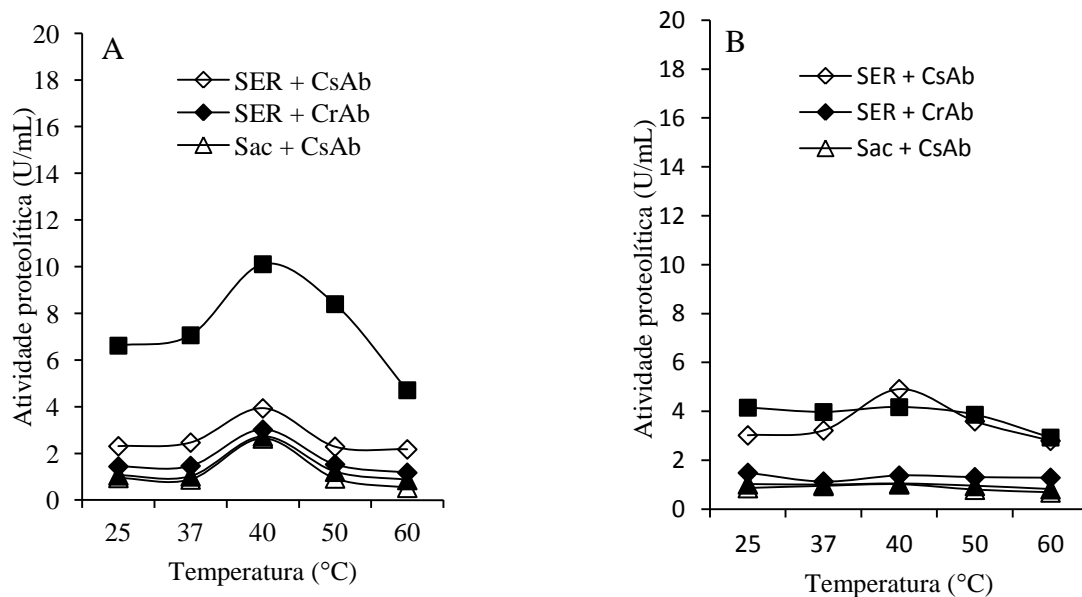
Em se tratando dos cogumelos, a atividade de proteases está demonstrada em *Agaricus bisporus*, *Pleurotus citrinopileatus*, *Grifola frondosa*, *Pleurotus ostreatus*, *Termitomyces albuminosus*, *Pleurotus sajor-caju* e por Sabotic et al. (2007) para 43 basidiomicetos (BURTON et al., 1997; CUI et al., 2007; NISHIWAKI et al., 2009; CAMPOS et al., 2010; ZHENG et al., 2011; RAVIKUMAR et al., 2012). Os resultados desta investigação revelaram a produção de proteases por *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 e o potencial da casca do fruto do cupuaçuzeiro (*T. grandiflorum*) adicionado de farelo de arroz como substratos para produção máxima das enzimas. O uso de resíduos da fruticultura amazônica na tecnologia da fermentação, entre outros benefícios, pode reduzir a contaminação ambiental e o custo de produção de compostos bioativos. No setor comercial as proteases têm importantes aplicações na indústria de detergente, alimentos, couro, produtos farmacêuticos e diagnósticos, gestão de resíduos e recuperação de prata dos filmes de raios-X (TREMACOLDI e CARMONA, 2005; NAKAMURA et al., 2011).

Quanto ao efeito da temperatura na atividade das proteases de *P. ostreatoroseus* (Figura 2), os dados mostram que entre 25 °C e 60 °C as enzimas permaneceram ativas por 60 minutos. Em média, a temperatura ótima para a atividade proteolítica foi determinada a 40 °C, em todos os extratos dos cultivos mantidos na presença de luz (Figura 2A). Nos cultivos na ausência de luz, o

perfil da atividade foi semelhante aos incubados na presença de luz, com exceção do extrato bruto obtido da fermentação em serragem e coroa de abacaxi (SER+CrAb), cuja atividade ótima foi determinada a 25 °C (Figura 2B). Ainda na figura 2A e 2B pode ser observado que a atividade enzimática na faixa de 50 °C a 60 °C foi reduzida de forma gradual sem causar a inativação das enzimas proteolíticas.

Com base nos resultados apresentados ficou evidente que nos extratos recuperados dos cultivos CC+FA e SER+CsAb, em todas as temperaturas, a atividade das proteases foi superior quando comparado aos demais substratos (Figura 2A e 2B). Dados semelhantes foram demonstrados para subtilisina, protease produzida por *G. frondosa* (NISHIWAKI et al., 2009).

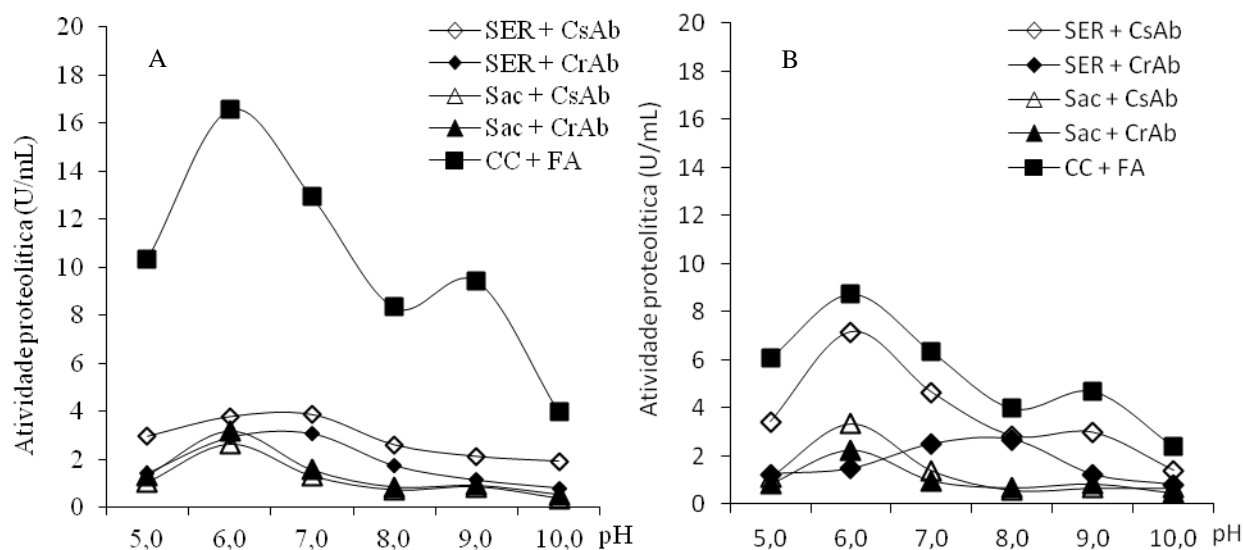
Figura 2. Efeito da temperatura na atividade das proteases de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 produzidas por fermentação semi-sólida em substratos agroindustriais durante 15 dias na presença (A) e ausência de luz (B). CC+FA (casca de cupuaçu+farelo de arroz); Sac+CsAb (semente de açaí+casca de abacaxi); Sac+CrAb (semente de açaí+coroa de abacaxi); SER+CsAb (Serragem+casca de abacaxi); SER+CrAb (Serragem+ coroa de abacaxi).



O efeito do pH na atividade das proteases foi determinado na faixa de 5,0 a 10,0 na temperatura ótima previamente determinada. Os dados mostrados na figura 3 evidenciaram o perfil dessas enzimas de *P. ostreatoroseus* que na totalidade foram ativas nas condições experimentais. Contudo nos extratos provenientes dos cultivos realizados na presença de luz a atividade máxima foi determinada em pH 6,0 quando na fermentação foi utilizado CC+FA, Sac+CrAb e Sac+CsAb. Nos demais substratos, SER+CsAb e SER+CrAb, o maior valor de atividade proteolítica foi determinada em pH 7,0 (Figura 3A), resultado semelhante foi obtido para protease do basidiomas de *Cordyceps militaris* (CHOI et al., 2011).

Na ausência de luz, a atividade ótima foi predominante em pH 6,0 nos extratos procedentes da fermentação em CC+FA, SER+CsAb, Sac+CsAb e Sac+CrAb, em ordem decrescente ao valor da atividade proteolítica. Nessa mesma condição, a atividade ótima das proteases excretadas em SER+CrAb foi determinada em pH 8,0, assim como o obtido para a protease purificada de *P. sajor-caju* cultivado em farinha de milho adicionado de farelo de trigo (RAVIKUMAR et al., 2012).

Figura 3. Efeito do pH na atividade das proteases de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 produzidas por fermentação semi-sólida em substratos agroindustriais durante 15 dias na presença (A) e ausência de luz (B). CC+FA (casca de cupuaçu+farelo de arroz); Sac+CsAb (semente de açaí+casca de abacaxi); Sac+CrAb (semente de açaí+coroa de abacaxi); SER+CsAb (Serragem+casca de abacaxi); SER+CrAb (Serragem+ coroa de abacaxi).



A produção de proteases extracelulares com atividade ótima em pH 6,0, 7,0 e 8,0 por *P. ostreatoroseus* provavelmente esteja associada a necessidade do cogumelo em hidrolisar os diferentes substratos disponíveis como fonte de nutrientes protéicos. As proteases do basidioma de *P. ostreatus* e *P. citrinopileatus* apresentaram pH ótimo levemente ácido a alcalino (SHIN E CHOI, 1998; CUI et al., 2007). Cha et al. (2010) para *P. eryngii*, nos extratos dos cultivos em sabugo de milho adicionado de farelo de arroz obtiveram máxima atividade enzimática em pH 5,0. Nirmal et al. (2011), citam que os fungos produzem proteases ácidas, neutras e alcalinas, inclusive uma espécie pode produzir mais de um tipo dessas enzimas que podem ser ativas a uma ampla faixa de pH (4,0 a 11,0).

Palmieri et al. (2001) reportaram o pH alcalino para atividade ótima de subtilisina, uma serino protease produzida por *P. ostreatus*. Em outro relato feito por Cui et al (2007), para uma serino protease extraída dos basidiomas *in natura* de *P. citrinopileatus* a máxima atividade proteolítica foi determinada no pH 10,0. Nos resultados apresentados por Nishiwaki et al. (2009),

proteases de *Grifola frondosa* na avaliação da especificidade de substrato expressou pH ótimo 3,0 e 7,0 para hemoglobina e caseína, respectivamente.

#### **4. Conclusões**

Os substratos agroindustriais (casca de cupuaçu, semente de açaí e serragem) e os respectivos suplementos (farelo de arroz, coroa e casca de abacaxi) se mostraram como potenciais substratos em fermentação semi-sólida para produção de enzimas proteolíticas por *P. ostreatoroseus*. No entanto, nos cultivos mantidos sob luz, casca de cupuaçu e farelo de arroz foi a mistura de substrato mais eficiente para produção das proteases, com atividade ótima em pH 6,0 e a 40 °C, características permitem a aplicação na indústria farmacêutica, têxtil, alimentícia e química.

#### **Agradecimentos**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES, a Universidade Federal do Amazonas-UFAM pelo apoio financeiro e a todas as pessoas que colaboraram para a realização deste artigo.

#### **Abstract**

*Proteolytic enzymes are one of the most important enzyme group that have extensive commercial and industrial use. The fungal proteases have advantages because of their high diversity, easier large scale production and recovery. This study was conducted to evaluate and partially characterize the proteases of the crude extract of Pleurotus ostreatoroseus cultivated on agroindustrial substrate. The mushroom culture was prepared in potato dextrose agar with yeast extract 0.5% (w/v). The production of proteolytic enzymes was performed by solid state fermentation in agroindustrial substrate for 15 days under two growth conditions (in the presence and absence of light). The crude extract was successively filtrated in cotton fabric and in a membrane pore of 0.22µm. Then it was used to determinate the protease activity and the partial characterization of the enzymes. The results demonstrated that the residues were good sources to produce proteases with pH ranging from slightly acidic to alkaline and with optimum temperature at 25°C and 40°C.*

**Key-words:** *Pleurotus ostreatoroseus*; solid-state fermentation; enzymes.



## Referências

BURTON, K. S.; PARTIS, M. D.; WOOD, D. A.; THURSTON, C. F. Accumulation of serine proteinase in senescent sporophores of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. **Mycology Research**, v. 101, n. 2, p. 146-152, 1997. <http://dx.doi.org/10.1017/S0953756296002316>

CAMPOS, C.; DIAS, D. C.; VALLE, J. S.; COLAUTO, N. B.; LINDE, G. A. Produção de biomassa, proteases e exopolissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* em cultivo líquido. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia**, v. 13, n. 1, p. 19-24, 2010.

CHA, W.-S.; PARK, S.-S.; KIM, S.-J.; CHOI, D. Biochemical and enzymatic properties of a fibrinolytic enzyme from *Pleurotus eryngii* cultivated under solid-state conditions using corn cob. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6475–6481, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.048>

CHOI, D.; CHA, W.-S.; PARK, N.; KIM, H.-W.; LEE, J.-H., PARK, J. S.; PARK, S.-S. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from fruiting bodies of Korean *Cordyceps militaris*. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3279–3285, 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.002>

CHUTMANOP, J.; CHUICHULCHERM, S.; CHISTI, Y.; SRINOPHAKUN, P. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 1012–1018, 2008. <http://dx.doi.org/10.1002/jctb.1907>

CUI, L.; LIU, Q. H.; WANG, H. X.; NG, T. B. An alkaline protease from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 81-85, 2007. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-006-0801-z>

DABOOR, S. M.; BUDGE, S. M.; GHALY, A. E.; BROOKS, S.-L.; DAVE, D. Extraction and purification of collagenase enzymes: A critical review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 6, n. 4, p. 239-263, 2010. <http://dx.doi.org/10.3844/ajbbsp.2010.239.263>

GENÇKAL, H. **Studies on alkaline protease production from *Bacillus* sp.** İzmir, 2004, 98 f.. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Department of Biotechnology and Bioengineering - İzmir Institute of Technology.

KIRSCH, L. S.; PINTO, A. C. S.; PORTO, T. S.; PORTO, A. L. F.; TEIXEIRA, M. F. S. The influence of different submerged cultivation conditions on mycelial biomass and protease production by *Lentinus citrinus* Walley et Rammeloo DPUA 1535 (*Agaricomycetidae*). **International Journal of Medical Mushrooms**, v. 13, n. 2, p. 185-192, 2011. <http://dx.doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v13.i2.110>

KIRSCH, L. S.; PINTO, A. C. S.; TEIXEIRA, M. F. S.; PORTO, T. S.; PORTO, A. L. F. Partition of proteases from *Lentinus citrinus* DPUA 1535 by the Peg/Phosphate Aqueous Two-Phase System. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 1912-915, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422012001000004>

- MOREIRA, K. A.; CAVALCANTI, M. T. H.; DUARTE, H. S.; TAMBOURGI, E. B.; MELO, E. H. M.; SILVA, V. L.; PORTO, A. L.; LIMA, J. S. F. Partial characterization of proteases from *Streptomyces clavuligerus* using an inexpensive medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 215-220, 2001. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822001000300010>
- NAKAMURA, M.; IKETANI, A.; SHIOI, Y. A survey of proteases in edible mushrooms with synthetic peptides as substrates. **Mycoscience**, v. 52, p. 234-241, 2011. <http://dx.doi.org/10.1007/S10267-010-0089-9>
- NIRMAL, N. P.; SHANKAR, S.; LAXMAN, R. S. Fungal proteases: An overview. **Internacional Journal of Biotechnology and Biosciences**, v. 1, n. 1, p. 1-40, 2011.
- NISHIWAKI, T.; ASANO, S.; OHYAMA, T. Properties and substrate specificities of proteolytic enzymes from the edible basidiomycete *Grifola frondosa*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107, n. 6, p. 605-609, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.01.008>
- OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS JÚNIOR, A. F. Atividade enzimática de isolados de rizóbia nativos da Amazônia central crescendo em diferentes níveis de acidez. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.1, p.204-210, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612006000100032>
- PALHETA, R. A.; VIEIRA, J. N.; NEVES, K. C. S.; TEIXEIRA, M. F. S. Crescimento micelial vertical de duas espécies de *Pleurotus* em resíduo agroindustrial da Amazônia utilizando planejamento fatorial. **Caderno de Pesquisa série Biologia**, v. 23, n. 3, p. 52-60, 2011.
- PALMIERI, G.; BIANCO, C.; CENNAMO, G.; GIARDINA, P.; MARINO, G.; MONTI, M.; SANNIA, G. Purification, characterization, and functional role of a novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2754-2759, 2001. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.67.6.2754-2759.2001>
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81-84, 2003. [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00121-3](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00121-3)
- PARK, S.-E.; LI, M.-H.; KIM, J.-S.; SAPKOTA, K.; KIM, J.-E.; CHOI, B.-S.; YOON, Y.-H.; LEE, J.-C.; LEE, H.-H.; KIM, C.-S.; KIM, S.-J. Purification and characterization of a fibrinolytic protease from a culture supernatant of *Flammulina velutipes* mycelia. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, n. 9, p. 2214-2222, 2007. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.70193>
- PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. **Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais**. Fortaleza, CE: Embrapa Agroindústria Tropical (Comunicado técnico, 102), 5 p., 2005.
- RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESH-PANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.
- RAVIKUMAR, G.; GOMATHI, D.; KALAISELVI, M.; UMA, C. A protease from the medicinal mushroom *Pleurotus sajor-caju*: production, purification and partial characterization.

**Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 1, p. 411-417, 2012. [http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60198-1](http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60198-1)

REDDY, G. V.; RAVINDRA-BABUB, P.; KOMARAIHC, P.; ROYA, K. R. R. M.; KOTHARI, I. L. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). **Process Biochemistry**, v. 38, p.1457-1462, 2003. [http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00025-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00025-6)

SABOTIC, J.; TRCEK, T.; POPOVIC, T.; BRZIN, J. Basidiomycetes harbour a hidden treasure of proteolytic diversity. **Journal of Biotechnology**, v. 128, p. 297-307, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.10.006>

SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2689–2694, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2004.12.001>

SANTOS, D. T.; SARROUH, B. F.; SANTOS, J. C.; PÉREZ, V. H.; SILVA, S. S. Potencialidades e aplicações da fermentação semi-sólida em Biotecnologia. **Janus: Revista de Pesquisa Científica**, n. 4, 2006.

SHABA, A. M.; BABA, J. Screening of *Pleurotus ostreatus* and *Gleophyllum sepiarium* strains for extracellular protease enzyme production. **Bayero Journal of Pure and Applied Sciences**, v. 5, n. 1, p. 187-190, 2012. <http://dx.doi.org/10.4314/bajopas.v5i1.33>

SHIN, H.-H.; CHOI, H.-S. Purification and characterization of cysteine protease from *Pleurotus ostreatus*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.62, n.7, p.1416-1418, 1998. <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.62.1416>

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13-18, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2008.10.019>

TREMACOLDI, C. R.; CARMONA, E. C. Production of extracellular alkaline proteases by *Aspergillus clavatus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 169–172, 2005. <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-004-2724-0>

ZHENG, S.; WANG, H.; ZHANG, G. A novel alkaline protease from wild edible mushroom *Termitomyces albuminosus*. **Acta Biochimica Polonica**, v. 58, n. 2, p. 269-273, 2011.

WANI, B. A.; BODHA, R. H.; WANI, A. H. Nutritional and medicinal importance of mushrooms. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 24, p. 2598-2604, 2010.

Submetido em 01 abr. 2013, Aceito para publicação em 20 dez. 2013.

#### 4. Conclusão

O cogumelo comestível *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 cresceu em todos os substratos testados na ausência e presença de luz, mas casca de cupuaçu adicionado com farelo de arroz (CC+FA 20%) foi o substrato que demonstrou melhor resultado quanto ao vigor e densidade micelial sendo selecionado para produção do basidioma.

Os resíduos quando combinados foram eficientes para a produção de proteases em fermentação semi-sólida, sendo substrato CC + FA 20% também o mais indicado para produção de proteases nos cultivos mantidos sob luz com características favoráveis para aplicação na indústria farmacêutica, têxtil, alimentícia e química.

Os basidiomas produzidos em CC + FA 20% apresentam alto teor de fibras e proteínas, baixo teor de lipídios com a presença de minerais e aminoácidos essenciais para dieta alimentar, além de condições higiênico-sanitárias dentro do exigido pela legislação.

Dessa forma os dados obtidos sugerem que o uso de resíduos agroindustriais para produção de cogumelo e enzimas como as proteases é um bioprocessamento economicamente viável e limpo e os basidiomas resultantes da fermentação semi-sólida podendo ser inseridos na dieta alimentar de animais e humanos por apresentar todos os componentes de um alimento saudável.

## Referências Bibliográficas

AGUIAR, L. V. B.; SALES-CAMPOS, C.; CARVALHO, C. S. M.; MINHOMI, M. T. A.; ANDRADE, M. C. N. Desenvolvimento micelial de *Lentinula edodes* em meios de cultivo à base de diferentes substratos orgânicos. **Interciência**, v. 36, n. 3, p. 205-210, 2011.

AMARAL, L. **A química**. São Paulo: Edições Loyola, 1995. 112p.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 16<sup>a</sup> ed., Estados Unidos da América: Arlington, 1997, 1141p.

BARROS, L.; CRUZ, T.; BAPTISTA, P.; ESTEVINHO, L. M.; FERREIRA, I. C. F. R. Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2742–2747, 2008.

BERNARDI, E.; DONINI, L. P.; MINOTTO, E.; NASCIMENTO, J. S. Utilização de diferentes substratos para a produção de inóculo de *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 38, n. 1, p. 84-89, 2007.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência: UFRJ: CAPES: FAPERJ: FCT, 2008, 506p.

BRASIL. Resolução RDC n. 12, 2 de janeiro de 2001. **Estabelece padrões microbiológicos de alimentos**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Ministério da Saúde, 17 p., 2001.

CAMPOS, C.; DIAS, D. C.; SANTOS, M. P.; MEDEIROS, C.; VALLE, J. S.; VIEIRA, E. S. N.; COLAUTO, N. B.; LINDE, G. A. Seleção de Basidiomicetos Proteolíticos. **Arquivos de Ciência Veterinária e Zoologia - UNIPAR**, v. 14, n. 1, p. 45-49, 2011.

CARVALHO, T.; ABREU FILHO, G.; PACHECO, C. S. V.; FERREIRA, A. N.; ROCHA, T. J. O.; FRANCO, M. Produção de enzimas hidrolíticas por fermentação em estado sólido da palma doce (*Nopalea coccinellifera*) utilizando modelos estatísticos significativos. **Revista de estudos ambientais**, v. 14, n. 3, p. 48-57, 2012.

CEITA, G. O.; UETANABARO, A. P. T.; KAMIDA, H. M. Emprego de substratos convencionais e alternativos para produção de cogumelos comestíveis: uma breve revisão. **SITIEN TIBUS: Série Ciências Biológicas**, v. 9, n. 1, p. 52-56, 2009.

CHA, W.-S.; PARK, S.-S.; KIM, S.-J.; CHOI, D. Biochemical and enzymatic properties of a fibrinolytic enzyme from *Pleurotus eryngii* cultivated under solid-state conditions using corn cob. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 6475–6481, 2010.

CHOI, D.; CHA, W.-S.; PARK, N.; KIM, H.-W.; LEE, J.-H., PARK, J. S.; PARK, S.-S. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from fruiting bodies of Korean *Cordyceps militaris*. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3279–3285, 2011.

CHUTMANOP, J.; CHUICHULCHERM, S.; CHISTI, Y.; SRINOPHAKUN, P. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 1012–1018, 2008.

COLAUTO, N. B.; SILVEIRA, A. R. DA; EIRA, A. F. DA ; LINDE, G. A. Pasteurização da turfa brasileira para o cultivo de *Agaricus brasiliensis*. **Semina. Ciências Agrárias**, v. 31, p. 1331-1336, 2010.

CUI, L.; LIU, Q. H.; WANG, H. X.; NG, T. B. An alkaline protease from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 81-85, 2007.

DIAS, E. S.; KOSHIKUMO, E. M. S.; SCHWAN, R. F.; SILVA, R. Cultivo do cogumelo *Pleurotus sajor-caju* em diferentes resíduos agrícolas. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 6, p. 1363-1369, 2003.

DONINI, L. P.; BERNARDI, E.; MINOTTO, E.; NASCIMENTO, J. S. Desenvolvimento *in vitro* de *Pleurotus* spp. sob a influência de diferentes substratos e dextrose. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 331-338, 2005.

DONINI, L. P.; BERNARDI, E.; MINOTTO, E.; NASCIMENTO, J. S. Efeito da suplementação com farelos no crescimento *in vitro* de *Pleurotus ostreatus* em meio a base de capim-elefante (*Pennisetum* spp.). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 3, p. 303-309, 2006.

ESPÓSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2ª ed., Caxias do Sul: Educs, 2004, 510p.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Statistics Databases, 2013. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/613/DesktopDefault.aspx?PageID=613#ancor>>. Acesso em: 18 de jan. 2013.

FERDINANDI, D. M.; ROSADO, F. R. Produção de biomassa de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.Fr.) Kummer sob influência do extrato aquoso de Ginkgo biloba em diferentes concentrações. **Saúde e Pesquisa**, v. 1, p. 99-102, 2008.

FIGUEIRÓ, G. G. **Influência do substrato no cultivo e na composição química do cogumelo *Pleurotus florida***. 2009. 65 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho, Ilha Solteira, São Paulo, 2009.

FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 154-157, 2007.

FIGUEIRÓ, G. G.; GRACIOLLI, L. A. Influência da composição química do substrato no cultivo de *Pleurotus florida*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 5, p. 924-930, 2011.

GENÇCELEP, H.; UZUN, Y.; TUNCTURK, Y.; DEMIREL, K. Determination of mineral contents of wild-grown edible mushrooms. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1033–1036, 2009.

GENÇKAL, H. **Studies on Alkaline Protease Production from *Bacillus* sp.** 2004. 98 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - İzmir Institute of Technology, İzmir, Turquia, 2004.

GERN, R. M. M.; WISBECK, E.; RAMPINELLI, J. R.; NINOW, J. L.; FURLAN, S. A. Alternative medium for production of *Pleurotus ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 76–82, 2008.

GONÇALVES, C. C. DE M.; PAIVA, P. C. DE A.; DIAS, E. S.; SIQUEIRA, F. G. DE ; HENRIQUE, F. Avaliação do cultivo de *Pleurotus sajor-caju* (Fries) Sing. sobre o resíduo de algodão da indústria têxtil para a produção de cogumelos e para alimentação animal. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p. 1413-7054, 2010.

GUAN, G.-P.; ZHANG, G.-Q.; WU, Y.-Y.; WANG, H.-X.; NG, T.-B. Purification and characterization of a novel serine protease from the mushroom *Pholiota nameko*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 111, n. 6, p. 641–645, 2011.

GUERRERO, R. T.; HOMRICH, M. H. **Fungos Macroscópicos Comuns no Rio Grande do Sul**. 2ª edição. Porto Alegre: UFRGS, 1999, 126p.

HI, E. M. B.; BACH, E. E. O uso terapêutico de cogumelos no câncer. **Saúde Coletiva**, v. 11, n. 3, p. 91-94, 2006.

HOLTZ, M.; BORGES, G. M.; FURLAN, S. A.; WISBECK, E. Cultivo de *Pleurotus ostreatus* utilizando resíduos de algodão da indústria têxtil. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 3, n. 1, p. 37-51, 2009.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia; e Estatística**. SIDRA: Sistema IBGE de recuperação automática, 2006. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/horti/default.asp?t=2&z=t&o=19&u1=1&u2=1&u3=1>>. Acesso em: 06 dez. 2012.

ISRAEL, C. M. **Utilização do resíduo do processamento do palmito para a produção de enzimas hidrolíticas por fungos do gênero *Polyporus***. 2005. 136 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, 2005.

JAFARPOUR, M.; ZAND, A. J.; DEHDASHTIZADEH, B.; EGHBALESAIED, S. Evaluation of agricultural wastes and food supplements usage on growth characteristics of *Pleurotus ostreatus*. **African Journal of Agricultural Research**, v.5, n.23, p. 3291-3296, 2010.

KARAM, C.; SASSINE, Y. N.; MOUNAYAR, D.; ABDEL-MENHEM, G. Prospective of local Oyster mushroom production in Lebanon. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 5, n. 2, p. 34-37, 2011.

KIRSCH, L. S.; PINTO, A. C. S.; TEIXEIRA, M. F. S.; PORTO, T. S.; PORTO, A. L. F. Partition of proteases from *Lentinus citrinus* DPUA 1535 by the Peg/Phosphate Aqueous Two-Phase System. **Química Nova**, v. 35, n. 10, p. 1912-915, 2012.

LATINFOODS. **Tabla de composición de alimentos de América Latina**. 2002. (<http://www.fao.org/LAmerica/grupo>). Acesso em 15/08/2011.

LEMO, F. M. R. **Elaboração e caracterização de produto análogo a hambúrguer de cogumelo *Agaricus brasiliensis***. 2009. 147 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2009.

LIANG, T.-W.; LIN, J.-J.; YEN, Y.-H.; WANG, C.-L.; WANG, S.-L. Purification and characterization of a protease extracellularly produced by *Monascus purpureus* CCRC31499 in a shrimp and crab shell powder medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 74-80, 2006.

MARINO, R. H.; ABREU, L. D. Cultivo do cogumelo shiitake em resíduo de coco suplementado com farelo de trigo e/ou arroz. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 4, p. 11-16, 2009.

MARINO, R. H.; ABREU, L. D.; MESQUITA, J. B.; RIBEIRO, G. T. Crescimento e cultivo de diferentes isolados de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer em serragem da casca de coco. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n. 1, p. 29-36, 2008.



MEHTA, B. K.; JAIN, S. K.; SHARMA, G. P.; DOSHI, A.; JAIN, H. K. Cultivation of button mushroom and its processing: an techno-economic feasibility. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**, v. 2, n. 1, p. 201-207, 2011.

MENOLLI JUNIOR, N.; ASAI, T.; CAPELARI, M.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Morphological and molecular identification of four brazilian commercial isolates of *Pleurotus* spp. and cultivation on corncob. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 2, p. 397-408, 2010.

MINOTTO, E.; BERNARDI, E.; DONINI, L. P.; DO NASCIMENTO, J. S. Crescimento miceliano *in vitro* de *Pleurotus ostreatoroseus* e colonização do substrato capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) suplementado com diferentes farelos. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 75, n. 3, p. 379-383, 2008.

MINOTTO, E.; BERNARDI, E.; ROSA, F. O.; NASCIMENTO, J. S. Desenvolvimento micelial *in vitro* de *Pleurotus* sp. em palha de arroz suplementada com serragem de couro. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 4, p. 609-613, 2011.

MOREIRA, K. A.; CAVALCANTI, M. T. H.; DUARTE, H. S.; TAMBOURGI, E. B.; DE MELO, E. H. M.; SILVA, V. L.; PORTO, A. L.; LIMA, J. S. F. Partial characterization of proteases from *Streptomyces clavuligerus* using an inexpensive medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 215-220, 2001.

NASCIMENTO, W. C. A.; SILVA, C. R.; CARVALHO, R. V.; MARTINS, M. L. L. Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por um *Bacillus* sp. termofílico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 417-421, 2007.

NEPA. **Tabela de composição de alimentos**. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação. UNICAMP. Campinas, São Paulo, Brasil. 2006, 105 p.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS JÚNIOR, A. F. Atividade enzimática de isolados de rizóbia nativos da Amazônia central crescendo em diferentes níveis de acidez. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 204-210, 2006.

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 e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 84-87, 2007.

OMARINI, A.; NEPOTE, V.; GROSSO, N. R.; ZYGADLO, J. A.; ALBERTÓ, E. Sensory analysis and fruiting bodies characterisation of the edible mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Polyporus tenuiculus* obtained on leaf waste from the essential oil production industry. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 466-474, 2010.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios: Revista de saúde e biologia**, v. 7, n. 3, p. 97-109, 2012.

PALHETA, R. A.; VIEIRA, J. N.; NEVES, K. C. S.; TEIXEIRA, M. F. S. Crescimento micelial vertical de duas espécies de *Pleurotus* em resíduo agroindustrial da Amazônia utilizando planejamento fatorial. **Caderno de Pesquisa série Biologia**, v. 23, n. 3, p. 52-60, 2011.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81–84, 2003.

PEIL, R. M. N.; ROSSETTO, E. A.; ROCHA, M. T. R. Rendimento do cogumelo *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach em três formulações de compostos. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 1, n. 3, p. 163-166, 1995.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S. DE; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. **Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2005. 5p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 102).

PUTZKE, J. Os gêneros *Pleurotus* e *Lentinus* (Agaricales, Basidiomycota, Fungos) no Brasil - I: lista de espécies e chaves de identificação. **Caderno de Pesquisas Série Biologia**, v. 14, n. 1, p. 67-75, 2002.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESH-PANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RAVIKUMAR, G.; GOMATHI, D.; KALAISELVI, M.; UMA, C. A protease from the medicinal mushroom *Pleurotus sajor-caju*: production, purification and partial characterization. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 1, p. 411-417, 2012.

REFFATTI, P. F.; LORENZETTI, E ; RODRIGUES, M. B. Caracterização de resíduos de erva-mate para produção axênica de cogumelos. **Synergismus Scyentifica UTFPR**, v. 1, p. 1-4, 2006.

REGINA, M.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D.; BARBOSA, A. M.; AMADOR, I. R.; ANDRADE-NOBREGA, G. M.; MASCHIARE, D. C. Sabugo de milho e carvão ativado na produção de lacase e basidiomas de *Pleurotus* sp. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 1, p. 39-48, 2012.

REIS, D. L. **Avaliação da qualidade microbiológica de carnes moídas “in natura” comercializada em supermercados de Brasília.** 2010. 56 f. Trabalho monográfico (Pós-graduação *Lato sensu* em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal) - Instituto Qualittas, Universidade Castelo Branco, Brasília, 2010.

REIS, M. F.; DUCCA, F.; FERDINANDI, D. M.; ZONETTI, P. C.; ROSADO, F. R. Análise de substratos alternativos para o cultivo de *Pleurotus ostreatoroseus* e *Pleurotus florida*. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v. 3, n. 2, p. 79-91, 2010.

REZENDE-LAGO, N. C. M.; ROSSI JR., O. D.; VIDAL-MARTINS, A. M. C.; AMARAL, L. A. Ocorrência de *Bacillus cereus* em leite integral e capacidade enterotoxigênica das cepas isoladas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootenia**, v. 59, n. 6, p. 1563-1569, 2007.

RIVAS, P. M. S. **Crescimento *in vitro* de basidiomicetos do gênero *Pleurotus* (Agaricales) em substratos pectocelulósicos como alternativa para reciclagem de resíduos domésticos.** In: Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil, São Lourenço, 2009.

RIVAS, P. M. S.; PEREIRA-FILHO, A. A.; SANTOS, F. A. S.; ROSA, I. G. Avaliação de substratos pectocelulósicos para o cultivo de cogumelos comestíveis do gênero *Pleurotus* sp. (Agaricales). **Cadernos de Pesquisa - Universidade Federal do Maranhão**, v. 17, p. 78-83. 2010.

ROLLAN, M. G. **Cultivo de Setas y Trufas.** 4ª ed., Espanha: Artes Gráficas Cuesta S.A., 2003. 239 p.

ROSADO, F. R.; KEMMELMEIER, C.; COSTA, S. M. G. Alternative method of inoculum and spawn production for the cultivation of the edible Brazilian mushroom *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. **Journal of Basic Microbiology**, v.42, n.1, p.37-44, 2002.

SABOTIC, J.; TRCEK, T.; POPOVIC, T.; BRZIN, J. Basidiomycetes harbour a hidden treasure of proteolytic diversity. **Journal of Biotechnology**, v. 128, p. 297-307, 2007.

SALES-CAMPOS, C.; CARVALHO, C.S.M. DE; AGUIAR, L.V.B.; ANDRADE, M.C.N. Cinética micelial dos fungos comestíveis *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes* em resíduos lignocelulósicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, p. 141-145, 2011.

SALES-CAMPOS, C. ; MINHONI, M. T. A. ; ANDRADE, M. C. N. Produtividade de *Pleurotus ostreatus* em resíduos da Amazônia. **Interciencia (Caracas)**, v.35, p.198-201, 2010.

SAMPAIO, S. M.; QUEIROZ, M. R. Influência do processo de secagem na qualidade do cogumelo Shiitake. **Engenharia Agrícola**, v. 26, n. 2, p. 570-577. 2006.

SANTOS, D. T.; SARROUH, B. F.; SANTOS, J. C.; PÉREZ, V. H.; SILVA, S. S. Potencialidades e aplicações da fermentação semi-sólida em Biotecnologia. **Janus: Revista de Pesquisa Científica**, n. 4, 2006.

SCARIOT, M. R.; COSTA, S. M. G.; CLEMENTE, E. Composição química de cogumelos comestíveis cultivados em resíduo de algodão (*Gossypium hirsutum* L.). **Acta Scientiarum**, v. 22, p. 317-320, 2000.

SENA, A. R.; KOBLITZ, M. G. B.; NETO, A. G.; UETANABARO, A. P. T. Seleção de fungos do semi-árido baiano secretores de hidrolases de interesse em alimentos. **Sitientibus**, n. 35, p. 91-98, 2006.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Editora Livraria Varela, 2007. 552 p.

SILVA, F. C. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2<sup>a</sup> ed. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2009. 627 p.

SPIES, J. R. Determination of tryptophan in proteins. **Analytical Chemistry**, v. 39, n. 12, p. 1412-1415, 1967.

STROPARO, E. C.; BEITEL, S. M.; RESENDE, J.T.V.; KNOB, A. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p. 2267-2278, 2012.

STURION, G. L.; RANZANI, M. R. Composição em minerais de cogumelos comestíveis cultivados no Brasil - *Pleurotus* spp. e outras espécies desidratadas. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 1, n. 50, p. 102-108, 2000.

TAVEIRA, V. C.; NOVAES, M. R. C. G. Consumo de Cogumelos na Nutrição Humana: Uma revisão de literatura. **Comunicação em Ciências da Saúde**, v. 18, p. 315-322, 2007.

UDDIN, M. N.; YESMIN, S.; KHAN, M. A.; TANIA, M.; MOONMOON, M.; AHMED, S. Production of oyster mushrooms in different seasonal conditions of Bangladesh. **Journal of Scientific Research**, v. 3, n. 1, p. 161-167, 2011.

VILELA, P. S. **Cogumelos: Mercado e Comercialização**. Minas Gerais: Federação da Agricultura do estado de Minas Gerais, 2003. Disponível em: <<http://www.faemg.org.br/Content.aspx?Code=353&ParentPath=None;13&ContentVersion=C&ParentCode=>>>. Acesso em: 20 ago. 2011.

WANG, H.; NG, T. B. Pleureryn, a novel protease from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 289, p. 750–755, 2001.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. An evaluation of the waters pico-tag system for the amino-acid-analysis of food materials. **Journal of Automatic Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 170-177, 1986.

WHO. Quality control methods for medicinal plant materials. Geneva, 122p., 1998.

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

ZHANG, X.; LIU, Q.; ZHANG, G.; WANG, H.; NG, T. Purification and molecular cloning of a serine protease from the mushroom *Hypsizigus marmoreus*. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 724-730, 2010.

ZIMMER, K. R.; BORRÉ, G. L.; TRENTIN, D. S.; WOICICKOSKI JÚNIOR, C.; FRASSON, A. P.; GRAEFF, A. A.; GOMES, P.; MACEDO, A. J. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato**, v. 10, n. 14, p. 123-137, 2009.

## ANEXO 1

Revista na qual foi submetido o artigo do capítulo II.



The screenshot displays the website for RBTA (Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial). The header features the RBTA logo and the journal title. A navigation menu includes links for CAPA, SOBRE, PÁGINA DO USUÁRIO, PESQUISA, ATUAL, ANTERIORES, and NOTÍCIAS. The main content area shows a breadcrumb trail: Capa > Usuário > Autor > Submissões > Submissões ativas. The title 'Submissões ativas' is prominently displayed. Below it, a message states: 'Submissão concluída. Agradecemos seu interesse em contribuir com seu trabalho para a revista Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial.' A link for 'Submissões ativas' is provided. The ISSN number 1981-3686 is also visible. On the right side, there is a sidebar with 'OPEN JOURNAL' and 'Ajuda do sistema' links. The 'USUÁRIO' section indicates the user is logged in as 'tfonseca' and offers links for 'Meus dados', 'Perfil', and 'Sair do sistema'. The 'CONTEÚDO' section includes a search bar with a 'Pesquisar' button and a 'Todos' dropdown menu.

CAPA SOBRE PÁGINA DO USUÁRIO PESQUISA ATUAL ANTERIORES NOTÍCIAS

Capa > Usuário > Autor > Submissões > Submissões ativas

### Submissões ativas

Submissão concluída. Agradecemos seu interesse em contribuir com seu trabalho para a revista Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial.

» [Submissões ativas](#)

ISSN: 1981-3686

OPEN JOURNAL

[Ajuda do sistema](#)

USUÁRIO

Logado como **tfonseca**

- [Meus dados](#)
- [Perfil](#)
- [Sair do sistema](#)

CONTEÚDO

Pesquisa

Todos

Pesquisar