

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE
BIOLÓGICA**

**PRODUÇÃO DE PROTEASES NEUTRAS DE COGUMELOS
PARA APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA DE DETERGENTE**

Larissa Svetlana Cavalcante Silva

**MANAUS
2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE
BIOLÓGICA**

Larissa Svetlana Cavalcante Silva

**PRODUÇÃO DE PROTEASES NEUTRAS DE COGUMELOS
PARA APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA DE DETERGENTE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como requisito parcial para a obtenção de título de Mestre em Diversidade Biológica.

Orientadora: Professora Doutora Maria Francisca Simas Teixeira

**MANAUS
2015**

LARISSA SVETLANA CAVALCANTE SILVA

PRODUÇÃO DE PROTEASES NEUTRAS DE COGUMELOS
PARA APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA DE DETERGENTE

BANCA EXAMINADORA

Professora Doutora Maria Francisca Simas Teixeira – Presidente

Doutora Ormezinda Celeste Cristo Fernandes

Doutor Raimundo Felipe Cruz Filho

Doutora Rosana Antunes Palheta

MANAUS
2015

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586p Silva, Larissa Svetlana Cavalcante
PRODUÇÃO DE PROTEASES NEUTRAS DE COGUMELOS
PARA APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA DE DETERGENTE / Larissa
Svetlana Cavalcante Silva. 2015
57 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Maria Francisca Simas Teixeira
Dissertação (Mestrado em Diversidade Biológica) - Universidade
Federal do Amazonas.

1. Basidiomicetos. 2. Enzimas. 3. Fermentação submersa. 4.
Fungos. I. Teixeira, Maria Francisca Simas II. Universidade Federal
do Amazonas III. Título

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, irmãos, familiares e orientadora.
A todos aqueles que, direta ou indiretamente, fizeram parte deste projeto.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus e a Nossa Senhora pela vida e pelas oportunidades que me foram dadas até aqui.

Aos meus pais, Sandra e Wellington, pelos valores transmitidos a mim e aos meus irmãos. Por me darem condições para que eu pudesse concluir mais uma etapa da minha formação acadêmica.

Aos meus avós, Joselito e Lireuda, por tanto amor e carinho, pelas rezas para que tudo desse certo.

À minha tia Socorro, por ser tão querida e me ajudar sempre que preciso.

Aos meus irmãos Thiago e Philippe, que sempre serviram de exemplo. À minha irmã, Letícia Esther, por ter me acompanhado de perto durante este período, sempre ajudando e alegrando.

Ao namorado, Pedro Afonso, por todo o amor, compreensão e força quando tudo parecia dar errado. À família França por me querer tão bem e acreditar no meu potencial.

Agradeço às amigas Raiane Aila, Tamiris Fonseca, Jéssica Barroncas e Tamires Menezes pelos momentos de descontração, apoio e incentivo.

Agradeço à Universidade Federal do Amazonas, ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica, ao Laboratório de Micologia da UFAM e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

À minha orientadora, Professora Doutora Maria Francisca Simas Teixeira, por me incentivar no caminho da ciência, transmitindo ensinamentos, por ser exemplo de profissional e mulher.

Aos membros da banca examinadora por se disponibilizarem a participar desta defesa de dissertação.

A todos do Laboratório de Micologia, Mircella Alecrim, Ana Rita, Rosimar Palheta, Bianca, Lorisa Simas, Nelly Vinhote, Taciana Amorim e Raimundo Felipe que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho, especialmente ao Salomão Martim pela ajuda em todos os momentos.

“Oh minha Senhora e também minha Mãe, eu me ofereço inteiramente toda a vós.
E em prova da minha devoção, eu hoje vos dou meu coração.
Consagro a vós meus olhos, meus ouvidos, minha boca.
Tudo o que sou desejo que a vós pertença.
Incomparável Mãe, guardai-me, defendei-me.
Como filha e propriedade vossa, Amém.”

RESUMO

Proteases são enzimas comercialmente importantes e dentre as fontes desses biocatalizadores estão os basidiomicetos. A utilização destas nos diferentes segmentos industriais é o fator essencial que contribui para busca de proteases com novas propriedades. O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade proteolítica de quatro espécies de cogumelos da Coleção de Cultura DPUA para avaliar mecanismos regulatórios da espécie produtora de altos níveis de protease para aplicação industrial. *Auricularia mixotricha* DPUA 1695, *Ganoderma lucidum* DPUA 1694, *Lentinus citrinus* DPUA 1693 e *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720 foram investigados quanto à produção de proteases em meio GYP [(glicose 2% (p/v) + peptona 1% (p/v) + extrato de levedura 0,5% (p/v)]. Na determinação da influência de diferentes parâmetros na síntese enzimática, fontes de carbono, nitrogênio, tamanho do inóculo, tempo de cultivo e volume do meio foram estudados. Para verificação da influência de substrato indutor (gelatina e extrato de levedura), idade do inóculo e pH inicial foi realizado um planejamento fatorial completo 2^4 , com 4 pontos centrais. Na determinação do pH ótimo, soluções tampão 0,1 M foram utilizadas: citrato (pH 4-6), fosfato (pH 6-8) e carbonato-bicarbonato de sódio (pH 9-10). O efeito da temperatura na atividade proteolítica foi avaliado nas temperaturas 30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C. O efeito de íons metálicos e inibidores foi determinado utilizando CaCl_2 , KCl, NaCl, CuSO_4 , FeSO_4 , MgSO_4 e ZnSO_4 , EDTA, PMSF, pepstatina e ácido iodoacético. A eficiência da protease na remoção de manchas foi realizada utilizando tecidos de algodão manchados com polpa de açaí, suco de couve e suco V8 vegetais®. No teste de compatibilidade do extrato bruto com detergentes comerciais foi utilizado Ace®, Ariel®, Minuano® e Omo®. *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 apresentou maior quantitativo enzimático, sendo a espécie selecionada para determinação da influência de diferentes parâmetros na síntese enzimática. A maior produção de protease foi verificada utilizando 5 discos miceliais como inóculo em 40 mL do meio AYG [amido 2% (p/v) + extrato de levedura 0,5% (p/v) + gelatina 1% (p/v)], durante sete dias. No planejamento fatorial a máxima atividade obtida foi verificada no ensaio contendo amido 2% (p/v) + gelatina 0,5% (p/v) + extrato de levedura 1% (p/v), pH 8 e inóculo com 16 dias de cultivo. As proteases apresentaram atividade máxima em pH 7,0 a 50 °C, sendo estáveis por 1h entre pH 7 a 9 e de 30 a 50 °C. Íons Fe^{2+} estimularam a atividade, enquanto ions K^+ , EDTA, PMSF e ácido iodoacético inibiram, indicando ser metalo, serino e cisteino-proteases. O extrato bruto foi eficaz na remoção de mancha de açaí e apresentou compatibilidade com Minuano®. As características destas enzimas como pH e temperatura ótima, compatibilidade e estabilidade, permitem sua utilização como aditivos na indústria de detergentes.

Palavras chave: basidiomicetos; enzimas; fermentação submersa.

ABSTRACT

Proteases are important commercial enzymes with several applications in industrial areas and it is an essential factor the search of proteases sources with new properties. For that reason, the aim of this study was to investigate the proteolytic activity of four mushrooms strains from DPUA Culture Collection and evaluate the regulatory mechanisms of the highest producer in order to industrial application. *Auricularia mixotricha* DPUA 1695, *Ganoderma lucidum* DPUA 1694, *Lentinus citrinus* DPUA 1693 and *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720 were inoculated in GYP medium [(2.0% (w/v) glucose + 1.0% (w/v) peptone + 0.5% (w/v) yeast extract)]. The parameters used to determine the influence in enzyme production were: carbon sources, nitrogen sources, inoculum size, cultivation time and medium volume. A 2⁴ full factorial design, with 4 central points, was made to verify the influence of inducer substrate, inoculum age and initial pH. The determination of optimum pH was carried out with citrate (pH 4.0 to 6.0), phosphate (pH 6.0 to 8.0) and carbonate-sodium bicarbonate (pH 9.0 to 10.0) buffers; the optimum temperature in 30, 40, 50, 60, 70 and 80 °C; and the effect of inhibitors was made using CaCl₂, KCl, NaCl, CuSO₄, FeSO₄, MgSO₄, ZnSO₄, EDTA, PMSF, pepstatin and iodoacetic acid. The protease efficiency in removing stains was carried out using cotton cloths stained with acai pulp, cabbage juice and V8 vegetable juice® and the crude extract compatibility was compared to the commercial detergent brands Ace®, Ariel®, Minuano® and Omo®. *P. ostreatoroseus* was the selected strain presenting the highest protease production. According to the parameters evaluated, the cultivation using 5 discs of the mushroom mycelium in 40 mL of AYG [2.0% (w/v) starch, 0.5% (w/v) yeast extract + 1.0 % (w/v) gelatin] during 7 days promoted the highest protease production. In the factorial design, the highest activity was obtained in the medium containing 2.0 (w/v) starch + 0.5 % gelatin + 1.0 % yeast extract, pH 8.0 and inoculum of 16 days age. The proteases had maximum activity at pH 7.0 and 50 °C. They were stable for 1 hour between pH 7.0 and 9.0 and for 30 minutes at 50 °C. The metallic Fe ions stimulated the activity while K ions, EDTA, PMSF and iodoacetic acid inhibited the activity indicating the presence of metallic, serine and cysteine proteases. The crude extract was efficient in the removing of acai pulp stains and was compatible with the commercial detergent Minuano®. The enzymes characteristics, according to optimum pH and temperature, compatibility and stability, allow their utilization as additive in detergent industry.

Keywords: basidiomycetes; enzymes; submerged fermentation.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Capítulo 01

Figura 1. A – *Auricularia mixotricha*; B – *Ganoderma lucidum*; C – *Lentinus citrinus*; D – *Pleurotus ostreatoroseus*.....18

Tabela 1. Parâmetros avaliados no planejamento fatorial 2^4 para otimização da produção de proteases por *P. ostreatoroseus*.....22

Capítulo 02

Figura 1. Diagrama de Pareto para efeitos estimados das variáveis (1) Idade do inóculo, (2) Extrato de levedura % (p/v), (3) Gelatina % (p/v) e (4) pH inicial na produção de proteases por *P. ostreatoroseus*.....35

Figura 2. Efeito do pH (A) e da temperatura (B) na atividade de proteases produzida por *P. ostreatoroseus*.....36

Figura 3. Estabilidade ao pH (A) e a temperatura (B) na atividade de proteases produzida por *P. ostreatoroseus*.....37

Figura 4. Eficiência da protease de *P. ostreatoroseus* na remoção de manchas de suco de açaí.....38

Figura 5. Compatibilidade e estabilidade de protease produzida por *P. ostreatoroseus* com detergentes comerciais. Os detergentes estudados foram: A) Ace®; B) Ariel®; C) Minuano® e D) Omo®.....39

Tabela 1. Parâmetros avaliados no planejamento fatorial 2^4 para otimização da produção de proteases pelo cogumelo selecionado.....29

Tabela 2. Atividade de proteases produzidas por cogumelos comestíveis em 50 mL de GYP [(glicose 2% (p/v) + peptona 1% (p/v) + extrato de levedura 0,5% (p/v), pH 7,0], a 150 rpm, durante 120 horas.....32

Tabela 3. Influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio, tamanho do inóculo, tempo de fermentação e volume do meio na produção de proteases por *P. ostreatoroseus*.....33

Tabela 4. Matriz do planejamento 2^4 utilizada para identificação da concentração de gelatina, extrato de levedura, idade ideal do inóculo e pH inicial do meio na produção de protease por *P. ostreatoroseus*.....34

Tabela 5. Efeito de íons e substâncias na atividade de protease.....38

SUMÁRIO

Capítulo 01	12
Revisão bibliográfica e Material e métodos	12
1. INTRODUÇÃO GERAL	13
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 Enzimas proteolíticas	14
2.2 Classificação e aplicação industrial das proteases	14
2.2.1 Utilização na indústria de detergentes.....	15
2.3 Fontes de proteases.....	15
2.4 Cogumelos comestíveis como fontes de proteases.....	16
2.4.1 Espécies de cogumelos.....	17
2.5 Fermentação submersa	18
3. OBJETIVOS	20
3.1 Geral.....	20
3.2 Específicos	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Cultivo dos cogumelos	21
4.2 Fermentação submersa	21
4.3 Determinação da atividade de protease – Seleção do cogumelo	21
4.4 Determinação da influência de diferentes parâmetros na produção de proteases pelo cogumelo selecionado.....	21
4.5 Padronização dos fatores de influência: substrato indutor, idade do inóculo e pH inicial do meio	22
4.6 Caracterização das proteases quanto temperatura ótima e pH ótimo e estabilidade ao pH e temperatura.....	22
4.6.1 Efeito do pH e temperatura na atividade de proteases	22
4.6.2 Efeito do pH e temperatura na estabilidade de proteases	23
4.7 Efeito de íons metálicos e inibidores.....	23
4.8 Aplicações biotecnológicas	23
4.8.1 Remoção de manchas.....	23
4.8.2 Compatibilidade com detergentes comerciais.....	24
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
Capítulo 02.....	25
Artigo a ser submetido	25
PROTEASE DE COGUMELOS DA AMAZÔNIA COM PROPRIEDADE PARA USO EM DETERGENTE.....	26

6. CONCLUSÃO GERAL	46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

Capítulo 01

Revisão bibliográfica e Material e métodos

1. INTRODUÇÃO GERAL

Em meio às várias enzimas comercializadas, as proteases apresentam características únicas, em termo de mecanismo catalítico e especificidade do substrato, atuando na hidrólise de proteínas. Estes biocatalisadores somam 65% do total de vendas e podem ser utilizados em diversos setores industriais como, processamento de alimentos e bebidas, formulação de detergentes, produção de medicamentos e fabricação de papel (SANTOS e SATO, 2009; YIN et al., 2014; KUMMARI e PRASAD, 2015).

Dentre a variedade de aplicações das enzimas proteolíticas no mercado industrial, são mais utilizadas como aditivos de detergentes, substituindo catalisadores químicos que causam poluição ambiental (PUNDIR et al., 2012; NIYONZIMA e MORE, 2013). Atuam na hidrólise de manchas protéicas, como sangue e outros fluidos corporais. A utilização de proteases na indústria de detergentes depende da atividade enzimática em pH que varia de neutro a alcalino, além de suportarem temperaturas de lavagem (ZAMBARE et al., 2014).

As enzimas proteolíticas têm sido produzidas por fermentação submersa, um processo em que bactérias, leveduras ou fungos filamentosos crescem em um determinado meio líquido, padronizado para fornecer condições ideais para o crescimento e produção das enzimas desejadas. O cultivo submerso oferece uma série de vantagens, como facilidade de cultivo, crescimento dos micro-organismos em condições controladas de temperatura e pH, além da fácil recuperação das enzimas excretadas no meio (COUTO e SANROMAN, 2006; FEITOSA, 2009).

Cogumelos são macrofungos que possuem propriedade nutricional, considerados uma especiaria nobre na culinária. Muitas espécies são fontes de compostos bioativos com propriedade medicinal, antimicrobiana, antioxidante, além de polissacarídeos, vitaminas e enzimas (BASKAR et al., 2011; ORSINE et al., 2012; ALI et al., 2013). A diversidade de cogumelos produtores de enzimas está estimulando a identificação e produção de proteases apropriadas para uso em processos industriais específicos (CAMPOS et al., 2011; RAMOS et al., 2011). A utilização de cogumelos em bioprocessos vem ganhando espaço por necessitarem de teores reduzidos de nutrientes para crescimento, excelente adaptação em meios naturais ou sintéticos, além de técnicas fáceis de cultivo (ORSINE et al., 2012; MANZUR et al., 2014).

Considerando a diversidade de basidiomicetos produtores de proteases da Coleção de Culturas DPUA e a utilização destas enzimas nos diferentes segmentos industriais, estudos são necessários para padronização de condições adequadas de produção de proteases com novas propriedades.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Enzimas proteolíticas

Em meados do século XX, as enzimas começaram a ser comercializadas para a utilização em processos industriais. Dentre a variedade de reações que as enzimas participam, a proteólise causa a modificação das propriedades físicas, químicas e biológicas originais das proteínas, sendo um processo essencial para o ser humano, por ser responsável pelo catabolismo de proteínas, coagulação do sangue, entre outras funções fisiológicas e também para as indústrias que necessitam da digestão protéica (CAMPOS et al., 2011; SUGANTHI et al., 2013).

As proteases ganharam um grande espaço nos diversos setores produtivos, ocupando hoje 65% do mercado mundial. Essas enzimas substituem catalisadores químicos nas indústrias têxteis, farmacêuticas, de detergentes, de alimentos e bebidas e de recuperação de prata de raio-x (VIJAYARAGHAVAN et al., 2014; ABHIJIT, 2012).

2.2 Classificação e aplicação industrial das proteases

A *Enzyme Commission* (EC) posiciona as proteases no grupo 3 (hidrolases) e sub-grupo 4 (hidrolisam ligações peptídicas), família EC 3.4. Tais enzimas podem ser divididas em dois grupos principais, dependendo da posição da ligação peptídica clivada.

As exopeptidases caracterizam-se por hidrolisarem ligações peptídicas a partir das extremidades aminoterminal e carboxiterminal do substrato, já as endopeptidases atuam na clivagem interna da cadeia polipeptídica. As endopeptidases se classificam de acordo com o aminoácido presente no seu sítio ativo e podem ser subdivididas em serina (EC 3.4.21), cisteína (EC 3.4.22), aspártico (EC 3.4.23) e metalo-protease (EC 3.4.24) (NC-IUBMB, 2011; HSIAO et al., 2014).

Além da classificação tradicional, as proteases podem também ser agrupadas de acordo com a faixa de pH no qual expressam sua maior atividade (RAI e MUKHERJEE, 2009; SINGHAL et al., 2012).

As proteases ácidas são representadas principalmente pelas aspártico-proteases e tem sua melhor atividade em pH entre 2,0 e 6,0. Geralmente são produzidas por micro-organismos, sendo utilizadas na fabricação de queijos, no amaciamento de carnes, cereais e bebidas (WISEMAN, 1991).

As proteases neutras são representadas pelas cisteíno-proteases, metalo-proteases e algumas serino-proteases. Geralmente proteases bacterianas expressam maior atividade em uma faixa de pH de 5-8 e fúngicas em pH 7, podendo então ser utilizadas na indústria de

detergente e alimentícia (RAO et al.,1998; JISHA et al., 2013). Possuem um papel de destaque na fabricação de alimentos porque catalisam a hidrólise de uma ligação específica em um determinado aminoácido, melhorando o sabor, o aroma, a textura, a funcionalidade e a qualidade nutricional (AHMED et al., 2010; INÁCIO et al., 2015).

As proteases alcalinas são representadas principalmente pelas serino-proteases, são conhecidas por constituírem 60 a 65% do mercado industrial de proteases e tem uma faixa ótima de pH de 8,0 a 11,0. Possuem uma vasta gama de aplicações, como recuperação de prata de raio-x, fabricação de medicamentos, indústria têxtil, e formulação de detergentes (RAI e MUKHERJEE, 2010; GOMAA, 2012).

2.2.1 Utilização na indústria de detergentes

Dentre as aplicações no mercado industrial, as proteases são mais utilizadas como aditivos de detergentes, o que corresponde a 42% do mercado. São empregadas na retirada de resíduos protéicos como manchas de alimentos e secreções corporais, permitindo a substituição de produtos tóxicos que agridem o meio ambiente, além de aumentar a eficácia da lavagem, manter a cor dos tecidos e economizar energia e água (PUNDIR et al., 2012; NIYONZIMA e MORE, 2013).

A adição de enzimas proteolíticas na formulação de detergentes depende de uma série de fatores como maior atividade em pH neutro a alcalino (7-11) e em ampla faixa de temperatura, força iônica e estabilidade na presença de agentes oxidantes e surfactantes (ZAMBARE et al., 2014).

2.3 Fontes de proteases

As proteases são amplamente distribuídas na natureza. Segundo Raj et al. (2012) e Mushtaq et al. (2015) são fontes de proteases, os vegetais, animais e um grande número de micro-organismos, incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos.

Tradicionalmente, as enzimas mais estudadas são aquelas de origem animal e vegetal, porém há alguns anos a produção de enzimas por micro-organismos vem ganhando relevância industrial, já que as extraídas de plantas e de animais não atendem a demanda comercial (ZAMBARE et al., 2014; MUSHTAQ et al., 2014).

A produção industrial de proteases por micro-organismos é beneficiada pela grande diversidade genética e fácil manipulação, por necessitarem de um espaço curto de tempo para produção por fermentação submersa ou fermentação semi-sólida em condições controladas, além da fácil recuperação das enzimas secretadas (SANKARALINGAM et al., 2012; CASTRO e SATO, 2014).

Dentre os fungos fontes de proteases, os filamentosos estão sendo bastante estudados no que diz respeito à produção de enzimas industriais devido a sua capacidade de crescer facilmente em substratos orgânicos e produzir uma vasta gama de enzimas extracelulares. Entre as muitas vantagens oferecidas pela produção de enzimas por fungos estão: baixo custo de materiais e elevada e rápida produtividade (SILVA et al., 2009; VISHWANATHA et al., 2010).

2.4 Cogumelos comestíveis como fontes de proteases

Cogumelos comestíveis são macrofungos pertencentes ao Reino Fungi, Filo Basidiomycota, morfológicamente complexos, exibindo formas estruturais diferentes durante todo seu ciclo de vida. Tem como característica morfológica, o micélio que após um período de crescimento em condições favoráveis, produz uma estrutura denominada píleo, comumente chamado de corpos de frutificação ou basidioma, com um estipe, que o prende ao substrato (CHANG, 1989; CHANG e MILES, 1992; PUTZKE e PUTZKE, 1998, PUTZKE, 2011).

As diversas espécies de cogumelos estão distribuídas em diferentes tipos de ambientes e podem ser parasitas, micorrízicos e na maioria das vezes sapróbios, decompositores de substratos orgânicos (ERJAVEC et al., 2012).

Consumidos no Oriente desde a antiguidade, são alimentos quase completos, ricos em proteínas, sais minerais, ferro, vitaminas B1 e B2, cálcio, além de apresentarem baixos teores de gordura e carboidratos. Além disso, apresentam potencial farmacológico como, imunoestimulante, antitumoral, hipoglicêmico e como suplemento nutricional (XU et al., 2011; ZHANG et al., 2014; DULAY et al., 2015).

Os cogumelos não só fornecem alto valor nutritivo, mas também, são capazes de produzir metabólitos secundários e enzimas que podem ser utilizadas em vários segmentos industriais (RAMOS et al., 2011).

Há uma variedade de enzimas potencialmente comerciais produzidas por basidiomicetos, inclusive proteases. Durante o crescimento *in vitro* do micélio as enzimas são liberadas no meio de fermentação pelo cogumelo para degradar os materiais insolúveis em moléculas simples e solúveis, que são posteriormente utilizadas para nutrição intracelular. A vantagem de se obter proteases de cogumelos comestíveis é que são fungos de fácil acesso, crescem *in vitro*, não são tóxicos e o micélio pode ser facilmente removido do substrato obtido por fermentação em meio líquido (IKETANI et al., 2013; ZAFERANLOO et al., 2014).

2.4.1 Espécies de cogumelos

2.4.1.1 *Auricularia mixotricha*

Espécies do gênero *Auricularia* são geralmente comestíveis e muito utilizadas na medicina pelos povos orientais, como *Auricularia politricha* e *Auricularia auricula-judae*. Têm sido cultivadas em regiões tropicais e subtropicais e podem ser encontradas no Brasil. Seus basidiomas são facilmente reconhecíveis pela sua consistência gelatinosa (IRAWATI et al., 2012).

Auricularia mixotricha (Figura 1A) pertence a Classe Badiomycetes, subclasse Phragmobasidiomycetidae, Ordem Auriculariales e Família Auriculariaceae (GUERRERO e HOMRICH, 1999).

2.4.1.2 *Ganoderma lucidum*

Ganoderma é um gênero de cogumelos decompositores de madeira que possuem corpo de frutificação rígido, possuindo mais de 300 espécies relatadas. Devido sua consistência são pouco utilizados na alimentação (BABY et al., 2015).

Ganoderma lucidum (Figura 1B), um cogumelo pertencente à classe de Homobasidiomycetes, Ordem Ganodermatales (Polyporales), Família Ganodermataceae (Polyporaceae), está bem representado nos trópicos, ocorrendo em diversos ecossistemas brasileiros (GUGLIOTTA et al., 2011; JUNIOR et al., 2011). Em função dos compostos bioativos produzidos por esta espécie vêm sendo utilizado na medicina oriental há mais de 2000 anos (YANG et al., 2013). A espécie caracteriza-se por ser brilhante, como se fossem envernizados, píleo semicircular, com tamanho de 5 a 15 cm de largura, estipe normalmente longo (GUERRERO e HOMRICH, 1999).

2.4.1.3 *Lentinus citrinus*

O gênero *Lentinus* possui como características morfológicas estipe sempre presente, central ou excêntrico, píleo pigmentado, quando velho ou seco, e a camada cortical formada por hifas prostadas, lamelas com borda mais ou menos denticulada, crenulada ou serrulada (PEREIRA e PUTZKE, 1989).

Lentinus citrinus Walley ET Rammeloo (Figura 1C), Ordem Agaricales, Família Lentinaceae (Polyporaceae) é citado como cogumelo comestível, produtor de proteases em meio natural e sintético e pode ser encontrado em regiões tropicais e subtropicais (PUTZKE, 2002; KIRSCH et al., 2011).

2.4.1.4 *Pleurotus ostreatoroseus*

Pleurotus é um gênero importante de Basidiomicetos, onde a maioria das espécies conhecidas, *P. citrinopileatus*, *P. pulmonarius*, *P. eryngii*, *P. florida*, *P. ostreatus*, *P. ostreatoroseus*, são comestíveis e várias delas cultivadas (PUTZKE, 2002; TÉLLEZ-TÉLLEZ et al., 2013). Possuem também propriedades terapêuticas como antimicrobianos, antivirais, antitumorais e antioxidantes (PATEL et al., 2012).

São características comuns ao gênero: superfície lisa, píleo carnoso, às vezes membranáceo e não pigmentado. O estipe é geralmente central, excêntrico ou lateral e raramente ausente. Quando pigmentado, possuem tons de cinza, verde, vermelho, lilás ou rosa, por exemplo, a coloração típica de *P. ostreatoroseus*. *Pleurotus ostreatoroseus* (Figura 1D) pertence à ordem Agaricales, Família Pleurotaceae (Polyporaceae) (PEREIRA e PUTZKE, 1989).

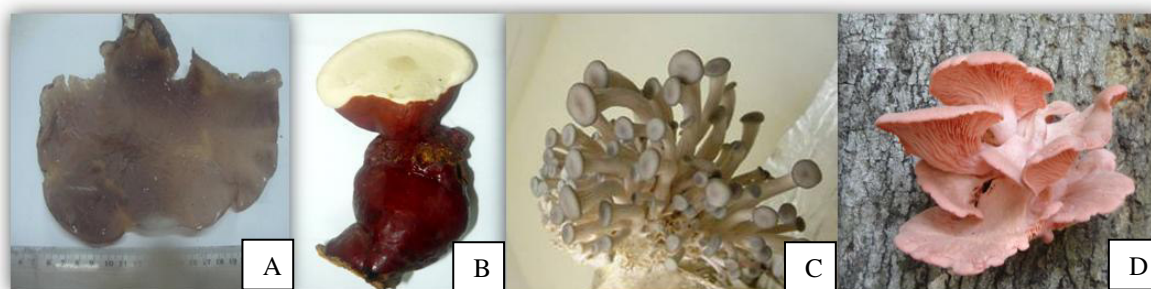


Figura 1. A – *Auricularia mixotricha*; B – *Ganoderma lucidum*; C – *Lentinus citrinus*; D – *Pleurotus ostreatoroseus*

Fonte: Herbário Micológico Jair Putzke

2.5 Fermentação submersa

Dentre os bioprocessos, a fermentação submersa é uma técnica que utiliza meio nutriente líquido para cultivar determinados tipos de micro-organismos. É bastante eficaz na produção de proteases em escala industrial, pois além da facilidade de cultivo, as enzimas de interesse são facilmente recuperadas por serem extracelulares, ou seja, os micro-organismos secretam as enzimas para que haja a quebra de nutrientes presentes no meio (SUBRAMANIAM e VIMALA, 2012; NIYONZIMA e MORE, 2013).

Lakshmi et al. (2014) mostra que a eficácia do processo de produção de proteases depende diretamente das condições de cultivo. Parâmetros nutricionais, como fontes de carbono e nitrogênio, bem como suas concentrações, devem ser medidos e controlados para otimizar o processo de fermentação, já que são os principais constituintes de um meio de

cultivo. A avaliação do teor e da qualidade dos nutrientes do meio pode ser uma alternativa para manter um equilíbrio entre os vários compostos presentes, minimizando assim a quantidade de componentes não utilizados ao fim da fermentação (KUMAR e TAKAGI, 1999; PATRICK et al., 2011). Diferentes espécies de micro-organismos possuem distintas preferências em relação às fontes de carbono e nitrogênio para o crescimento e produção de enzimas. A resposta das células microbianas aos diferentes indutores enzimáticos varia dependendo, por exemplo, da concentração e tipo, ou pela presença de glicose ou outros açúcares no meio (AGUIAR e MENEZES, 2000; SHAMPA et al. 2009).

Fatores físicos também influenciam diretamente na taxa de crescimento dos micro-organismos e conseqüentemente na produção de enzimas. Prasad e Raju (2013) citam que todos os micro-organismos são sensíveis à concentração de íons H^+ no meio, pois influenciam os processos enzimáticos e transporte celular intermembranar, existindo uma faixa de pH em que o crescimento e a produção enzimática é máxima. Segundo Aikat e Bhattacharyya (2000) e Maldonado et al. (2014), a idade e tamanho do inóculo podem variar em função da espécie e dos nutrientes utilizados. Já a aeração influencia significativamente no crescimento de bactérias e fungos e conseqüentemente na formação de produtos metabólicos, se as reações enzimáticas forem dependentes de oxigênio. Portanto todos os parâmetros de um bioprocessamento precisam ser avaliados e monitorados para que seja eficaz (BACH et al., 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar a produção de protease por espécies de cogumelos da Coleção de Cultura DPUA e caracterizar a enzima para aplicação industrial.

3.2 Específicos

- Avaliar a produção de enzimas proteolíticas de quatro espécies de cogumelos para selecionar a que expressar maior atividade enzimática para uso industrial.
- Investigar a influência de parâmetros químicos e físicos na produção de proteases pela espécie selecionada.
- Caracterizar as proteases da espécie selecionada quanto a temperatura e pH ótimo e estabilidade à temperatura e pH.
- Verificar a viabilidade da aplicação do extrato enzimático bruto na retirada de mancha e compatibilidade com detergente comercial.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivo dos cogumelos

A. mixotricha DPUA 1695, *G. lucidum* DPUA 1694, *L. citrinus* DPUA 1535, *P. ostreatoroseus* DPUA 1720, preservados sob óleo mineral, foram cedidas pela Coleção de Cultura DPUA, da Universidade Federal do Amazonas-UFAM. As culturas foram subcultivadas em ágar batata dextrose (BDA) com extrato de levedura (YE) 0,5% (p/v), em placas de Petri (90 mm x 15 mm). Os cultivos foram mantidos a 25 °C, sem luz, por doze dias.

4.2 Fermentação submersa

A produção das enzimas proteolíticas pelos cogumelos foi realizada por fermentação submersa. Para produção de proteases em 50 mL de extrato de GYP [(glicose 2% (p/v) + peptona 1% (p/v) + extrato de levedura 0,5% (p/v), pH 7,0], em cada frasco Erlenmeyer de 125 mL foram inoculados 10 discos miceliais ($\varnothing=10$ mm) retirados dos cultivos em BDA+YE. A fermentação foi conduzida a 25 °C, 150 rpm. Após cinco dias a biomassa micelial foi separada do sobrenadante por filtração a vácuo e o extrato bruto filtrado em membrana de acetato de celulose (0,45 μ m). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.3 Determinação da atividade de protease – Seleção do cogumelo

Na determinação da atividade das proteases, 150 μ L do extrato bruto foi adicionado em 250 μ L de azocaseína 1% (p/v), em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,2. A mistura reacional foi incubada a 25 °C, em câmara escura. Após uma hora a reação foi interrompida pela adição de 1,2 mL de ácido tricloroacético 10% (p/v). Do sobrenadante foi transferido 800 μ L para 1,4 mL de hidróxido de sódio 1 M. Todos os experimentos, incluindo o branco, foram realizados em triplicata.

Uma unidade de atividade proteolítica foi definida, segundo Leighton (1973) modificado, como a quantidade de enzimas capaz de produzir um aumento na absorvância de 0,01 em uma hora, a 440 nm.

4.4 Determinação da influência de diferentes parâmetros na produção de proteases pelo cogumelo selecionado

Na determinação da influência de fonte de carbono, nitrogênio, tempo de fermentação e volume do meio de cultura, a glicose do meio base (GYP) foi substituída por amido e

sacarose 2% (p/v) e, a peptona por gelatina e sulfato de amônio 1% (p/v). Em todas as formulações foi adicionado extrato de levedura 0,5% (p/v). Os meios líquidos preparados foram: 1) Amido + extrato de levedura + gelatina (AYG); 2) Amido + extrato de levedura + sulfato de amônio (AYSa); 3) Sacarose + extrato de levedura + gelatina (SYG); 4) Sacarose + extrato de levedura + sulfato de amônio (SYSa). Em cada frasco de Erlenmeyer foi adicionado 40 ou 60 mL de cada meio, seguindo-se a esterilização a 121 °C por 15 minutos. Em cada frasco contendo AYG, AYSa, SYG, SYSa foi inoculado 5 ou 15 discos miceliais da cultura inóculo. Os cultivos foram realizados a 25 °C, 150 rpm, durante três ou sete dias. O cultivo controle foi preparado utilizando-se como inóculo 10 discos miceliais em 50 mL do meio base (GYP), durante 5 dias. Ao término da fermentação a massa micelial foi separada do sobrenadante por filtração a vácuo e o extrato bruto concentrado em membrana de acetato de celulose (0,45 µm). A atividade de protease foi determinada em triplicata.

4.5 Padronização dos fatores de influência: substrato indutor, idade do inóculo e pH inicial do meio

Para determinação da influência da concentração de gelatina, extrato de levedura, idade do inóculo e pH inicial do meio foi realizado um planejamento fatorial completo 2⁴, com 4 pontos centrais (Tabela 1). O meio de cultura, o tamanho do inóculo, tempo de incubação e o volume do meio utilizado neste experimento foram os padronizados no item anterior. A fermentação foi conduzida a 25 °C, 150 rpm. A atividade de protease foi determinada em triplicata.

Tabela 1. Parâmetros avaliados no planejamento fatorial 2⁴ para otimização da produção de proteases por *P. ostreatoroseus*

Parâmetros	Nível (-1)	Nível (0)	Nível (+1)
Gelatina (%)	0,5	1,0	2,0
Extrato de levedura (%)	0,2	0,5	1,0
Idade do inóculo	8	12	16
pH inicial	6	7	8

4.6 Caracterização das proteases quanto temperatura ótima e pH ótimo e estabilidade ao pH e temperatura

4.6.1 Efeito do pH e temperatura na atividade de proteases

Para determinar o efeito do pH na atividade das proteases o extrato bruto foi adicionado nos seguintes tampões contendo azocaseína 1% (p/v): Solução tampão citrato 0,1 M (pH 4-6), solução tampão fosfato 0,1 M (pH 6-8) e solução tampão carbonato-bicarbonato

de sódio 0,1 M (pH 9-10). As análises foram realizadas por uma hora, a 25 °C, em câmara escura, seguindo-se a determinação da atividade das proteases. O efeito da temperatura na atividade proteolítica foi avaliado incubando o extrato enzimático em tampão de pH ótimo contendo azocaseína 1% (p/v) nas temperaturas de estudo (30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C), durante 1 hora, seguindo-se a determinação da atividade das proteases.

4.6.2 Efeito do pH e temperatura na estabilidade de proteases

Para os ensaios de estabilidade ao pH, o extrato foi diluído nos tampões utilizados no item anterior, incubados durante 24 h a 25°C, seguindo-se da determinação da atividade proteolítica nas condições ótimas de pH encontradas. Para a realização do teste de estabilidade à temperatura, incubou-se o extrato enzimático durante 1 h em diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C), seguindo-se da determinação da atividade proteolítica em condições ótimas de pH e temperatura.

4.7 Efeito de íons metálicos e inibidores

O efeito de íons metálicos [Cloreto de cálcio (CaCl₂), Cloreto de potássio (KCl), Cloreto de sódio (NaCl), Sulfato de cobre (CuSO₄), Sulfato ferroso (FeSO₄), Sulfato de magnésio (MgSO₄) e Sulfato de zinco (ZnSO₄)] e de compostos inibidores de protease [EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil), pepstatina e ácido iodoacético], na concentração final de 10 mM foi determinado por pré-incubação com o extrato bruto durante 1 hora, a 50 °C. A atividade enzimática residual foi determinada e comparada com o controle que corresponde a 100% de atividade. Todas as amostras foram preparadas em triplicata (ALECRIM et al., 2015).

4.8 Aplicações biotecnológicas

4.8.1 Remoção de manchas

Para determinar a eficiência da protease na remoção de manchas, tecidos de algodão (5cm x 5cm) foram manchados, separadamente, com 100 µL de polpa de açaí, suco de couve e suco V8 vegetais®. Os tecidos foram secos, embebidos em formaldeído a 2% e lavados com água destilada para remoção do formaldeído. O extrato bruto (2000 µL) foi adicionado aos tecidos que foram incubados a 37 ° C. Os controles foram acondicionados sem enzima. Após 30 minutos cada pedaço de tecido, incluindo o controle, foi lavado com água destilada e seco (VIJAYALAKSHMI et al., 2011).

4.8.2 Compatibilidade com detergentes comerciais

Os detergentes Ace®, Ariel®, Minuano® e Omo® foram diluídos em água destilada, na concentração final de 7 mg/mL para simular condições de lavagem. Em seguida, foram tratados termicamente a 100 °C por 15 min, para inativar as enzimas que poderiam fazer parte da formulação dos detergentes. O extrato bruto foi adicionado na preparação do detergente (1:1) e incubado na temperatura ótima por 1 h. A cada 10 minutos foram retiradas amostras para determinação da atividade residual, tanto nos tratamentos quanto no controle (NASCIMENTO e MARTINS, 2006).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ao nível de 95% de significância e médias comparadas pelo teste de Tukey com 5% de significância, utilizando-se o “Software Minitab ® 17.1.0” e o “Software Statistica 8.0” (Statsoft, Inc., 2008, USA).

Capítulo 02

Artigo a ser submetido

PROTEASE DE COGUMELOS DA AMAZÔNIA COM PROPRIEDADE PARA USO EM DETERGENTE

Larissa Svetlana Cavalcante SILVA¹, Salomão Rocha MARTIM², Mircella Marialva ALECRIM³, Maria Francisca Simas TEIXEIRA⁴

¹Universidade Federal do Amazonas – UFAM - Manaus – Brasil – larissasvetlanas@gmail.com

²Universidade Federal do Amazonas – UFAM - Manaus – Brasil – salomao.martim@gmail.com

³Universidade Federal do Amazonas – UFAM - Manaus – Brasil – mircella.ma@gmail.com

⁴Universidade Federal do Amazonas – UFAM - Manaus – Brasil – mteixeira@ufam.edu.br

RESUMO

A busca de proteases com características específicas, assim como novos organismos produtores está sendo objetivo de vários estudos para redução do custo de produção em determinados setores industriais. O objetivo do trabalho foi verificar a produção de protease por quatro cogumelos de podridão branca para selecionar uma espécie com características apropriadas para aplicação na indústria de detergentes. Os cogumelos produziram proteases nos cultivos em meio líquido [glicose-peptona-extrato de levedura (GYP)], 30 °C por 72 h, 150 rpm, condição que proporcionou a identificação de *Pleurotus ostreatoroseus* como espécie que expressou maior quantidade (75,11 U/mL ± 0,77 U/mL) de proteases extracelulares. Nas diferentes condições avaliadas, os fatores que influenciaram na produção dessas enzimas foram fontes de carbono e nitrogênio, tempo de fermentação, volume do meio, tamanho e idade do inóculo. *Pleurotus ostreatoroseus* é fonte de proteases neutras, metaloproteases, serino-proteases e cisteino-proteases que removeram manchas de suco de açaí (*Euterpe Oleracea* Mart.) e expressaram compatibilidade com detergente comercial.

Palavras chave: basidiomicetos de podridão branca; enzimas; fermentação submersa.

ABSTRACT

The search of proteases with specific characteristics as well as new sources of these enzymes has been the main objective of several studies to reduce the production cost in industrial areas. The aim of this study was to verify the protease production by four white rot mushrooms and select one to determinate its enzyme application in detergent industry. The mushrooms produced proteases in liquid fermentation using GYP (glucose, peptone, yeast extract) and maintained at 30 C, for 72h and 150 rpm. This condition promoted the highest extracellular protease production by *Pleurotus ostreatoroseus* (75.11 U/mL± 0.77 U/mL). The parameters that influenced effective enzyme production were carbon and nitrogen sources, fermentation time, medium volume, size and inoculum age. *P. ostreatoroseus* were source of neutral, metal, serine and cysteine proteases which were capable to remove stains of acai juice (*Euterpeoleracea* Mart.) and expressed compatibility with commercial detergent.

Keywords: white rot basidiomycetes; enzymes; submerged fermentation.

1. INTRODUÇÃO

A diversidade de cogumelos são fontes de várias enzimas, característica que está estimulando a identificação de espécies produtoras de proteases apropriadas para uso em processos industriais específicos (CAMPOS et al., 2011; RAMOS et al., 2011). Outras propriedades que favorecem o uso de cogumelos em bioprocessos são a necessidade de teores reduzidos de nutrientes que exigem para crescimento, excelente adaptação, técnicas fáceis de cultivo, além de apresentarem potencial farmacológico como, imunoestimulante, antitumoral e hipoglicêmico (ORSINE et al., 2012; MANZUR et al., 2014).

As proteases de origem microbiana são produzidas por fermentação submersa e/ou fermentação semi-sólida, sendo que o cultivo em meio líquido oferece uma série de vantagens, como crescimento dos micro-organismos em condições controladas de temperatura e pH, além da fácil recuperação das enzimas secretadas no meio (SANKARALINGAM et al., 2012; HANSEN et al., 2015). Tais enzimas são classificadas em cisteíno, serino, aspártico e metalo-proteases de acordo com sua estrutura e com o aminoácido presente no seu sítio ativo. Conforme o pH ótimo de atividade, também podem ser do tipo ácidas, neutras e alcalinas (HSIAO et al., 2014).

Em função da ação em diversos processos industriais, o interesse por proteases tem aumentado o desenvolvimento de produtos inovadores com propriedades particulares. No mercado industrial de enzimas, proteases produzidas por fungos predominam na indústria de detergentes, proporcionando a substituição de produtos tóxicos contaminantes do meio ambiente, reduzindo danos às roupas e equipamentos (PUNDIR et al., 2012; NIYONZIMA e MORE, 2013). Na indústria de alimentos são usadas para melhoramento da qualidade, textura e sabor do produto final (INÁCIO et al., 2015). E em medicina, atuam na correção da deficiência de enzimas digestivas e no tratamento de feridas, queimaduras, abscessos e dissolução de coágulo (SOUZA et al., 2015).

Considerando a importância da utilização de novas proteases em diversos segmentos industriais, o objetivo deste trabalho foi investigar espécies de cogumelos como fontes de proteases para selecionar uma espécie com características apropriadas para aplicação na indústria de detergentes.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultivo dos cogumelos

Auricularia mixotricha DPUA 1695, *Ganoderma lucidum* DPUA 1694, *Lentinus citrinus* DPUA 1693 e *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720, preservados sob óleo mineral, foram cedidas pela Coleção de Cultura DPUA, da Universidade Federal do Amazonas-UFAM. Estas espécies foram subcultivadas em ágar batata dextrose (BDA) com extrato de levedura (YE) 0,5% (p/v), em placas de Petri (90 mm x 15 mm). Os cultivos foram mantidos a 25 °C, sem luz, por 12 dias.

2.2 Fermentação submersa

A produção das enzimas proteolíticas pelos cogumelos foi realizada por fermentação submersa. Para produção de proteases em 50 mL de extrato de GYP [(glicose 2% (p/v) + peptona 1% (p/v) + extrato de levedura 0,5% (p/v), pH 7,0], em cada frasco Erlenmeyer de 125 mL foram inoculados 10 discos miceliais ($\varnothing=10$ mm) retirados dos cultivos em BDA+YE. A fermentação foi conduzida a 25 °C, 150 rpm. Após cinco dias a biomassa foi separada do sobrenadante por filtração a vácuo e o extrato bruto filtrado em membrana de acetato de celulose (0,45 μ m). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

2.3 Determinação da atividade de protease – Seleção do cogumelo

Na determinação da atividade das proteases, 150 μ L do extrato bruto foi adicionado em 250 μ L de azocaseína 1% (p/v), em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,2. A mistura reacional foi incubada a 25 °C, em câmara escura. Após uma hora a reação foi interrompida pela adição de 1,2 mL de ácido tricloroacético 10% (p/v). Do sobrenadante foi transferido 800 μ L para 1,4 mL de hidróxido de sódio 1 M. Todos os experimentos, incluindo o branco, foram realizados em triplicata. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida, segundo Leighton (1973) modificado, como a quantidade de enzimas capaz de produzir um aumento na absorvância de 0,01 em uma hora, a 440 nm.

2.4 Determinação da influência de diferentes parâmetros na produção de proteases pelo cogumelo selecionado

Na determinação da influência de fonte de carbono, nitrogênio, tempo de fermentação e volume do meio de cultura, a glicose do meio base (GYP) foi substituída por amido e sacarose 2% (p/v) e, a peptona por gelatina e sulfato de amônio 1% (p/v). Em todas as

formulações foi adicionado extrato de levedura 0,5% (p/v). Os meios líquidos preparados foram: 1) Amido + extrato de levedura + gelatina (AYG); 2) Amido + extrato de levedura + sulfato de amônio (AYSa); 3) Sacarose + extrato de levedura + gelatina (SYG); 4) Sacarose + extrato de levedura + sulfato de amônio (SYSa). Em cada frasco de Erlenmeyer foi adicionado 40 ou 60 mL de cada meio, seguindo-se a esterilização a 121 °C por 15 minutos. Em cada frasco contendo AYG, AYSa, SYG, SYSa foi inoculado 5 ou 15 discos miceliais da cultura inóculo. Os cultivos foram realizados a 25 °C, 150 rpm, durante três ou sete dias. O cultivo controle foi preparado utilizando-se como inóculo 10 discos miceliais em 50 mL do meio base (GYP), durante 5 dias. Ao término da fermentação, a massa micelial foi separada do sobrenadante por filtração a vácuo e o extrato bruto concentrado em membrana de acetato de celulose (0,45 µm). A atividade de protease foi determinada em triplicata.

2.5 Padronização dos fatores de influência: substrato indutor, idade do inóculo e pH inicial do meio

Para determinação da influência de substrato indutor, idade do inóculo e pH inicial do meio foi realizado um planejamento fatorial completo 2⁴, com 4 pontos centrais (Tabela 1). O meio de cultura, o tamanho do inóculo, tempo de incubação e o volume do meio utilizado neste experimento foram os padronizados no item anterior. A fermentação foi conduzida a 25 °C, 150 rpm. A atividade de protease foi determinada em triplicata.

Tabela 1. Parâmetros avaliados no planejamento fatorial 2⁴ para otimização da produção de proteases pelo cogumelo selecionado

Parâmetros	Nível (-1)	Nível (0)	Nível (+1)
Gelatina (%)	0,5	1,0	2,0
Extrato de levedura (%)	0,2	0,5	1,0
Idade do inóculo	8	12	16
pH inicial	6	7	8

2.6 Caracterização das proteases quanto temperatura ótima e pH ótimo e estabilidade ao pH e temperatura

2.6.1 Determinação do efeito do pH e temperatura na atividade de protease

Para determinar o efeito do pH na atividade das proteases o extrato bruto foi adicionado nos seguintes tampões contendo azocaseína 1% (p/v): Solução tampão citrato 0,1 M (pH 4-6), solução tampão fosfato 0,1 M (pH 6-8) e solução tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,1 M (pH 9-10). As análises foram realizadas por uma hora, a 25 °C, em câmara

escura, seguindo-se a determinação da atividade das proteases. O efeito da temperatura na atividade proteolítica foi avaliado incubando o extrato enzimático em tampão de pH ótimo contendo azocaseína 1% (p/v) nas temperaturas de estudo (30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C), durante 1 hora, seguindo-se a determinação da atividade das proteases.

2.6.2 Efeito do pH e temperatura na estabilidade

Para os ensaios de estabilidade ao pH, os extratos foram diluídos nos tampões de uso durante 24 horas, a 25 °C, seguindo-se da determinação da atividade proteolítica nas condições ótimas de pH encontradas. Para a realização do teste de estabilidade à temperatura, incubou-se cada extrato enzimático durante 1 h em diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60, 70, 80 °C), seguindo-se da determinação da atividade proteolítica em condições ótimas de pH e temperatura.

2.7 Efeito de íons metálicos e inibidores

O efeito de íons metálicos [Cloreto de cálcio (CaCl_2), Cloreto de potássio (KCl), Cloreto de sódio (NaCl), Sulfato de cobre (CuSO_4), Sulfato ferroso (FeSO_4), Sulfato de magnésio (MgSO_4) e Sulfato de zinco (ZnSO_4)] e de compostos inibidores de protease [EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil), pepstatina e ácido iodoacético], na concentração final de 10 mM foi determinado por pré-incubação com o extrato bruto durante 1 hora, na temperatura ótima. A atividade enzimática residual foi determinada e comparada com o controle que corresponde a 100% de atividade. Todas as amostras foram preparadas em triplicata (ALECRIM et al., 2015).

2.8 Aplicações biotecnológicas

2.8.1 Remoção de manchas

Para determinar a eficiência da protease na remoção de manchas, tecidos de algodão (5 cm x 5 cm) foram manchados, separadamente, com 100 µL de polpa de açaí, suco de couve e suco V8 vegetais®. Os tecidos foram secos, embebidos em formaldeído a 2% e lavados com água destilada para remoção do formaldeído. O extrato bruto (2000 µL) foi adicionado aos tecidos que foram incubados a 37 °C. Os controles foram acondicionados sem enzima. Após 30 minutos cada pedaço de tecido, incluindo o controle, foi lavado com água destilada e seco. Todos os experimentos foram realizados em triplicata (VIJAYALAKSHMI et al., 2011).

2.8.2 Compatibilidade com detergentes comerciais

Os detergentes Ace®, Ariel®, Minuano® e Omo® foram diluídos em água destilada, na concentração final de 7 mg/mL para simular condições de lavagem. Em seguida, foram tratados termicamente a 100 °C por 15 min, para inativar as enzimas que poderiam fazer parte da formulação dos detergentes. O extrato bruto foi adicionado na preparação do detergente (1:1) e incubado na temperatura ótima por 1 h. A cada 10 minutos foram retiradas amostras para determinação da atividade residual, tanto nos tratamentos quanto no controle (NASCIMENTO e MARTINS, 2006).

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ao nível de 95% de significância e médias comparadas pelo teste de Tukey com 5% de significância, utilizando-se o “Software Minitab® 17.1.0” e “Statistica 8.0” (Statsoft, Inc., 2008, USA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção da espécie de cogumelo de maior atividade proteolítica

A produção de proteases é uma característica predominante de vegetais e micro-organismos, entre estes bactérias e fungos são os mais explorados comercialmente devido à facilidade de produção em larga escala, via fermentação (BATRA e WALIA, 2014). Neste estudo realizado em 120 horas para selecionar uma espécie produtora de níveis significativos de protease, foi determinada a atividade proteolítica nos quatro cogumelos investigados (Tabela 2). *P. ostreatoroseus* foi a espécie que expressou valor significativo de atividade de proteases (75,11 U/mL \pm 0,77). Em ordem decrescente de atividade, os demais cogumelos expressaram os seguintes valores, *L. citrinus* (51,11 U/mL \pm 1,92), *A. mixotricha* (21,55 U/mL \pm 0,77) e *G. lucidum* (13,11 U/mL \pm 1,54). Dados que mostram a variação dos valores de atividade das proteases entre as espécies nas condições experimentais.

Estudos recentes têm demonstrado que espécies de cogumelos comestíveis, como *Agaricus bisporus*, *Armillariella mellea*, *Grifola frondosa*, *Lentinus citrinus*, *Pleurotus citrinopileatus*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus sajor-caju*, *Flammulina velutipes*, *Termitomyces albuminosus*, também são produtoras de enzimas proteolíticas, o que é interessante, visto que os valores medicinais e nutricionais geralmente são os mais estudados (CAMPOS et al., 2010; KIRSCH et al., 2013; WANI et al., 2010; ZHENG et al., 2011; RAVIKUMAR et al., 2012).

Ao final da fermentação, o pH do meio variou de fortemente ácido à neutro, com particularidade para cada espécie. O pH fortemente e levemente ácido foi registrado nos cultivos de *G. lucidum* (pH 3,5) e, *A. mixotricha* e *P. ostreatoroseus* (pH 5,5), respectivamente. Somente no cultivo de *L. citrinus* foi observado o pH neutro (pH 7). Segundo Papagianni (2004) e Chen et al. (2014), o pH apresenta efeitos nas reações enzimáticas, na solubilidade dos nutrientes presentes no meio e por consequência no transporte destes para as células fúngicas. Assim sendo, a secreção de ácidos e a consequente redução do pH no meio extracelular também são parâmetros importantes para o conhecimento da fisiologia das espécies que se deseja estudar em processos biotecnológicos.

Tabela 2. Atividade de proteases produzidas por cogumelos comestíveis em 50 mL de GYP [(glicose 2% (p/v) + peptona 1% (p/v) + extrato de levedura 0,5% (p/v), pH 7,0], a 150 rpm, durante 120 horas

Espécies de cogumelos	Atividade de protease (U/mL)	pH final Extrato bruto
<i>Auricularia mixotricha</i> DPUA 1695	21,55 ± 0,77 ^c	5,5
<i>Ganoderma lucidum</i> DPUA 1694	13,11 ± 1,54 ^d	3,5
<i>Lentinus citrinus</i> DPUA 1535	51,11 ± 1,92 ^b	7,0
<i>Pleurotus ostreatoroseus</i> DPUA 1720	75,11 ± 0,77 ^a	5,5

4.2 Determinação da influência de diferentes parâmetros na produção de proteases

Para determinação da influência de diferentes parâmetros na produção de protease *P. ostreatoroseus* foi a espécie selecionada por expressar a maior atividade enzimática. Na tabela 3 está demonstrada a influência das fontes de carbono e nitrogênio, tamanho do inóculo, tempo de fermentação e volume do meio. Em todos os ensaios realizados houve produção de proteases, porém a maior atividade (30,66 ± 0,66), em relação ao controle, foi observada nos cultivos em que 5 discos miceliais foram utilizados como inóculo em 40 mL do meio AYG [amido 2% (p/v) + extrato de levedura 0,5% (p/v) + gelatina 1% (p/v)], durante sete dias. A utilização de 15 discos miceliais influenciou negativamente a produção de protease (6,88 ± 3,07), provavelmente devido à restrição da taxa de nutrientes no substrato durante o crescimento do cogumelo, que reutiliza as proteínas extracelulares para prolongar seu crescimento (PAPAGIANNI 2004; THANAPIMMENTHA et al., 2012).

Estudos mostram que a eficácia do processo de produção de proteases está intimamente relacionada às características de crescimento e fisiologia do micro-organismo utilizado na fermentação. Diferentes fontes de carbono e nitrogênio e fatores físicos, tais como aeração, tamanho e idade do inóculo, tempo de incubação e pH influenciam no desenvolvimento do micélio, na formação de metabólitos primários e na absorção de

nutrientes (ANBU et al., 2009; BACH et al., 2012). Segundo Griffin (1996) dois tipos de inóculo podem ser utilizados na fermentação submersa para produção de metabólitos por fungos, como concentração de esporos e fragmentos de hifa. No entanto o mais importante é a padronização do inóculo para que este esteja no mesmo estado fisiológico e possua a mesma viabilidade.

Tabela 3. Influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio, tamanho do inóculo, tempo de fermentação e volume do meio na produção de proteases por *P. ostreatoroseus*

Parâmetros Meio de fermentação	Atividade de protease (U/mL)
Amido+Gelatina I ⁵ T ⁷ V ⁴⁰	30,66 ± 0,66 ^a
Amido+Sulfato de Amônio I ⁵ T ⁷ V ⁶⁰	26,22 ± 0,38 ^b
Sacarose+Gelatina I ⁵ T ⁷ V ⁶⁰	26,22 ± 0,38 ^b
Sacarose +Gelatina I ⁵ T ³ V ⁴⁰	19,77 ± 3,07 ^c
Sacarose+Gelatina I ¹⁵ T ⁷ V ⁴⁰	17,55 ± 1,54 ^{c,d}
Sacarose+Gelatina I ¹⁵ T ⁷ V ⁴⁰	26,66 ± 1,15 ^{a,b}
Sacarose+Sulfato de Amônio I ⁵ T ³ V ⁴⁰	17,33 ± 1,15 ^{c,d,e}
Sacarose+Gelatina I ¹⁵ T ³ V ⁴⁰	17,11 ± 0,38 ^{c,d,e}
Amido+Gelatina I ⁵ T ⁷ V ⁶⁰	15,55 ± 1,92 ^{c,d,e,f}
Amido+Gelatina I ⁵ T ³ V ⁴⁰	13,77 ± 0,77 ^{d,e,f,g}
Amido+Gelatina I ¹⁵ T ³ V ⁴⁰	13,77 ± 0,77 ^{d,e,f,g}
Amido+Sulfato de Amônio I ⁵ T ³ V ⁶⁰	13,55 ± 0,38 ^{d,e,f,g}
Amido+Sulfato de Amônio I ¹⁵ T ⁷ V ⁴⁰	13,55 ± 1,54 ^{d,e,f,g}
Sacarose+Sulfato de Amônio I ⁵ T ³ V ⁶⁰	13,55 ± 0,38 ^{d,e,f,g}
Amido+Sulfato de Amônio I ¹⁵ T ³ V ⁴⁰	13,11 ± 1,54 ^{e,f,g}
Sacarose+Gelatina I ¹⁵ T ³ V ⁶⁰	12,66 ± 0,66 ^{f,g,h,i}
Glicose+Peptonal I ¹⁰ T ⁵ V ⁵⁰	12,38 ± 1,69 ^{f,g}
Amido+Gelatina I ⁵ T ³ V ⁶⁰	10,44 ± 1,92 ^{g,h,i,j}
Amido+Gelatina I ¹⁵ T ³ V ⁶⁰	10,22 ± 1,01 ^{g,h,i,j}
Amido+Sulfato de Amônio I ¹⁵ T ³ V ⁶⁰	8,44 ± 0,77 ^{i,j,k}
Amido+Sulfato de Amônio I ⁵ T ³ V ⁴⁰	8,44 ± 1,92 ^{h,i,j,k}
Sacarose+Sulfato de Amônio I ⁵ T ⁷ V ⁶⁰	8,22 ± 1,54 ^{j,k,l}
Sacarose+Gelatina I ⁵ T ³ V ⁶⁰	7,77 ± 0,38 ^{j,k,l}
Amido+Sulfato de Amônio I ⁵ T ⁷ V ⁴⁰	7,11 ± 0,38 ^{j,k,l,m}
Amido+Gelatina I ¹⁵ T ⁷ V ⁴⁰	6,88 ± 3,07 ^{j,k,l,m}
Sacarose+Sulfato de Amônio I ¹⁵ T ³ V ⁶⁰	6,44 ± 1,92 ^{j,k,l,m}
Sacarose+Sulfato de Amônio I ⁵ T ⁷ V ⁴⁰	6,22 ± 0,38 ^{j,k,l,m}
Sacarose+Gelatina I ¹⁵ T ⁷ V ⁶⁰	6,22 ± 0,77 ^{j,k,l,m}
Sacarose+Sulfato de Amônio I ¹⁵ T ³ V ⁴⁰	5,55 ± 0,77 ^{k,l,m}
Sacarose+Sulfato de Amônio I ¹⁵ T ⁷ V ⁴⁰	4,22 ± 0,38 ^{k,l,m,n}
Sacarose+Sulfato de Amônio I ¹⁵ T ⁷ V ⁶⁰	4,00 ± 1,15 ^{l,m,n}
Amido+Gelatina I ¹⁵ T ⁷ V ⁶⁰	2,88 ± 0,77 ^{m,n}
Amido+Sulfato de Amônio I ¹⁵ T ⁷ V ⁶⁰	0,89 ± 0,38 ⁿ

Médias seguidas pelas mesmas letras não se diferenciam uma da outra pelo Teste de Tukey ($\rho < 0.05$)/(±) – I=tamanho do inóculo; T=tempo de fermentação;V=volume do meio.

A partir da determinação da influência de diferentes parâmetros na produção de proteases por *P. ostreatoroseus*, foi utilizado um planejamento fatorial 2⁴ para investigar as variáveis, a forma de interação entre estas, assim como determinar os parâmetros que

otimizem os resultados no bioprocesso. Neste experimento a atividade proteolítica foi determinada em todas as condições de fermentação (Tabela 4). A máxima atividade (26,44 U/mL) foi verificada no ensaio 14 contendo amido 2% (p/v) + gelatina 0,5% (p/v) + extrato de levedura 1% (p/v), pH 8 e inóculo com 16 dias de cultivo.

Tabela 4. Matriz do planejamento 2⁴ utilizada para identificação da concentração de gelatina, extrato de levedura, idade ideal do inóculo e pH inicial do meio na produção de protease por *P. ostreatoroseus*

Ensaio	Idade do inóculo (dias)	Extrato de levedura % (p/v)	Gelatina % (p/v)	pH inicial	pH final (Extrato bruto)	Atividade de protease (U/mL)
1	8	0,2	0,5	6	6,5	3,11
2	8	0,2	0,5	8	7,5	2,88
3	8	0,2	2,0	6	6,5	4,44
4	8	0,2	2,0	8	7,0	4,22
5	8	1,0	0,5	6	6,5	7,77
6	8	1,0	0,5	8	8	10,22
7	8	1,0	2,0	6	6,5	8,88
8	8	1,0	2,0	8	7,5	7,33
9	16	0,2	0,5	6	7,5	9,33
10	16	0,2	0,5	8	7,5	6,44
11	16	0,2	2,0	6	6,0	24,22
12	16	0,2	2,0	8	7,0	10,44
13	16	1,0	0,5	6	6,0	19,55
14	16	1,0	0,5	8	8,0	26,44
15	16	1,0	2,0	6	8,0	12,44
16	16	1,0	2,0	8	7,5	14,66
17	12	0,5	1,0	7	7,0	16,66
18	12	0,5	1,0	7	7,5	16,66
19	12	0,5	1,0	7	7,5	16,66
20	12	0,5	1,0	7	7,0	16,66

No diagrama de Pareto (Figura 1) os dados mostram que a idade do inóculo, quando analisada separadamente, foi a única variável que influenciou significativamente na produção de proteases. O aumento da atividade foi diretamente proporcional ao aumento da idade da cultura inóculo. Este resultado difere do encontrado por Maldonado et al. (2014) e Kumar et al. (2012) com *Geotrichum candidum* e *Aspergillus tamerii*, respectivamente, onde a menor idade do inóculo promoveu maior quantitativo enzimático. O controle deste parâmetro na fermentação é importante para indução e produção de enzimas, pois o tempo de desenvolvimento celular é altamente variável dependendo das características genéticas do micro-organismo utilizado e das condições de incubação (LEZZAR et al., 2014).

Além disso, a interação entre as variáveis, concentração de gelatina, do extrato de levedura, idade do inóculo e pH inicial do meio de fermentação, não foi significativa. Assim, a mudança destes parâmetros pode contribuir para a adequação do bioprocesso e aumento da produção das enzimas.

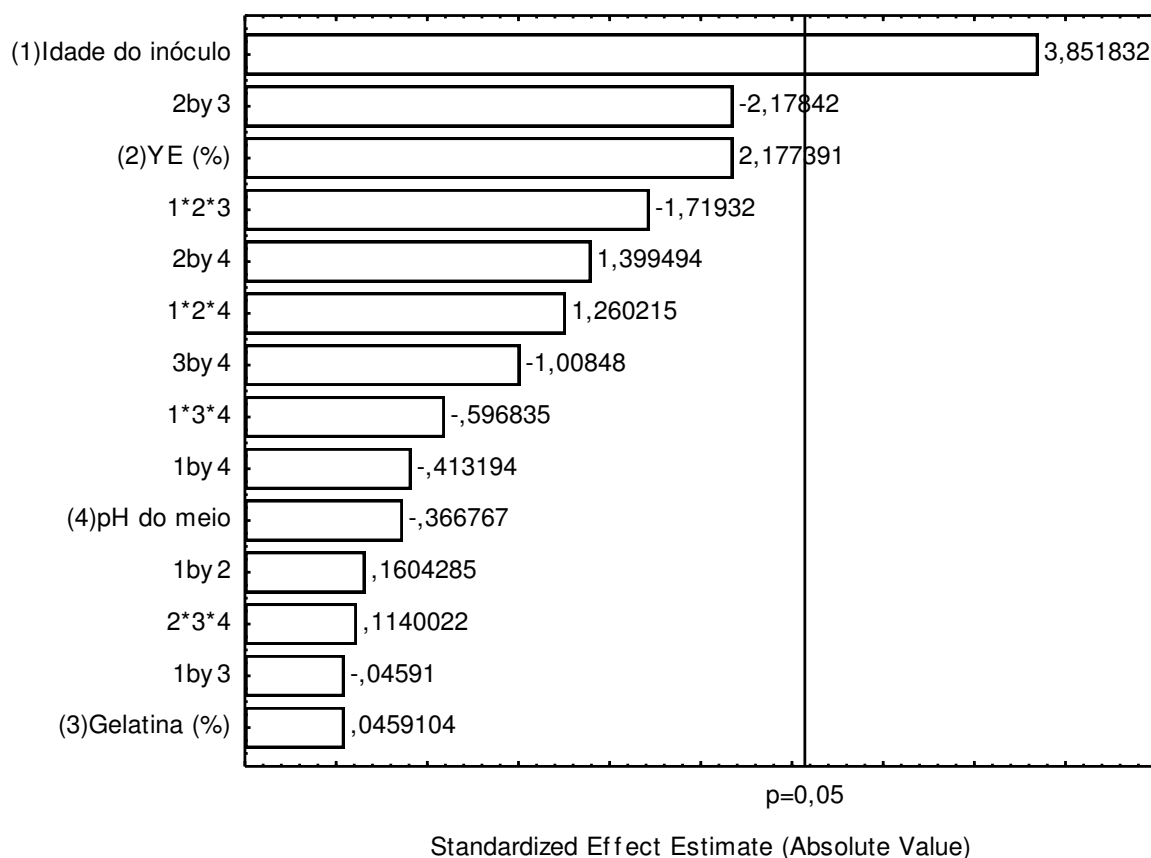


Figura 1. Diagrama de Pareto para efeitos estimados das variáveis (1) Idade do inóculo, (2) Extrato de levedura % (p/v), (3) Gelatina % (p/v) e (4) pH inicial na produção de proteases por *P. ostreatoroseus*

4.4 Caracterização parcial das enzimas proteolíticas

4.4.1 pH ótimo e temperatura ótima na atividade de protease

O efeito do pH na atividade enzimática foi avaliado na faixa de pH entre 4 e 10 (Figura 2A). Em pH ácido as proteases de *P. ostreatoroseus* apresentaram 49 a 58% de atividade enzimática. A atividade ótima foi determinada em pH 7. Em pH 7 a 9 a atividade enzimática foi reduzida até 49%, já em pH 10 houve diminuição de 42%. A presença de mais de um pico nas atividades de pH pode indicar a existência de outra protease no extrato bruto (MERHEB-DINI et al., 2010).

Nos estudos realizados por Fonseca et al. (2014) quando *P. ostreatoroseus* foi submetido a fermentação semi-sólida, o pH de atividade ótima das proteases foi 6,0, a 8,0. De acordo com Jisha et al. (2013) proteases com pH ótimo 5 a 8 tem aplicação em diversos segmentos industriais, inclusive na formulação de detergente. No entanto, outros parâmetros precisam ser avaliados, como atividade ótima em temperaturas de lavagem, estabilidade e compatibilidade com os componentes do detergente, além da eficiência na remoção de manchas.

O efeito da temperatura na atividade da enzima foi determinado entre 30 a 80 °C, com intervalo de 10 °C (Figura 2B). Nestas condições, as enzimas de *P. ostreatoroseus* demonstraram atividade ótima a 50° C, seguido de decréscimo, até a completa inativação a 80 °C. Em temperaturas elevadas, as enzimas sofrem desnaturação protéica, pois as ligações intramoleculares são afetadas (AHMED et al., 2011, ALI et al., 2014). Estes resultados estão de acordo com Cui et al. (2007), Guan et al. (2011) e Zhang et al. (2010) em que a temperatura ótima das proteases de *Pleurotus citrinopileatus*, *Pholiota nameko* e *Hypsizigus marmoreus*, foi determinada a 50 °C.

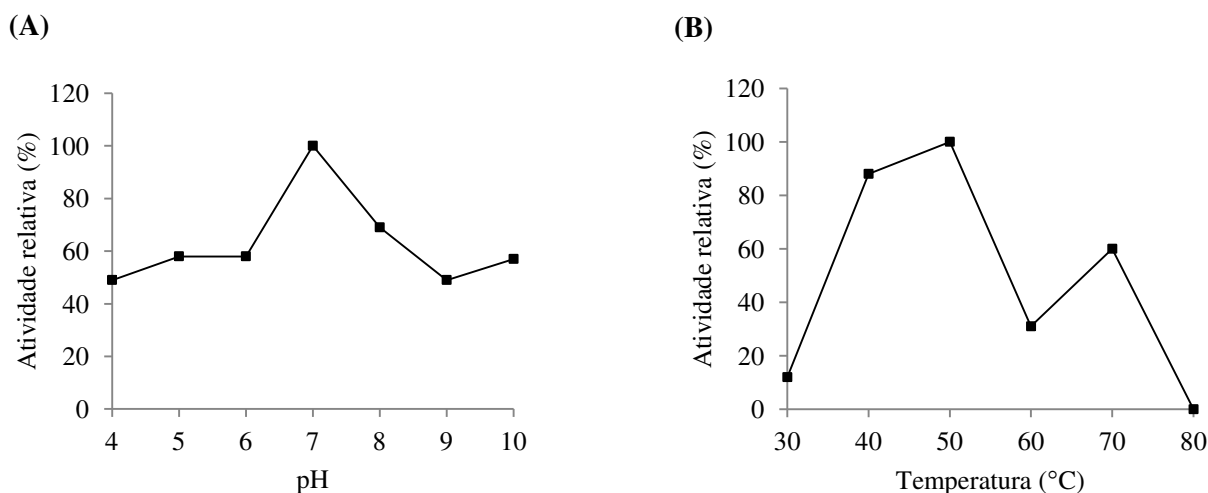


Figura 2. Efeito do pH (A) e da temperatura (B) na atividade de proteases produzida por *P. ostreatoroseus*

4.4.2 Estabilidade ao pH e temperatura

A estabilidade ao pH e temperatura é um parâmetro importante na utilização de enzimas em indústrias pois determina a viabilidade econômica do processo (EIJSSINK et al., 2004; MORETTI et al., 2012). A estabilidade ao pH foi mantida entre pH 7 e 9, com 97% de atividade por 1 hora, com redução de atividade em pH 10 (Figura 3A). Em intervalo de tempo similar, a estabilidade térmica destas enzimas foi mantida entre 30 a 50 °C, exibindo 49 a 66% de atividade relativa, respectivamente. Em 70 °C foi verificada a inativação das enzimas, contudo a 80 °C houve retenção de 33% (Figura 3B). Proteases produzidas por *Cryptococcus* sp. também apresentaram estabilidade por 1 hora, até 50 °C (RAO et al., 2011). De acordo com Cheng et al. (2012) a termoestabilidade de proteínas de cogumelos comestíveis pode variar.

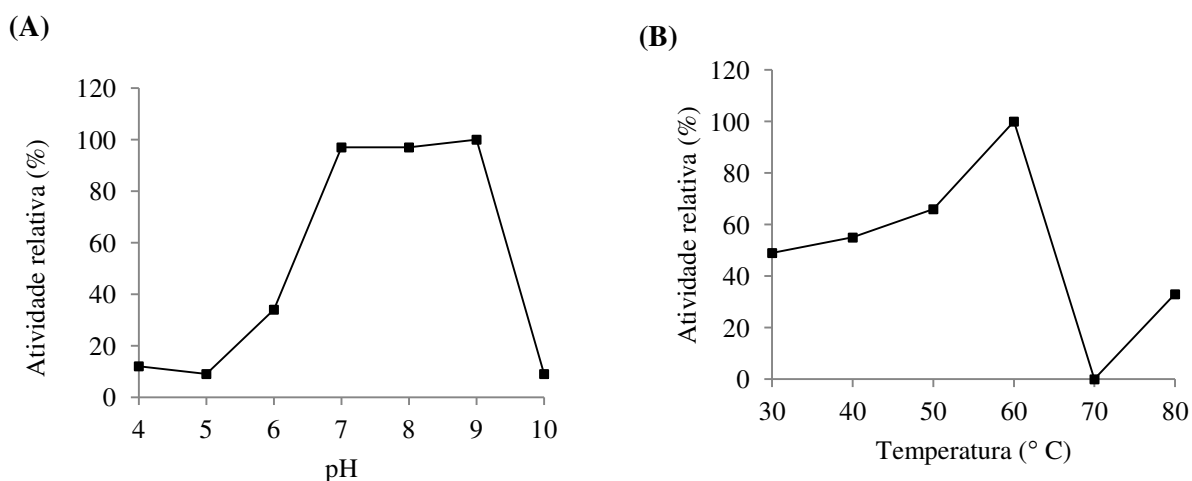


Figura 3. Estabilidade ao pH (A) e a temperatura (B) na atividade de proteases produzida por *P. ostreatoroseus*

4.5 Efeitos de íons metálicos e inibidores

Os resultados do efeito de inibidores sobre atividade das proteases apresentados na tabela 5 demonstram que as enzimas foram inibidas em 33% por EDTA e PMSF e em 23% por ácido iodoacético, sugerindo a presença de metalo-proteases, serino-proteases e cisteino-proteases no extrato bruto de *P. ostreatoroseus*, respectivamente. Estudos têm reportado a presença de diferentes classes de proteases em cogumelos. Sabotič et al. (2007) cita a presença de cisteino-proteases e metalo-proteases em *P. ostreatus*. Lebedeva et al. (2009) e Zhang et al. (2010) verificaram a inibição da atividade proteolítica de *P. ostreatus* (Fr.) Kumm e *Hypsizigus marmoreus* ao utilizar PMSF, sugerindo a presença de serino-proteases.

Na presença de íons metálicos a 10 mM, a maior redução da atividade enzimática foi verificada utilizando K^+ . Em condições similares, Ca^{2+} , Na^+ , Cu^{2+} , Mg^{2+} e Zn^{2+} exerceram pouca influência na atividade enzimática. Na presença de Fe^{2+} a atividade proteolítica de *P. ostreatoroseus* foi potencializada. Efeitos semelhantes foram obtidos por Lakshman et al. (2010) com *Monascus pilosus*, onde K^+ teve efeito inibidor na atividade de protease. Estudos feitos por Sun et al. (2014) e Zhang et al. (2010) com *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* e *Hypsizigus marmoreus*, respectivamente, mostram aumento na atividade enzimática quando utilizado Fe^{2+} .

Tabela 5. Efeito de íons e substâncias na atividade de protease

Inibidores	Atividade Relativa (%)
Íons (10 mM)	
Controle	100
CaCl ₂	75.50
KCl	66.0
NaCl	73.30
CuSO ₄	77.70
FeSO ₄	135.50
MgSO ₄	84.40
ZnSO ₄	75.50
Substâncias	
EDTA (10mM)	66,70
PMSF (10mM)	66,70
Ácidoiodoacético (10mM)	76,70
Pepstatina (1mM)	93,30

4.6 Aplicações biotecnológicas

4.6.1 Remoção de manchas

A eficiência na retirada das manchas dos tecidos pelas proteases foi observada somente nos tratamentos utilizando suco de açaí (*Euterpe Oleracea* Mart.) (Figura 4). Este resultado está associado à presença de proteínas no suco (PORTINHO et al., 2012). Quando utilizado suco de couve e suco V8 vegetais® as proteases se mostraram ineficazes na retirada das manchas, devido ao seu baixo teor proteico (FEIBER E CAETANO 2012). Por serem eficientes na remoção de manchas em tecidos, as proteases de *P. ostreatoroseus* provavelmente podem ser utilizadas como aditivos em detergentes comerciais.

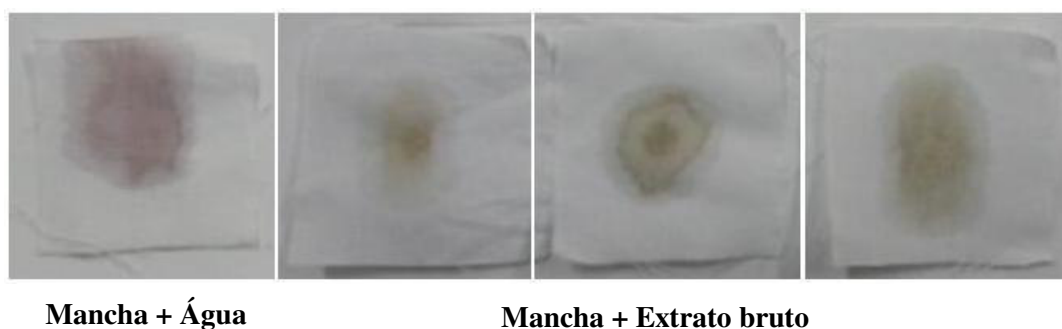


Figura 4. Eficiência da protease de *P. ostreatoroseus* na remoção de manchas de suco de açaí (*Euterpe Oleracea* Mart.)

4.6.2 Compatibilidade com detergente comercial

A atividade e compatibilidade das proteases produzidas por *P. ostreatoroseus* com detergentes comerciais está demonstrada na figura 5 A, B, C e D. No detergente Minuano® a

atividade proteolítica foi retida 94 a 98% até 30 minutos a 50 ° C (Figura 5C). Os detergentes que causaram maior instabilidade na atividade da protease foram Ace®, Ariel® e Omo®. De acordo com Singhal (2012) e Niyonzima e More (2015) a estabilidade das enzimas utilizadas em detergentes é influenciada pela presença de agentes surfactantes e oxidantes, além do pH e temperatura. Portanto, a perda parcial da atividade de protease em alguns detergentes pode ser atribuída ao efeito inibitório de seus componentes. Deste modo, a instabilidade das enzimas pode ser corrigida pela adição de cálcio e inibidores reversíveis, como a glicina que evita sua autólise. A ação das enzimas na remoção de manchas promove economia de energia elétrica e manutenção da qualidade dos tecidos (NASCIMENTO e MARTINS, 2006; NIRMAL e LAXMAN, 2014).

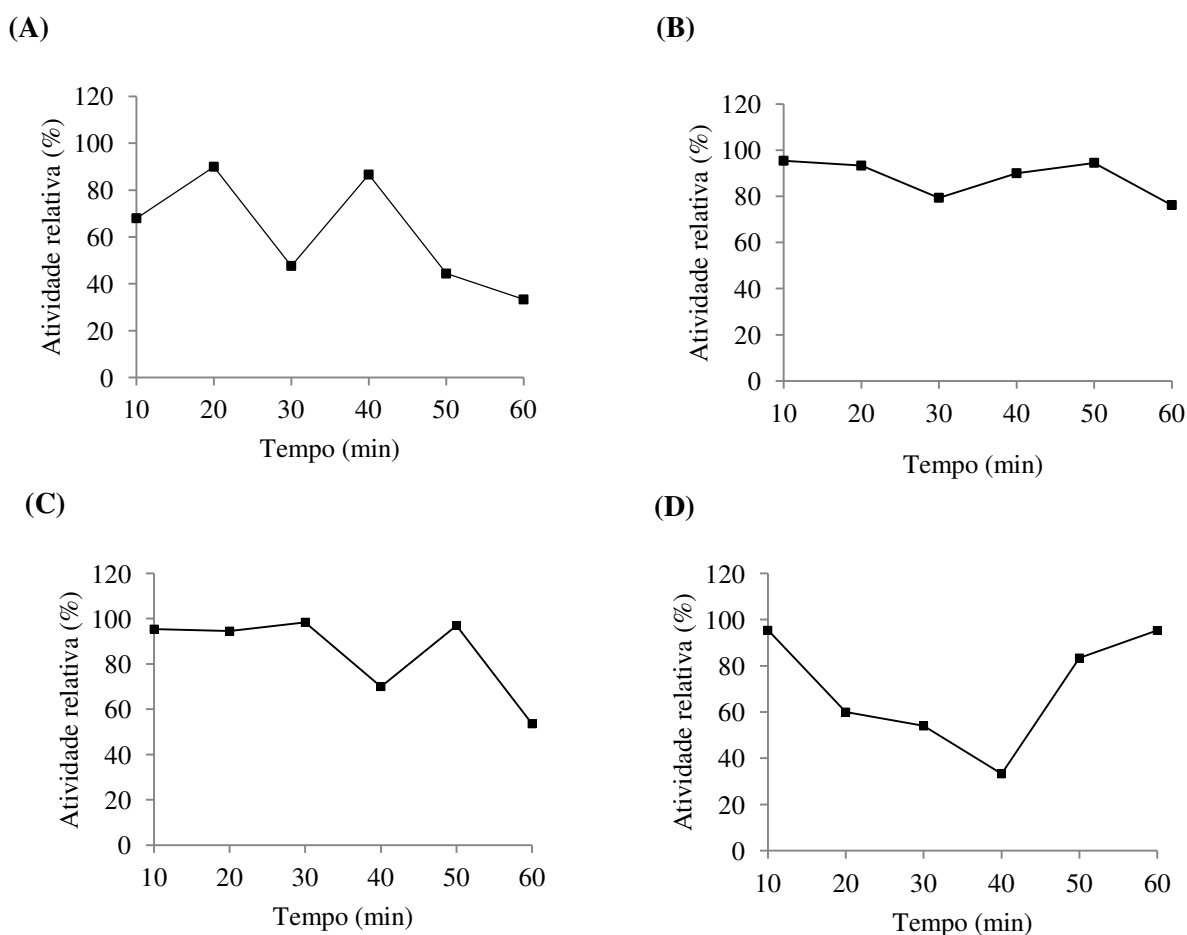


Figura 5. Compatibilidade e estabilidade de protease produzida por *P. ostreatoroseus* com detergentes comerciais. Os detergentes estudados foram: A) Ace®; B) Ariel®; C) Minuano® e D) Omo®.

5. CONCLUSÕES

Os dados obtidos mostraram que *A. mixotricha*, *G. lucidum*, *L. citrinus* e *P. ostreatoroseus* sintetizaram e excretaram proteases e destas, *P. ostreatoroseus* foi a espécie que expressou quantidade significativa de enzimas que são influenciadas por mecanismos regulatórios físicos e químicos. As proteases predominantes no extrato bruto foram as neutras, metalo-proteases, cisteíno-proteases e serino-proteases, estimuladas por íons Fe^{2+} e inibidas por K^+ , são estáveis em alta temperatura e pH neutro. Além disso, se mostraram eficazes na remoção de mancha proteica e compatíveis com certos detergentes comerciais, característica que proporciona a utilização como aditivos na indústria.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, I.; ZIA, M. A.; IFTIKHAR, T.; IQBAL, H. M. N. Characterization and detergent compatibility of purified protease produce from *Aspegillus niger* by utilizing agro wastes. **BioResources**, v. 6, n. 4, p. 4505-4522, 2011.

ALECRIM, M. M.; PALHETA, R. A.; TEIXEIRA, M. F. S.; OLIVEIRA, I. M. A. Milk-clotting enzymes produced by *Aspergillus flavor-furcatis* strains on Amazonic fruit waste. **International Journal of Food Science and Technology**, 2015.

ALI, S. M.; LING, T.; MUNIANDY, S.; TAN, Y. S.; RAMAN, J.; SABARATNAM, V. Recovery and partial purification of fibrinolytic enzymes of *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc by an aqueous two-phase system. **Separation and Purification Technology**, v. 122, p. 359–366, 2014.

ANBU, P.; ANNADURAY, G.; LEE, J-F.; HUR, B-K. Optimization of alkaline protease production from *Shewanella oneidensis*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, p. 54-62, 2009.

BACH, E.; SANT'ANNA, V.; DAROIT, D. J.; CORREA, A. P. F.; SEGALINC, J.; BRANDELLIA, A. Production, one-step purification, and characterization of a keratinolytic protease from *Serratia marcescens* P3. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 2455–2462, 2012.

BATRA, N.; WALIA, M. Production and characterization of alkaline protease from bacteria strains isolated from cotton Field. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, p. 702-709, 2014.

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. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 13, n. 1, p. 19-24, 2010.

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 Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**v. 14, n. 1, p. 45-49, 2011.

CHEN, J-Z.; LO, H-C.; LIN, F-Y.; CHANG, S-L.; HSIEH, C-W.; LIANG, Z-C.; HO, W-J.; HSU, T-H. Effects of Medium Components and Culture Conditions on Mycelial Biomass and the Production of Bioactive Ingredients in Submerged Culture of *Xylaria nigripes* (Ascomycetes), a Chinese Medicinal Fungus. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 16, n. 15, p. 431–447, 2014.

CHENG, G.Y.; LIU, J.; TAO, M. X.; LU, C. M.; WU, G. R. Activity, thermostability and isozymes of superoxide dismutase in 17 edible mushrooms. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 26, p. 136–143, 2012.

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.

EIJSINK, V. G. H.; BJØRK, A.; GÅSEIDNES, S.; SIREVÅG, R.; SYNSTAD, B.; BURG, B.; VRIEND, G. Rational engineering of enzyme stability. **Journal of Biotechnology**, v. 113, p. 105, 2004.

FEIBER, L. T.; CAETANO, R. Estudo da composição centesimal e teores de cálcio em polpas de couve (*Brassica oleracea* var. *Acephala*). **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 23, n. 1, p. 141-145, 2012.

FONSECA, T. R. B.; BARRONCAS, J.F.; TEIXEIRA, M. F. S. Produção em matriz sólida e caracterização parcial das proteases de cogumelo comestível da floresta amazônica. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 8, n. 1, p. 1227-1236, 2014.

GRIFFIN, D. H. *Fungal Physiology*, Ed. 2, 1996, 472 p.

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.

HANSEN, G. H.; LÜBECK, M.; FRISVAD, J. C.; LÜBECK, P. S. ANDERSEN, B. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. **Process Biochemistry**, p. 15, 2015.

HSIAO, N.W.; CHEN, Y.; KUAN, Y. C.; LEE, Y. C.; LEE, S. K.; CHAN, H. H.; KAO, C. H. Purification and characterization of an aspartic protease from the *Rhizopus oryzae* protease extract, Peptidase R. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.17, n.2, 2014.

INÁCIO, F. D.; FERREIRA, R. O.; ARAUJO, C. A. V.; BRUGNARI, T.; CASTOLDI, R.; PERALTA, R. M.; SOUZA, C. G. M. Proteases of Wood Rot Fungi with Emphasis on the Genus *Pleurotus*. **BioMed Research International**.

JISHA, V. N.; SMITHA, R. B.; PRADEEP, S.; SREEDEVI, S.; UNNI, K. N.; SAJITH, S.; PRIJI, P.; JOSH, M. S.; BENJAMIN, S. Versatility of microbial proteases. **Advances in Enzyme Research**, v. 1, n.3, p. 39-51, 2013.

KIRSCH, L. S.; EBINUMA, V. C. S.; TEIXEIRA, M. F. Mycelial Biomass and Biochemical Properties of Proteases Produced by *Lentinus citrinus* DPUA 1535 (Higher Basidiomycetes) in Submerged Cultivation. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 15, n. 5, p. 505–515, 2013.

KUMAR, P. S.; SOUNDERRAJ, L.; SIVAKUMAR, K.; RAJAKUMAR, S. Enzymatic Hydrolyses of Chrome Shaving Waste from Tannery through *Aspergillus tamerii*. **Journal of Biodiversity and Environmental Sciences**, v. 6, n.18, p. 285-292, 2012.

LAKSHMAN, P.L. N.; TOYOKAWA, Y.; TOYAMA, H.; TAIRA, T.; YASUDA, M. Purification and characterization of two extracellular acid proteinases from *Monascus pilosus*. **Food Chemistry**, v. 121, p. 1216–1224, 2010.

LEBEDEVA, G. V.; PROSKURYAKOV, M. T. Purification and Characterization of Milk-Clotting Enzymes from Oyster Mushroom (*Pleurotostreatus* (Fr.) Kumm). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 623–625, 2009.

LEIGHTON, T.J.; DOI, R. H.; WARREN, R.A. J.; KELLN, R. A. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Molecular Biology**, v. 76, p. 103-122, 1973.

LEZZAR, H. B.; LEGHLIMI, H.; COPINET, E.; DUCHIRON, F.; MAZA, A. M. Utilization of tomato pomace as a substrate for neutral protease production by *Aspergillus oryzae* 2220 on solid-state fermentation. **International Journal of Advanced Research**, v. 2, n. 11, p. 338-346, 2014.

MALDONADO, R. R.; BURKERT, J. F. M.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; DURRANT, L.; MAZUTTI, M. A.; FILHO, F. M.; RODRIGUES, M. I. Elucidation of the effects of inoculum size and age on lipase production by *Geotrichum candidum*. **Biotecnologia Aplicada**. v. 31, p. 216-221, 2014.

MANZUR, A. P. P.; SAPNA, K.; REKHA MOL, K. R.; BHAT, S. G.; CHANDRASEKARAN, M.; ELYAS, K. K. Trypsin Inhibitor from Edible Mushroom *Pleurotus floridanus* Active against Proteases of Microbial Origin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, p. 167–178, 2014.

MERHEB-DINI, C.; GOMES, E.; BOSCOLO, M. SILVA, R. Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (Milk-clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31). **Food Chemistry**, v. 120, p. 87–93, 2010.

MORETTI, M. M. S.; BOCCHINI-MARTINS, D. A.; SILVA, R.; RODRIGUES, A.; SETTE, L. D.; GOMES, E. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1062-1071, 2012.

NASCIMENTO, W. C. A.; MARTINS, M. L. L. Produção de proteases por *Bacillus* sp SMIA-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 582-588, 2006.

NIRMAL, N. P., LAXMAN, R. S. Enhanced Thermostability of a Fungal Alkaline Protease by Different Additives. **Enzyme Research**, p. 8, 2014.

NIYONZIMA, F. N.; MORE, S. S. Screening and optimization of cultural parameters for an alkaline protease production by *Aspergillus terreus* gr. under submerged fermentation. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 4, n. 1, p. 1016 – 1028, 2013.

NIYONZIMA, F. N.; MORE, S. S. Purification and characterization of detergent-compatible protease from *Aspergillus terreus* gr. **3 Biotech**, v. 5, p. 61–70, 2015.

ORSINE, J. V. C; BRITO, L. M. B.; NOVAES, M. R. C. G.; Cogumelos comestíveis: uso, conservação, características nutricionais e Farmacológicas. **Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, v. 4, n. 32, p.452-460, 2012.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelia processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 189–259, 2004.

PORTINHO, J. A.; ZIMMERMANN, L. M.; BRUCK, M. R. Efeitos Benéficos do Açaí. **International Journal of Nutrology**, v.5, n.1, 2012.

PUNDIR, R. K.; RANA, S.; TYAGI, H. Studies on Compatibility of Fungal alkaline Protease with Commercially Available Detergents. **International Journal of Modern Biochemistry**, v.1, p.41-56, 2012.

RAMOS, C.; SAPATA, M.; FERREIRA, A.; ANDRADA, L.; CANDEIAS, M. Produção de três espécies de cogumelos *Pleurotus* e avaliação da qualidade em atmosfera modificada. **Revista de Ciências Agrárias**, v.34, n.1, 2011.

RAO, S.; MIZUTANI, O.; HIRANO, T.; MASAKI, K.; IEFUJI, H. Purification and characterization of a novel aspartic protease from basidiomycetous yeast *Cryptococcus* sp. S-2. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 5, p. 441–446, 2011.

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**, p. 411-417, 2012.

SABOTIČ, J.; TRČEK T.; POPOVIČ, T.; BRZIN, J. Basidiomycetes harbour a hidden treasure of proteolytic diversity. **Journal of Biotechnology**, v. 128, p. 297–307, 2007.

SANKARALINGAM, S.; SHANKAR, T.; RAMASUBBURAYAN, R.; PRAKASH, S.; KUMAR, C. Optimization of Culture Conditions for the Production of Amylase from *Bacillus licheniformis* on Submerged Fermentation. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v. 12, n. 11, p. 1507-1513, 2012.

SINGHAL, P.; NIGAM, V. K.; VIDYARTHI, A. S. Studies on production, characterization and applications of microbial alkaline proteases. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**. v. 3, n. 3, p. 653-669, 2012.

SOUZA, P. M.; BITTENCOURT, M. A.; CAPRARA, C. C.; FREITAS, M.; ALMEIDA, D. S. FONSECA, Y. M. FILHO, E. X.; MAGALHÃES, P. O. A biotechnology perspective offungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 337-346, 2015.

SUN, Q. WANG, X. P.; YAN, Q. J.; CHEN, W.; JIANG, Z. Q. Purification and Characterization of a Chymosin from *Rhizopusmicrosporus* var. *rhizopodiformis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, p. 174–185, 2014.

THANAPIMMENTHA, A.; LUADSONGKRAM, A.; TITAPIWATANAKUM, B.; SRINOPHAKUN, P. Value added waste of *Jatropha* curcas residue: optimization of protease production in solid state fermentation by Taguchi DOE methodology. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 1–5, 2012.

VIJAYALAKSHMI, S.; VENKATKUMAR, S.; THANKAMANI, V. Screening of alkalophilic thermophilic protease isolated from *Bacillus* RV.B2.90 for Industrial applications. **Research in Biotechnology**, v.2, n.3, p. 32-41, 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.

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.

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

6. CONCLUSÃO GERAL

Com os resultados deste estudo, conclui-se que:

- Os cogumelos estudados, *A. mixotricha*, *G. lucidum*, *L. citrinus* e *P. ostreatoroseus*, são produtores de proteases;
- *P. ostreatoroseus* foi a espécie que expressou níveis significativos de enzimas que são influenciadas por parâmetros químicos e físicos;
- As proteases apresentaram atividade ótima e pH 7 a 50 °C e estabilidade entre pH 7 a 9 e 30 a 50 °C;
- Foram identificadas no extrato bruto metalo-proteases, cisteíno-proteases e serino-proteases;
- As enzimas proteolíticas presentes no extrato bruto foram estimuladas por ions Fe^{2+} e inibidas por íons K^+ ;
- Nas condições experimentais, as enzimas foram eficazes na remoção de mancha de açai (*Euterpe Oleracea* Mart.) e compatíveis com detergente comercial Minuano®, podendo provavelmente ser utilizadas como aditivos na indústria.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABHIJIT, R. Protease Enzyme- Potential Industrial Scope. **International Journal Technology**, v. 2, n. 1, p. 01-04, 2012.

AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. Produção de celulase e xilanase por *Aspergillus niger* usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 18, n. 1, p. 57-70, 2000.

AHMED, I.; IRFAN, M.; NADEEM, M.; ZIA, M. A.; AHMAD, B. M.; IQBAL, H. M. N. Optimization of Media and Environmental Conditions for Alkaline Protease Production Using *Bacillus Subtilis* in Submerged Fermentation Process. **International Journal for Agro Veterinary and Medical Sciences**, v. 4, n. 4, p. 105-113, 2010.

AIKAT, K.; BHATTACHARYYA B.C. Protease extraction in solid-state fermentation of wheat bran by a local strain of *Rhizopus oryzae* and growth studies by the soft gel technique. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 907-914, 2000.

ALECRIM, M. M.; PALHETA, R. A.; TEIXEIRA, M. F. S.; OLIVEIRA, I. M. A. Milk-clotting enzymes produced by *Aspergillus flavofurcatis* strains on Amazonic fruit waste. **International Journal of Food Science and Technology**, 2015.

ALI, S. M.; LING, T.; MUNIANDY, S.; TAN, Y. S.; RAMAN, J.; SABARATNAM, V. Recovery and partial purification of fibrinolytic enzymes of *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc by an aqueous two-phase system. **Separation and Purification Technology**, v. 122, p. 359–366, 2013.

ANBU, P.; ANNADURAY, G.; LEE, J-F.; HUR, B-K. Optimization of alkaline protease production from *Shewanella oneidensis*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, p. 54-62, 2009.

BABY, S.; JOHNSON, A. J.; GOVINDAN, BALAJI. Secondary metabolites from Ganoderma. **Phytochemistry**, v.114, p. 66–101, 2015.

BACH, E.; SANT'ANNA, V.; DAROIT, D. J.; CORREA, A. P. F.; SEGALINC, J.; BRANDELLIA, A. Production, one-step purification, and characterization of a keratinolytic protease from *Serratia marcescens* P3. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 2455–2462, 2012.

BASKAR, G.; RAJESH, K. S.; RENGANATHAN, S. Statistical screening and optimization of exo-polysaccharide production by medicinal mushroom using design of experiments. **Biotechnology, bioinformatics and bioengineering**, v. 1, p. 47-58, 2011.

BATRA, N.; WALIA, M. Production and characterization of alkaline protease from bacteria strains isolated from cotton Field. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, p. 702-709, 2014.

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. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 13, n. 1, p. 19-24, 2010.

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 Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 14, n. 1, p. 45-49, 2011.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Production and biochemical characterization of protease from *Aspergillus oryzae*: Na evaluation of the physical–chemical parameters using agroindustrial wastes as supports. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, 20–25, 2014.

CHANG, S. T. **Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact**. 2^a ed., 1989.

CHANG, S. T.; MILES, P.G. Mushroom biology: a new discipline. **Mycologist**, v. 6, p. 64–65, 1992.

CHEN, J-Z.; LO, H-C.; LIN, F-Y.; CHANG, S-L.; HSIEH, C-W.; LIANG, Z-C.; HO, W-J.; HSU, T-H. Effects of Medium Components and Culture Conditions on Mycelial Biomass and the Production of Bioactive Ingredients in Submerged Culture of *Xylaria nigripes* (Ascomycetes), a Chinese Medicinal Fungus. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 16, n. 15, p. 431–447, 2014.

CHENG, G.Y.; LIU, J.; TAO, M. X.; LU, C. M.; WU, G. R. Activity, thermostability and isozymes of superoxide dismutase in 17 edible mushrooms. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 26, p. 136–143, 2012.

COUTO, S.; SANROMAN, M. Application of solid-state fermentation to food industry – a review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 3, p. 291-302, 2006.

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.

DULAY, R. M. R.; RAY, K.; HOU, C. T. Optimization of liquid culture conditions of Philippine wild edible mushrooms as potential source of bioactive lipids. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2015.

EIJSINK, V. G. H.; BJØRK, A.; GÅSEIDNES, S.; SIREVÅG, R.; SYNSTAD, B.; BURG, B.; VRIEND, G. Rational engineering of enzyme stability. **Journal of Biotechnology**, v. 113, p. 105, 2004.

ERJAVEC, J.; KOS, J.; RAVNIKAR, M.; DREO, T.; SABOTIČ, J. Proteins of higher fungi- from forest to application. **Trends in Biotechnology**, v. 30, n. 5, 2012.

FEIBER, L. T.; CAETANO, R. Estudo da composição centesimal e teores de cálcio em polpas de couve (*Brassica oleracea* var. *Acephala*). **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 23, n. 1, p. 141-145, 2012.

FEITOSA, I. C. **Produção de enzimas lipolíticas utilizando bactéria isolada de solo com histórico de contato com petróleo em fermentação submersa**. 2009. 104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade Tiradentes, Aracaju, 2009.

FONSECA, T. R. B.; BARRONCAS, J.F.; TEIXEIRA, M. F. S. Produção em matriz sólida e caracterização parcial das proteases de cogumelo comestível da floresta amazônica. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 8, n. 1, p. 1227-1236, 2014.

GRIFFIN, D. H. *Fungal Physiology*, Ed. 2, 1996, 472 p.

GOMAA, E.Z. Optimization and characterization of alkaline protease and carboxymethyl-cellulase produced by *Bacillus pumillus* grown on Ficus nitida wastes. **Brazilian Journal of Microbiology Online Ahead of Print**. 2012.

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 ed., Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 1999.

GUGLIOTTA, A. M.; POSCOLERE, G. D.; CAMPACCI, T. V. S. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP, Brasil. Fungos, 10: Ganodermataceae. **Hoehnea**, v. 38, n. 4, 2011.

HANSEN, G. H.; LÜBECK, M.; FRISVAD, J. C.; LÜBECK, P. S. ANDERSEN, B. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. **Process Biochemistry**, p. 15, 2015.

HSIAO, N.W.; CHEN, Y.; KUAN, Y. C.; LEE, Y. C.; LEE, S. K.; CHAN, H. H.; KAO, C. H. Purification and characterization of an aspartic protease from the *Rhizopus oryzae* protease extract, Peptidase R. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.17, n.2, 2014.

IKETANI, A.; NAKAMURA, M.; SUZUKI, Y.; AWAI, K.; SHIOI, Y. A novel serine protease with caspase- and legumain-like activities from edible basidiomycete *Flammulina velutipes*. **Fungal biology**, v. 117, p. 173-181, 2013.

INÁCIO, F. D.; FERREIRA, R. O.; ARAUJO, C. A. V.; BRUGNARI, T.; CASTOLDI, R.; PERALTA, R. M.; SOUZA, C. G. M. Proteases of Wood Rot Fungi with Emphasis on the Genus *Pleurotus*. **BioMed Research International**.

IRAWATI, D.; YOKOTA, S.; NIWA, T.; TAKASHIMA, Y.; UEDA, C.; ISHGURI, F.; IIZUKA, K.; YOSHIZAWA, N. Enzymatic saccharification of spent Wood-meal media made of 5 different tree species after cultivation of edible mushroom *Auricularia polytricha*. **Journal of Wood Science**, v. 58, p. 180-183, 2012.

JISHA, V. N.; SMITHA, R. B.; PRADEEP, S.; SREEDEVI, S.; UNNI, K. N.; SAJITH, S.; PRIJI, P.; JOSH, M. S.; BENJAMIN, S. Versatility of microbial proteases. **Advances in Enzyme Research**, v. 1, n.3, p. 39-51, 2013.

JUNIOR, A. S. M.; GIBERTONI, T. B.; SOTÃO, H. M. P. Espécies de *Ganoderma* P. Karst (Ganodermataceae) e *Phellinus* Qué. (Hymenochaetaceae) na Estação Científica Ferreira Penna, Pará, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 3, p. 531-533, 2011.

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.

KIRSCH, L. S.; EBINUMA, V. C. S.; TEIXEIRA, M. F. Mycelial Biomass and Biochemical Properties of Proteases Produced by *Lentinus citrinus* DPUA 1535 (Higher Basidiomycetes) in Submerged Cultivation. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 15, n. 5, p. 505–515, 2013.

KUMAR G. C.; TAKAGI, H.; Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial view point. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 561–594, 1999.

KUMAR, P. S.; SOUNDERRAJ, L.; SIVAKUMAR, K.; RAJAKUMAR, S. Enzymatic Hydrolyses of Chrome Shaving Waste from Tannery through *Aspergillus tamerii*. **Journal of Biodiversity and Environmental Sciences**, v. 6, n.18, p. 285-292, 2012.

KUMMARI, S.; PRASAD, S. Isolation and Screening of Protease Producing Bacteria from Soil. **International Journal of Emerging Trends in Science and Technology**, v. 2, n. 5, p. 2516-2519, 2015.

LAKSHMAN, P.L. N.; TOYOKAWA, Y.; TOYAMA, H.; TAIRA, T.; YASUDA, M. Purification and characterization of two extracellular acid proteinases from *Monascus pilosus*. **Food Chemistry**, v. 121, p. 1216–1224, 2010.

LAKSHMI, B. K. M.; RATNA, SRI, P.V.; AMBIKA DEVI, K.; HEMALATHA, KP.J. Media optimization of protease production by *Bacillus licheniformis* and partial characterization of Alkaline protease. **International Journal of Current of Microbiology and Applied Sciences**.v.3, n 5, p650-659, 2014.

LEBEDEVA, G. V.; PROSKURYAKOV, M. T. Purification and Characterization of Milk-Clotting Enzymes from Oyster Mushroom (*Pleurotusostreatus* (Fr.) Kumm). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 623–625, 2009.

LEIGHTON, T.J.; DOI, R. H.; WARREN, R.A. J.; KELLN, R. A. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Molecular Biology**, v. 76, p. 103-122, 1973.

LEZZAR, H. B.; LEGHLIMI, H.; COPINET, E.; DUCHIRON, F.; MAZA, A. M. Utilization of tomato pomace as a substrate for neutral protease production by *Aspergillus oryzae* 2220 on solid-state fermentation. **International Journal of Advanced Research**, v. 2, n. 11, p. 338-346, 2014.

MALDONADO, R. R.; BURKERT, J. F. M.; AGUIAR-OLIVEIRA, E.; DURRANT, L.; MAZUTTI, M. A.; FILHO, F. M.; RODRIGUES, M. I. Elucidation of the effects of inoculum size and age on lipase production by *Geotrichum candidum*. **Biotechnologia Aplicada**. v. 31, p. 216-221, 2014.

MANZUR ALI, P. P.; SAPNA, K.; REKHA MOL, K. R.; BHAT, S. G.; CHANDRASEKARAN, M.; ELYAS, K. K. Trypsin Inhibitor from Edible Mushroom *Pleurotus floridanus* Active against Proteases of Microbial Origin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, p. 167–178, 2014.

MERHEB-DINI, C.; GOMES, E.; BOSCOLO, M. SILVA, R. Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly

isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (Milk-clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31). **Food Chemistry**, v. 120, p. 87–93, 2010.

MORETTI, M. M. S.; BOCCHINI-MARTINS, D. A.; SILVA, R.; RODRIGUES, A.; SETTE, L. D.; GOMES, E. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1062-1071, 2012.

MUSHTAQ, Z.; ADNAN, A.; MEHMOOD, Z.; SYED, Q. Process optimization by response surface methodology for extracellular alkaline protease production from *Bacillus subtilis*. **Pakistan Journal of Botany**, v.46, n.2, p. 699-704, 2014.

MUSHTAQ, Z.; IRFAN, M. NADEEM, M.; NAZ, M. SYED, Q. Kinetics Study of Extracellular Detergent Stable Alkaline Protease from *Rhizopus oryzae*. **Brazilian Archives of biology and technology**, v. 58, n. 2, p. 175-184, 2015.

NASCIMENTO, W. C. A.; MARTINS, M. L. L. Produção de proteases por *Bacillus* sp SMIA-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 582-588, 2006.

NC-IUBMB, 2011. **Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)**. Disponível em: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme>>. Acesso em: 10 fev. 2015.

NIRMAL, N. P., LAXMAN, R. S. Enhanced Thermostability of a Fungal Alkaline Protease by Different Additives. **Enzyme Research**, p. 8, 2014.

NIYONZIMA, F. N.; MORE, S. S. Screening and optimization of cultural parameters for an alkaline protease production by *Aspergillus terreus* gr. under submerged fermentation. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 4, n. 1, p. 1016 – 1028, 2013.

NIYONZIMA, F. N.; MORE, S. S. Purification and characterization of detergent-compatible protease from *Aspergillus terreus* gr. **3 Biotech**, v. 5, p. 61–70, 2015.

ONYANGO, B. O.; PALAPALA, V. A.; ARAMA, P. F.; WAGAI, S. O.; GICHIMU, B. M. Morphological characterization of Kenyan mushroom [*Auricularia auricular* (L. ex Hook.) Underw.] and the effect of supplemented millet and sorghum grains in spawn production. **Agriculture and biology journal of north america**, v. 2, n. 3, p. 407-414, 2011.

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.

ORSINE, J. V. C; BRITO, L. M. B.; NOVAES, M. R. C. G.; Cogumelos comestíveis: uso, conservação, características nutricionais e Farmacológicas. **Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, v. 4, n. 32, p.452-460, 2012.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelia processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 189–259, 2004.

PATEL, Y.; NARAIAN, R.; SINGH, V. K. Medicinal Properties of *Pleurotus* Species (Oyster Mushroom): A Review. **World Journal of Fungal and Plant Biology**, v. 3, n. 1, p. 01-12, 2012.

PATRICK, F.; MTUI, G.; MSHANDETE, A. M.; KIVAISI, A. Optimization of laccase and manganese peroxidase production in submerged culture of *Pleurotus sajor-caju*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 50, p. 10166-10177, 2011.

PEREIRA, A. B.; PUTZKE, J. **Famílias e gêneros de fungos Agaricales (Cogumelos) no Rio Grande do Sul**. Santa Cruz do Sul: Livraria e Editora da FISC, 1989, 188p.

PORTINHO, J. A.; ZIMMERMANN, L. M.; BRUCK, M. R. Efeitos Benéficos do Açáí. **International Journal of Nutrology**, v.5, n.1, 2012.

PRASAD, D. S. R.; RAJU, K. J. Studies on the production of Neutral Protease by *Rhizopus oligosporus* NCIM 1215 using *Lablab purpureus* seed powder under solid state fermentation. **Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences**, v. 3, n. 4, p. 2772-2783, 2013.

PUNDIR, R. K.; RANA, S.; TYAGI, H. Studies on Compatibility of Fungal alkaline Protease with Commercially Available Detergents. **International Journal of Modern Biochemistry**, v.1, p. 41-56, 2012.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os reinos dos fungos**. Vol. I, Ed. EDUNISC, 1998, 606p.

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.

PUTZKE, J. **Cogumelos Agaricales (Sensu lato) da Amazônia: coleta e identificação**. In: TEIXEIRA, M. F.; SILVA, T. A.; PALHETA, R. A.; CARNEIRO, A. L. B.; ATAYDE, H. M. Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada. Manaus: Edua, Cap. 2, p. 45-52, 2011.

RAI, S. K.; MUKHERJEE, A. K. Ecological significance and some biotechnological application of an organic -solvent stable alkaline serine protease from *Bacillus subtilis* strain DM-04. **Bioresource technology**, v. 100, p. 2642–2645, 2009.

RAI, S. K.; MUKHERJEE, A. K. Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease (Alzwiprase) from *Bacillus subtilis* DM-04 - **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, p. 173-180, 2010.

RAJ, A.; KHESS, N.; PUJARI, N.; BHATTACHARYA, S.; DAS, A.; RAJAN, S. S. Enhancement of protease production by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from dairy effluent sludge and determination of its fibrinolytic potential. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. 1845-1851, 2012.

RAMOS, C.; SAPATA, M.; FERREIRA, A.; ANDRADA, L.; CANDEIAS, M. Produção de três espécies de cogumelos *Pleurotus* e avaliação da qualidade em atmosfera modificada. **Revista de Ciências Agrárias**, v.34, n.1, 2011.

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.

RAO, S.; MIZUTANI, O.; HIRANO, T.; MASAKI, K.; IEFUJI, H. Purification and characterization of a novel aspartic protease from basidiomycetous yeast *Cryptococcus* sp. S-2. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 5, p. 441–446, 2011.

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**, p. 411-417, 2012.

SABOTIČ, J.; TRČEK T.; POPOVIČ, T.; BRZIN, J. Basidiomycetes harbour a hidden treasure of proteolytic diversity. **Journal of Biotechnology**, v. 128, p. 297–307, 2007.

SANKARALINGAM, S.; SHANKAR, T.; RAMASUBBURAYAN, R.; PRAKASH, S.; KUMAR, C. Optimization of Culture Conditions for the Production of Amylase from *Bacillus licheniformis* on Submerged Fermentation. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences**, v. 12, n. 11, p. 1507-1513, 2012.

SANTOS, L. F.; SATO, H. H. Production of alkaline protease from *Cellulosi microbium cellulans*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40 p. 54-60, 2009.

SHAMPA, S.; DASU V. V.; BISHNUPADA, M. Effect of physical parameters, carbon and nitrogen sources on the production of alkaline protease from a newly isolated *Bacillus pseudofirmus* SVB1. **Annals of Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 531-538, 2009.

SILVA, T. A.; INOUI, C.T.; SOUZA, T. C.; ALECRIM, M. M.; TEIXEIRA, M. F. S. **Deteção de atividade enzimática em *Aspergillus* e *Penicillium* depositados na Coleção de Cultura DPUA/UFAM**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 25. Porto de Galinhas, 2009.

SINGHAL, P.; NIGAM, V. K.; VIDYARTHI, A. S. Studies on production, characterization and applications of microbial alkaline proteases. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**. v. 3, n. 3, p. 653-669, 2012.

SOUZA, P. M.; BITTENCOURT, M. A.; CAPRARA, C. C.; FREITAS, M.; ALMEIDA, D. S. FONSECA, Y. M. FILHO, E. X.; MAGALHÃES, P. O. A biotechnology perspective offungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 337-346, 2015.

SUBRAMANIYAM, R.; VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. **International Journal of science and nature**.v.3, n. 3, p. 480 – 486, 2012.

SUGANTHI, C.; MAGESWARI, A.; KARTHIKEYAN, S.; ANBALAGAN, M.; SIVAKUMAR, A.; GOTHANDAM, K.M. Screening and optimization of protease production from a halotolerant *Bacillus licheniformis* isolated from saltern sediments. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 11, p. 47-52, 2013.

SUN, Q. WANG, X. P.; YAN, Q. J.; CHEN, W.; JIANG, Z. Q. Purification and Characterization of a Chymosin from *Rhizopusmicrosporus* var. *rhizopodiformis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, p. 174–185, 2014.

TÉLLEZ-TÉLLEZ, M.; DÍAZ, R. SÁNCHEZ, C. DÍAZ-GODÍNEZ, G. Hydrolytic enzymes produced by *Pleurotus* species. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 4, p. 276-281, 2013.

VIJAYALAKSHMI, S., VENKATKUMAR, S., THANKAMANI, V.; Screening of alkalophilic thermophilic protease isolated from *Bacillus* RV.B2.90 for Industrial applications. **Research in Biotechnology**, v.2, n.3, p. 32-41, 2011.

VIJAYARAGHAVAN, P.; LAZARUS, S.; VINCENT, S. G. P. De-hairing protease production by an isolated *Bacillus cereus* strain AT under solid-state fermentation using cow dung: Biosynthesis and properties. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, p. 27–34, 2014.

VISHWANATHA, K. S.; RAO A. G.; SINGH, S. A. Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process Parameters. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 129–138, 2010.

XU, X.; YAN, H. CHEN, J. ZHANG, X. XU, X. YAN, H.; CHEN, J. ZHANG, X. Bioactive proteins from mushrooms. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 667-674, 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.

WISEMAN, A. **Manual de biotecnologia de las enzimas**. Zaragoza: acribia: 1991.

YANG, H.; MIN, W.; BI, P.; ZHOU, H.; HUANG, F. Stimulatory effects of Coixlacryma-jobi oil on the mycelial growth and metabolites biosynthesis by the submerged culture of *Ganoderma lucidum*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 76, p. 77– 82, 2013.

YIN, C.; ZHENG, L.; CHEN, L.; TAN, Q.; SHANG, X.; MA, A. Cloning, expression, and characterization of a milk-clotting aspartic protease gene (Po-Asp) from *Pleurotus ostreatus*. **Applied Biochemical Biotechnology**, v. 172, p. 2119-2131, 2014.

ZAFERANLOO, B.; QUANG, T. D.; DAUMOO, S.; GHORBANI, M. M.; MAHON, P. J.; PALOMBO, E. A. Optimization of protease production by endophytic fungus, *Alternaria alternata*, isolated from an Australian native plant. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 30, p. 1755–1762, 2014.

ZAMBARE, V. P.; NILEGAONKAR, S. S.; KSHIRSAGAR, P. R.; KANEKAR, P. P. Scale up production of Protease using *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327 and its Detergent Compatibility. **Journal of Biochemical Technology**, v. 5(2), p. 698-707, 2014.

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.

ZHANG, Y.; LIU, Z.; NG, T. B.; CHEN, Z.; QIAO, W.; LIU, FANG. Purification and characterization of a novel antitumor protein with antioxidant and deoxyribonuclease activity from edible mushroom *Pholiota nameko*. **Biochimie**, p. 28–37, 2014.

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