

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS**  
**ESCOLA NORMAL SUPERIOR - ENS**  
**CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**LAYNAH PIMENTA**

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PROTEASES E EXOPOLISSACARÍDEOS POR**  
*Pleurotus ostreatus* E *Pleurotus eryngii*

**MANAUS – AM**  
**2018**

**LAYNAH PIMENTA**

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PROTEASES E EXOPOLISSACARÍDEOS POR  
*Pleurotus ostreatus* E *Pleurotus eryngii***

Monografia apresentada como pré-requisito para conclusão do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade do Estado do Amazonas – UEA.

Orientador(a) Prof<sup>a</sup> Dra. Larissa Kirsch

**MANAUS – AM**

**2018**

### Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
**Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.**

P644a	<p>Pimenta, Laynah</p> <p>Avaliação da produção de proteases e exopolissacarídeos por <i>Pleurotus ostreatus</i> e <i>Pleurotus eryngii</i> / Laynah Pimenta. Manaus : [s.n], 2018.</p> <p>33 f.: color.; 30 cm.</p> <p>TCC - Graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2018.</p> <p>Inclui bibliografia</p> <p>Orientador: Larissa de Souza Kirsch</p> <p>1. Basidiomicetos. 2. Fermentação submersa. 3. Enzimas. 4. EPS. I. Larissa de Souza Kirsch (Orient.). II. Universidade do Estado do Amazonas. III. Avaliação da produção de proteases e exopolissacarídeos por <i>Pleurotus ostreatus</i> e <i>Pleurotus eryngii</i></p>
-------	---

LAYNAH PIMENTA

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PROTEASES E EXOPOLISSACARÍDEOS  
POR *Pleurotus ostreatus* E *Pleurotus eryngii***

Monografia apresentada à Universidade do Estado do Amazonas como requisito para graduação em Ciências Biológicas.

DATA DE APROVAÇÃO: Manaus – AM, 05 de Julho de 2018.

**BANCA EXAMINADORA**



---

**Orientador (a) Profª Drª Larissa de Souza Kirsch  
Universidade do Estado do Amazonas (UEA)**

---

**Membro Titular I**

**Drª Ormezinda Celeste Cristo Fernandes  
ILMD/ FIOCRUZ- AMAZÔNIA**



---

**Membro Titular II**

**Profª Drª Ieda Hortêncio Batista  
Universidade do Estado do Amazonas (UEA)**



---

**Suplente**

**MSc. Thayana Cruz de Souza  
ILMD/ FIOCRUZ- AMAZÔNIA**



---

**Suplente**

**Drª Rosilene Gomes da Silva Ferreira  
Universidade do Estado do Amazonas (UEA)**

A minha mãe e a minha querida avó, com  
todo o meu amor,

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo seu infinito amor e misericórdia, por ser bom o tempo todo comigo, e por seu cuidado e proteção.

À minha orientadora Dra. Larissa Kirsch, pelos ensinamentos, pela coragem em acreditar em mim e me adotar há dois anos mesmo que eu ainda fosse inexperiente.

A professora Dra. Maria Francisca Simas, por não hesitar em dividir comigo seus conhecimentos dia após dia, pelas conversas de vida, inúmeros conselhos e por me adotar de uma forma tão amorosa, fazendo eu me sentir parte da família do “ Lab”.

A Universidade do Estado do Amazonas por contribuir com minha formação acadêmica e profissional.

Ao laboratório de Coleção DPUA da Universidade Federal do Amazonas, pelo espaço concedido para realização dos experimentos.

Aos meus pais, Renan, Jacyra e ao meu “ tio-pai” Dave, pelos sacrifícios feitos em prol de me oferecer oportunidade de ter uma educação de qualidade, por me impulsionar a conquistar um espaço no mundo e por principalmente fazerem dos meus sonhos, os deles.

A minha querida avó Raimunda, que é mais que uma segunda mãe, por me apoiar mais do que qualquer pessoa na vida, por me levantar quando eu estive fraca e pelas orações feitas.

Ao meu lindo, Filipe que me ajudou muito com alguns ajustes deste trabalho, por todas as vezes que aguentou meu estresse e me deu todo o amor possível e teve uma paciência infinita.

As amigas, Ana Kézia pela amizade e paciência infinita e a Juliana por todo apoio, amizade e pelos momentos compartilhados.

Aos colegas de laboratório, Elliza, Dib e Salomão pela ajuda com os experimentos sempre que possível e pelo compartilhamento de conhecimento.

A Valéria de Carvalho Santos Ebinuma, pela disponibilidade em ajudar nas análises estatísticas do trabalho.

E a todos que participaram dessa minha jornada, pelos ensinamentos, puxões de orelha ou até mesmo aqueles que se lembraram de mim em suas orações, muito obrigada!

*“...E tudo quanto pedirdes em oração, crendo, recebereis...”*

*Mateus 21:22*

## RESUMO

Os cogumelos comestíveis despertam o interesse por apresentar propriedades nutricionais e farmacêuticas, dentre os quais se destacam representantes do gênero *Pleurotus*, os quais são capazes de secretar uma gama de metabólitos primários e secundários. Desta forma, o principal objetivo desta pesquisa visou avaliar a produção de proteases e exopolissacarídeos (EPS) de *P. ostreatus* e *P. eryngii* utilizando planejamento fatorial por fermentação submersa considerando a influência de diferentes concentrações de fontes nutricionais. Para isso, a produção de proteases e exopolissacarídeos foi verificada por fermentação submersa conduzida por 15 dias, com meio contendo os seguintes componentes: glicose, peptona, extrato de levedura, com pH inicial de 6,2. Foi utilizado um planejamento fatorial  $2^3$  com 4 pontos centrais, totalizando 12 experimentos, para cada espécie. A partir do meio líquido recuperado do processo se obteve os exopolissacarídeos e proteases. Nas condições experimentais a produção de EPS não foi significativa para as duas espécies, por conta de influências dos componentes do meio em determinadas concentrações. Em contrapartida, a atividade proteolítica determinada se mostrou bastante significativa com máxima atividade proteolítica (5,28 U/mL) na espécie de *P. eryngii* em 8 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de glicose e 15 g/L de peptona. Esta condição foi a mais eficiente para a produção das proteases com atividade ótima em pH 6,0 e temperatura ótima a 50°C. As características destas enzimas como pH e temperatura ótima, juntamente com outros testes podem permitir sua utilização futura na produção como aditivos em vários setores industriais.

**Palavras-chave:** Basidiomicetos; Fermentação submersa; Enzimas; EPS.

## ABSTRACT

The edible mushrooms arouse the interest for their nutritional and pharmaceutical properties, among which the representatives of the genus *Pleurotus* stand out, which are able to secrete a range of primary and secondary metabolites. Then, the main objective of the research was the production of proteases and exopolysaccharides of *P. ostreatus* and *P.eryngii* using factorial planning by submerged fermentation considering the various sources of nutritional foods. For this, a protease and exopolysaccharide production was verified by submerged fermentation for 15 days, with the following components: glucose, peptone, yeast extract, with initial pH of 6.2. It was for factorial planning 23 with 4 central points, totaling 12 experiments, for each species. From the liquid medium recovered the process of production of proteases and exopolysaccharides. Experimental experiments on the production of EPS were not significant for both species, due to influences of the components of the medium in certain concentrations. In contrast, an age proteolytic activity in a proteolytic activity (5.28 U/mL), as *P.eryngii* in 8 g/L of yeast extract, 10 g/L of glucose and 15 g/L of peptone. This condition was more efficient for a protease production with the highest pH 6.0 and an optimum temperature of 50 ° C. Plants such as temperature rates and processing capacity may become future in production as a result in various industrial aspects.

Keywords: Basidiomycetes; Submerged fermentation; Enzymes; EPS

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Estrutura morfológica geral dos cogumelos .....10
- Figura 2** - Variedade de coloração de fungos do gênero *Pleurotus*; *P.ostreatus* de coloração marrom; *P. citrinopileatus* de coloração amarela; *P. ostretoroseus* de coloração rosa; *P. ostretoroseus* de coloração rosa; *P.djamor* de coloração salmão. ....12
- Figura 3** - *P.ostreatus* na forma vegetativa; Basidiomas de *P.ostreatus*; *P.eryngii* na forma vegetativa; Basidioma de *P.eryngii*; .....13
- Figura 4** - Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis extrato de levedura (1), Glicose (2), Peptona (3), na produção de EPS de *P.eryngii*.....22
- Figura 5** - Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis Extrato de levedura (1), Glicose (2), Peptona (3), na produção de EPS de *P.ostreatus*.....23
- Figura 6** - Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis Extrato de levedura (1), Glicose (2), Peptona (3) na atividade proteolítica de *P.eryngii*.....25
- Figura 7** - Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis Extrato de levedura (1), Glicose (2), Peptona (3), na produção de EPS de *P.eryngii*.....25
- Figura 8** - Efeito do pH na atividade de proteases produzida por *P. eryngii*.....27
- Figura 9** - Efeito da temperatura ótima na atividade de proteases produzida por *P. eryngii*.....28

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Espécies produtoras de EPS do gênero <i>Pleurotus</i> .....	16
<b>Tabela 2</b> - Espécies produtores de proteases do gênero <i>Pleurotus</i> .....	17
<b>Tabela 3</b> - Níveis dos fatores para avaliação da produção de EPS e proteases de <i>P.ostreatus</i> e <i>P.eryngii</i> .....	19
<b>Tabela 4</b> - Resultados do planejamento fatorial $2^3$ com 4 pontos centrais para produção de EPS.....	21
<b>Tabela 5</b> - Resultados do planejamento fatorial $2^3$ com 4 pontos centrais para atividade proteolítica.....	24

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	10
1.1 Cogumelos Comestíveis .....	10
1.2 Gênero <i>Pleurotus</i> .....	11
1.3 Fermentação Submersa .....	14
1.3.1 Carboidratos – exopolissacarídeos .....	15
1.3.2 Proteases .....	16
<b>2.OBJETIVOS</b> .....	18
2.1 Objetivo Geral .....	18
2.2 Objetivos específicos .....	18
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	18
3.1 Organismos, reativação e manutenção das culturas .....	18
3.2 Fermentação submersa para produção de EPS e proteases .....	18
3.3 Extração e quantificação de EPS .....	19
3.4 Determinações da atividade proteolítica .....	19
3.5 Caracterização parcial quanto ao pH e temperatura ótimos de atividade proteolítica ....	19
<b>3.RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	21
4.1 Variáveis que influenciam no crescimento e produção de exopolissacarídeos de <i>P. eryngii</i> e <i>P. ostreatus</i> . .....	21
4.2 Variáveis que influenciam na atividade proteolítica de <i>P.eryngii</i> e <i>P.ostreatus</i> . .....	23
4.3 Caracterização parcial das enzimas proteolíticas .....	27
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	28
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	29

# 1. INTRODUÇÃO

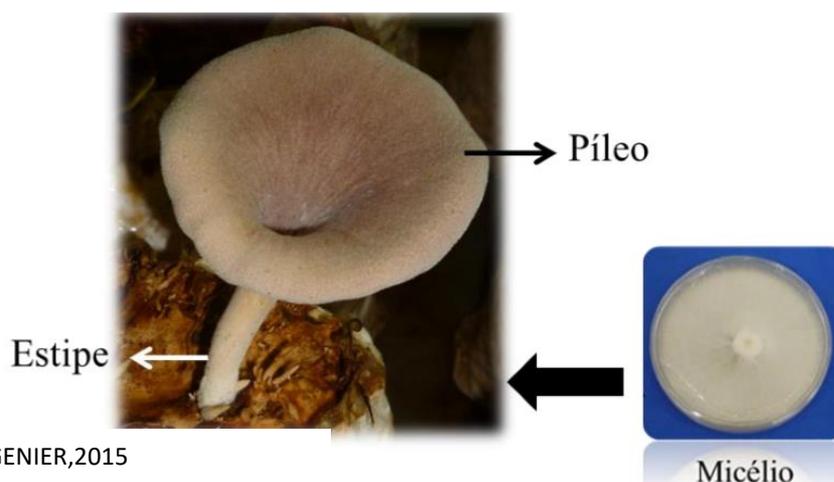
## 1.1 Cogumelos Comestíveis

Os cogumelos são macrofungos capazes de ocupar uma diversidade de ecossistemas florestais, sendo também muito apreciados por seu valor gastronômico, nutricional e medicinal. Sendo assim, possuem uma importância em função de um mercado em contínuo crescimento que está ligado com a qualidade, a produtividade e o custo de produção desses cogumelos (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

Na literatura estima-se que existam aproximadamente 140.000 espécies de cogumelos, dos quais apenas 10% são conhecidos, 50% deles considerados comestíveis e 40% têm comprovada propriedade farmacológica, característica esta que está promovendo o reconhecimento mundial da denominação “cogumelo medicinal”, termo que caracteriza a ação medicinal desses fungos (Costa, 2010; Kim, 2017; Wen et al., 2017).

Dentre os fungos comestíveis, a maioria pertence à divisão Basidiomycota com hábito sapróbio, mas alguns dos mais saborosos são fitoparasitas e muitos podem ser simbioses micorrízicos, como por exemplo: *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius*, *Pleurotus citrinopileatus*, *Pleurotus djamor*. A morfologia destes macrofungos é constituída basicamente por micélio, formado por muitos filamentos ou hifas (do grego hypha=rede), que originam uma estrutura macroscópica chamada basidioma, basidiocarpo ou corpo de frutificação. Muitos deles apresentam a forma que lembra um guarda-chuva com um “chapéu” (píleo) e uma haste (estipe) (Figura 1) (REN *et al*, 2012).

Figura 1 – Estrutura morfológica geral dos cogumelos. Fonte: GENIER, 2015.



Muitas espécies de cogumelos possuem ação benéfica à saúde humana e na produção de metabólitos primários e secundários, os quais despertam o interesse das indústrias farmacêuticas, de alimentos, como fonte nutritiva e de compostos com atividade biológica funcional (Ma et al., 2013; Ao et al., 2016). Importante salientar que muitos desses fungos, são produzidos em larga escala ao redor do mundo, pois além de serem fáceis de cultivá-los em uma grande variedade de resíduos lignocelulósicos, também possuem normalmente componentes naturais com atividade antimicrobiana, pois precisam sobreviver ao seu ambiente natural. Portanto, componentes antibacterianos e antifúngicos podem ser isolados do corpo de frutificação, micélio e do cultivo submerso (caldo fermentado proveniente de uma fermentação submersa), trazendo benefícios para humanidade (ALVES *et al.*, 2012).

Dessa forma, nos últimos anos, o consumo de cogumelos vem crescendo e se destacando gastronomicamente, em função do seu sabor refinado e valor nutricional excepcional (Correia et al., 2017). Comumente, tal alimento contém conteúdo lipídico baixo e também são fontes de carboidratos, fibras e proteínas, além de aminoácidos e vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K). Além disso, os cogumelos estão se tornando cada vez mais atraentes como alimentos funcionais e produtos potenciais para o desenvolvimento de novas drogas (Farzana; Mohajan, 2015).

Considerando as características acima citadas, os cogumelos comestíveis estão se tornando populares como ingredientes em função do seu conteúdo nutricional para fortificação de diversas preparações, tais como biscoitos, bolos e massas alimentícias que são processados por tecnologia simples e de baixo custo (Farzana; Mohajan, 2015).

## 1.2 Gênero *Pleurotus*

*Pleurotus* é um gênero que inclui cogumelos comestíveis com formato do píleo semelhante a uma concha e estipe excêntrica ou lateral, chamados comumente de cogumelos ostra. Sua coloração pode variar entre azul-escuro, cinza-escuro, branco, creme, marrom, amarelo e rosa (Fig.2). Os fungos desse gênero possuem ampla distribuição mundial, podendo ser encontrados em florestas úmidas tropicais e subtropicais, algumas encontradas em áreas da mata atlântica brasileira. A maioria das espécies é comestível, possuindo alto índice protéico, vitamínico e de carboidratos, e baixo teor de gordura, tornando estes cogumelos apropriados para incorporação na dieta humana (SILVEIRA, 2015).

O gênero *Pleurotus* é o segundo maior grupo de cultivares cogumelos comestíveis do mundo, compreendendo mais de 40 espécies. No entanto, espécies do gênero *Pleurotus*

apresentam vantagens quando comparado com outros cogumelos. Por exemplo, eles podem ser cultivados em diferentes substratos e temperaturas, podem ser cultivados artificialmente sem grandes problemas e cresce de uma forma desordenada na tropical e regiões subtropicais (INÁCIO *et al*, 2015).

Os fungos deste gênero são conhecidos por serem eficientes na degradação de lignina, sendo capazes, portanto, de crescer em troncos de árvores vivas e mortas, principalmente em florestas de clima temperado (GUNDE-CIMERMAN, 1999). Estes organismos produzem enzimas extracelulares como lignina peroxidase, manganês peroxidase e lacases (fenol oxidases) que podem modificar e degradar a lignina, fazendo com que estes organismos sejam conhecidos como fungos de podridão branca (SILVEIRA, 2015). Por conta destas características, tais fungos são de fácil cultivo, crescendo em resíduos agroindustriais e agrofloretais como substrato, agregando valor a estes resíduos, através da fermentação submersa ou cultivo tradicional com o meio sólido (SILVEIRA, 2015).

Figura 2 – Variedade de coloração de fungos do gênero *Pleurotus*; A - *P.ostreatus* de coloração marrom; *P. citrinopileatus* de coloração amarela; C - *P. ostreatoroseus* de coloração rosa; C - *P. ostreatoroseus* de coloração rosa; D - *P.djamor* de coloração salmão.

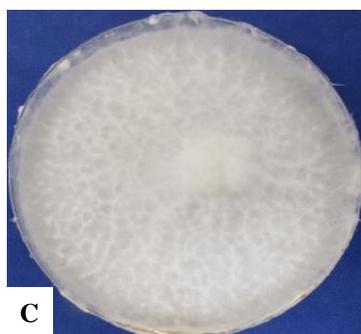
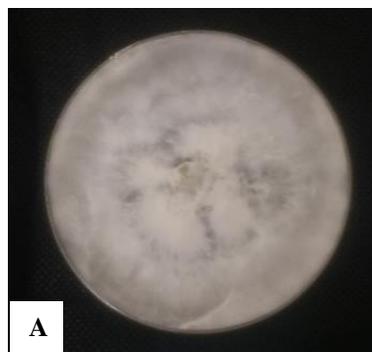


Fonte: PIMENTA,2016; PERRONE,2017

Uma das espécies que se destaca no mercado mundial pelo seu sabor e aspectos nutritivos é *Pleurotus ostreatus*(fig.3), conhecida pelos orientais como Hiratake e no restante do mundo como Shimeji(COHEN *et al.*, 2002). De acordo com a classificação científica, o *P. ostreatus* é um organismo Eukariota que pertence ao Reino Fungi, Filo Basidiomycota, Subfilo Agaricomycotina, Classe Agaricomycetidae, Subclasse Agaricomycetidae, Ordem Agaricales, Família Pleurotaceae, Gênero *Pleurotus* e Espécie *ostreatus* (IWOA, 2016;MYCOBANK,2018).

O *Pleurotus eryngii*, (fig.3) também conhecido como **Cardoncello** é um cogumelo pouco estudado em relação ao seu conteúdo mineral, mas, sendo do mesmo gênero que o Shimeji, apresenta um perfil semelhante aos demais *Pleurotus*. Essa espécie pertence ao Reino Fungi, Filo Basidiomycota, Classe Agaricomycotina Subclasse Agaricomycetidae, Ordem Agaricales, Família Pleurotacea e, Gênero *Pleurotus* e Espécie *eryngii* (IWOA, 2016).

Figura 3– A- *P.ostreatus* na forma vegetativa; B- Basidiomas de *P.ostreatus*; C- *P.eryngii* na forma vegetativa; D- Basidioma de *P.eryngii*;



Fonte :PIMENTA,2017

*P. ostreatus* e *P. eryngii* são duas espécies muito cultivadas em nível mundial, sendo facilmente produzidas, devido à capacidade de degradar uma larga variedade de substratos lignocelulósicos, como por exemplo, resíduos agroflorestais (BISCAIA, 2012; SILVEIRA, 2015)

### 1.3 Fermentação Submersa

Dois tipos básicos de fermentação são utilizados para a produção de enzimas, proteases e biomassa de basidiomicetos: a fermentação submersa (FS) e a fermentação em estado sólido (FES).

A FES requer o meio de cultura composto de substratos sólidos, atuando como fonte de carbono e energia, e apresenta ausência total ou quase total de água livre, o que faz com que essa condição de crescimento tente se aproximar do habitat natural do fungo, entretanto, a dificuldade na escolha de microrganismos capazes de crescer sob condições de baixa umidade, condições controladas de umidade, pH e fluxo de ar continua sendo uma das limitações do processo de FES (ORLANDELLI *et al.*, 2012).

A FS é a técnica majoritariamente utilizada nos países ocidentais para a produção de enzimas e outros metabólitos devido à facilidade de crescimento dos microrganismos em condições controladas de pH e temperatura, além de tornar fácil a recuperação das enzimas extracelulares; portanto, será a técnica enfatizada neste TCC. Este processo utiliza um meio fermentativo líquido, onde as fontes de nutrientes utilizadas são solúveis e o desenvolvimento do microrganismo se dá em presença de água livre. O conteúdo de água nesse processo é superior a 95% (ORLANDELLI *et al.*, 2012).

Nos processos de fermentação em escala industrial são utilizados fermentadores com grande capacidade de volume. Já em escala laboratorial, frascos (como exemplo, Erlenmeyers) e agitadores de bancada são utilizados. A FS inicia-se com os processos prévios à fermentação, também chamados processos *upstream* ou a montante da fermentação. A cultura estoque do microrganismo a ser utilizada é cultivada em frascos que permanecem em agitação até que seja atingida a fase de crescimento exponencial média ou tardia (ORLANDELLI *et al.*, 2012). Os meios de cultivo podem ser formulados a partir de matérias-primas naturais (como resíduos agroindustriais), ou a partir de compostos quimicamente conhecidos (meio sintéticos). Esses meios devem conter fontes de carbono (como farinhas amiláceas, melaços, licores de milho, soja e outros cereais), fontes de nitrogênio (como farinha de peixe, gelatinas, licores de milho e de soja), fatores de crescimento e micronutrientes (como extrato de levedura e farinhas de sementes oleaginosas) (ORLANDELLI *et al.*, 2012).

### 1.3.1 Carboidratos – exopolissacarídeos

Carboidrato é a designação dada aos açúcares, compreendendo o grupo de mono, oligo e polissacarídeos e estes últimos são polímeros formados por muitos monossacarídeos unidos por ligações O-glicosídicas. Sabe-se que suas funções biológicas desempenhadas por eles estão relacionadas com a estrutura química, podendo ser ramificados ou lineares e de acordo com os monômeros presentes na molécula podem ser classificados em homopolissacarídeos, com apenas um tipo de monossacarídeo, e heteropolissacarídeos, dois ou mais tipos de monossacarídeos, apresentando diferentes configurações glicosídicas (REN *et al*, 2012).

Várias glucanas, as quais são um polissacarídeo de monômeros de glicose, unidos por ligações glicosídicas, de cogumelos têm sido isoladas e caracterizadas, sendo relatados seus efeitos imunomodulador, profilático e antitumoral. As moléculas mais descritas e que têm demonstrado atividade antitumoral são as que apresentam ligações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 3) com ramificação (1 $\rightarrow$ 6)(KAGIMURA *et al*, 2015).

Os exopolissacarídeos (EPS), os quais são macromoléculas naturais encontradas em todos os seres vivos constituindo um dos grupos de compostos de maior incidência na terra. Os polissacarídeos representam uma classe de macromoléculas, com ampla ocorrência na natureza e com alta capacidade de carregar informações biológicas, devido a sua grande variabilidade estrutural. São formados por unidades monossacarídicas unidas entre si por ligações glicosídicas, podendo formar estruturas lineares ou ramificadas (SILVEIRA, 2015).

Os polissacarídeos são sintetizados e acumulados geralmente após a fase de crescimento ou quando o organismo se encontra em condições ambientais desfavoráveis, representando uma estratégia metabólica para sua sobrevivência, já os EPS, são polissacarídeos que são secretados para o meio externo. A síntese do EPS pode ser dividida em três fases: assimilação de substrato carbônico; síntese intracelular de polissacarídeo e exsudação do polissacarídeo para o meio extracelular (DOMINATO, 2017).

Na área de alimento, a pululana (um tipo de exopolissacarídeo) é usada como pró-biótico para promover seletivamente o crescimento de *Bifidobacterium spp* no intestino humano. Na área da saúde, alguns polissacarídeos são usados como agentes antitumorais. Além de apresentarem estas propriedades, estas biomoléculas são menos susceptíveis à variabilidade em suas propriedades químicas e físicas, mantendo o padrão de qualidade, pois sua produção pode ser controlada cuidadosamente. Além disso, sua recuperação e purificação apresentam dificuldades menores, comparadas as moléculas provenientes dos vegetais (PESSOA, 2016).

Essas moléculas bioativas, principalmente os polissacarídeos, podem ser extraídos e isolados tanto do corpo de frutificação, do micélio e a partir do cultivo submerso (caldo fermentado) de várias espécies do gênero *Pleurotus* (Tab. 1). A busca por estas moléculas vem crescendo nos últimos anos, aumentando o interesse por estes polímeros, pois apresentam aplicações para indústria alimentícia, exemplo pré-biótico e suplemento alimentar, farmacêutica, utilizados como veículo de liberação de fármaco (PESSOA, 2016).

Tabela 1. Espécies produtoras de EPS do gênero *Pleurotus*.

FUNGO	REFERÊNCIA
<i>P. djamor</i>	DE BARBA <i>et al.</i> , 2011
<i>P. citrinopileatus</i>	SILVEIRA, 2015
<i>P. ferulae</i>	WANG <i>et al.</i> , 2014
<i>P. florida var. blue</i>	DEY <i>et al.</i> , 2012
<i>P. geesteranus</i>	ZHANG <i>et al.</i> , 2013
<i>P. ostreatus var. florida</i>	INÁCIO <i>et al.</i> , 2015
<i>P. ostreatoroseus</i>	SILVEIRA, 2015
<i>P. pulmonarius</i>	SILVEIRA, 2015
<i>P. sajor caju</i>	BONOMINI <i>et al.</i> , 2017
<i>P. tuber-regium</i>	SILVEIRA, 2015

### 1.3.2 Proteases

Proteases ou peptidases, são enzimas responsáveis pela clivagem hidrolítica da ligação amida entre os grupos carboxila e amina dos aminoácidos que formam as proteínas, são metabólitos primários, produzidos no crescimento inicial do fungo. As peptidases podem ser divididas em dois grandes grupos: as exopeptidases, que removem sequencialmente os aminoácidos das extremidades N-iniciais ou C-terminais e as endopeptidases, responsáveis pela clivagem das ligações peptídicas internas (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

As proteases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas exploradas industrialmente, respondendo pelo menos por 75% da produção de enzimas disponíveis comercialmente. Elas são usadas largamente na indústria de detergentes, laticínios, carnes, panificação, couro, e mais recentemente em síntese de peptídeos e resolução racêmica de aminoácidos (GENIER, 2015; PESSOA, 2016; ESPOSITO; AZEVEDO, 2010).

A produção de proteases por microrganismos é muito influenciada por componentes do meio, especialmente fontes de carbono e nitrogênio, e fatores físicos tais como temperatura, pH, tempo de incubação, agitação e a densidade do inóculo (GENIER, 2015; PESSOA, 2016).

O aumento da demanda por proteases com propriedades importantes principalmente no setor industrial levou os biotecnologistas a explorar novas fontes de proteases. A maioria das proteases fúngicas tem características neutras a ligeiramente ácidas. Dessa forma, o estudo dessas enzimas aumentou nas últimas décadas, porém o conhecimento acerca de proteases de basidiomicetes ainda é limitada. Em 2009, aproximadamente 60% das enzimas comercializadas de fungos e apenas cinco originam de macrofungos (lacases, uma peroxidase e uma fitase) (INÁCIO *et al.*, 2015).

Embora sejam reconhecidos pelo seu valor nutricional e a extração de compostos bioativos de basidioma e micélios, cogumelos ainda possuem muita informação inexplorada em relação a algumas das enzimas que produzem, como proteases, as quais são isoladas e identificadas. *Lentinula edodes* destacou-se entre as maiores halo de atividade proteolítica usando o método de seleção em placas contendo caseína, já o gênero *Pleurotus* ficou em segundo lugar na produção de protease (INÁCIO *et al.*, 2015).

Algumas espécies desse gênero por exemplo, *P. ostreatus* secreta tripsina extracelular durante todo o seu desenvolvimento, *P. eryngii* destacou-se na produção de protease, a Pleurerina, a protease extraída de corpos frutíferos de *P. eryngii* com anti-HIV-1 ação, apresentou as características de uma protease aspártica devido à sua sequência N-terminal, que é diferente de outras proteases fúngicas aspárticas. Porém, outras espécies desse gênero possuem potencial para produção de proteases ( Tab. 2) (INÁCIO *et al.*, 2015).

Tabela 2. Espécies produtores de proteases do gênero *Pleurotus*

FUNGO	REFERÊNCIA
<i>P. citrinopileatus</i>	SILVEIRA, 2015
<i>P. djamor</i>	BONOMINI <i>et al.</i> , 2017
<i>P. ostreatus var. florida</i>	KOMURA, 2009
<i>P. ostreatoroseus</i>	FONSECA <i>et al.</i> , 2014
<i>P. sajor caju</i>	HEINZ <i>et al.</i> , 2014

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a capacidade de produção de proteases e exopolissacarídeos a partir de *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus eryngii*.

### 2.2. Objetivos específicos

- Analisar a influência de diferentes concentrações de fontes nutricionais na produção EPS e proteases dos cogumelos por fermentação submersa.
- Extrair e quantificar os EPS a partir dos extratos brutos;
- Quantificar as proteases.
- Caracterizar as proteases quanto à temperatura e pH ótimos de atividade.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Organismos, reativação e manutenção das culturas

Nesta pesquisa foram avaliadas duas espécies de basidiomicetos mantidas no acervo da Coleção de Culturas do Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas: *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus eryngii*.

A reativação das culturas preservadas em óleo mineral foi realizada transferindo-se um fragmento do micélio para a superfície de meio ágar Batata Dextrose com extrato de levedura 0,5% (p/v) – BDA + YE, em placas de Petri (90 mm x 15 mm). A partir das culturas reativadas estas foram mantidas em BDA + YE, sob refrigeração (4 °C) e os repiques realizados a cada três meses (KIRSCH *et al.*, 2011).

### 3.2. Fermentação submersa para produção de EPS e proteases

Para produção de EPS e proteases dos basidiomicetos a fermentação submersa foi realizada em frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 100 mL do meio de cultura com a seguinte formulação: glicose (20g/L), peptona (10g/L), extrato de levedura (5g/L), com pH inicial de 6,2.

Com a finalidade de avaliar a influência da concentração das fontes nutricionais do meio de cultura (citado acima) foi utilizado um planejamento fatorial 2<sup>3</sup> com 4 pontos centrais, totalizando 12 experimentos (Barros Neto, 2002). Os níveis das variáveis analisadas estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3. Níveis dos fatores para avaliação da produção de EPS e proteases de *P.ostreatus* e *P.eryngii*.

Fatores	Níveis		
	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
Extrato de levedura (g/L)	2	5	8
Glicose (g/L)	10	20	30
Peptona	5	10	15

A partir das culturas mantidas em BDA + YE (item 3.1) foram retirados 3 fragmentos de micélio ( $\varnothing= 1\text{cm}$ ) para serem adicionados aos meios de cultura, previamente esterilizados a 121 °C por 15 minutos. A fermentação submersa foi conduzida durante 15 dias a 25 °C sob agitação constante de 150 rpm (KIRSCH *et al.*, 2011).

### 3.3 Extração e quantificação de EPS

O meio líquido recuperado do processo fermentativo foi filtrado em papel de filtro (Whatman Nº.1) e ao filtrado foi adicionado etanol resfriado a 8 °C na proporção de 3:1 (etanol: amostra). Após 24 horas sob agitação (4 °C) a amostra foi centrifugada a 6000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante descartado. A amostra de EPS foi coletada e desidratada até alcançar peso constante para quantificação a peso seco (KIM *et al.*, 2005).

### 3.4 Determinações da atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi determinada a 25 °C segundo Leighton *et al.*, (1973). Para a mistura reacional 150  $\mu\text{L}$  do caldo fermentado foram homogeneizados com 250  $\mu\text{L}$  de substrato [(azocaseína 1,0% (p/v) (Sigma, St. Luis, MO USA)], em tampão 0,2 M Tris-HCl, pH 7,2. Decorridos 60 minutos de incubação por 1 hora em câmara escura a reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético 10% (p/v) e, em seguida as amostras foram centrifugadas por 15 minutos, a 8.000 x g a 4 °C. Do sobrenadante, 1,2 mL foram transferidos para 1,4 mL de Hidróxido de Sódio 1M, procedendo-se a leitura em espectrofotômetro a 440 nm. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorvância de 0,1 em uma hora (TREMACOLDI *et al.*, 2007).<sup>7</sup>

### 3.5 Caracterização parcial quanto ao pH e temperatura ótimos de atividade proteolítica

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 5-6),

solução tampão fosfato 0,1 M (pH 7-8) e solução tampão carbonato-bicarbonato 23 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 (SILVA, 2015).

### 3.5 Análises estatísticas

Os resultados experimentais foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média e submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey para determinar a significância das diferenças observadas nas amostras, ao nível de significância de 5%. Os dados relativos ao planejamento fatorial foram analisados utilizando o programa Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA, 2008).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.1 Variáveis que influenciam no crescimento e produção de exopolissacarídeos de *P.eryngii* e *P.ostreatus*.

Os resultados obtidos dos 24 ensaios do planejamento fatorial para a produção de EPS de *P.eryngii* e *P. ostreatus* nos diferentes meios de cultivo estão mostrados na Tabela 4. Os dados indicam que da totalidade de experimentos realizados, a produção de EPS de *P.eryngii* apresentou variação de 1,08 g/L a 3,98 g/L (ensaios 1 e ponto central) e para *P. ostreatus* variação de 0 g/L a 3,67 g/L (ensaios 1 e 8), valores mínimos e máximos, respectivamente.

Quanto aos exopolissacarídeos, foram produzidos em quantidade maior no ponto central, para as duas espécies estudadas como mostra na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados do planejamento fatorial 2<sup>3</sup> com 4 pontos centrais para produção de EPS.

ENSAIOS	Variáveis analisadas (g/L)			EPS (g/L) <i>P. eryngii</i>	EPS (g/L) <i>P. ostreatus</i>
	Extrato de Levedura	Glicose	Peptona		
1	2	10	5	1,08	0
2	2	10	15	1,11	1,13
3	2	30	5	2,35	2,35
4	2	30	15	2,42	2,42
5	8	10	5	2,21	0
6	8	10	15	2,69	2,09
7	8	30	5	3,48	2,39
8	8	30	15	3,72	3,67
PC	5	20	10	3,34	2,14
PC	5	20	10	3,01	3,01
PC	5	20	10	3,12	2,11
PC	5	20	10	3,98	1,72

A produção de EPS por fungos depende do tipo de fonte de carbono e da concentração usada. Em geral, se a fonte de carbono pode ser metabolizada pelo fungo, ela também pode promover a produção de EPS, mas nem sempre na mesma extensão, além disso, quando a fonte de carbono do meio é insuficiente para o crescimento micelial e considerando os dias de fermentação, o EPS é utilizado como fonte de carbono para o desenvolvimento do fungo (HONRICAR,2014).

Portanto, os meios com fonte de carbono em concentrações mais baixas (ensaios 1, 2 e 5) para *P. ostreatus*, tiveram a sua produção de EPS comprometida, também pode-se observar no ensaio 5 a produção de EPS para *P. eryngii* foi extremamente baixa. A diferença entre essa produção pode ser justificada, isso porque existe a capacidade diferenciada de cada espécie

sobreviver em condições limitantes de glicose, onde foi verificada uma resistência maior a essa falta na espécie de *P. eryngii* (BARBOSA *et al.*, 2004; HONRICAR,2014).Além disso, segundo Barbosa *et al.*, 2004, em seus estudos verificou quepolissacarídeos são produzidos geralmente sob condições de nitrogênio limitantes e que altos níveis de nitrogênio no meio de cultivo reprimem a formação de EPS, corroborando com os resultados encontrados no ensaio 6.

Sendo necessário balancear as concentrações de glicose e extrato de levedura e peptona em um meio de cultivo para que a produção seja significativa, em algumas espécies desse gênero (BARBOSA *et al.*, 2004; HONRICAR,2014; INÁCIO *et al.*,2015).

As Figuras 4 e 5mostram os valores dos efeitos estimados relativos à produção de EPS. No gráfico de Pareto as variáveis e interaçõesentre as variáveis estão representadas por siglas e letras no eixo vertical e a linha vertical é usada para julgar quais os efeitos são estatisticamente significativos. As barras que se estendem além dessa linha correspondem aos efeitos estatisticamente significativos com um nível de 95% de significância. Portanto, para as duas espécies de cogumelos estudadas, as variáveis peptona, extrato de levedura e a glicose, quando analisadas separadamente e suas interações, não foramestatisticamente significativas.

Figura 4. Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis extrato de levedura (1),Glicose (2), Peptona (3), na produção de EPS de *P.eryngii*.

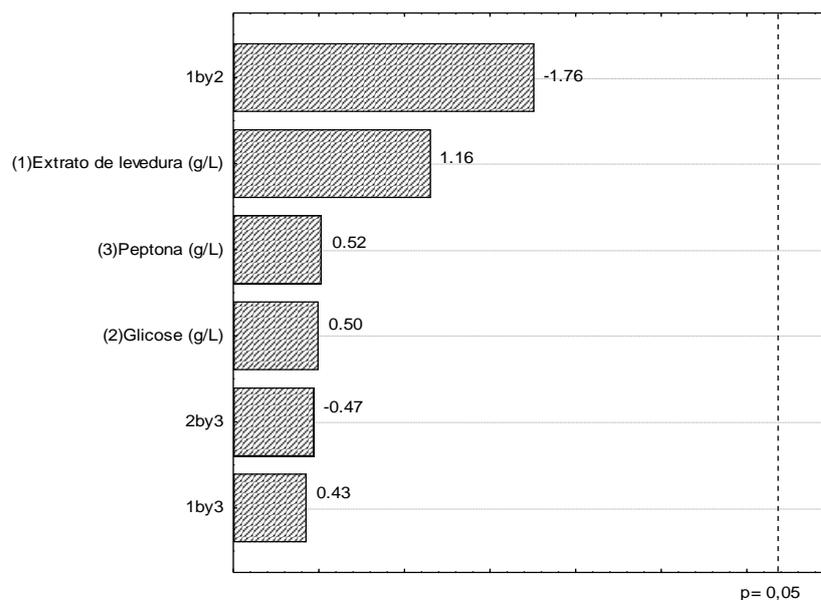
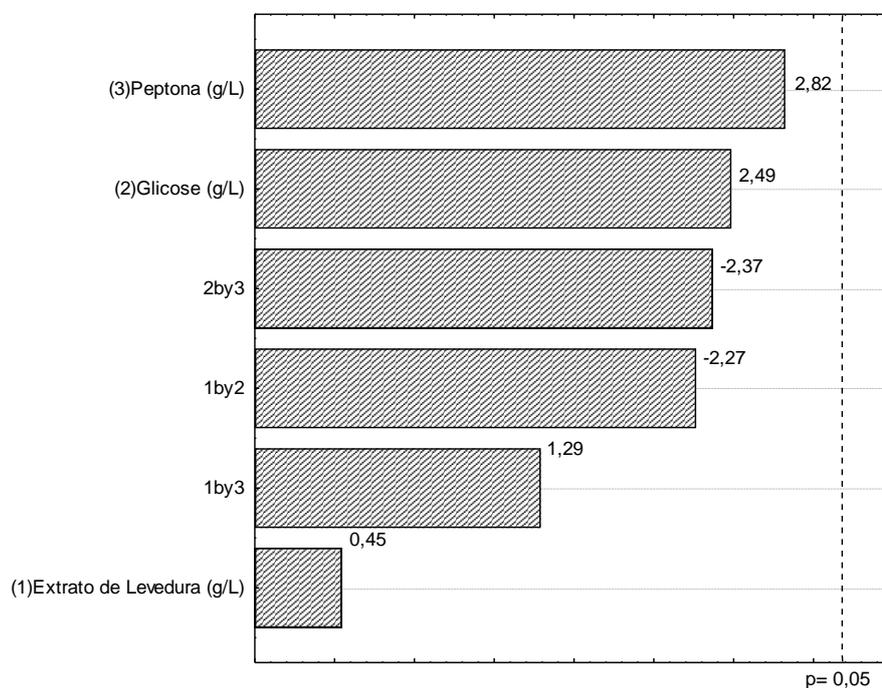


Figura 5. Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis Extrato de levedura (1), Glicose (2), Peptona (3), na produção de EPS de *P.ostreatus*



#### 4.2 Variáveis que influenciam na atividade proteolítica de *P.eryngii* e *P.ostreatus*.

Os dados indicam que da totalidade de experimentos realizados, a atividade proteolítica de *P. eryngii* apresentou variação de 2,33 U/mL a 5,28 U/mL (ensaios 4 e 6) e para *P. ostreatus* variação de 0,66 U/ml  $\pm$  0,04 a 3,04  $\pm$  0,38 (ensaios 1 e 5), valores mínimos e máximos, respectivamente.

Quanto à atividade proteolítica, foi possível observar que foram produzidas em quantidade maior no ensaio 6 para *P.eryngii* e no ensaio 5 para *P.ostreatus* como mostra na Tabela 5.

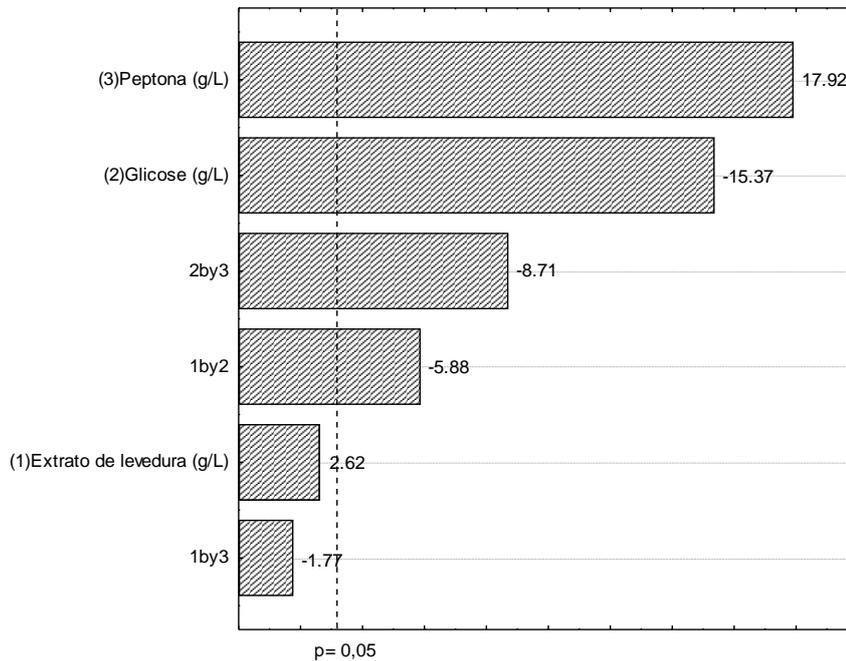
Tabela 5- Resultados do planejamento fatorial 2<sup>3</sup> com 4 pontos centrais para atividade proteolítica.

ENSAIOS	Variáveis analisadas (g/L)			Atividade proteolítica (U/mL) <i>P.eryngii</i>	Atividade proteolítica (U/mL) <i>P.ostreatus</i>
	Extrato de Levedura	Glicose	Peptona		
1	2	10	5	2,56	0,66
2	2	10	15	4,68	2,13
3	2	30	5	2,40	1,71
4	2	30	15	2,33	2,95
5	8	10	5	3,266	3,04
6	8	10	15	5,28	2,93
7	8	30	5	4,06	2,13
8	8	30	15	4,35	2,86
PC	5	20	10	2,44	2,79
PC	5	20	10	2,55	2,68
PC	5	20	10	2,71	2,71
PC	5	20	10	2,53	2,66

Em relação ao efeito das variáveis, foi possível verificar que, com exceção da concentração do Extrato de Levedura, para *P. eryngii*, todas as outras duas variáveis, quando analisadas separadamente, influenciaram de forma significativa na atividade proteolítica. Entre as variáveis testadas, peptona como fonte de nitrogênio e a glicose como fonte de carbono favoreceram as maiores atividades proteolíticas, expressando o maior valor de atividade nos ensaios 6 (Figura 6).

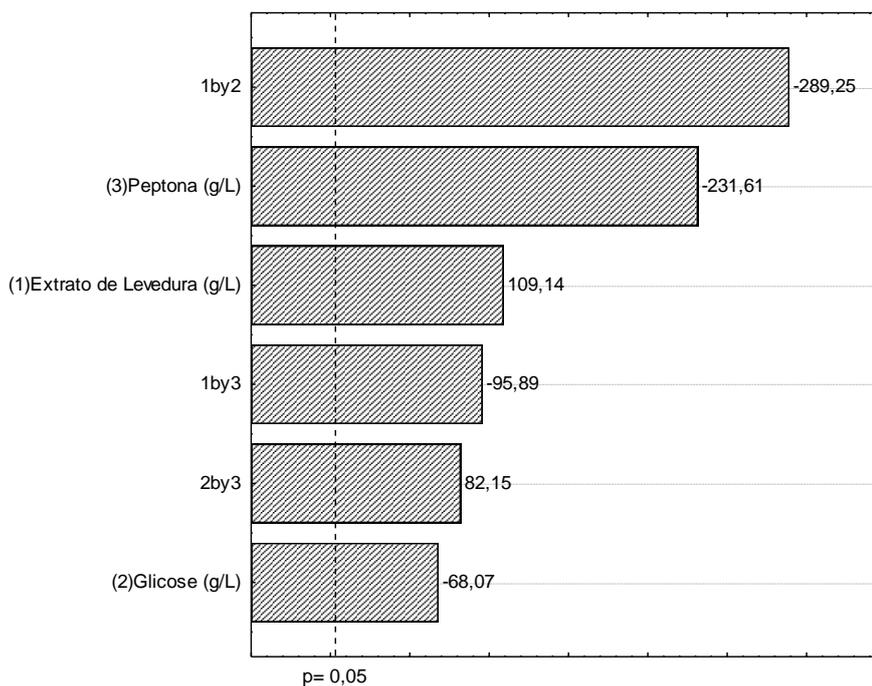
Pode-se observar também que a interação de glicose e peptona em níveis inferiores foi a terceira maior interação significativa, comportando-se de forma igual a interação em níveis inferiores de extrato de levedura e peptona, sendo a quarta maior significativa (Figura 6).

Figura 6. Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis Extrato de levedura (1), Glicose (2), Peptona (3) na atividade proteolítica de *P.eryngii*.



Concernente ao efeito das variáveis analisadas na fermentação de *P.ostreatus*, foi possível verificar que todas as variáveis quando analisadas juntas e separadamente foram significativas, sendo a maiores concentrações em níveis inferiores, com a interação entre extrato de levedura e glicose, em seguida, a peptona, observado na figura 7.

Figura 7. Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis Extrato de levedura (1), Glicose (2), Peptona (3) na atividade proteolítica de *P.ostretus*.



Segundo Inácio *et al.*, 2015, as enzimas parecem ter uma relação estreita com o hábito de fungos saprófitos, como por exemplo, *P. pulmonarius*, que geralmente cresce em madeira morta, secreta subtilisina, mas não produz tripsina, porém, a espécie *P. ostreatus*, que cresce em hospedeiros vivos, secreta tripsina extracelular durante todo o seu desenvolvimento. A presença de tecidos vivos como hospedeiros podem estar relacionados à expressão de proteases do tipo tripsina ou proteases no geral.

Ainda nos estudos de Inácio *et al.*, 2015 verificou-se que a depleção de nitrogênio no meio estimula a secreção de proteases por fungos, ou seja, a fonte de nitrogênio em níveis baixos no meio pode favorecer a produção de proteases, como mostrado na Figura 7, onde a concentração de peptona é significativa no crescimento do fungo quando em níveis inferiores (INÁCIO *et al.*, 2015).

No entanto, Zorn *et al.* 2005 consideram que a existência de nitrogênio parece estimular a produção de proteases por fungos, além disso meios contendo soja, caseína, gelatina, milho e levedura são comumente usados para produzir proteases em alguns tipos de fungos, como verificado nesse estudo para *P. eryngii*, verificado na figura 6.

Além disso, Zorn *et al.* 2005 em seus estudos afirmam também que outras fontes nutricionais como amido, lactose e cevada também são usados para obtenção de proteases, mas que altas concentrações de carboidratos inibem a produção de enzimas, assim, meios que possuam uma quantidade muito grande em fonte carbono têm suas atividades proteásicas comprometidas, resultado que corrobora o gráfico de Pareto, na figura 7. Dessa forma, meios com os dois tipos de fonte nutricionais (carbono e nitrogênio) interagindo em níveis inferiores também podem produzir proteases de forma significativa (Fig.7).

Essa diferença entre as atividades proteolíticas das espécies é observada através de estudos, os quais 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 33 nutrientes (ANBU *et al.*, 2009; BACH *et al.*, 2012).

Além disso, um outro estudo realizado com *P.ostreatoroseus*, mostra que atividade proteolítica com o meio com amido e gelatina com concentrações iguais correspondeu a maior atividade proteolítica (3,66 U/mL  $\pm$  0,66) (SILVA,2015).A atividade proteolítica maior foi

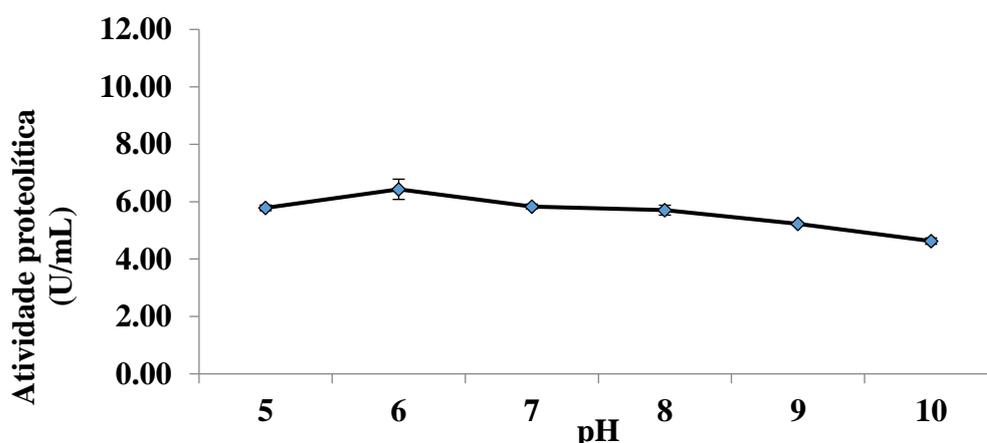
encontrada quando realizada com a espécie de *P.eryngii*, que segundo, Inácio *et al.* 2015, em estudo com mais de 6 espécies de basidiomicetos do gênero *Pleurotus*, constatou que a maior atividade proteásica era verificada quando em fermentações realizadas com *P.eryngii*.

#### 4.3 Caracterização parcial das enzimas proteolíticas

##### 4.3.1 Efeitos do pH e temperatura na atividade de proteases

O critério de avaliação para a realização da atividade de pH e temperatura ótima de atividade de proteases foi o ensaio que expressou a maior atividade proteásica, destacando-se *P.eryngii*. O efeito do pH na atividade proteásica foi avaliado na faixa de pH entre 5 e 10 e a atividade ótima foi determinada em pH 6 (Figura 8). Além disso, o gráfico mostra também que apesar da atividade ótima ter sido em pH 6, não houve variação muito significativa entre os valores avaliados para os demais pHs.

Figura 8. Efeito do pH na atividade de proteases produzida por *P. eryngii*.

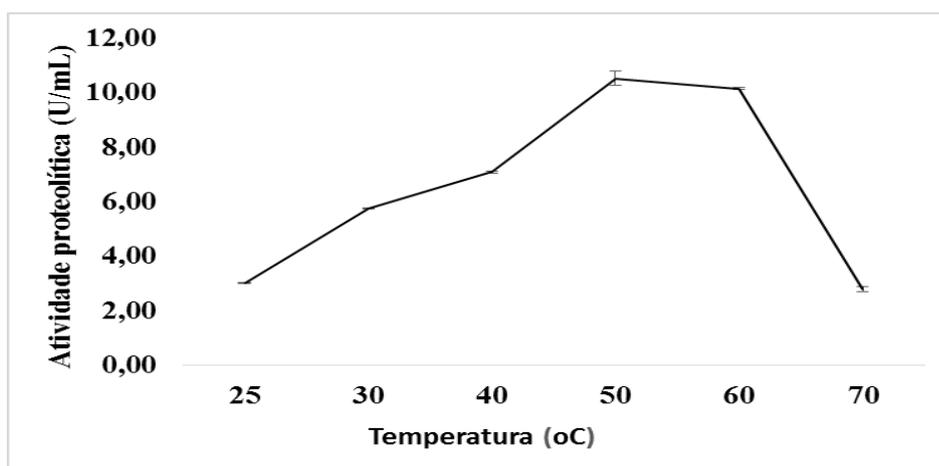


Estes resultados estão em concordância com os encontrados na literatura, já que espécies do gênero *Pleurotus* apresentam enzimas coagulantes com atividade na faixa pH desde o levemente ácido pH 5,0 e 6,0 para *Pleurotus eryngii*(FONSECA, 2013). De modo semelhante, estudos realizados por Fonseca *et al.* (2014) quando *P. ostreatoroseus* foi submetido a fermentação, o pH de atividade ótima das proteases variou de 6,0, a 8,0. De acordo com Jisha *et al.* (2013) proteases com pH ótimo variando de 5 a 8 têm aplicação em diversos segmentos industriais, inclusive na formulação de detergente e na indústria alimentícia.

O efeito da temperatura na atividade da enzima foi determinado entre 25 a 70°C. Nestas condições, as enzimas de *P. eryngii* demonstraram atividade ótima a 50° C, porém tendo um

decréscimo mínimo em 60° C (Figura 9), seguido de decréscimo. 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 *Hypsizygus marmoreus*, foi determinada a 50 °C, respectivamente.

Figura 9. Efeito da temperatura na atividade de proteases produzida por *P. eryngii*.



## 5. CONCLUSÃO

Os dados obtidos através do planejamento fatorial mostraram que *P.eryngii* e *P.ostreatus* sintetizaram e excretaram proteases e destas, *P. eryngii* foi espécie que expressou quantidade significativa de enzimas que são influenciadas por mecanismos regulatórios físicos e químicos. Em contrapartida, na síntese de exopolissacarídeos as duas espécies não expressaram resultados significativos.

Dessa forma, esse trabalho mostra a necessidade de existir uma continuação de estudos voltados a produção de EPS e uma otimização para proteases, em busca de aplicar tais enzimas no ramo industrial.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. **Fungos de Interesse: Aplicações Biotecnológicas**. Universidade Estadual de Maringá – UEM. Revista UNINGÁ Review - Vol.21, nº 1, pp.55-59(Jan – Mar). 2015.
- 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.
- 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.
- ALVES, Maria Jose, et al. A review on antifungal activity of mushroom (basidiomycetes) extracts and isolated compounds. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. Pennsylvania, v. 13, n.21, 2012.
- AO, T., SEB, J., AJUNGLA, T., DEB, C. R.. **Diversity of Wild Mushrooms in Nagaland, India**. Open Journal of Forestry, 6(05), 404, 2016.
- BARBOSA, A. M. *et al.* **Production and Applications of Fungal Exopolysaccharides**. Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina, v. 25, n. 1, p. 29-42, jan./jun. 2004
- BISCAIA, S. M. P. **Avaliação da Atividade Biológica “in vitro” de Polissacarídeos Obtidos dos Gêneros *Pleurotus*, *Lentinus* e *Agaricus***. Curitiba, 2012.
- COHEN, R. L.; PERSKY, L.; HADAR, Y. **Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus***. Applied Microbiological Biotechnology. v. 58, n. 5 p. 582-594, 2002.
- CORREIA, P. M., ESTEVES, S. A., GUINÉ, R. P. F. **Effect of mushroom powder in fresh pasta development**. In **Baltic Conference on Food Science and Technology: conference proceedings**. LLU, 2017.
- COSTA, N. M. B; ROSA, B. R. **Alimentos Funcionais: Componentes Bioativos e efeitos fisiológicos**. Editora Rubio, 2010.

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

DE BARBA, F. M.; SILVEIRA, M. L. L.; PILONI, B. U.; FURLAN, S. A.; PINHO, M. S. L. **Influence of *Pleurotus djamor* bioactive substances on the survival time of mice inoculated with sarcoma 180**. International Journal of Pharmacology, v. 7, n. 4, p. 478-484, 2011

DEY, B.; BHUNIA, S. K.; MAITY, K. K.; PATRA, S.; MANDAL, S.; MAITI, S.; MAITI, T. K.; SIKDAR, S. R.; ISLAM, S. S. **Glucans of *Pleurotus florida* blue variant: Isolation, purification, characterization and immunological studies**. International Journal of Biological Macromolecules, v.50, p. 591–597, 2012

DOMINATO, A.A.G. **Produção de exopolissacarídeos pelos fungos endofíticos *Neofusicoccum parvum*, *Fusarium* sp e *Colletotrichum gloeosporioides*: caracterização química e atividade anticoagulante**. São José do Rio Preto, 2017.

DONG, C.H, YAO, Y.J. Nutritional requirements of mycelial growth of *Cordyceps sinensis* in submerged culture. Journal of Applied Microbiology v. 99, p. 483–492, 2005.

FARZANA, T; MOHAJAN, S. **Effect of incorporation of soy flour to wheat flour on nutritional and sensory quality of biscuits fortified with mushroom**. Food science & nutrition, 3(5), 363-369, 2015.

FONSECA, T.R. B. ***Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720: Avaliação do Crescimento, Produção de Basidioma e Determinação da Atividade Proteolítica em Resíduos Agroindustriais**. UFAM.2013.

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.

GONÇALVES, J. M. **Espécies Comestíveis de Cogumelos: Perfil Mineral, Bioacumulação de Metais e Procedimento de Preparo de Material de Referência Certificado**. Tese de pós-graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 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.
- HEITMAN, J. Microbial pathogens in the fungal kingdom. **Fungal biology reviews**. USA, v. 25, n. 1, Mar.2011.
- HORINCAR, Vicentiu-Bogdan; POPA, Ana; PARFENE, Georgiana; BALAES, Tiberius. **Estudo Preliminar Biotecnológico de Condições de cultivo de *Pleurotus ostreatus* em Sistema Submerso**. Innovative Romanian Food Biotechnology. Vol.15.p.58–62.2014.
- INÁCIO, Fabíola Dorneles *et al.*, **Proteases of Wood Rot Fungi with Emphasis on the Genus *Pleurotus***. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International. Vol 15.2015
- IOWA STATE UNIVERSITY. **Ada Hayden Herbarium: *Pleurotus ostreatus* (jacq.: Fr.) kummer**. Ames, 2008. Disponível em: . Acesso em: 30 ago. 2016.
- 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.
- KALÁČ, Pavel. A review of chemical composition and nutritional value of wildgrowing and cultivated mushrooms. **Journal of the Science of Food and Agriculture, USA**, v. 93, n. 2, Jan. 2013.
- KAGIMURA, Francini Yumi, *et al.* **Biological activities of derivatized D-glucans: a review**. International Journal of Biological Macromolecules. Amsterdam, v. 72, Jan.2015.
- KIM, H.O.; LIM, J.M.; JOO, J.H.; KIM, S.W.; HWANG, H.J.; CHOI, J.W.; YUN, J.W. **Optimization of submerged cultura condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea***. Bioresource Technology, v. 96, p. 1175-1182, 2005.
- KIM, K. H. **Discovery of new bioactive metabolites from Korean wild mushrooms**. 균학회소식, 29(1), 21-22, 2017.
- KIRSCH, L. S. **of different submerged cultivation conditions on mycelial biomass and protease production by *Lentinus citrinus* Walley et Rammeloo DPUA 1535 (Agaricomycetidae)**. International Journal of Medicinal Mushrooms, v. 13, n. 2, 2011.

- MA, L., CHEN, H., DONG, P., LU, X. **Anti-inflammatory and anticancer activities of extracts and compounds from the mushroom *Inonotus obliquus***. Food Chemistry, 139(1), 503-508, 2013.
- OLIVEIRA, R. L. **Avaliação do Potencial Biotecnológico de Fungos**.2010. Mestrado (dissertação). Universidade do Estado do Amazonas - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia. Manaus, 2010.
- PESSOA, F. B. **Extração e Caracterização Química de Polissacarídeos de Basidiomicetos Comestíveis de Ocorrência na Amazônia**.2016.95 f.Tese de pós graduação- doutorado (Programa MultiInstitucional de Pós-Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas.Manaus, 2016.
- REN, Lu; PERERA, Conrad; HEMAR, Yacine. **Antitumor activity of mushroom polysaccharides: a review**.Food & Function.v. 3, n. 11, Nov. 2012.
- SILVA, Camila Joyce Alves da; MALTA, Diana Jussara do Nascimento. **A Importância dos Fungos na Biotecnologia**. Ciências biológicas e da saúde. Vol. 2. n. 3. Jul, 2016.
- SILVEIRA, M.L.L. **Caracterização Estrutural e Ação Antinociceptiva e Anti-Inflamatória de Polissacarídeos Isolados de *Pleurotus sajor-caju***.2015. 196 f. Tese de pós-graduação – doutorado (Programa de PósGraduação em Ciências) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.
- SYED, S. H.; NAMDEO, A. G. **Current status of natural products for the treatment of liver disease – A review**. International Journal of Phytopharmacy, v. 4, n. 2, p. 3743, 2014.
- WANG, J.; WU, C.; CHEN, Y.; CHEN, C.; HU, S.; CHANG, S. **Antihyperglycemic activity of exopolysaccharide produced by mushroom *Pleurotus ferulae* with submerged liquid culture on streptozotocin-induced diabetic rats**. Journal of Food and Nutrition Research, v. 2, n. 7, p. 419-424, 2014.
- WASSER, S. P. **Medicinal mushroom science: current perspectives, advances, evidences, and challenges**. Biomedical Journal, v. 37, n. 6, p. 345-356, 2015.
- WEN, T. C., XIAO, Y. P., HAN, Y. F., HUANG, S. K., ZHA, L. S., HYDE, K. D., & KANG, J. C. **Multigene phylogeny and morphology reveal that the Chinese medicinal mushroom ‘*Cordyceps gunnii*’is *Metacordyceps neogunnii* sp. nov.** Phytotaxa, 302(1), 27-39, 2017.

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, A.; ZHANG, Y.; YANG, J.; SUN, P. **Structural elucidation of a novel heteropolysaccharide from the fruiting bodies of *Pleurotus eryngii***. *Carbohydrate Polymers*, v. 92, p. 2239-2244, 2013

ZORN, H.; PETERS, T.; NIMTZ, M. **“The secretome of *Pleurotus sapidus*,”** *Proteomics*, vol. 5, no. 18, pp. 4832–4838, 2005.

