

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
RENORBIO**

**PRODUÇÃO DE PROTEASES COAGULANTES  
POR ESPÉCIES DE *Pleurotus* EM RESÍDUOS  
VEGETAIS DA AMAZÔNIA**

**KILMA CRISTIANE SILVA NEVES**

**RECIFE  
2014**

KILMA CRISTIANE SILVA NEVES

**PRODUÇÃO DE PROTEASES COAGULANTES  
POR ESPÉCIES DE *Pleurotus* EM RESÍDUOS  
VEGETAIS DA AMAZÔNIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Francisca Simas Teixeira

**RECIFE  
2014**

Ficha catalográfica  
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central-UFRPE

N518p      Neves, Kilma Cristiane Silva  
                Produção de proteases coagulantes por espécies  
de *Pleurotus* em resíduos vegetais da Amazônia / Kilma  
Cristiane Silva Neves. – Recife, 2014.  
                97 f.: il.

                Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto.  
                Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede  
Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO).  
                Ponto focal em Pernambuco - Universidade Federal  
Rural de Pernambuco, Recife, 2014.  
                Inclui referências e anexo(s).

                1. Cogumelo 2. Fermentação 3. Resíduos vegetais  
4. Valor nutricional 5. Coagulante 6. Toxicidade  
I. Porto, Ana Lúcia Figueiredo, orientadora II. Título

CDD 620.8

Kilma Cristiane Silva Neves

PRODUÇÃO DE PROTEASES COAGULANTES POR  
ESPÉCIES DE *Pleurotus* EM RESÍDUOS VEGETAIS DA  
AMAZÔNIA

Aprovada em 19/03/2014.

Comissão Examinadora:

---

Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto  
UFRPE (Orientadora)

---

Dra. Maria Francisca Simas Teixeira  
UFAM (Co-orientadora)

---

Dra. Daniela de Araújo Viana Marques  
UFRPE (Titular)

---

Dra. Maria de Mascena Diniz Maia  
UFRPE (Titular)

---

Dra. Cristina Maria de Souza Motta  
UFPE (Titular)

---

Dra. Tatiana de Souza Porto  
UFRPE (Titular)

RECIFE  
2014

***Dedico:***

*Aos meus pais, Ageu e Marinalva, como forma de gratidão pelo apoio e esforços realizados para minha formação pessoal e profissional.*

*Ao meu marido Flávio pela compreensão e companheirismo durante toda esta jornada.*

*Ao meu filho Daniel, meu amor, meu tesouro!*

*À Tully.*

## Agradecimentos

A Deus minha profunda gratidão.

À minha irmã Danielle e família (Jânio, Lucas e João Pedro) pela acolhida a mim e ao meu filho, nos proporcionando agradáveis momentos de convívio familiar.

À Professora Doutora Ana Lúcia Figueiredo Porto pela orientação, oportunidade, paciência e confiança em mim depositada para execução deste projeto.

À Professora Doutora Maria Francisca Simas Teixeira pela co-orientação, ensinamentos, disponibilidade, paciência e contagiante entusiasmo pela ciência.

À Professora Doutora Rosana Antunes Palheta pela amizade, disposição em partilhar experiências e significativas contribuições realizadas ao longo de todo o trabalho.

Às Professoras, Dra. Cristina Maria de Souza Motta, Dra. Daniela de Araújo Viana Marques e Dra. Maria de Mascena Diniz Maia pelas prestimosas contribuições na banca de qualificação.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM), pela liberação da carga horária didático-pedagógica para realização deste projeto de pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), pela concessão da bolsa de doutorado.

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM) por ceder o espaço físico e equipamentos para realização de algumas etapas deste projeto de pesquisa.

Aos colegas que compõem o grupo de pesquisadores da Micoteca/Coleção de Cultura DPUA, do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas, em especial aos integrantes do Projeto Amazônia Legal, com os quais vivi um ambiente de aprendizagem colaborativa.

Ao Mestre Fábio Lopes, do Departamento de Ciências Pesqueiras da Universidade Federal do Amazonas, pela orientação e colaboração na realização das análises físico-químicas.

Ao Mestre Everton Ferreira Lima, professor de Patologia Veterinária, da Escola Superior Batista do Amazonas, pela colaboração na interpretação das leituras das lâminas de histopatologia.

À Maria da Conceição Loureiro Campelo, analista do Laboratório de Análise de Solos e Plantas/LASP- EMBRAPA Amazônia Ocidental, pela colaboração e interpretação das análises de minerais.

Aos docentes, discentes e colaboradores do Programa de Doutorado em Biotecnologia, da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento durante esta jornada.

*MUITO OBRIGADA!*

*“A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que ele ganha com isso, mas o que ele se torna com isso.”*

*John Ruskin*

## RESUMO

Espécies de fungos já estão disponíveis no mercado e os cogumelos têm sido reportados como produtores de enzimas coagulantes do leite para produção de queijos. O objetivo do presente trabalho foi investigar o crescimento de *Pleurotus florida* DPUA 1534 e *Pleurotus ostreatus* DPUA 1533 em substrato vegetal para selecionar uma espécie com potencial proteolítico coagulante para fins de aplicação na indústria de alimentos. Nos resultados do crescimento micelial vertical, embora *P. florida* DPUA 1534 e *Pleurotus ostreatus* DPUA 1533 tenham colonizado os resíduos naturais testados, *P. florida* DPUA 1534 foi a espécie que apresentou crescimento significativo ( $p > 0,05$ ) ao final de 15 dias, dado que determinou a escolha dessa espécie para produção dos basidiomas. Na produção o substrato formulado a base de casca de cupuaçu suplementado com farelo de arroz 20%, inóculo de 20 discos miceliais ( $\varnothing = 10$  mm) resultou na melhor eficiência biológica (14,2%) e as demais análises foram realizadas do cogumelo de *P. florida* DPUA 1534 produzido nessas condições. A análise dos basidiomas mostrou em destaque a seguinte característica nutricional de *P. florida* DPUA 1534, proteínas (25,94%), carboidratos (49,72%), ferro (89,82%) e zinco (85,08%), além da presença de todos os aminoácidos essenciais. No extrato bruto dos basidiomas de *P. florida* DPUA 1534 a atividade coagulante e a razão foi de 67,68 UAC e 2,15, respectivamente. A atividade ótima foi demonstrada em pH 7,0 a 40 °C. O extrato enzimático mostrou-se estável entre 25 °C e 40 °C, e na faixa de pH entre 4 a 10 apresentou cerca de 80 a 90% de atividade nos primeiros 90 minutos de incubação. O extrato enzimático mostrou susceptibilidade aos inibidores das classes de serino-protease (90%), metaloprotease (93%), cisteíno-protease (92%) e protease aspártica (94%). O composto mais eficaz foi Pepstatin A, sugerindo a presença de protease aspártica, enzimas que apresentam resíduos aspárticos no sítio ativo, indicando a possibilidade de sua aplicação na indústria de laticínios. Em relação à toxicidade os resultados demonstraram que *P. florida* DPUA 1534 produz proteases com atividade biológica frente à *Artemia salina* ( $CL_{50} = 25,5 \mu\text{g}$ ) e apresentou atividade hemolítica em sangue de carneiro comercial em ordem crescente em relação à concentração do extrato (0,2 a 1,0 mL), com  $CL_{50} = 363,88 \mu\text{g}$  e  $CL_{50} = 241,51 \mu\text{g}$  após 1h e 24h de incubação, respectivamente. O teste *in vivo* indicou que o extrato quando administrado na dose de 1000 mg.Kg<sup>-1</sup> em ratos Wistar, não ocorreu óbito ou sinais clínicos de toxicidade em nenhum dos animais tratados, não promoveu alterações significativas dos parâmetros hematológicos e bioquímicos quando comparados ao grupo controle, e as análises histológicas revelaram que não houve toxicidade aguda nas condições do experimento. Portanto, o extrato de *P. florida* DPUA 1534 apresentou potencial para utilização como coagulante do leite.

**Palavras-chave:** Cogumelo, Fermentação, Resíduos vegetais, Valor nutricional, Coagulante, Toxicidade.



## ABSTRACT

Fungal species are already available in the market and the mushrooms have been reported as producers of milk coagulating enzymes for cheese production. The objective of this study was to investigate the growth of *Pleurotus florida* DPUA 1534 and *Pleurotus ostreatus* DPUA 1533 in vegetable substrate to select a species with potential proteolytic coagulant for the application in the food industry. The results of vertical mycelial growth, although *P. florida* DPUA 1534 and *P. ostreatus* DPUA 1533 have colonized natural residues tested, *P. florida* DPUA 1534 was the species that showed a significant increase ( $p > 0.05$ ) after 15 days given that determined the choice of this species for the production of the mushroom. In producing the substrate formulated based on cupuaçu bark supplemented with rice bran 20%, 20 mycelial inoculum discs ( $\text{Ø} = 10 \text{ mm}$ ) resulted in better biological efficiency (14.2%) and the remaining analyzes were performed with *P. florida* DPUA 1534 produced under those conditions. The analysis showed the mushroom highlighted in the following nutritional characteristics *P. florida* DPUA 1534 proteins (25.94%), carbohydrate (49.72%), iron (89.82%) and zinc (85.08%) and the presence of all essential amino acids. In the crude extract of the mushroom *P. florida* DPUA 1534 to coagulant activity and the AUC ratio was 67.68 and 2.15, respectively. Optimum activity was shown at pH 7.0 at 40 ° C. The enzyme extract was stable between 25 ° C and 40 ° C and at pH between 4 and 10 showed about 80 to 90% of activity in the first 90 minutes of incubation. The enzymatic extract showed susceptibility to inhibitors of the serine protease class (90%), metalloprotease (93%), cysteine proteases (92%) and aspartic protease (94%). The most effective compound was Pepstatin A, suggesting the presence of aspartic protease enzymes showing aspartic residues in the active site, indicating the possibility of its application in the dairy industry. Regarding toxicity results showed that *P. florida* DPUA 1534 produces proteases with biological activity on *Artemia salina* ( $\text{LC}_{50} = 25,5\mu\text{g}$ ) and showed hemolytic activity in blood of sheep trading in ascending order with respect to extract concentrations (0, 2 to 1.0 mL),  $\text{LC}_{50} = 363,88\mu\text{g}$  and  $\text{LC}_{50} = 241,51\mu\text{g}$  after 1h and 24h of incubation, respectively. The in vivo test indicated that the extract when administered at a dose of 1000 mg.Kg<sup>-1</sup> in rats, no deaths or clinical signs of toxicity in any of the treated animals did not cause significant changes in haematological and biochemical parameters when compared to the group control, and histological analyzes revealed no acute toxicity under the experimental conditions. Therefore, the extract of *P. florida* DPUA 1534 showed potential for use as coagulating milk.

**Keywords:** Mushroom, Fermentation, Vegetable waste, Nutritional value, Coagulant, Toxicity.

## LISTA DE FIGURAS

<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
Figura 1 - <i>Pleurotus ostreatus</i> DPUA 1533 (A) e <i>Pleurotus florida</i> DPUA1534 (B).....	18
Figura 2 - Etapas do processo de cultivo de <i>Pleurotus</i> .....	21
Figura 3 - Corte transversal de uma micela, mostrando as submicelas, os aglomerados de fosfato de sódio e os peptídios de caseína $\kappa$ , recobrando a superfície da micela.....	30
<b>ARTIGO 1. Cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i> DPUA 1533 e <i>Pleurotus florida</i> DPUA 1534 em resíduos vegetais da Amazônia</b> .....	45
Figura 1 - Média do crescimento micelial vertical de <i>Pleurotus florida</i> DPUA 1534 e <i>Pleurotus ostreatus</i> DPUA 1533 cultivados por 15 dias em substrato a base de casca de cupuaçu (CC), suplementado nas concentrações de 10 e 20% com farelo de arroz (FA), liteira (Li) e casca de arroz (CA) e inóculo de 10 e 20 discos miceliais. Nas colunas, as mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade .....	50
<b>ARTIGO 2. Produção e caracterização de protease coagulante de basidiomas de <i>Pleurotus florida</i> DPUA 1534</b> .....	66
Figura 1 - Temperatura ótima (A) e pH ótimo (B) do extrato bruto de <i>Pleurotus florida</i> DPUA 1534 .....	71
Figura 2 - Estabilidade da temperatura (A) e do pH (B) do extrato bruto de <i>Pleurotus florida</i> DPUA 1534.....	72
<b>ARTIGO 3. Caracterização toxicológica <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> do extrato proteolítico dos basidiomas de <i>Pleurotus florida</i> DPUA 1534</b> .....	76
Figura 1 - Determinação da CL50 do extrato de <i>Pleurotus florida</i> DPUA 1534 frente ao microcrustáceo <i>Artemia salina</i> .....	80
Figura 2 - Atividade hemolítica qualitativa dos extratos de <i>Pleurotus florida</i> DPUA 1534 em diferentes concentrações utilizando sangue de carneiro desfibrinado comercial .....	81
Figura 3 - Índice de hemólise (%) do extrato de <i>Pleurotus florida</i> DPUA 1534 em diferentes concentrações ( $\mu\text{g}$ ) após os períodos de 1h e 24h de incubação.....	82

## LISTA DE TABELAS

<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
Tabela 1 - Proteases microbianas identificadas a partir de pesquisas recentes .....	26
Tabela 2 - Principais proteínas do leite .....	29
<b>ARTIGO 1. Cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i> DPUA 1533 e <i>Pleurotus florida</i> DPUA 1534 em resíduos vegetais da Amazônia</b> .....	45
Tabela 1 - Análise físico-química dos substratos casca de cupuaçu (CC), farelo de arroz (FA), liteira (Li) e casca de arroz (CA) utilizados para o cultivo de <i>Pleurotus florida</i> DPUA 1534 e <i>Pleurotus ostreatus</i> DPUA 1533.....	51
Tabela 2 - Produção de basidiomas de <i>Pleurotus florida</i> DPUA 1534 em substrato a base de casca de cupuaçu (CC) suplementado nas concentrações de 10 e 20% com farelo de arroz (FA), liteira (Li) e casca de arroz (CA) e inóculo de 10 e 20 discos miceliais .....	53
Tabela 3 - Características da produção de basidiomas de <i>Pleurotus florida</i> DPUA 1534 em substrato a base de casca de cupuaçu (CC) suplementado nas concentrações de 10 e 20% com farelo de arroz (FA), liteira (Li) e casca de arroz (CA) e inóculo de 10 e 20 discos miceliais .....	55
Tabela 4 - Análise físico-química de basidioma de <i>Pleurotus florida</i> DPUA 1534 produzido em substrato a base de casca de cupuaçu (CC) suplementado com farelo de arroz (FA) 10% e inóculo de 20 discos miceliais (% baseado no peso seco) .....	57
Tabela 5 - Composição de aminoácidos dos basidiomas de <i>Pleurotus florida</i> DPUA 1534 produzido em substrato a base de casca de cupuaçu (CC) suplementado com farelo de arroz (FA) 10% e inóculo de 20 discos miceliais (baseado no peso seco) .....	58
Tabela 6 - Conteúdo mineral dos basidiomas de <i>Pleurotus florida</i> DPUA 1534 produzidos em substrato a base de casca de cupuaçu (CC) suplementado com farelo de arroz (FA) 10% e inóculo de 20 discos miceliais (baseado no peso seco) .....	59
<b>ARTIGO 2. Produção e caracterização de protease coagulante de basidiomas de <i>Pleurotus florida</i> DPUA 1534</b> .....	66
Tabela 1 - Efeito de inibidores na atividade de <i>Pleurotus florida</i> DPUA 1534.....	72
<b>ARTIGO 3. Caracterização toxicológica <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> do extrato proteolítico dos basidiomas de <i>Pleurotus florida</i> DPUA 1534</b> .....	76
Tabela 1 - Teste de atividade hemolítica do extrato de <i>Pleurotus florida</i> DPUA 1534 em sangue comercial de carneiro. Representação da avaliação da tonalidade vermelha do sobrenadante. C- (controle negativo- solução salina) e C+ [controle positivo- Triton x-100(1%)], HM (hemólise mecânica) e HT (hemólise total). Grau de hemólise: (0= negativo; (= = muito fraco); (+= fraco); (++++= moderado); [controle positivo (++++= total)].....	81
Tabela 2 - Análise hematológica do sangue de ratos Wistar, machos e fêmeas, tratados com extrato bruto proteolítico de <i>Pleurotus florida</i> DPUA 1534 .....	84
Tabela 3 - Análise bioquímica do sangue de ratos Wistar, machos e fêmeas, tratados com extrato bruto proteolítico de <i>Pleurotus florida</i> DPUA 1534 .....	84

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1 Objetivos.....	14
Objetivo Geral .....	14
Objetivos Específicos .....	14
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
2.1 Proteases .....	16
2.2 Aspectos gerais sobre <i>Pleurotus florida</i> e <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	17
2.3 Bioprocessos de produção .....	23
2.4 Proteases coagulantes .....	24
2.5 Leite .....	27
2.6 Coagulação do leite .....	31
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	33
<b>3. ARTIGOS DERIVADOS DA TESE</b> .....	45
Artigo 1. Cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i> DPUA 1533 e <i>Pleurotus florida</i> DPUA 1534 em resíduos vegetais da Amazônia.....	45
Artigo 2. Produção e caracterização de protease coagulante de basidiomas de <i>Pleurotus florida</i> DPUA 1534.....	66
Artigo 3. Caracterização toxicológica <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> do extrato proteolítico dos basidiomas de <i>Pleurotus florida</i> DPUA 1534.....	76
<b>4. PATENTE DERIVADA DA TESE</b> .....	89
Patente. Processo de produção de extrato bruto com protease coagulante, bioativo dos basidiomas de <i>Pleurotus florida</i> , extrato obtido e seu uso .....	89
<b>5. Considerações finais</b> .....	95
<b>ANEXOS</b> .....	97

# *1. INTRODUÇÃO*

As proteases constituem o grupo mais importante entre as enzimas industriais, sendo responsáveis por cerca de 60% do total das enzimas comercializadas em todo mundo para utilização nos setores alimentícios, farmacêuticos e de detergentes. Dois terços das proteases produzidas industrialmente têm origem microbiana (PALHETA et al, 2011; KIRSCH, 2011).

As proteases coagulantes do leite podem ser de origem animal, como a quimosina e a pepsina, extraída do quarto estômago de bezerros; de origem vegetal, como a cardosina extraída da flor do cardo – *Cynara* sp.; ou de origem microbiana como quimosina obtida de organismos geneticamente modificados, como *Kluyveromyces lactis* e *Aspergillus niger* (GHORAI et al 2009; KUMARI et al, 2012; SHAH et al, 2014).

Quimosina (EC 3.4.23.4), extraída do quarto estômago de bezerros, é a protease preferida na produção do queijo devido à sua alta especificidade pela caseína característica que proporciona que essa enzima seja a mais utilizada na coagulação do leite (JACOB et al, 2011).

Um grande número de enzimas proteolíticas de origem microbiana atuam de forma semelhante à quimosina na sua capacidade de clivar a ligação peptídica Fenilalanina<sub>105</sub>-Metionina<sub>106</sub> da  $\kappa$ -caseína, o que desencadeia a desestabilização das micelas da caseína, promovendo a coagulação do leite (FARSHAD et al, 2013; SILVA et al, 2014).

Os micro-organismos representam uma fonte atrativa de protease pela possibilidade de cultivo em grandes quantidades, em um tempo relativamente curto, por métodos estabelecidos de fermentação (GUPTA et al., 2002; YU et al, 2013).

Basidiomicetos são fungos pertencentes ao Filo Basidiomycota, popularmente conhecidos como cogumelos, os quais desempenham papel fundamental na ciclagem de nutrientes e manutenção dos ecossistemas, atuando na degradação da matéria orgânica. Realizam a bioconversão, transformando os resíduos lignocelulósicos em alimento com alto valor protéico e possuem compostos bioativos com propriedades medicinais reconhecidas pelas culturas orientais (GUILLAMÓN et al, 2010; JACOB et al, 2011).

Diferente de outros cogumelos, cogumelos ostras (*Pleurotus* spp.) são fáceis, rápidos e baratos para cultivar, pois requerem pouco tempo de preparação e baixa tecnologia de cultivo. Tradicionalmente, o cultivo é realizado em substrato compostado, esterilizado (axênico), ou ainda, em substrato natural, apenas pasteurizado (MANDEEL et al, 2005; AVENDAÑO-HERNANDEZ & SÁNCHEZ, 2013).

Diversos tipos de resíduos lignocelulósicos são utilizados para o cultivo de *Pleurotus* spp., tais como: palhas de vários cereais, resíduos de algodão, bagaço de cana-de-açúcar, serragens, polpa e casca de frutas, restos de papel, folhas de bananeira, polpa de café, entre outros. Estes resíduos, na maioria das vezes, são combinados a outras fontes nutricionais, destacando-se os farelos e a uréia (LÓPEZ et al, 2008; ROMERO et al, 2010; HERNÁNDEZ & LÓPEZ, 2010)

Os cogumelos durante a colonização de substrato natural fazem a bioconversão de resíduo lignocelulósico, processo econômico que disponibiliza nutriente e contribui para limpeza ambiental, caracterizando-se como uma tecnologia limpa (MOHAMED et al, 2014).

O Brasil apresenta grande potencial para a busca de novos extratos enzimáticos microbianos, considerando a quantidade e variedade inigualáveis de produtos naturais, uma vasta biodiversidade microbiana a ser explorada, para aplicação imediata ou após melhoramento genético, visando à produção de enzimas por processos fermentativos, transformando resíduos em produtos úteis de maior valor agregado (ZIMMER et al, 2009).

Em virtude da grande demanda do consumo de queijos, preocupações éticas associadas com a produção de coalhos extraídos do abomaso de bezerros, alto preço, além de questões religiosas e culturais, várias pesquisas têm buscado encontrar coagulantes substitutos (BRUNO et al, 2010; FAO, 2010; JACOB et al, 2011; ADRIANO & DEMAIN, 2014).

Nesse contexto, considerando a carência de proteases coagulantes no mercado, as propriedades bioquímicas dos cogumelos e a disponibilidade de substratos naturais na Amazônia, este estudo teve como objetivo encontrar uma fonte alternativa sustentável de protease coagulante para a indústria de laticínios a partir da produção de cogumelos do gênero *Pleurotus*.

## 1.1 OBJETIVOS

### Objetivo geral

Investigar o crescimento de *Pleurotus florida* DPUA 1533 e de *Pleurotus ostreatus* DPUA 1534 para selecionar uma espécie com potencial proteolítico coagulante com fins de aplicação na indústria de alimentos.

### Objetivos específicos

- Avaliar o crescimento micelial *in vitro* de *Pleurotus florida* DPUA 1534 e *Pleurotus ostreatus* DPUA 1533 em diferentes resíduos naturais e selecionar uma entre estas duas espécies a que melhor apresenta potencial proteolítico coagulante para produção em escala laboratorial;
- Investigar a produção da espécie de cogumelo selecionada associada à produção de protease coagulante em resíduos vegetais por fermentação semi-sólida;
- Caracterizar o extrato bruto quanto aos parâmetros: atividade de protease coagulante, efeito da temperatura, do pH e de inibidores;
- Avaliar a toxicidade do extrato coagulante *in vitro* e *in vivo*.



## *2. REVISÃO DE LITERATURA*

## 2.1 Proteases

Enzimas são de grande importância no desenvolvimento de bioprocessos industriais. Suas aplicações ocorrem nos mais diferentes segmentos industriais, incluindo o de couro, têxtil, farmacêutico, biocombustíveis, detergentes, alimentos e bebidas, entre outros. O mercado mundial para enzimas industriais alcançou US\$ 3,3 bilhões em 2010 e é estimado que atinja um valor de US\$ 4,4, bilhões em 2015. Estima-se que o uso de enzimas na indústria de alimentos e bebidas alcance valor em torno de US\$ 1,3 bilhões em 2015 (SANCHEZ e DEMAINE, 2011; ADRIO e DEMAINE, 2014).

As proteases apresentam sua maior aplicação nas indústrias de detergentes e alimentos. Na indústria de detergentes, as proteases são aplicadas como ingrediente na produção de detergentes com a finalidade de remoção de resíduos de alimentos, sangue e secreções corporais. Na indústria de alimentos são reconhecidas o grupo de enzimas com maior aplicação, possuindo papel fundamental na fabricação de cervejas, na maturação de queijos, no amaciamento de carnes, na produção de hidrolisados funcionais protéicos com a finalidade de melhorar o sabor e a qualidade do produto, na panificação, na fabricação de adoçantes artificiais, como o aspartame e na recuperação e aproveitamento de resíduos e subprodutos (RAO et al, 1998; KOBLITZ, 2010; NOVOZYMES, 2012).

Na indústria de laticínios, as proteases são empregadas na coagulação do leite para produção de queijos, promovendo a hidrólise da ligação peptídica entre os resíduos fenilalanina (Phe 105) e metionina (Met 106) da  $\kappa$ -caseína presente no leite (BRUNO et al, 2010).

As enzimas proteolíticas (EC 3.4) pertencem ao grupo de hidrolases que catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas e podem apresentar atividade sobre ligações éster e amida. A União Internacional de Bioquímica (IUB) classifica as enzimas proteolíticas em seis grupos de acordo com o tamanho molecular, propriedades elétricas, com sua especificidade ao substrato e modo de ação. São classificadas pelo modo de ação em exopeptidases (atuam nas extremidades da cadeia polipeptídicas) e endopeptidases (agem nas ligações no interior da cadeia protéica). As proteases exopeptidases dividem-se em: aminopeptidases, carboxipeptidases, serina-proteases, cisteína-proteases ou proteases sulfídricas, proteases aspárticas ou ácidas e metalo-proteases (BEYNON e BOND, 1996; KOBLITZ, 2010).

As proteases têm importante papel em todos os processos fisiológicos, desde a quebra geral de proteína à regulação da morte celular programada (POZA et al., 2001). Executam uma grande variedade de funções fisiológicas complexas. Sua importância em conduzir o metabolismo essencial e as funções regulatórias se torna evidente a partir da sua ocorrência em todos os organismos vivos existentes. De um modo geral, proteases extracelulares catalisam a hidrólise de proteínas em moléculas menores para conseqüente absorção pela célula, enquanto as intracelulares possuem um papel vital na regulação do metabolismo (RAO et al., 1998). As proteases podem ser obtidas por fontes vegetal, animal e microbiana, uma vez que se encontram em todos os organismos, conduzindo funções metabólicas e essenciais.

As proteases vegetais são muito utilizadas na indústria de alimentos e estão presentes em maior concentração em frutos verdes. A papaína, bromelina e a ficina estão entre as mais importantes cisteína-proteases (WISEMAN, 1991; MAZORRA-MANZANO et al, 2013).

As proteases animais ocorrem em tecidos específicos dos animais e apresentam grande importância industrial. As mais importantes são as gástricas, pepsina e renina, e as pancreáticas, tripsina e quimiotripsina (RAO et al., 1998).

As proteases de origem microbiana são preferidas devido ao seu rápido crescimento, ao pequeno espaço requerido para o cultivo e à grande variedade catalítica que dispõem (RAO et al., 1998). As proteases microbianas, em geral, são mais estáveis que as homólogas de plantas e animais, além do seu processo de produção ser mais fácil e seguro (WISEMAN, 1991).

Os micro-organismos representam uma fonte atrativa de protease pela possibilidade de cultivo em grandes quantidades, em um tempo relativamente curto, por métodos estabelecidos de fermentação. Além disso, as proteases microbianas têm uma vida mais longa e podem ser armazenadas sob condições ideais sem perda significativa da atividade (YOUSIF et al 1996).

## **2.2 Aspectos gerais de *Pleurotus florida* e *Pleurotus ostreatus***

Fungos do gênero *Pleurotus* estão incluídos no filo Basidiomycota (CARLILE et al., 2001; WBSTER e WEBER, 2007), abrangendo diversas espécies, sendo todas comestíveis, bastante versátil e adaptável a diversas condições ecológicas, conhecidos pelos orientais como Hiratake e Shimeji, também chamado de cogumelo gigante,

caetetuba e internacionalmente como cogumelo ostra “Oyster mushroom” (BONONI et al., 1999). Possuem basidiocarpo de 6 a 10 cm, formando uma “pétala” ou “leque” e nascem em cachos, eles dificilmente apresentam estipe e quando apresenta, a mesma é diminuta (FERREIRA, 1998). As espécies de *Pleurotus* apresentam uma grande variedade de cores, que vão do branco ao azul escuro, marrom, amarelo, rosa, variando de acordo com a espécie, incidência de luz durante a frutificação, natureza do substrato e tempo de incubação.

De acordo com Bano; Rajarathnam (1998) e Chang; Miles (2004), o gênero *Pleurotus* apresenta a seguinte classificação botânica:

Reino: Fungi

Divisão: Eumycota

Subdivisão: Basidiomycetes

Oredem: Agaricales

Família: Pleurotaceae

Gênero: *Pleurotus*

A maioria das espécies e linhagens utilizadas para o cultivo no Brasil foram introduzidas da Europa e da Ásia (BONONI et al., 1995). Entre as espécies de *Pleurotus* mais conhecidas estão *P. florida* e *P. ostreatus* (Figura 1), além de *P. citrinopileatus*, *P. ostreatoroseus*, *P. pulmonarius* e *P. eryngii* (KUES; LIU, 2000). Estes cogumelos apresentam as seguintes características genéricas: superfície lisa, píleo carnoso, às vezes membranáceo e não pigmentado (PEREIRA e PUTZKE, 1989).

Ocorre naturalmente em florestas temperadas, subtropicais e tropicais, podendo ser saprófito ou parasita em plantas previamente debilitadas, decompondo madeira e outros resíduos vegetais (ZADRAZIL e KURTZMAN, 1984).

Figura 1. *Pleurotus ostreatus* DPUA 1533 (A) e *Pleurotus florida* DPUA 1534 (B).



A produção de várias espécies de *Pleurotus* no Brasil teve início na década de 70 com linhagens trazidas da Itália. Na década de 80 seu cultivo tornou-se mais intenso, utilizando substrato enriquecido com farelos e esterilizado em autoclaves e cultivado de forma totalmente climatizada (SOUZA, 2008).

Os cogumelos do gênero *Pleurotus* apresentam elevado valor gastronômico e são bastante versáteis, adaptável a diversas condições ecológicas, têm excelentes características organolépticas e nutricionais, constituindo em excelente alimento a ser incorporado na dieta. Contêm baixas quantidades de lipídios, elevado teor de fibras, além de apresentar mais proteína que a maioria dos vegetais, possui todos os aminoácidos essenciais, e são ricos em vitaminas (tiamina, riboflavina, niacina e ácido ascórbico) e minerais, como cálcio, potássio, iodo e fósforo (CHANG; MILES, 1989; YILDIZ et al, 2002). O teor de proteína bruta do cogumelo na base seca varia de 8,9 a 38,7%, de 15 a 50%, e em média 19,8%, valores obtidos com o fator N x 4,38 (BANO; RAJARATHNAM, 1982; LAU, 1982; MAZIERO, 1990; RAMOS et al., 2007).

A presença de altos teores de potássio, juntamente com baixos níveis de sódio, torna esses alimentos apropriados para pessoas com hipertensão (MANZI et al., 1999; AGRAHAR-MURUGKAR; SUBBULAKSHMI, 2005). Os cogumelos comestíveis cozidos ou processados são nutricionalmente uma boa opção para vegetarianos, e são adequados para pacientes diabéticos e cardíacos (BREENE, 1990). Além disso, podem acompanhar qualquer tipo de carne ou simplesmente ser um ingrediente principal de uma receita (MOLENA, 1986).

Pertencem ao grupo denominado de “fungos de podridão branca”, por crescerem em troncos de árvores ou madeira morta, produzem um micélio branco e degradam tanto a lignina, um polímero fenólico recalcitrante encontrado nos vegetais, como a celulose. Para tanto, possuem um complexo enzimático lignocelulolítico único com enzimas como celulase, ligninase, celobiase, lacase e hemicelulase que fazem com que estes fungos degradem uma grande variedade de resíduos lignocelulósicos e resíduos orgânicos, o que faz esses fungos serem mais utilizados que os outros fungos decompositores na aplicação de processos biotecnológicos baseados em materiais lignocelulósicos (BONONI e TRUFEM, 1995; EICHLEROVÁ et al., 2000; ROSADO et al., 2002; CABRERA et al., 2002; BONATTI et al., 2004; PERALTA, 2008).

Devido a este complexo enzimático, além da aplicação direta como fonte de alimento de alto valor nutritivo (BONATTI et al., 2004) os fungos do gênero *Pleurotus* podem ser utilizados também em diferentes áreas, como por exemplo, na indústria de

fármacos, na biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos aromáticos, na degradação de poluentes ambientais e no tratamento de efluentes industriais (MARQUEZ-ROCHA *et al.*, 2000, REDDY *et al.*, 2003, ELISASHVILI *et al.*, 2007).

Variáveis como a espécie, a idade ou estágio de desenvolvimento do cogumelo, condições pós-colheita, a composição do substrato, bem como o método de cultivo determinam as diferenças observadas na composição química dos basidiocarpos, principalmente no conteúdo de proteínas, minerais e nos constituintes de aroma e sabor (CRISAN; SANDS, 1978; CHANG; LAU; CHO, 1981; BANO; RAJARATHNAM, 1988).

Os fungos do gênero *Pleurotus* apresentam algumas vantagens de cultivo em relação ao gênero *Agaricus* e outros cogumelos comestíveis: são pouco exigentes em relação ao substrato e de bom desenvolvimento em condições rústicas (SCHMIDT *et al.*, 2003). Além disso, apresentam crescimento mais rápido, são mais agressivos na competição com outros organismos, têm capacidade de crescimento numa grande amplitude térmica, podendo ser cultivados em todo o território nacional, por tolerarem temperaturas elevadas. Estes fungos, também requerem uma tecnologia de produção menos complexa e apresentam um ciclo produtivo reduzido, características desejáveis e determinantes na viabilidade técnica e econômica de um cultivo industrial (CHANG; HAYES, 1978; CHANG; QUIMIO, 1984).

Diversos tipos de resíduos lignocelulósicos são indicados para o cultivo de *Pleurotus* spp., tais como: palhas de vários cereais, resíduos de algodão, bagaço de cana-de-açúcar, serragens, polpa e casca de frutas, restos de papel, folhas de bananeira, polpa de café, entre outros (EIRA, 2003; RAGUNATHAN, SWAMINATHAN, 2003; JOB, 2004; MODA ET AL., 2005; MOLINA, 2005).

Estes resíduos, na maioria das vezes, são combinados a outras fontes nutricionais, destacando-se os farelos e a uréia (LI *et al.*, 2001; EIRA, 2003; MODA *et al.*, 2005). Segundo Mandeel *et al.* (2005), diferente de outros cogumelos, cogumelos ostras (*Pleurotus* spp.) são fáceis, rápidos e baratos para cultivar, pois requerem pouco tempo de preparação e baixa tecnologia de cultivo. Tradicionalmente, o cultivo é realizado em substrato compostado, esterilizado (axênico), ou ainda, em substrato natural, apenas pasteurizado.

Na produção de cogumelos, várias etapas devem ser seguidas (Figura 2), sendo que estas vão desde a obtenção do inóculo até a comercialização do produto. As

condições de cultivo são fatores determinantes na eficiência da produção (HOLTZ, 2008; STURION, 1994; ROYSE, 2002).

Figura 2. Etapas do processo de cultivo de *Pleurotus*.



Fonte: HOLTZ, 2008

Outro fator que interfere no cultivo de cogumelos é a seleção de substratos para produção, em que material adequado, tanto biológico quanto o custo do meio de cultura são fundamentais para o sucesso do bioprocesso. O cultivo de cogumelos, além de ser uma forma de diminuir os impactos ambientais provocados pelo acúmulo de resíduos agroindustriais no ambiente, possibilita a prática de técnicas que viabilizam a obtenção de um retorno econômico, social e ambiental, caracterizando-se como uma tecnologia limpa (TISDALE et al., 2006).

Uma grande variedade de compostos bioativos, isolados de várias espécies de cogumelos, tem sido identificados (WASSER, 2002). Muitos desses compostos são terpenóides, esteróis, ácidos graxos, proteínas, lectinas, proteoglicanas e polissacarídeos (LIU et al., 2007; MORADALI et al., 2007).

Reduzir custos de produção é uma forma de ampliar o uso de enzimas em processos industriais. A otimização da fermentação e do processo de produção é alvo de

extensa pesquisa e, nesse sentido, o uso de resíduos agroindustriais como substratos alternativos em processos fermentativos vem sendo estudado por diversos pesquisadores (BONFÁ et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2007). Tais processos permitem agregar valor aos resíduos, diminuem os custos de produção, além de removerem do ambiente material potencialmente poluente (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003). Além disso, o substrato residual, com alta digestibilidade e rico em nutrientes, pode ser utilizado na alimentação de ruminantes e suínos, podendo também ser aproveitado como fertilizante ou na produção de biogás (MANSUR et al., 1992; BUSWELL; CHANG, 1993).

A biotransformação de resíduos agroindustriais por fungos é uma alternativa biotecnológica para obtenção potencial de produtos com alto valor agregado e subprodutos de interesse econômico como as enzimas.

*Pleurotus florida* e *Pleurotus ostreatus* estão entre as espécies apontadas como as mais apropriadas para cultivo em regiões subtropicais e tropicais (CASTRO, 2003).

Os corpos frutíferos de *P. florida* geralmente apresentam coloração branca, creme, marrom clara ou amarela, dependendo das condições de cultivo. Os cogumelos cultivados em temperatura elevada apresentam píleo branco (KINUGAWA et al., 1997). Abaixo de 9°C é marrom brilhante e a 25°C, é creme ou branca (ZADRAZIL; GRABBE, 1983). Esta espécie é capaz de frutificar em temperaturas acima de 25°C, o que torna esta característica desejável em condições tropicais (EGER; EDEN; WISSING, 1976; EGER, 1978).

Os corpos frutíferos de *P. ostreatus* apresentam coloração que variam de acordo com a linhagem ou variedade, podendo ser brancas, amarelas, marrons, cinza, preta ou azuis. Este cogumelo apresenta píleo carnoso, haste curta e cilíndrica e de coloração cinza claro a escuro. Espécie típica de regiões temperadas, possuindo píleo de coloração escura azul-acinzentada e necessita de temperatura mais baixas para frutificação, entre 15 a 20°C (GUNDE-CIMERMAN, 1999; KÜES; LIU, 2000; SOUZA, 2006).

Os fungos do gênero *Pleurotus* apresentam algumas vantagens de cultivo em relação a outros cogumelos comestíveis: são pouco exigentes em relação ao substrato e de bom desenvolvimento em condições rústicas (SCHMIDT et al., 2003). Além disso, apresentam crescimento mais rápido, são mais agressivos na competição com outros organismos, têm capacidade de crescimento numa grande amplitude térmica, podendo ser cultivados em todo o território nacional, por tolerarem temperaturas elevadas. Estes fungos, também requerem uma tecnologia de produção menos complexa e apresentam um ciclo produtivo reduzido, características desejáveis e determinantes na viabilidade



técnica e econômica de um cultivo industrial (CHANG; HAYES, 1978; CHANG; QUIMIO, 1984).

### **2.3 Bioprocessos de produção**

Fermentação é um processo que acompanha o desenvolvimento dos micro-organismos, sendo uma ferramenta importante na obtenção de diversos produtos, tais como enzimas, vitaminas, hormônios, pigmentos, biosurfactantes, biopesticidas, entre outros (SCHMIDELL et al, 2001; PANDEY, 2003).

Os processos microbianos de produção enzimática ocorrem sob fermentação submersa (FS) ou fermentação semi-sólida ou sólida (FSS) (CASTRO et al., 2010).

Fermentação submersa (FS) baseia-se no processo em que o micro-organismo se desenvolve em meio de cultura com excesso de água sob agitação. As fermentações são conduzidas em biorreatores agitados e aerados mecanicamente. A fermentação submersa é o processo mais utilizado na produção comercial de enzimas, pois com o desenvolvimento de novos equipamentos houve também o maior número de pesquisas e instrumentações para controle do processo, tornando-o mais acessível, somada à facilidade de monitoramento (KIRK et al., 2002). A fermentação submersa apresenta outras vantagens quando comparada à fermentação semi-sólida, como: facilidade de controle dos parâmetros físico-químicos; melhor absorção de nutrientes e recuperação de metabólitos e redução da possibilidade de degradação do produto, principalmente enzimas de baixa termoestabilidade (CASTRO; PEREIRA JÚNIOR, 2010).

No processo de fermentação semi-sólida (FSS) ocorre o crescimento de micro-organismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida, onde a quantidade de líquido apresenta um nível de atividade de água que possa garantir o crescimento e metabolismo dos micro-organismos, mas não exceda à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida (PINTO et al., 2006). A fermentação semi-sólida, utilizada industrialmente, apresenta algumas vantagens quando comparada à fermentação submersa, como menor geração de efluentes, diminuição do risco de contaminação do meio e menor exigência de água quando (SANTOS, 2006). Além disso, as condições de cultivo são mais parecidas com o habitat natural dos fungos filamentosos, com isto os fungos estão mais adaptados para crescer e excretar maior quantidade de enzimas (PANDEY et al., 1999). A concentração dos produtos após extração é bem maior que os obtidos no processo de fermentação submersa. Este processo desperta maior interesse

econômico em regiões com abundância em biomassa e resíduos agroindustriais, que representam material barato e abundante (CASTILHO et al., 2000).

No cultivo de basidiomicetos em meio líquido, a biomassa produzida pode ser diretamente usada como inóculo em novos processos produtivos (MAZIERO et al., 1999; ROSADO et al., 2003). A vantagem do micélio obtido em meio líquido é que ele pode ser facilmente manuseado e homogeneizado (PAPAGIANNI, 2004).

Processos fermentativos semi-sólido e submersos têm sido utilizados com sucesso para estudar a produção de proteases fúngicas (MACCHIONE et al., 2008; MERHEB et al., 2007; MERHEB-DINI et al., 2010; MERHEB-DINI et al., 2009; SANDHYA et al., 2005; POZA et al., 2003; FERNANDEZLAHORE et al., 1999; KHAN et al., 1979; SRINIVASAN et al., 1964).

## **2.4 Proteases coagulantes**

Na indústria de laticínios as proteases são de fundamental importância na fabricação do queijo. O queijo é um produto lácteo nutritivo de interesse econômico significativo, sendo quase um terço de toda a produção de leite consumido desta forma (KETHIREDDIPALLI et al., 2010).

Coalhos e coagulantes são preparações de enzimas proteolíticas que têm sido utilizadas na indústria de laticínios há muitos anos, sendo a aplicação mais antiga de enzimas. Coalho é definido como o extrato de abomaso de animais ruminantes e do nome coalho derivou a palavra renina para a enzima que coagula o leite, hoje conhecida como quimosina (EC 3.4.23.4) (ANDRÉN, 2002). O coalho contém aproximadamente 80% de quimosina e 20% de pepsina bovina. Quando o coalho é extraído de animais adultos, essa proporção se inverte, ocorrendo predominância de pepsina em detrimento da quimosina (FOLEGATTI, 1994).

Devido à sua especificidade pela ligação Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> da  $\kappa$ -caseína, a quimosina se mostra mais eficiente na coagulação do leite e produção de queijos quando comparada à pepsina, que apresenta ação proteolítica generalizada, podendo comprometer o rendimento, sabor e aroma do queijo. Outras proteases de origem diferente do abomaso de ruminantes, mas que também apresentam capacidade de coagular o leite são denominados coagulantes (ANDRÉN, 2002; FOLEGATTI, 1994; MAZORRA-MANZANO et al., 2013).

A renina é a principal enzima utilizada na produção de queijos. Está presente no coalho de animais ruminantes e é tradicionalmente obtida do quarto estômago de bezerros em lactação (D'AMBRÓSIO et al., 2003; KUMAR et al. 2005).

Os coagulantes microbianos conhecidos e caracterizados usados para fabricação de queijos são de origem fúngica. Duas espécies relatadas de fungos zigomicetos, *Rhizomucor pusillus* e *Rhizomucor miehei*, secretam proteases aspárticas, também conhecidas como renina de mucor. Estas enzimas possuem alta atividade coagulante do leite e baixa atividade proteolítica, sendo consideradas como substitutas da quimosina de bezerro na indústria de queijos. *Rhizomucor miehei* é o mais frequentemente utilizado devido à suas características serem muito similares a quimosina de bezerro (RAO, et al, 1998; HARBOE & BUDTZ, 1999; JACOB et al, 2011).

Atualmente, a maioria dos coagulantes comercializados na indústria de laticínios é oriunda de fontes recombinantes ou de origem microbiana, e apenas 20-30% são de fonte natural (estômago de bezerros). O decréscimo do suprimento de coalho natural e o crescimento da produção mundial de queijos nos últimos anos têm levado ao aumento da demanda de novos coagulantes substitutos, motivando a busca de novas fontes de proteases com propriedades semelhantes ao coalho (JACOB et al, 2011; MAZORRA-MANZANO et al, 2013).

Um substituto adequado deve possuir intensa atividade coagulante e baixa atividade proteolítica para minimizar a dissolução do coágulo (HASHIM, 1999). Na Tabela 1 encontram-se alguns exemplos de novas proteases coagulantes de origem microbiana descobertas a partir de pesquisas recentes (JACOB et al, 2011).

Tabela 1. Proteases microbianas identificadas a partir de pesquisas recentes.

Micro-organismos	Propriedades	Referência
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	Atividade coagulante na manufatura de queijos	Moharib (2007)
<i>Mucor bacilliformis</i>	Alta similaridade estrutural à quimosina bovina Menor termoestabilidade que a protease de <i>Rhizomucor miehei</i>	Machalinski et al. (2006) Venera et al. (1997)
<i>Thermoascus aurantiacus</i>	Hidrólise enzimática da caseína bovina diferiram dos padrões de proteólise gerada pela quimosina bovina	Merheb et al. (2007)
<i>Thermomucor indicae-seudaticae</i> N31	Extrato bruto enzimático apresentaram alta coagulação do leite e baixas atividade proteolítica e termoestabilidade	Merheb-Dini et al. (2010)
<i>Metschnikowia reukaufii</i>	Atividade coagulante do leite Clonado com sucesso em <i>Escherichia coli</i>	Chi et al. (2009) Li et al. (2009)
<i>Myxococcus xanthus</i>	Massa molecular: 40kDa, mais alta atividade coagulante em pH 6 e 37°C, rendimento aceitável e propriedades de coalhada em experimentos de manufatura de queijos	Poza et al. (2003)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Clonado com sucesso em <i>Escherichia coli</i> <i>Enterococcus faecalis</i> semelhantes padrões eletroforéticos de hidrolisado j-caseína como <i>Rhizomucor miehei</i> , efetivamente aplicados em fabricação de queijos Camembert	Poza et al. (2004) Sato et al. (2004)
<i>Nocardiopsis</i> sp.	Extratos extracelular com capacidade de coagulação do leite Otimização da produção de enzimas por fermentação	Cavalcanti et al. (2004) Cavalcanti et al. (2005)
<i>Bacillus subtilis</i>	Razão de coagulação do leite e atividade proteolítica comparáveis com proteases fúngicas comerciais, mas alta termoestabilidade	Dutt et al. (2008, 2009), Shieh et al. (2009)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Apresenta uma cinética típica de coagulação do leite	Ageitos et al. (2007)

Fonte: JACOB et al, 2011

Os substitutos do coalho de origem microbiana são mais interessantes tendo em vista sua constante disponibilidade, baixo custo devido à possibilidade de utilização de substratos facilmente disponíveis para fermentação, apresentar maior aceitação entre pessoas cujos hábitos alimentares e crenças religiosas são contra o consumo de produtos

contendo derivados de animais sacrificados (SARDINAS, 1968; TUBESHA, AL-DELAIMY, 2003; YU, CHOU, 2005).

A razão entre as atividades coagulante e proteolítica é um índice utilizado para caracterizar substitutos de coalho. A atividade coagulante representa a especificidade da atividade proteolítica, ou seja, está relacionada com a clivagem da ligação Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> da caseína. Por sua vez, a atividade proteolítica representa a capacidade de hidrólise de qualquer ligação peptídica da caseína que o coagulante possa apresentar e, por isso, é considerada uma atividade generalizada, inespecífica (FEIJOO-SIOTA e VILLA, 2011; JACOB et al, 2011).

Desta forma, o valor da razão entre as atividades coagulante e proteolítica deve ser sempre alto, ou seja, o coagulante deve exibir maior afinidade pela ligação Phe<sub>105</sub>-Met<sub>106</sub> durante a etapa de coagulação do leite, o que implica em evitar proteólise inespecífica excessiva durante a produção de queijos, prevenindo assim formação de estruturas de gel fracas, alta perda de proteína/gordura para o soro e baixo rendimento de matéria seca nos queijos. Além disso, previne a hidrólise excessiva durante a maturação assegurando uma correta relação entre proteína intacta e peptídeos, com consequente sabor, aroma e textura típicos deste tipo de queijo (GUINEE, WILKINSON, 1992; SOUSA et al, 2001; MAZORRA-MANZANO et al, 2012).

## **2.5 Leite**

Segundo o Artigo 475, do Decreto no 30.691 de 29/03/1952 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), que regulamenta a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal, o leite é o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas leiteiras sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que proceda (BRASIL, 2002).

Segundo Behmer (1999) que leite é uma emulsão de cor branca, ligeiramente amarelada, de odor suave e gosto adocicado. Do ponto de vista físico-químico, o leite é uma mistura homogênea de várias substâncias como: lactose, glicerídeos, proteínas, sais, vitaminas e enzimas, destas algumas estão em emulsão (a gordura e as substâncias associadas), algumas em suspensão (as caseínas ligadas a sais minerais) e outras em dissolução verdadeira (lactose, vitaminas hidrossolúveis, proteínas do soro) (ORDÓÑEZ, 2005).

Vários fatores intrínsecos e extrínsecos podem afetar a qualidade final do leite. Os fatores intrínsecos incluem a raça do animal, o período de lactação, o número de parições, a dieta e o estado de saúde do animal. Os fatores extrínsecos, por sua vez, são aqueles capazes de afetar a qualidade do produto após sua produção, como por exemplo, o manejo e a higiene da ordenha, a velocidade e a temperatura de resfriamento, o transporte e o armazenamento do leite antes de seu processamento (WALSTRA et al, 2006).

O leite bovino contém em média 87,1% de água, 4,0% de gordura, 3,3% de proteína, 4,6% de lactose e 0,7% de cinzas (WALSTRA et al., 2006). Sua composição é um importante parâmetro básico de qualidade. A variação é acompanhada da alteração das características sensoriais (cor, gosto, aroma, textura), nutricionais (valor energético) e tecnológicas do leite, ou seja, alterações da composição do leite afetam sua capacidade de ser transformado em produtos lácteos seguros e que mantenham as características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais durante a vida de prateleira. Antunes (2003) afirma que a composição aproximada do leite pode variar em razão da estação do ano e reflete diferenças entre raças, estágio de lactação e o sistema de alimentação.

As proteínas do leite (Tabela 2) são veículos naturais, que fornecem micronutrientes essenciais (cálcio e fósforo), aminoácidos, assim como componentes do sistema imune (imunoglobulinas e lactoferrina), para o recém-nascido (LIVNEY, 2010). As proteínas do leite se apresentam na fase micelar, composta por caseínas e na fase solúvel, composta pelas proteínas do soro (PARK et al, 2007; MICHAELIDOU, 2008). As caseínas representam cerca de 80% do total protéico e as proteínas do soro somam ao redor de 20% do total de proteínas. A proporção entre caseínas e proteínas do soro afeta as características biológicas do leite e suas características tecnológicas, pois suas diferentes proteínas possuem comportamentos distintos frente aos diversos processos empregados na fabricação dos produtos lácteos (FOX e McSWEENEY, 1998; WALSTRA et al, 2006).

Tabela 2- Principais proteínas do leite

<b>Proteínas</b>	<b>Quantidade no leite (g/L)</b>
<b>CASEÍNAS</b>	24-28
$\alpha_{s1}$	12-15
$\alpha_{s2}$	3-4
$\beta$	9-11
$\kappa$	3-4
<b>PROTEÍNAS DO SORO</b>	5-7
$\beta$ -lactoglobulina	2-4
$\alpha$ -lactalbumina	1-1,5
Albumina sérica	0,1-0,4
Imunoglobulinas	0,6- 1,0
lactoferrina	~0,1
<b>PROTEÍNAS DA MEMBRANA DOS GLÓBULOS DE GORDURA</b>	~0,4
<b>Total de proteínas do leite</b>	<b>30-35</b>

Fonte: LIVNEY (2010).

A caseína é dividida em três frações principais conhecidas como alpha ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) e kappa ( $\kappa$ ) caseína, as quais diferem na sua estrutura e peso molecular (PHADUNGATH, 2005; FARRELL JR et al., 2006; VACLAVIK e CHRISTIAN, 2007; GOSH et al., 2009). A caseína pode ser definida como uma proteína micelar precipitada por acidificação do leite desnatado a pH 4,6 (temperatura de referência 20°C), classificada como uma fosfoproteína, devido à presença do fósforo (OLIVEIRA E TIMM, 2007). A caseína possui atividade anfipática por apresentar regiões hidrofóbicas e hidrofílicas (DE KRUIF e GRINBERG, 2002).

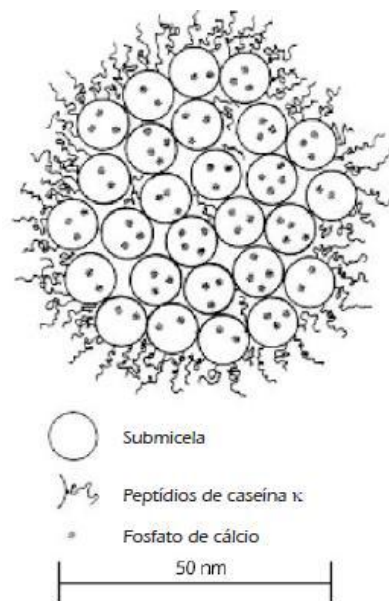
Cerca de 95% da caseína no leite está presente na forma de partículas coloidais, conhecidas como micelas, que é a responsável pela estabilidade térmica do leite (FOX & BRODKORB, 2008). A estrutura interna da micela de caseína é constituída predominantemente por  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ -caseína e de nanopartículas de fosfato de cálcio coloidal, enquanto que a  $\kappa$ -caseína está localizada preferencialmente na superfície da micela (DALGLEISH, 2011).

Apesar de diversos estudos acerca da composição e estrutura das micelas de caseína, a sua exata estrutura permanece em debate (HORNE, 2006; KRÜGER, 2006; OLIVEIRA e TIMM, 2007; QI, 2007). Porém, há um consenso de que a estrutura das micelas de caseína é estabilizada principalmente por interações hidrofóbicas e iônicas (HOLT et al., 2003).

O modelo que descreve a estrutura das micelas de caseína mais comumente aceito foi proposto por Walstra (1990) (Figura 3), no qual a micela se apresenta

essencialmente esférica, porém sua superfície não se apresenta lisa; a micela, formada de unidades menores denominadas submicelas, contem principalmente caseína; as submicelas variam na composição, destacando-se dois tipos principais, um tipo formado pelas caseínas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\kappa$  e outro formado pelas  $\alpha$  e  $\kappa$  caseínas; as submicelas permanecem ligadas por aglomerados (*clusters*) de fosfato de cálcio, que servem como “cimento” para manter as submicelas ordenadas; as submicelas se agregam até a formação completa da micela, em que a caseína  $\kappa$  se posiciona na superfície; a porção C-terminal da caseína  $\kappa$  (glicopeptídeo projeta-se para fora da superfície da micela, formando uma camada esponjosa que previne, por repulsões esféricas e eletrostáticas, qualquer agregação posterior de submicelas (SGARBIERI, 2005).

Figura 3. Corte transversal de uma micela, mostrando as submicelas, os aglomerados de fosfato de sódio e os peptídios de caseína  $\kappa$ , recobrendo a superfície da micela.



Fonte: SGARBIERE (2005).

Muitas das propriedades tecnologicamente importantes do leite, por exemplo, a cor branca, a estabilidade ao calor, ao etanol e a coagulação pelo coalho, são devidos às propriedades das micelas de caseína, o que justifica o interesse em pesquisas sobre a caseína micelar (FOX & BRODKORB, 2008).



## 2.6 Coagulação do leite

A aplicação de protease coagulante é de fundamental importância na produção de queijos. O leite é uma emulsão de gorduras em água estabilizada por uma dispersão coloidal de proteína. Para a fabricação de queijos é necessário provocar a desestabilização dessas proteínas para que ocorra a formação do coágulo.

A coagulação enzimática pode ser dividida em fases. Na fase primária ou enzimática, onde tem lugar a hidrólise da caseína  $k$  após a adição de enzimas proteolíticas, seguindo-se uma fase secundária ou de agregação micelar, onde ocorre a agregação das micelas de caseína desestabilizadas e a consequente formação do gel ou coalhada (BRULÉ et al., 1997; MAHAUT et al., 2000, MARTINS, 2001). Na fase final da coagulação ocorre a sinérese, que corresponde a uma expulsão espontânea do soro na sequência do aumento da rigidez do gel, isto é, quando a coalhada tem condições de sofrer ações externas, como o corte, iniciando-se assim outra operação do processo de fabricação do queijo, o dessoramento (PAYNE et al., 1993; MARTINS, 1999).

*Fase primária ou enzimática.* Após a adição do agente coagulante se inicia a fase primária ou enzimática. Esta fase caracteriza-se pela hidrólise da caseína  $k$ , realizada pelas enzimas proteolíticas ao nível da ligação fenilalanina (105) e metionina (106), e a consequente liberação do caseinomacropéptido (CMP) que se perderá no soro (MARTINS, 2001). Com a liberação do CMP ocorre uma importante redução da carga das micelas de caseína e uma diminuição das forças de repulsão eletrostáticas que, no estado inicial, contribuem para a manutenção do estado coloidal (BRULÉ et al., 1997), desestabilizando as micelas de caseína. Note-se que esta é uma fase puramente enzimática, não se verificando modificações macroscópicas no leite. Quando cerca de 80 a 90% da caseína  $k$  for afetada, inicia-se a segunda fase (BRULÉ et al., 1997; MARTINS, 2001).

*Fase secundária ou de agregação micelar.* A agregação das micelas de caseína desestabilizadas corresponde à coagulação propriamente dita. Aqui intervêm processos físicos originando um aumento da viscosidade gradual devido à formação do gel (MARTINS, 2001). Em seguida verifica-se uma reorganização das micelas agregadas e dá-se a formação de uma rede protéica, a chamada coalhada, onde fica aprisionada a fase aquosa (BRULÉ et al., 1997).

O tempo de coagulação ou de floculação consiste no tempo necessário para o aparecimento dos primeiros flocos no leite, ainda não visíveis a olho nú, após a adição

do agente coagulante, representando o início da agregação das micelas de caseína desestabilizadas pela ação enzimática e do aumento de viscosidade, o que corresponde ao início da segunda fase da coagulação (MARTINS, 1999).

## REFERÊNCIAS

ADRIO, J.L.; DEMAIN, A.L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, v. 4, 117-139p, 2014.

AGRAHAR-MURUGKAR, D. AND SUBBULAKSHMI. Nutritive value of wild edible green leaves consumed by the Khasis of Meghalaya. **International Journal of Food Science and Nutrition.**, (In Press), 2005.

ANDREN, A. Rennets and Coagulants In **Encyclopedia of Dairy Sciences**, Academic Press, London, p. 281-286, 2002.

AVENDAÑO-HERNANDEZ, R.J.; SÁNCHEZ, J.E. Self-pasteurised substrate for growing oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) **African Journal of Microbiology Research**. Vol. 7(3), pp. 220-226, 15, 2013.

BANO, Z. AND S. RAJARATHNAM. *Pleurotus* Mushroom as a Nutritious Food. In S. T. Chang T. H. Quimio (eds). Tropical Mushrooms: Biological Nature and Cultivation methods. **The Chinese University Press**, 1982.

BANO, Z.; RAJARATHNAM, S. *Pleurotus mushrooms*. Part II. Chemical composition, nutritional value, post-harvest physiology, preservation, and roles an human food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.27, n.2, p.87-158, 1988.

BEYNON, R.J.;BOND, J.S. Proteolytic Enzymes: A practical approach. New York: Oxyford University Press, 257p. 1996.

BHEMER, Manuel Lecy A. Tecnologia do Leite: leite, manteiga, queijo, caseína, sorvetes e instalações; produção, industrialização e análise. São Paulo: Nobel, 1976.

BONATTI, M., KARNOPP, P., SOARES, H.M., FURLAN, S.A. Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajorcaju* nutritional characteridtics when cultivated in diferente lignocellulosic wastes. *Food Chemistry*, v. 88, p. 425-428, 2004.

BONFÁ, M. R. L. et al. Produção de ligninas por fungos de degradação branca em resíduos agroindustriais. In: SINAFERM (SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES), 14Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: SINAFERM, 2003.

BONONI, V.L.R., TRUFEM, S.F.B. *Cogumelos comestíveis*. 1 ed. São Paulo: Ícone, 206p. 1995.

BONONI, V.L.; CAPELARI, M.; MAZIERO, R. Cultivo de cogumelos comestíveis. **Coleção Brasil Agrícola**. Editora Ícone, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Portaria nº146, de 7 de março de 1996. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, mar., 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova e oficializa o Regulamento Técnico de identidade e qualidade de leite pasteurizado tipo C refrigerado. Diário Oficial da União, Brasília, 20 de setembro de 2002. Seção 1, p. 13.

BREENE, W.M. Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. **Journal Food Protection**, v.53, n.10, p.883- 894, 1990.

BRULÉ, G.; LENOIR, J.; REMEUF, F. La micelle de caséine et la coagulation du lait. In: *Le Fromage* (3<sup>a</sup> ed). Lavoisier,. **Editions Technique & Documentation**. Paris, 1997.

BRUNO, M. A.; LAZZA, C. M.; ERRASTI, M. E.; . LOPEZ, L.M.I.; CAFFINI, N.O.; PARDO, M. F. Milk clotting and proteolytic activity of an enzyme preparation from *Bromelia hieronymi* fruits. **Food Science and Technology**. v. 43, 695–701p., 2010.

BUSWELL, J.A.; CHANG, S.T.. Edible mushrooms: attributes and applications. In Genetics and breeding of edible mushrooms, eds S.T. Chang; J.A. Buswell, and P.G. Miles. Pp. 297-324. Philadelphia: **Gordon and Breach Scientific Publishers**,1993.

CABRERA, G.M., ROBERTI, M.J., WRIGHT, J.E., SELDES, A.M. Cryptoporin and isocryptoporin acids from the fungal cultures of *Polyporus arcularius* and *P. ciliatus*. **Phytochemistry**, v. 61, p. 189-193, 2002.

CARLILE, M.J. -WATKINSON, S.C. - GRAHAM, W.G. *The Fungi*. Second edition. San Diego, California: Academic Press, 2001.

CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A.; ALVES, T. L. M.; Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresour. Technol.**, 71, 45, 2000.

CASTRO, A. L. A. **Resíduo de lixadeira do algodão: produção de cogumelo , ensilagem e alterações da composição bromatológica e degradabilidade**. 2003. 56 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia-Nutrição de Ruminantes) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

CASTRO,A.M.; PEREIRA JÚNIOR., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33,n.1, p.181-188, 2010.

CHANG, S.T.; HAYES, W.A. The biology and cultivation of edible mushrooms. **Academic**, New York p 137. (1978)

CHANG, S.T., LAU, O.W., CHO, K.Y. The cultivation and nutritional value of *Pleurotus sajor-caju*. **European Journal Microbiology Biotechnology**, v.12, p. 58-62. 1981.

CHANG. S. T.; MILES, P. G. **Edible mushrooms and their cultivation**. Boca Raton: CRC, 1989.

CHANG ST, MILES PG. Culture preservation. In: Mushrooms cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact (eds ST Chang ST PG Miles). **CRC press. Boca Raton**. Florida. 189–201p, 2004

CHANG, S. T.; QUIMIO, T. H. **Tropical mushrooms**. Hong Kong: The Chinese Univ., 1984.

CRISAN, E. B.; SANDS, A. Nutritional value. In: CHANG, S. T.; HAYES, W. A (Ed). **The biology and cultivation of mushrooms**. New York: Academic., p.137, 1978.

DALGLEISH, D. G. On the structural models of bovine casein micelles – Review and possible improvements. **Soft Matter**, v. 7, p. 2265–2272, 2011.

D'AMBROSIO, A. et al. Proteolytic and milk clotting activities in extracts obtained from the crustaceans *Munida*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 22, p. 145-150, 2003.

DE KRUIF, C. G.; GRINBERG, V. Y. Micellisation of  $\beta$ -casein. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 210, p. 183-190, 2002.

EGER, G.; EDEN, G.; WISSING, E. *Pleurotus ostreatus*, breeding potential of a new cultivated mushroom. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.47, p.155-163, 1976.

EGER, G. Biology and breeding of *Pleurotus*. In: CHANG, S. T.; HAYES, W. A. (Ed). **The biology and cultivation of edible mushrooms**. New York: Academic., cap.24, p.497- 519, 1978.

EICHLEROVÁ, I., HOMOLKA, L., NERUD, F., ZADRAZIL, F., BALDRIAN, P., GABRIEL, J. Screening of *Pleurotus ostreatus* isolates for their ligninolytic properties during cultivation on natural substrates. **Biodegradation**, v. 11, n. 5, p. 279-287, 2000.

EIRA, A.F. Cultivo do cogumelo medicinal *Agaricus blazei* (Murrill) ss. *Heinemann* ou *Agaricus brasiliensis* (Wasser et al.). **Aprenda Fácil**. Viçosa, Brasil. 395p, 2003.

ELISASHVILI, V., PENNINCKX ,M., KACHLISHVILI, E., TSIKLARI, N., METREVELI, E., KHARZIANI, T., KVESITADZE, G. *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. **Bioresource Technology**, v.99, p. 457–462, 2007.

FARRELL JR, H. M.; MALIN, E. L.; BROWN, E. M.; QI, P. X. Casein micelle structure: What can be learned from milk synthesis and structural biology? **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 11, p. 135-147, 2006.

FARSHADA, K.; SOHEILAB, A.; FERAYDOON, M. Semi-purification and kinetic study of microfungus rennet biosynthesized by local isolate of *Rhizomucor nainitalensis* using solid-state fermentation system: Concentration methods and determinant factors

in clotting activity. **European Journal of Experimental Biology**, Pelagia Research Library, 3(2):167-174P, 2013.

FEIJOO-SIOTA, L.; VILLA, T. G. Native and biotechnologically engineered plant proteases with industrial applications. **Food and Bioprocess Technology**, 4(6), 1066–1088p. 2011.

FERNANDEZ-LAHORE, H. M. et al. Purification and characterization of an acid proteinase from mesophilic *Mucor* sp. solid-state cultures. **Journal of Peptide Research**, v. 53, p. 599- 605, 1999.

FERREIRA, J. E. F. **Produção de cogumelos**. São Paulo: Agropecuária, 1998. 136p.

FIGUEIREDO, E. L.. Elaboração e caracterização do “Queijo Marajó”, tipo creme, de leite de búfala, visando sua padronização. 2006, 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Pará. Belém, 2006.

FOLEGATTI, M. I. S. **Avaliação do uso de quimosina produzida por *Aspergillus niger* var. *awamori* na fabricação de queijo tipo Prato**. 1994. 65f. Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.

FOX, P. F. **Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology**. v. 1. General Aspects. Published by Chapman e Hall, 2-6 Boundary Row. 2 nd. ed. 577p. 1993.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H. **Fundamentals of cheese science**. Gaithersburg: Aspen, 587p., 2000.

FOX, P. F.; BRODKORB, A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. **International Dairy Journal**, Canada, v. 18, p. 677-684, 2008.

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Dairy chemistry and biochemistry**. Londres: Blackie Academic & Professional. 1998.

GHORAI, S.; BANIK, S. P.; VERMA, D.; CHOWDHURU, S.; MUKHERJEE, S.; KHOWALA, S. Fungal biotechnology in food and feed processing – Review. **Food Research International**. 42, 577–587. 2009.

GOSH, A.; ALI, M.A.; DIAS, G.J. Effect of Cross-Liking on Microstructure and Physical Performance of Casein Protein. **Biomacromolecules**, Washington, v.10, p. 1681-1688, 2009.

GUILLAMÓN, E.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; LOZANO, M.; D'ARRIGO, M.; ROSTAGNO, M.A.; VILLARES, A.; MARTÍNEZ, J.A. Edible mushrooms: Role in the prevention of cardiovascular diseases. **Fitoterapia**. v.81, 715–723p, 2010.

GUINEE. T. P.; WILKINSON, M. G. Rennet coagulation and coagulants in cheese manufacture. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v.45, n.4, p.94-104, 1992.

GUNDE-CIMERMAN, N. Medicinal value of the genus *Pleurotus* (Fr.) P. Karst. (agaricales s.l., Basidiomycetes). **International Journal of medicinal Mushrooms**, v. 1, p. 69-80, 1999.

HARBOE, M. & BUDTZ, P. The production, action and application of rennet and coagulants. In: LAW, B. A. (Ed.), **Technology of Cheesemaking**. Sheffield: Sheffield Academic Press, p. 33-65, 1999.

HERNÁNDEZ, R.; LÓPEZ, C..Evaluación del crecimiento y producción de *Pleurotus ostreatus* sobre diferentes residuos agroindustriales del Departamento de Cundinamarca. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D.C., Colombia. 2010.

HOLT, C., DE KRUIF, C. G., TUINIER, R., AND TIMMINS, P. A. Substructure of bovine casein micelles by small-angle X-ray and neutron scattering. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 213, 275-284, 2003.

HOLTZ, M. *Utilização de resíduos de algodão da indústria têxtil para a produção de corpos frutíferos de Pleurotus ostreatus DSM 1833*. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade da Região de Joinville, Joinville, 88p. 2008.

HORNE, D.S. Casein micelle structure: Models and muddles. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 11, p. 148-153, 2006.

JACOB, M.; JAROS, D.; ROHM, H. Recent advances in milk clotting enzymes – Review, **International Journal of Dairy Technology**. v. 64, 1 14-33, 2011.

KETHIREDDIPALLI, P.; HILL, A.R.; DALGLEISH, D.G Protein interactions in heat-treated milk and effect on rennet coagulation. **International Dairy Journal**, 20 (12) pp. 838–843, 2010.

KHAN, M. R.; BLAIN, J. A.; PATTERSON, J. D. E. Extracellular Proteases of *Mucor pusillus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, p. 719-724, 1979.

KINUGAWA, K.; TANESAKA, E.; NAGATA, A.; WATANABE, K. Cross-compatibility between Thai and Japanese oyster mushrooms and the inheritance of fruiting habits. **Memoirs of the Faculty of Agriculture of Kinki University**, n.30, p.7-11, 1997.

KIRK, O.; BORCHERT, T.V.; FUGLSANG, C.C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion Biotechnology**, v.13, n.4, p. 345-351, 2002.

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 Medicinal Mushrooms**, v. 13, p. 185-192, 2011.

KOBLITZ, M.G.B. **Bioquímica dos alimentos: teoria e prática**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2p, 2010.

KRÜGER, C.C.H. **Produção e caracterização química e fisiológica de caseinofosfopeptídeos de leite bovino**. 2006. 149f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

KUES, U.; LIU, Y. Fruiting body production in basidiomycetes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Washington, v.54, p.141–152, 2000.

KUMAR, S. et al. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1701-1705, 2005.

KUMARI, M.; SHARMA, A. JAGANNADHAM, M.V. Religiosin B, a milk-clotting serine protease from *Ficus religiosa*. **Food Chemistry**. 131, 1295–1303p., 2012.

LAU, O. Methods of chemical analysis of mushroom. In: CHANG, S.T.; QUIMIO, T.H (Eds). **Tropical mushrooms: biological nature and cultivation methods**. Hong Kong: The Chinese University Press, p.87-116, 1982.

LIVNEY, Y.D. Milk proteins as vehicles for bioactives. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 15 (1-2) (2010), pp. 73–83, 2010.

LÓPEZ, C.; HERNÁNDEZ, R.; SUÁREZ, C.; BORRERO, M. Evaluación del crecimiento y producción de *Pleurotus ostreatus* sobre diferentes residuos agroindustriales del Departamento de Cundinamarca. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. Disponible en <http://revistas.javeriana.edu.co>. 2008.

MACCHIONE, M.M.; MERHEB, C.W.; GOMES, E.; SILVA, R. Protease production diferente thermophilic fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 146. P.223-230, 2008.

MACHADO, E. C. **Características físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais**. 2002. 49 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2002.

MAGALHÃES, F. A. R. **Evolução de características físico-químicas e sensoriais durante a maturação do queijo tipo gorgonzola**. 2002, 85 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais. 2002.

MAHAUT, M., JEANTET, R., BRULÉ, G. Initiation à la technologie fromagère. **Editons Technique & Documentation**. Paris. p.194, 2000.

MANSUR, M.; KLIBANSKY, M.; GUTIÉRREZ, I.; GONZÁLES, L. Evaluacion de parametros de processo para la producción de hongos del género *Pleurotus* cultivados sobre paja de cana. **Boletim GEPLACEA**, México, v.9, n.8, p.11-21, 1992.

MANZI, P.; GAMBELLI, L.; MARCONI, S.; VIVANTI, V.; PIZZOFERRATO, L. Nutrients in edible mushrooms: An inter-species comparative study. **Food Chemistry**, London, v.65, p.477-482, 1999.



MARQUEZ-ROCHA, F.J.; RODRIGUEZ, V.Z.H.; DUHALT, R.V. Biodegradation of soil-adsorbed polycyclic aromatic hydrocarbons by White-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 469-472. 2000.

MARTINS, A.P.L., 1999. **A flor de cardo (*Cynara cardunculus* L.) como agente coagulante no fabrico de queijo. Caracterização e influência dos processos de conservação na atividade coagulante.** Tese de doutoramento, Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa.

MAZIERO, R. **Substratos alternativos para o cultivo de *Pleurotus* spp.** 1990. 136 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MAZIERO, R.; et al. Screening os basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. **Rev. Microbiol.**, v.30, p.77-84, 1999.

MAZORRA-MANZANO, M. A.; PEREA-GUTIÉRREZ, T. C.; LUGO-SÁNCHEZ, M. E.; RAMIREZ-SUAREZ, J.C.; TORRES-LLANEZ, M.J.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A.F.; VALLEJO-CORDOBA, B. Comparison of the milk-clotting properties of three plant extracts. **Food Chemistry**. v.141, 1902–1907p., 2013.

MERHEB-DINI, C.; CABRAL, H.; LEITE SR, R.; ZANPHORLIN, L.M.; OKAMOTO, D.N.; RODRIGUEZ, B.; JULIANO, L.; ARANTES, E.C.; GOMES, E.; SILVA, R. Partial characterization of protease from thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* and its hydrolytic activity on bovine casein. **Food Chemistry**, v.104, p. 127-131, 2007.

MERHEB, C.W.; CABRAL, H.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Biochemical and functional characterization of a metalloprotease from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p.9210-9217, 2009.

MERHEB-DINI, C.; GOMES, L.; BOSCOLO, M.; DA-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.

MICHAELIDOU, A.M. Factors influencing nutritional and health profile of milk and milk products. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.79, p.42-50, 2008.

MOHAMED, M.F.; NASSEF, D.M.T.; WALY, E.A.; KOTB, A.M. Production of oyster mushroom (*Pleurotus* spp.) intercropped with field grown faba bean (*Vicia faba* L.). **Asian Journal of Crop Science**. 1-11p. 2014.

MOLENA, O. **O moderno cultivo de cogumelos.** São Paulo: Nobel, 1986. 170p.

MORADALI, M.F.; Mostafavi, H.; Ghods,S.; Hedjaroude, G.A. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). **Int. Immunopharmacol.**, 7 (6) (2007), pp. 701–724

NOVOZYMES. Enzyme Business. Disponível em:<http://report2010.novozymes.com/Menu/Novozymes+Report+2010/Report/Sales+and+markets/Enzyme+Business>. Acesso em 18 de outubro de 2013.

OLIVEIRA, M.A., DONEGA, M.A., PERALTA, R.M., SOUZA, C.G.M. (2007). Produção de inóculo de cogumelo comestível *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quélet – CCB19 a partir de resíduos da agroindústria. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 84- 87.

OLIVEIRA; D.S.; TIMM, C.D. Instabilidade da caseína em leite sem acidez adquirida **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 102, n. 561-562, p. 17-22, 2007.

ORDÓÑEZ, Juan A. **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de origem animal**. v.2. Porto Alegre: Artmed, 2005.

PALHETA, R.A.; VIEIRA, J.N.; SILVA NEVES, K.C.; TEIXEIRA, M.F.S. Crescimento micelial vertical de duas espécies de *Pleurotus* em resíduos agroindustriais da Amazonia utilizando planejamento fatorial. **Caderno de Pesquisa**, Série Biologia, Volume 23, número 3, p 52-60,2011.

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, January 2004, vol. 22, no. 3, p. 189-259.

PARK, Y.W. et al. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.68,p.88-113, 2007.

PANDEY, A.; BENJAMIN, S.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**. V. 77, p. 149-152, 1999.

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

PERALTA, R.M. Aproveitamento de resíduos de frutas para a produção de enzimas lignocelulolíticas por basidiomicetos. In: SICOG - **SIMPOSIO INTERNACIONAL DE COGUMELOS**, 4, 2008, Caxias do Sul. P. 99 - 302.

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, 188p. 1989.

PHADUNGATH, C. Casein micelle structure: a concise review. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 27, p. 201-212, 2005.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; SILVA, F. L. H.; SANTOS, S. F. M.; MACEDO, G. R.; **Rev. Quím. Ind**, 74, 18. . 2006.

POZA, M.; SIEIRO, C.; CARREIRA, L.; BARROS-VALÁZQUEZ, J.; VILLA, T.G. Production and characterization of the milk-clotting protease of *Myxococcus xanthus* strain 442. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p.691-698, 2003.

QI, P. X. Casein micelle structure: the past and the present. **Le Lait, Dairy Science and Technology**, v.87, p.363–383, 2007.

RAMOS, A.C.; SAPATA, M.M.; CANDEIAS, M.; FIGUEIREDO, E.; GOMES, M.L. **Cultura de cogumelos do gênero *Pleurotus***. INIAP- Estação Agronômica Nacional. Departamento de Tecnologia de Produtos Agrários, Oeiras, Portugal. Artigo do Ministério de Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. 2007.

RAO, M.B., TANKSALE, A.M., GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 62, 597-635p. 1998.

REDDY, G.V., RAVINDRA BABU, P., KOMARAIHAH, P., ROY, K.R.R.M., KOTHARI, I.L. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic anzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor caju*). **Process Biochemistry**, v.38, n.10, p.1457-1462, 2003.

ROMERO, A. RODRÍGUEZ, A. Y PÉREZ. R. *Pleurotus ostreatus*. Importancia y Tecnología de cultivo. Facultad de Mecánica, Universidad de Cienfuegos “Carlos Rafael Rodríguez”. 2010.

ROSADO, F.R., CARBONERO, E.R., KEMMELMEIER, C., TISCHER, C.A., GORIN, P.A.J., IACOMINI, M. A partially 3-O-methylated (1→4)-linked -D-galactan and -Dmannan from *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. **FEMS Microbiology Letters**, v. 212, p. 261-265, 2002.

ROSADO, F.R.et al. Biomass and exopolysaccharide production in submerged cultures os *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. and *Pleurotus ostreatus* “*florida*” (Jack.: Fr.) Kummer. **J. Basic Microbiol.**, v. 43,n. 230-237, 2003.

ROYSE, D.J. Influence of spawn rate and commercial delayed release nutrient levels on *Pleurotus cornucopiae* (oyster mushroom) yield, size, and time to production. 2002. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.58, p.527-531.

SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS,G.; PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, p.2689-2694, 2005.

SANTOS, G. **Utilização de resíduos agroindustriais para produção de amiloglucosidase por *Aspergillus awamori***. 2006. 81f. Dissertação (Mestardo em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2006.

SARDINAS, J. L. Rennin enzyme of *Endothia parasitica*. **Applied Microbiology**, v. 16, p.248-255, 1968.

SHAH, M.A.; MIR, S.A.; PARAY, M.A. Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. **Dairy Sci. & Technol.** 94:5-16, 2014.

SILVA, C.A.B.; FERNANDES, A.R. Projetos de empreendimentos agroindustriais. Viçosa: Editora UFV, v.1. Universidade Federal de Viçosa, 2005.

SILVA, B.L.; GERALDS, F.M.; MURARI, C.S.; GOMES, E.; DA-SILVA, R. Production and characterization of a milk-clotting protease produced in submerged fermentation by the thermophilic fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 172: 1999-1011p, 2014.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 205-218, 2003.

SANCHEZ, S.; DEMAIN, A.L. Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical, and biotechnological significance. **Org. Process Res. Dev.**, v.15, 224–230p, 2011.

SILVA, S.V.; MALCATA F. X. Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from *Cynara cardunculus*. **Food Chemistry**, Volume 89, Issue 1, January, Pages 19-26, 2005.

SCHMIDT, P.; WECHSLER, F.S.; NASCIMENTO, J.S.; VARGAS JUNIOR, F.M. Tratamento do feno de braquiária pelo fungo *Pleurotus ostreatus*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.32, n.6, p.1866-1871, nov./dez. 2003.

SOUSA, M. J.; ARDO, Y.; MCSWEENEY, P. L. H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. **International Dairy Journal** 11 327–345, 2001.

SOUZA, E. Problemas no cultivo de *Pleurotus*. In: **Anais do IV SICOG** (4th International Symposium on mushrooms in Brazil), Caxias do Sul, RG, p. 28-34, 2008.

SRINIVASAN, R. A. et al. Milk-clotting enzymes from microorganisms. **Applied Microbiology**, v. 12, p. 475-478, 1964.

TISDALE, T.E.; MIYASAKA, S.C. E HEMMES, D.E. Cultivation of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on wood substrates in Hawaii. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.22.p.201-206, 2006.

TUBESHA, Z. A.; AL-DELAIMY, K. S. Rennin-like milk coagulant enzyme produced by a local isolate of *Mucor*. **International Journal of Dairy Technology**, v. 56, p. 237-241, 2003.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**. 2 ed, Boca Raton: CRC Press. 2006.

WALSTRA, P. On the Stability of Casein Micelles. **J Dairy Sci**, 73: 1965-1979, 1990.

WISEMAN, A. 1991. **Manual de biotecnologia de los enzimas**. Zaragoza: Acribia.

YILDIZ, S., CAFER, Y. C., GEZER, E. D., TEMIZ, A. Some lignocellulosic wastes used as raw material in cultivation of the *Pleurotus ostreatus* culture mushrooms. **Process Biochemistry**, v.38, p. 301-306, 2002.

YOUSIF, B. H., MCMAHON, D. J. ; SHAMMET, K. M. (1996)Milk-clotting enzyme from *Solanum dohium* plant. **International Dairy Journal**, Volume 6, Issue 6, June, Pages 637-644.

YU, P.J.; CHOU, C.C. Factors affecting the growth and production of milk-clotting enzyme by *Amylomyces rouxii* in rice liquid medium. **Food Technology and Biotechnology**, v. 43, p. 283-288, 2005.

ZADRAZIL, F.; GRABBE, K. Edible mushrooms. **Biotechnology**, Weinheim, v.3, p.145-187, 1983.

ZADRAZIL, F., KURTZMAN, J.R.H. The biology of *Pleurotus* cultivation in the tropics. In: CHANG, S.T., QUIMIO, T.H. *Tropical Mushrooms*. Hong Kong, The Chinese Univ. Press. 493p, p. 277-278, 1984.

### *3. ARTIGOS DERIVADOS DA TESE*

## Cultivo de *Pleurotus ostreatus* DPUA 1533 e *Pleurotus florida* DPUA 1534 em resíduos vegetais da Amazônia

Silva Neves, K.C.<sup>a</sup>; Palheta, R.A.<sup>b</sup>; Teixeira, M.F.S.<sup>b</sup>; Porto, A.L.F.<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Manaus, AM

<sup>b</sup> Coleção de Cultura DPUA/UFAM, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM

<sup>c</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE

### RESUMO

Devido à disponibilidade abundante de resíduos naturais, sua utilização pode servir como substrato ideal em processos microbianos para produção de produtos de valor agregado. A aplicação da tecnologia de fermentação semi-sólida pode ser uma possibilidade atrativa para as bioconversões. Este artigo apresentou a viabilidade da utilização do resíduo casca de cupuaçu suplementado com liteira, farelo de arroz e casca de arroz no crescimento micelial vertical de *Pleurotus ostreatus* DPUA 1533 e de *Pleurotus florida* DPUA 1534. Nos resultados, por apresentar melhor desenvolvimento nos substratos, foi realizada a produção de basidiomas de *P. florida* DPUA 1534. O substrato a base de casca de cupuaçu suplementado com farelo de arroz 20%, com inóculo de 20 discos miceliais resultou na melhor eficiência biológica (14,2%). *Pleurotus florida* pode ser considerado um importante alimento considerando suas características nutricionais: proteínas (25,94%) e carboidratos (49,72%), ferro (89,82%) e zinco (85,08%), além da presença de todos os aminoácidos essenciais.

**Palavras-chave:** *Pleurotus*, casca de cupuaçu, cultivo, eficiência biológica, valor nutricional

---

### 1. INTRODUÇÃO

Os fungos do gênero *Pleurotus*, popularmente conhecido por cogumelo ostra, são cogumelos comestíveis de alto valor nutricional, pouco exigente em relação ao substrato e de bom desenvolvimento em condições rústicas. As espécies podem ser encontradas naturalmente, em florestas tropicais e subtropicais ou cultivados artificialmente para fins comerciais (MOHAMED et al, 2014).

Os cogumelos devem ser apreciados não somente por sua textura e paladar, mas principalmente por suas propriedades químicas e nutricionais. *Pleurotus* spp. possui altos teores de proteínas e algumas propriedades medicinais, como imunomodulatórias, anticancerígenas, antiinflamatória, antitrombótica, ações antivirais, e ainda, efeitos positivos sobre hipoglicemia e funções cardíacas (GUILLAMÓN et al, 2010).

O aproveitamento de resíduos lignocelulósicos oriundos da produção agrícola para a produção de proteína alimentar na forma de biomassa fúngica é uma alternativa para agregar valor aos resíduos, considerando que a produção de cogumelos comestíveis é uma atividade comercial já bem estabelecida e rentável (FONSECA et al, 2014).

O cultivo desse macrofungo em resíduos da agroindústria é um processo econômico, que agrega valores, disponibiliza nutrientes e, ainda, propicia a redução do volume de resíduo diminuindo o impacto negativo pelo seu acúmulo e contribuindo para a limpeza ambiental. O processo de bioconversão de resíduo lignocelulósico realizado pelos fungos durante a colonização do substrato natural é uma alternativa de aproveitamento do resíduo agroindustrial, representando ganhos à produção agrícola (SÁNCHEZ, 2009; LUZ et al, 2013). Desta forma, o cultivo de cogumelos é uma prática que viabiliza a obtenção de retorno econômico, social e ambiental (SALES-CAMPOS et al, 2010; CARVALHO et al, 2011; ALMEIDA et al, 2013).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento micelial vertical de duas espécies de cogumelos comestíveis em resíduos da agroindústria amazônica para examinar a produção dos basidiomas de uma espécie em escala laboratorial e verificar a influência do tamanho do inóculo no ciclo de produção, rendimento e as características nutricionais.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Organismo e reativação da cultura matriz**

Os isolados de *Pleurotus florida* DPUA 1534 e *Pleurotus ostreatus* DPUA 1533 foram cedidos pela Coleção de Culturas do Departamento de Parasitologia da Universidade do Amazonas (DPUA), filiada ao World Data Centre for Microorganisms (WDCM) sob o n.º. 715.

As culturas estavam preservadas em óleo mineral e a reativação foi realizada pela transferência de fragmentos do micélio, para batata-dextrose-ágar suplementado com extrato de levedura 0,5% (p/v) (BDA+YE). As culturas foram incubadas a 25°C, por 8 dias.

### **2.2 Obtenção e preparo dos substratos**

Os substratos utilizados foram casca de cupuaçu (CC), adquirida no município de Novo Remanso-AM, farelo de arroz (FA) e casca de arroz (CA) procedentes do município de Boa Vista-RR (doado pela Universidade Federal de Roraima-UFRR) e liteira (Li) coletada de fruteiras regionais, no campus Universitário da UFAM-AM.



Cada substrato recebeu tratamento de trituração, limpeza, sanitização e esterilização conforme padronização utilizada na coleção de cultura DPUA/UFAM (PI1102270-1).

### 2.3 Crescimento micelial vertical

O crescimento de *Pleurotus florida* DPUA 1534 e *Pleurotus ostreatus* DPUA 1533 foram realizados em resíduo natural, casca de cupuaçu (CC) suplementada com 10 e 20% de casca de arroz (CA), farelo de arroz (FA) e liteira (Li), acondicionado em tubo de ensaio de 200 mm x 22 mm até preencher 15 cm de altura. A esterilização foi realizada a 121 °C por 45 minutos por dois dias consecutivos. (PALHETA et al, 2011; FONSECA et al, 2014). Da cultura matriz foram retirados dois discos miceliais ( $\varnothing=10\text{mm}$ ) para inoculação na superfície do resíduo. O crescimento micelial vertical foi conduzido a 25 °C, na presença de luminosidade e o crescimento do cogumelo determinado a cada 24 horas por 15 dias. A média do crescimento micelial vertical foi determinado em centímetros ao final do experimento e o vigor micelial classificado pelo método subjetivo de notas, nota 1 (fracamente adensado); nota 2 (mediamente adensado) e nota 3 (fortemente adensado) (MARINO e ABREU, 2009).

### 2.4 Produção do inóculo

O inóculo foi obtido por fermentação submersa em frascos de Erlenmeyers contendo 50 mL de GYP [glicose 2% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v), peptona 0,1% (p/v)], pH 6,0. Nos frascos os discos miceliais (10 e 20) com diâmetro de 10 mm foram inoculados. A fermentação foi conduzida em agitador orbital, a 25 °C, a 150 rpm, durante 5 dias. A biomassa do cogumelo foi recuperada por filtração em peneira de crivo e transferida para o meio sólido (SILVA, 2011).

### 2.5 Produção dos basidiomas

Os resíduos utilizados para fermentação semi-sólida (1kg) foram a base de casca de cupuaçu (CC), suplementado (10 e 20%), com farelo de arroz (FA), casca de arroz (CA) e liteira (Li). Todos foram distribuídos em sacos plásticos de alta densidade com capacidade para 3kg, contendo 1000g da mistura de substrato, e esterilizados a 121 °C por 60 minutos por 3 dias consecutivos. Após resfriamento dos resíduos com 60% de umidade foi realizado o inóculo, 10 e 20 discos miceliais ( $\varnothing=10\text{mm}$ ), nos respectivos substratos. A fermentação semi-sólida foi conduzida a 25 °C, na ausência de luz, umidade relativa de 80%, conforme as recomendações de Souza (2004).

Após completa miceliação do substrato para a indução dos primórdios o cultivo foi submetido a choque térmico a -20 °C por 5 horas. Em seguida, os sacos foram submetidos às condições de frutificação, a 25 °C, sob luz fluorescente, 12 horas/dia e umidade relativa de 90%.

Os basidiomas, colhidos quando o píleo apresentou abertura em torno de 80% (ANDRADE e GRACIOLLI, 2005), que ocorreu em média por volta do décimo dia após choque de indução, foram pesados e submetidos a secagem a 40 °C, em estufa com circulação de ar forçado. Ao término do bioprocessamento foram avaliados os seguintes dados: ciclo de produção (dias) – representado pelas diferentes fases (miceliação completa, formação dos primórdios, formação do basidioma, tempo de colheita); número de basidiomas, peso fresco basidioma (g), peso seco do basidioma, peso seco do substrato, peso úmido do substrato pós-colheita; dados biométricos (cm) - comprimento da haste e largura do píleo. A eficiência biológica (EB) e a perda de matéria orgânica (PMO) foram avaliadas conforme as equações abaixo (DIAS, 2003; CARVALHO et al., 2012):

$$EB = \frac{\text{peso fresco dos basidiomas (g)}}{\text{peso seco do substrato (g)}} \times 100$$

$$PMO = \frac{\text{peso seco do substrato inicial (g)} - \text{residual (g)}}{\text{peso seco do substrato inicial (g)}} \times 100$$

## 2.6 Análise físico-química dos substratos

Nas análises físico-químicas dos substratos casca de cupuaçu (CC), farelo de arroz (FA), liteira (Li) e casca de arroz (CA) realizou-se a determinação dos seguintes parâmetros: umidade, cinzas, lipídios, proteínas, fibras, carboidratos, (AOAC, 1997), energia (LATINFOODS, 2002; NEPA, 2006), conteúdo de carbono (MENDONÇA e MATOS, 2005) e conteúdo de nitrogênio (MALAVOLTA et al, 1989)

## 2.7 Análise nutricional dos basidiomas

Após colheita, os basidiomas, desidratados a 40 °C em estufa de ar circulante até atingir peso constante, foram triturados para posteriores análises nutricionais.

*Composição centesimal.* As análises de umidade, o total de lipídios, carboidratos totais e cinzas de acordo com metodologia descrita pela AOAC (1997). A proteína foi

determinada pelo Método de Kjeldahl, utilizando o fator de correção 4,38 (FURLANI e GODOY, 2005).

*Aminoácidos.* As amostras passaram por hidrolisação prévia com ácido clorídrico (HCl) bidestilado 6N, seguida de derivação pré-coluna dos aminoácidos livres com fenilisotiocianato (PITC), e a separação dos derivativos feniltiocarbamilaminoácidos (PTC-aa), em coluna de fase reversa C18 (Pico-Tag – 3,9x300 mm), com detecção por UV a 254 nm. A quantificação da amostra foi baseada na altura de cada pico de aminoácido, utilizando como referência a altura do pico do padrão interno de aminoácidos com concentração conhecida, com o padrão derivado nas mesmas condições e no mesmo tempo das amostras. Os teores de aminoácidos foram transformados para gramas por 16 g de N da amostra seca. Para isso, o teor de proteína bruta (PB, g por 100 g de matéria seca – MS) da amostra foi determinada pelo método de micro-Kjeldahl (RIBEIRO et al, 2007).

*Minerais.* Foram submetidos à digestão úmida utilizando HNO<sub>3</sub> + HCl O<sub>4</sub> (3:1) para determinação de macro (P, K, Ca e Mg) e micronutrientes (Fe, Zn, Cu, Mn e Na). O teor de fósforo foi determinado por espectrofotometria com azul de molibdênio e o teor de cálcio, magnésio, potássio, sódio, cobre, ferro, manganês e zinco por espectrofotometria de absorção atômica (EAA) (EMBRAPA, 2009).

## 2.8 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%), utilizando o programa Minitab versão 16.0.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

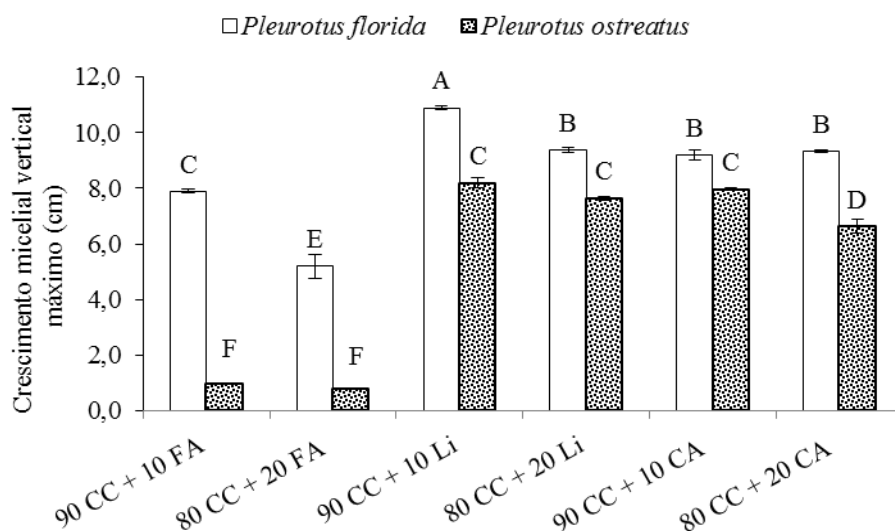
### 3.1 Crescimento micelial vertical de *Pleurotus ostreatus* DPUA 1533 e *Pleurotus florida* DPUA 1534

Os resultados do crescimento micelial vertical de *P. ostreatus* DPUA 1533 e *P. florida* DPUA 1534 em casca de cupuaçu suplementado com liteira (CC+Li), casca de arroz e farelo de arroz (CA+ FA) estão demonstrados na Figura 1. Independente do substrato avaliado, em 14 dias, as duas espécies de cogumelos procedentes de área tropical colonizaram os resíduos naturais, entre eles, *P. florida* DPUA 1534 foi a espécie que expressou crescimento significativo ao final do experimento (10,9 cm em liteira como substrato suplementar), propriedade que definiu a produção dos seus

basidiomas nesses resíduos. Castilo (2009) também obteve melhor crescimento micelial vertical de *P. ostreatus* URM 4072, *P. florida* URM 4066, *L. citrinus* URM 2672 e *L. lepideus* URM 404 ao utilizar liteira como substrato.

O crescimento de *P. ostreatus* DPUA 1533 em liteira e casca de arroz como suplemento foi em média de 7,9 cm e 7,3 cm, respectivamente. Porém, a média de crescimento foi menor (1,8 cm) quando foi utilizado farelo de arroz. Reis et al. (2010) ao utilizarem resíduo de algodão suplementados com farelo de arroz para cultivo de *P. ostreatoroseus* e *P. florida* observaram que a suplementação aumentou o tempo de miceliação.

Figura 1: Média do crescimento micelial vertical de *Pleurotus florida* DPUA 1534 e *Pleurotus ostreatus* DPUA 1533 cultivados por 15 dias em substrato a base de casca de cupuaçu (CC), suplementado nas concentrações de 10 e 20% com farelo de arroz (FA), liteira (Li) e casca de arroz (CA) e inóculo de 10 e 20 discos miceliais. Nas colunas, as mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.



Os dados relativos ao vigor micelial para *P. florida* DPUA 1534 e *P. ostreatus* DPUA 1533, o tipo fortemente adensado só foi observado em farelo de arroz. Em liteira e casca de arroz essa característica se expressou fracamente adensado. Estudos mostram que a suplementação dos substratos tem influencia no vigor superficial da massa micelial, especialmente os farelos que proporcionam o aumento da qualidade nutricional e a redução da relação C/N com nutrientes assimiláveis (PEDRA e MARINO, 2006; MARITO et al, 2008; RETTORE et al., 2011; FIGUEIRÓ e GRACIOLLI, 2011). Além

disso, a capacidade do fungo crescer e produzir cogumelos em substratos lignocelulósicos está relacionada com o vigor do micélio (FIGUEIREDO e DIAS, 2014).

Nos resíduos utilizados como substrato para cultivo de *P. florida* DPUA 1534 e *P. ostreatus* DPUA 1533, o quantitativo de C/N predominou em casca de arroz (113:1), valor superior 83% ao determinado em farelo de arroz, 71,0% em casca de cupuaçu, e 59,3% de liteira (Tabela 1), fator que também contribui para o comportamento dos cogumelos em relação ao crescimento e adensamento micelial. De acordo com Montini (2001), os cogumelos dependem da relação C/N para o seu desenvolvimento e em consequência para formação dos basidiomas em função do enriquecimento nutricional do substrato. Outros parâmetros que influenciam o crescimento desses macrofungos são o tamanho das partículas do substrato, o grau de compactação e capacidade de retenção de água em função da necessidade da oxigenação do substrato (CARDOSO et al, 2013).

Tabela 1. Análise físico-química dos substratos casca de cupuaçu (CC), farelo de arroz (FA), liteira (Li) e casca de arroz (CA) utilizados para o cultivo de *Pleurotus florida* DPUA 1534 e *Pleurotus ostreatus* DPUA 1533.

Variáveis	Casca de cupuaçu (CC)	Farelo de arroz (FA)	Liteira (LI)	Casca de arroz (CA)
Umidade	19,29	9,24	33,98	7,76
Energia (kcal)	319,78	423,53	264,68	294,65
Cinzas	1,94	9,14	6,3	4,5
Lipídios	0,94	19,41	5,16	0,65
Proteína (Nx 6,25)	1,81	17,37	1,31	16,88
Fibra	1,93	2,07	1,77	1,19
Carboidrato	76,02	44,84	53,26	70,21
Conteúdo carbono	46,13	42,99	44,88	35,50
Conteúdo de nitrogênio	1,39	2,29	0,97	0,31
Relação C:N	33,16	18,73	46,01	112,82

A identificação de substratos que permitam o rápido desenvolvimento micelial é uma das etapas importantes nos estudos que visam a produção de basidiomas (ALBUQUERQUE et al, 2012). *Pleurotus florida* DPUA 1534 foi a espécie selecionada para a produção de basidiomas por ter expressado crescimento micelial vertical significativo ( $p > 0,05$ ) nos resíduos testados.

### 3.2 Produção dos basidiomas de *Pleurotus florida* DPUA 1534

### 3.2.1 Tempo de cultivo de *Pleurotus florida* DPUA 1534

Na Tabela 2 estão os resultados da produção de *Pleurotus florida* DPUA 1534 nas substratos a base de casca de cupuaçu (CC) suplementado com farelo de arroz (FA), liteira (Li) e casca de arroz (CA). Em todas as fases de produção de acordo com o tipo, a concentração do substrato suplementar e o tamanho do inóculo, o comportamento do cogumelo apresentou variação. Nos cultivos suplementados com farelo de arroz a miceliação completa do substrato ocorreu numa média de intervalo de tempo menor (19 dias), seguido de casca de arroz (27 dias) e liteira (28 dias). Além da influência desses fatores, a relação C:N também não pode ser desconsiderada, pois esse parâmetro no farelo e casca de arroz, assim como na liteira, apresentaram valores de 18,73, 46,01 e 112,82, respectivamente (Tabela 1). Chang e Miles (2004) cita, em geral, para o crescimento dos cogumelos a ótima relação C:N está em torno de 17, valor que se aproxima ao encontrado no farelo de arroz, substrato suplementar cujo *P. florida* DPUA 1534 apresentou melhores resultados de produção.

As espécies do gênero *Pleurotus*, quando adaptadas ao substrato, o desenvolvimento micelial ocorre entre 15 a 30 dias e necessitam de 5 a 10 dias para emissão dos primórdios, totalizando em 40 dias de produção (REIS et al, 2010). No presente trabalho *Pleurotus florida* DPUA 1534, cultivado em diferentes substratos, apresentou ciclo de produção máximo de 44,5 dias. Esses resultados são semelhantes aos demonstrados por Reis et al. (2010) nos cultivos de *Pleurotus florida* suplementado com 5% de farelo de arroz e em resíduo de algodão e (43,4 e 41,5 dias, respectivamente).

Quando foi utilizada casca de cupuaçu suplementada com liteira a miceliação completa ocorreu numa média de 27,1 dias, enquanto que com o suplemento farelo de arroz essa média foi de 19,2 dias. Esse resultado tem relação com o vigor do micélio de *Pleurotus florida* DPUA 1534, que se apresentou fraco e fortemente adensado quando liteira e farelo de arroz foram utilizados como substrato suplementar, respectivamente. De acordo com Figueiredo e Dias (2014) a capacidade de crescimento do fungo e produção de cogumelos em substratos lignocelulósicos está relacionada com o vigor do micélio.

A fase de crescimento micelial sobre um substrato e a escolha de substratos que favoreçam o seu desenvolvimento é de fundamental importância (MAZIERO et al,1992; PHILIPPOUSIS et al, 2001). Enquanto o fungo não colonizar completamente o

substrato, os contaminantes ou competidores podem se constituir em sério problema. As contaminações por fungos e bactérias nessa fase de produção podem ser minimizadas caso a colonização transcorra de forma mais rápida (ROYSE, 2002).

O cultivo de *P. florida* DPUA 1534 apresentou melhor tempo de cultivo quando foi utilizada casca de cupuaçu suplementada com farelo de arroz a 10% com inóculo de 20 discos miceliais. A velocidade de desenvolvimento micelial relacionada à produção indica que uma rápida colonização favorece a formação de primórdios em menor tempo, consequentemente reduzindo o tempo total de cultivo (REIS et al, 2010).

Tabela 2- Produção de basidiomas de *Pleurotus florida* DPUA 1534 em substrato a base de casca de cupuaçu (CC) suplementado nas concentrações de 10 e 20% com farelo de arroz (FA), liteira (Li) e casca de arroz (CA) e inóculo de 10 e 20 discos miceliais.

Substrato/ Inóculo	Miceliação	Formação dos primórdios	Formação dos basidiomas	Tempo de colheita
	(dias)			
FA1(10d)	15,5	18,3	27,2	28,3
FA1(20d)	20,8	23,9	24,4	27,0
FA2(10d)	19,5	22,1	24,1	27,3
FA2(20d)	21,0	23,2	26,2	36,4
Li1(10d)	28,4	37,8	40,0	44,5
Li1(20d)	27,0	31,5	35,1	38,5
Li2(10d)	32,0	32,6	36,4	40,0
Li2(20d)	21,0	28,0	30,9	33,9
CA1(10d)	28,4	35,2	37,2	40,8
CA1(20d)	27,8	33,2	37,6	39,8
CA2(10d)	27,6	32,2	35,6	38,6
CA2(20d)	29,2	34,0	34,4	38,4

Substrato: 1= 10%; 2= 20%. Inóculo: 10d= 10 discos miceliais; 20d= 20 discos miceliais.

### 3.2.2 Bioconversão de substrato amazônico por *Pleurotus florida* DPUA 1534

Apesar da utilização de uma maior quantidade de inóculo poder garantir maiores chances de sucesso no desenvolvimento do fungo e, conseqüentemente, melhores produções (PICCININ, 2000), neste estudo não foi observada diferença na produção considerando a concentração de inóculo de 10 e 20% nos diferentes substratos.

No entanto, o substrato casca de cupuaçu suplementado com farelo de arroz promoveu maior bioconversão por *P. florida* DPUA 1534 do substrato em basidiomas, resultado revelado no valor significativo obtido na eficiência biológica (14,2%) (Tabela 3). A eficiência biológica satisfatória está diretamente associada a composição do substrato, com destaque para a relação C:N, nutrientes que promovem o desenvolvimento eficaz do micélio vigoroso (PEDRA & MARINO, 2006; BERNARDI et al, 2007). Os valores da perda de matéria orgânica (PMO) não teve relação com os encontrados para determinar a eficiência biológica, dados que corroboram com os encontrados por Sales-Campos (2010), pois o substrato que obteve maior eficiência biológica não foi o que apresentou maior perda de matéria orgânica. A perda de matéria orgânica pode ocorrer também devido à perda de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O durante o metabolismo dos microorganismos e não apenas devido à remoção de materiais para a construção dos basidiomas (ZADRAZIL, 1978).

Tradicionalmente algum tipo de farelo pode ser utilizado como fonte de enriquecimento do substrato utilizado para o crescimento dos cogumelos (DIAS et al, 2003). Entre os resíduos avaliados para produção de *Pleurotus florida* DPUA 1534 nesta pesquisa, a mistura de substrato cujo suplemento foi farelo de arroz, mostrou-se o mais promissor.



Tabela 3- Características da produção de basidiomas de *Pleurotus florida* DPUA 1534 em substrato a base de casca de cupuaçu (CC) suplementado nas concentrações de 10 e 20% com farelo de arroz (FA), liteira (Li) e casca de arroz (CA) e inóculo de 10 e 20 discos miceliais.

Substrato/ Inóculo	Quantidade basidiomas	Eficiência biológica (%)	Perda da Matéria Orgânica	Diâmetro do píleo (mm)
FA1(10d)	16,3 ± 2,9 <sup>bc</sup>	7,5 ± 1,2 <sup>bc</sup>	94,4 ± 3,8 <sup>a</sup>	39,0 ± 7,7 <sup>cde</sup>
FA1(20d)	56,6 ± 14,2 <sup>ab</sup>	14,2 ± 1,5 <sup>a</sup>	103,6 ± 31,2 <sup>a</sup>	37,4 ± 5,1 <sup>def</sup>
FA2(10d)	96,7 ± 70,8 <sup>a</sup>	9,4 ± 1,3 <sup>b</sup>	105,8 ± 21,5 <sup>a</sup>	24,6 ± 6,3 <sup>f</sup>
FA2(20d)	10,6 ± 1,1 <sup>c</sup>	5,7 ± 1,1 <sup>cd</sup>	105,8 ± 25,2 <sup>a</sup>	49,0 ± 8,4 <sup>abc</sup>
Li1(10d)	11,4 ± 7,4 <sup>bc</sup>	5,1 ± 0,7 <sup>de</sup>	124,2 ± 25,0 <sup>a</sup>	52,7 ± 4,8 <sup>ab</sup>
Li1(20d)	11,2 ± 2,8 <sup>bc</sup>	3,3 ± 1,2 <sup>ef</sup>	126,2 ± 34,0 <sup>a</sup>	31,5 ± 6,1 <sup>def</sup>
Li2(10d)	3,8 ± 1,5 <sup>c</sup>	5,3 ± 0,9 <sup>cde</sup>	101,0 ± 25,4 <sup>a</sup>	59,0 ± 7,2 <sup>a</sup>
Li2(20d)	8,5 ± 1,1 <sup>c</sup>	1,9 ± 0,9 <sup>f</sup>	131,0 ± 33,5 <sup>a</sup>	28,0 ± 6,964 <sup>ef</sup>
CA1(10d)	3,0 ± 1,0 <sup>c</sup>	3,1 ± 0,7 <sup>ef</sup>	99,2 ± 5,0 <sup>a</sup>	50,0 ± 7,4 <sup>abc</sup>
CA1(20d)	7,2 ± 3,8 <sup>c</sup>	5,3 ± 0,7 <sup>cde</sup>	91,0 ± 13,6 <sup>a</sup>	51,8 ± 3,7 <sup>abc</sup>
CA2(10d)	5,6 ± 2,3 <sup>c</sup>	1,9 ± 0,9 <sup>f</sup>	84,6 ± 11,5 <sup>a</sup>	27,0 ± 5,2 <sup>ef</sup>
CA2(20d)	3,2 ± 0,8 <sup>c</sup>	5,960 ± 0,7 <sup>cd</sup>	96,4 ± 7,6 <sup>a</sup>	42,0 ± 3,9 <sup>bcd</sup>

Substrato: 1= 10%; 2= 20%. Inóculo: 10d= 10 discos miceliais; 20d= 20 discos miceliais.

Médias seguidas de mesma letra minúscula, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Turkey (p<0,05).

Os valores correspondem à média aritmética de cinco repetições ± desvio padrão

Pelo fato da eficiência biológica significativa (14,2%) e o menor tempo de cultivo (27 dias) ter sido apresentado por *Pleurotus florida* DPUA 1534 quando se utilizou farelo de arroz (10%) como substrato suplementar e inóculo de 20 discos miceliais, as análises físico-química, aminoácidos e minerais foram realizadas do cogumelo produzido nessas condições.

### 3.3 Análise físico-química de *Pleurotus florida* DPUA 1534

A revisão feita por Furlani e Godoy (2005) mostra que existe uma grande diferença nas porcentagens de macro e micro nutrientes encontrados nos cogumelos, valores que muitas vezes são discrepantes em função da espécie e variedades, entre outros fatores.

Os teores de lipídios podem variar entre 2 a 8% da matéria seca do corpo de frutificação, variando com a espécie cultivada e o substrato utilizado (STURION &

OETTERER, 1995). O teor de gordura em cogumelos, geralmente é baixo (BONATTI et al, 2004; BERNAS et al, 2006; FURLANI & GODOY, 2007; TORO et al, 2006, HOLTZ et al, 2009). No entanto, Justo et al (1998) encontraram apenas 1,1% de gordura em *P. ostreatus* cultivado em palha de trigo. Os resíduos de algodão utilizados por Scariot et al (2000) favoreceram o teor de gordura de *P. ostreatus* (8,13%). A mesma situação parece ter ocorrido neste estudo (Tabela 4). Considerando que dentre os substratos suplementares utilizados o teor de lipídios do farelo de arroz foi o mais alto (19,41), *Pleurotus florida* cultivado nesse substrato apresentou 7,78% de lipídios, valor alto comparado aos encontrados por Silva et al (2007) para *Pleurotus* em diferentes resíduos (2,50; 2,03 e 1,91%). Ingale e Ramteke (2010) encontraram 1,9% de lipídios para *P. florida*.

Zhang e Fadel (2002) citaram que os teores de proteína dos basidiocarpos de *Pleurotus* spp. podem variar de 26,3-36,7%, porém Rangunathan e Swaminathan (2003) relataram que estes valores podem ser maiores, variando entre 25,6-44,3%. No presente estudo o valor de proteína foi de 25,94%, valor mais alto do que o encontrado por Ingale e Ramteke (2010), onde *P. florida* apresentou 22% de proteína bruta. Scariot et al (2000), cultivando *P. ostreatus* em resíduo de algodão, encontrou um valor de proteína bruta para os corpos frutíferos de 19,7% e Holtz et al (2009) cultivou a mesma espécie em resíduo de algodão da indústria têxtil obtendo teor de proteína de 16,47, enquanto Bonatti et al (2004), cultivando a mesma espécie em palha de bananeira, chegaram a 16,9%. Portanto, o tipo de substrato usado para o cultivo de *Pleurotus* spp., provavelmente influencia na composição nutricional dos corpos de frutificação, ou seja, o teor de proteína bruta dos corpos de frutificação parece estar relacionado com o teor de nitrogênio no substrato inicial bruto, combinado ou suplementado com farelos e/ou adubos agrícolas (Lelley e Janben, 1993; Sturion e Oetterer, 1995; Bernardi e Nascimento, 2011). Silva et al (2007), observou que com o aumento do teor de proteína nos basidiocarpos, ocorreu a diminuição do teor de lipídios.

Os valores de fibra bruta e cinzas determinados neste trabalho estão abaixo daqueles relatados em alguns trabalhos, segundo os quais os cogumelos podem apresentar teores de fibra bruta variando de 3 a 32% e cinzas em torno de 10,1% (Bonatti et al , 2004, Miles e Chang, 1997; Sturion e Oetterer, 1995; Ingale e Ramteke , 2010).

De um modo geral, os trabalhos sobre a composição química dos cogumelos do gênero *Pleurotus* mostram que estes valores podem variar em função dos substratos e

das espécies de *Pleurotus* (Silva et al, 2007). Alguns aspectos podem ser apontados como fatores que influenciam a composição nutricional dos cogumelos do gênero *Pleurotus*, tais como: tipos de cepas, composição do substrato e estágio de desenvolvimento do corpo de frutificação (Colauto et al., 1998).

De acordo com Bernas et al (2006), dos constituintes dos cogumelos, os carboidratos são encontrados em grande quantidade, variando de 16 a 85%. Holtz et al encontraram teor de 8,40% de carboidratos nos corpos frutíferos de *P. ostreatus*, enquanto que neste estudo o cogumelo apresentou teor de 49,72%.

Tabela 4. Análise físico-química de basidioma de *Pleurotus florida* DPUA 1534 produzido em substrato a base de casca de cupuaçu (CC) suplementado com farelo de arroz (FA) 10% e inóculo de 20 discos miceliais (% baseado no peso seco).

Determinações	%
Umidade	6,54
Lipídios	7,78
Cinzas	8,01
Proteínas	25,94
Fibras	2,02
Carboidratos	49,72

#### 3.4 Análise de aminoácidos de *Pleurotus florida* DPUA 1534

Os teores de aminoácidos essenciais de *P. florida* DPUA 1534 neste estudo (Tabela 5) foram superiores aos de uma espécie de *Pleurotus* estudada por Mattila et al (2002). Em contrapartida, Mdachi et al (2004) encontraram valores de aminoácidos superiores ao estudar *Pleurotus sajor-caju*, com exceção da leucina (0,46) e no caso do triptofano ao valores foram os mesmos (0,41).

Tabela 5. Composição de aminoácidos dos basidiomas de *Pleurotus florida* DPUA 1534 produzido em substrato a base de casca de cupuaçu (CC) suplementado com farelo de arroz (FA) 10% e inóculo de 20 discos miceliais (baseado no peso seco).

<b>Aminoácidos</b>	<b>g/100g peso seco</b>
Ácido aspártico	2,62
Treonina*	1,20
Serina	1,22
Ácido glutâmico	4,20
Glicina	1,39
Alanina	1,52
Valina*	1,52
Cisteína	0,28
Metionina*	0,70
Isoleucina*	1,19
Leucina*	1,85
Tirosina	0,93
Fenilalanina*	1,17
Lisina*	1,59
Histadina	0,67
Arginina	2,17
Prolina	1,24
Triptofano*	0,41
<b>Total de aminoácidos essenciais</b>	<b>9,63</b>
<b>Total aminoácidos</b>	<b>25,87</b>

\*Aminoácidos essenciais

### 3.5 Análise de minerais de *Pleurotus florida* DPUA 1534

As concentrações de minerais nos corpos de frutificação de fungos são, em geral, espécie-dependente e a composição do substrato é um importante fator que afeta a absorção, mas existem diferenças na acumulação dos metais individuais (MICHELOT, 1998).

Os componentes minerais apresentados mostrou que ferro e zinco foram os principais constituintes de cinzas de *P. florida* DPUA 1534 cultivado em casca de cupuaçu+farelo de arroz (Tabela 6). Estes valores diferem aos encontrados por Wang et al (2001) e Chang et al (1981) que relataram que potássio e fósforo foram os principais constituintes de cinzas. Jwanny et al (1995) reportaram que fósforo e magnésio foram os principais constituintes de cinzas de *P. ostreatus*, seguido de ferro e sódio.

Tabela 6. Conteúdo mineral dos basidiomas de *Pleurotus florida* DPUA 1534 produzidos em substrato a base de casca de cupuaçu (CC) suplementado com farelo de arroz (FA) 10% e inóculo de 20 discos miceliais, baseado no peso seco.

Macronutrientes				Micronutrientes				
P	K	Ca	Mg	Na	Cu	Fe	Mn	Zn
g kg <sup>-1</sup>				mg kg <sup>-1</sup>				
14,08	27,90	0,32	1,38	70,50	24,89	89,82	7,52	85,08

#### 4. CONCLUSÃO

Conclui-se que o substrato casca de cupuaçu suplementado com farelo de arroz foi favorável ao crescimento micelial vigoroso com eficiência biológica significativa (14,2%) de *Pleurotus florida* DPUA 1534. As análises revelaram que *P. florida* DPUA 1534 apresentou percentuais de proteínas e carboidratos, além de minerais e aminoácidos essenciais, compatíveis aos de um alimento de importante valor nutricional.

#### REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, M.P.; PEIL, R.M.N.; NASCIMENTO, J.S. Crescimento micelial de *Lentinus sajor caju* (Fr.) Fr. e *Pleurotus* spp. em diferentes resíduos agrícolas. **Biosci. J.**, v.28, n.5, p. 895-902, 2012.
- ALMEIDA, L.B.; SALES-CAMPOS, C.; CARVALHO, C.S.M.; MINHONI, M.T.A; ANDRADE, M.C.N. Resíduos de bananeira como substrato base para o cultivo *in vitro* de *Coprinus comatus*. **Ambiência Guarapuava (PR)**. v.9, n.3, 643-650p. 2013.
- ANDRADE, M.C.N.; GRACIOLLI, L.A. Controle de fungos contaminantes no cultivo do cogumelo comestível shiitake em toros de eucalipto. **Acta Sci. Agron.** Maringá, v. 27, n. 2, p. 293-299, 2005.
- AOAC. 1997. Official Methods of Analysis. 16a .ed. Association of Official Analytical Chemists. Gaithersburg, MD, EEUU. 1141 pp.
- BERNARDI, E.; DONINI, L.P., MINOTTO, E. E NASCIMENTO, J.S. 2007. Utilização de diferentes substratos para produção de inóculo de *Pleurotus ostreatoroseus*. Sing. **Revista Ciência Agronômica**, v.38, n.1, p.84-89.
- BERNAS, E.; JAWORSKA, G.; LISIEWSKA, Z. 2006. Edible mushrooms as a source of valuable nutritive constituents. **Acta Sci. Pol. Technol. Alim.**, v. 5, n. 1, p. 5-20.

BONATTI, M.; KARNOPP, P.; SOARES, H.M. E FURLAN, S.A. 2004. Evaluation of *Pleurotostreatus* and *Pleurotussajor-cajunutricional* characteristics when cultivated in different lignocellulosicwates. **Food Chemistry**, v.88,p.425-428.

CARDOSO, J.C.P.;DEMENJOUR, P.L.M.M.; PAZ, M.F. 2013. Cultivo do cogumelo comestível *Pleurotus ostreatus* em bagaço de bociáúva pela técnica jun-caó. **Evidência**, Joçóaba v.13 n.1, p.31-40.

CARVALHO, C. S. M.; ANDRADE, M. C. N.; SALES-CAMPOS, C. Avaliação da produção e das características bromatológicas de *Pleurotus ostreatus* cultivado em resíduos de bananeira. In: SALES-CAMPOS, C.; VAREJÃO, M. J. C. (Ed.). **Bioconversão de resíduos lignocelulolíticos da Amazônia para cultivo de cogumelos comestíveis**. Manaus: INPA, 2011. p. 39-46.

CARVALHO, C.S.M.; AGUIAR, L.V.B.; SALES-CAMPOS, C.; MONHONI, M.T.A.; ANDRADE, M.C.N. 2012. Applicability of the use of waste from diferente banana cultivars for the cultivation. **Brazilian Journal of Microbiology**. p. 819-826.

CASTILO T.A. 2009. **Basidiomicetos: caracterização fisiológica, produção de biocompostos e biomassa em substrato agroflorestal amazônico**. Tese doutorado de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal do Amazonas.

CHANG S.T.; MILES P.G. 2004. Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. **CRC Press**, Boca Ratón.

CHANG, S. T.; LAU, O. W.; CHO, K. Y. 1981. The cultivation and nutritional value of *Pleurotus sajor-caju*. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 58-62.

COLAUTO, N.B.; EIRA, A. F.; MINHONI, M. T. A. 1998. Fatores físicos que afetam a produtividade do cogumelo comestível *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer. **Científica**, São Paulo,v.26, p.25-43.

DAS, N.; MUKHERJEE, M. 2007. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* on weed plants. **Bioresource Technology** 98 , p. 2723–2726.

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

EIRA, A.F. Cultivo do cogumelo medicinal *Agaricus blazei* (Murrill) ss. *Heinemann* ou *Agaricus brasiliensis* (Wasser et al.). **Aprenda Fácil**. Viçosa, Brasil. 395p, 2003.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. 2.ed. Brasília-DF, Informação Tecnológica, 2009. 628p.

FIGUEIREDO, V.R.; DIAS, E.S. Cultivo do champignon em função da temperatura. **Ciência Rural**, v.44,n.2,241-246p., 2014.

FIGUEIRÓ, G.G. E GRACIOLLI, L.A. 2011. Influence of the chemical composition of the substrate in the cultivation of *Pleurotus florida*. **Ciência e Agrotecnologia**. Vol.35 no.5. Lavras.

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.08, 1227-1236p, 2014.

FURLANI, R.P.Z.;GODOY, H.T. 2005. Nutricional value of edible mushrooms: a revision. **Rev. Instituto Adolfo Lutz**, 64(2):149-154.

FURLANI R.P.; GODOY H.T. 2007. Valor nutricional de cogumelos comestíveis. **Ciênc Tecnol Aliment.**,27(1):154-7.

GUILLAMÓN, E.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; LOZANO, M.; D'ARRIGO, M.; ROSTAGNO, M.A.; VILLARES, A.; MARTÍNEZ, J.A. Edible mushrooms: Role in the prevention of cardiovascular diseases. **Fitoterapia**. v.81, 715–723p, 2010.

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

INGALE, A.; REAMTEKE, A. 2010. Studies on cultivation and biological efficiency of mushrooms grown on diferente agro-residues. **Innovative Romanian Food Biotechnology**. Vol.6, 25-28p.

ISRAEL, C.M. 2005. **Utilização do Resíduo do Processamento do Palmeiro para a Produção de Enzimas Hidrolíticas por Fungos do Gênero Polyporus**. Blumenau, Brazil, 100 p. (M.Sc. Dissertation, Engenharia Ambiental do Centro de Ciências Tecnológicas).

JUSTO M.B.; GUZMÁN G.A.; MEJÍA E.G.; DÍAZ C.L.G.; MARTÍNEZ G.; CORONA E.B. 1998. Composition química de tres cepas mexicanas de setas (*Pleurotus ostreatus*). **Archivos Latinoamericanos de Nutricion** 48(4): 359-363.

JWANNY, E.W.;RASHAD, M.M.; ABDU, H.M. Solid-state fermentation of agricultural wastes into food through *Pleurotus* cultivation. 1995. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 50.

LATINFOODS. 2002. *Tabla de Composicion de Alimentos de América Latina*. [www.fao.org/LAmerica/grupo.htm](http://www.fao.org/LAmerica/grupo.htm) (Cons.20/05/2006).

LELLEY, J. I.; JANBEN, A. 1993. Productivity improvement of oyster mushrooms substrate with a controlled release of nutrient. **Mushroom News**, Canada, v.41, n.2, p.6-13.

LUZ, J.M.R.; PAES, S.A.; TORRES, D.P.; NUNES, M.D.; SILVA, J.S.; MANTOVANI, H.C.; KASUYA, M.C.M. 2013. Production of edible mushroom and degradation of antinutritional factors in jatropha biodiesel residues. **Food Science and Technology**. v. 50, 575-580p.

- MALAVOLTA E.; VITTI G.C.; OLIVEIRA, A.S. (1989) *Avaliação do Estado Nutricional das Plantas: Princípios e Aplicações*. Nagy. Piracicaba, Brasil. 201 pp.
- MARINO, R. H.; ABREU, L.D.; MESQUITA, J.B.; RIBEIRO, G.T. 2008. Crescimento e cultivo de diferentes isolados de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer em serragem da casca de coco. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.75, n.1, p.29-36.
- MARINO, R.H.; ABREU, L.D. Cultivo do cogumelo Shiitake em resíduo de coco suplementado com farelo de trigo e/ou arroz **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, vol. 4, núm. 1, pp. 11-16, 2009.
- MATTILA, P.; SUONPAA, K.; PIIRONEN, V. 2000. Functional properties of edible mushrooms. **Nutrition**. v. 16 (7/8), p. 694-696.
- MAZIERO R.; BONONI V.L.; CAPELARI M. 1992. Cultivo e produtividade de *Pleurotus ostreatus* var. Florida em Mogi das Cruzes, SP, Brasil., Hoehnea, Sao Paulo.
- MDACHI, S. J.M., NKUNYA, M. H.H., NYIGO, V. A., URASA, I. T. 2004. Amino acid composition of some Tanzanian wild mushrooms. **Food Chemistry**. 86, 179–182.
- MENDONÇA, E.S.; MATOS, E.S. 2005. *Matéria Orgânica do Solo: Métodos de Análises*. UFV. Viçosa, Brasil. 107 pp.
- MICHELOT, D.; SIOBUD, E.; DORE, J.; VIEL, C.; POIRIER, F. 1998. Update of metal content profiles in mushrooms-toxicological implications and tentative approach to the mechanisms of bioaccumulation. **Toxicol**, v.36, p. 1997-2012.
- MOHAMED, M.F.; NASSEF, D.M.T.; WALY, E.A.; KOTB, A.M. Production of oyster mushroom (*Pleurotus* spp.) intercropped with field grown faba bean (*Vicia faba* L.). **Asian Journal of Crop Science**. 1-11p. 2014.
- MONTINI, R.M.C. 2001. **Efeito de linhagens e substratos no crescimento miceliano e na produtividade do cultivo axênico de shiitake *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler**. 2001. 97p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- NEPA (2006) *Tabela de Composição de Alimentos*. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação. UNICAMP. Campinas, Brasil. 105 pp.
- OLIVEIRA, M.A.; DONEGA, M.A.; PERALTA, R.M. E SOUZA, C.G.M. 2007. Produção de inóculo do cogumelo comestível *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quélet - CCB19 a partir de resíduos da agroindústria. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 27(supl.): 84-87.
- PANDEY, A.; NIGAM, P.; SOCCOL, C.R.; SOCCOL, V.T.; SINGH, D.; MOHAN, R. 2000. Advances in microbial amylases. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 31, n. 2, p. 135-152.
- PALHETA, R.A.; VIEIRA, J.N.; SILVA NEVES, K.C.; TEIXEIRA, M.F.S. 2011. Crescimento micelial vertical de duas espécies de *Pleurotus* em resíduos agroindustriais



da Amazonia utilizando planejamento fatorial. **Caderno de Pesquisa**, Série Biologia, Volume 23, número 3, p 52-60.

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

PHILIPPOUSSIS, A.; ZERVAKIS, G.; DIAMANTOPOULOU, P. 2001. Bioconversion of agricultural lignocelulosic wastes through the cultivation of the edible mushrooms *Agrocybe aeregita*, *Volvariella volvaceae* and *Pleurotus* spp. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.17, p.191-200.

PICCININ, E. **Potencial de preparações do cogumelo comestível “shiitake” (*Lentinula edodes*) no controle de fitopatógenos fúngicos, bacterianos e virais em sorgo, maracujá e fumo.** 2000. 160p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

RAGUNATHAN R, SWAMINATHAN K. 2003. Nutritional status of *Pleurotus* spp. Grown on various agro-wastes. **Food Chem.**, 80:371–5.

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

RETTORE, V.; GIOVANNI, R.N.; PAZ, M.F. Influência da luz na produção do cogumelo hiboukitake em bagaço de uva. 2011. **Evidência**, v. 11, n. 2, p. 29-36.

RIBEIRO, N.D.;LONDERO, P.M.G.;CARGNELUTTI FILHO, A.;JOST, E.;POERSCH, N.L.;MALLMANN, C.A. 2007. Composição de aminoácidos de cultivares de feijão e aplicações para o melhoramento genético. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.42, n.10, p.1393-1399.

ROYSE, D.J. Influence of spawn rate and commercial delayed release nutrient levels on *Pleurotuscornucopiae* (oyster mushroom) yield, size, and time to production. 2002. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.58, p.527-531.

SALES-CAMPOS, C.; CUNHA, A. L. B.; VAREJÃO, M. DE J. C.; ANDRADE, M. C. N. DE; ARAÚJO, L. M. 2010. Estudo físico-químico e nutricional de resíduo agroindustrial como base para formulação de substratos para cultivo de cogumelos. In: **Anais**. V Simpósio internacional sobre cogumelos no Brasil e IV Simpósio nacional sobre cogumelos comestíveis. UNISO. Sorocaba, São Paulo.

SÁNCHEZ, C. 2009. Lignocelulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, 27, 185 e 194.

SCARIOT, M. R.; RAK, L; COSTA, S.M.G.; CLEMENTE, E. 2000. Composição química de cogumelos comestíveis cultivados em resíduo de algodão. **Acta Scientiarum**, 22(2):317-320.

SILVA, E. G.; DIAS, E.S.; SIQUEIRA, F.G.; SCHAWN, R.F. 2007. Análise química de corpos de frutificação de *Pleurotus sajor-caju* cultivado em diferentes concentrações de nitrogênio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.1, p.72-75.

SILVA F.C. 2009. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. 2a. edição. Brasília, Embrapa Informações Tecnológicas, 627p.

SILVA, L. S. C. 2011. Bioprocesso para produção de biomassa e proteases por *Lentinus citrinus*. **Monografia**, Bacharel em Ciências Biológicas - Genética e Biotecnologia. Universidade Federal do Amazonas-UFAM.

SOUZA, E. 2004. Cultivo axênico de Cogumelos no Brasil. In: II Simpósio Internacional sobre cogumelos no Brasil: **Anais II Internatinal symposium on mushrooms in Brazil**: proceedings/editores técnicos, Arailde Fontes Urben, John Kennedy Pinho Santos. – 2. Ed. – Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Embrapa Informação Tecnológica, 198p.: il.

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

STURION, G.L.; OETTERER, M. 1995. Composição química de cogumelos comestíveis (*Pleurotus* spp.) originados em diferentes substratos. **Ciê. Tecnol. Alim.**15: 189-193.

TISDALE, T.E.; MIYASAKA, S.C.; HEMMES, D.E. Cultivation of the oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on wood substrates in Hawaii. 2006. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.22.p.201-206.

TONINI, R.C.G.; SANTOS,F.;ISHIKAWA, N.K.; TAVARES, L.B.B. Utilização de bainha de palmito (*Euterpe edulis*) Mart. Arecaceae como substrato de frutificação para o cultivo axênico de *Lentinula edodes* (Beck.) Pegler. 2007. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5,supl.2, p. 204-206.

TORO, G. V. D.; ; VEJA, R.C.; GARIN-AGUILAR, M.E.; LARA, H.L. 2006. Biological quality of proteins from three strains of *Pleurotus* spp. **Food Chem.**, v. 94, p. 494-497.

UFAM. Universidade Federal do Amazonas (Manaus, AM). Processo de produção de cogumelo comestível utilizando resíduos vegetais de cupuaçu, cogumelo comestível obtido e uso de resíduos vegetais de cupuaçu como substrato para crescimento de cogumelos. PII102270-1, 25 Maio 2011.

WANG, D.; SAKODA, A.; SUZUKI, M. 2001. Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. **Bioresource Technology**, v.78, p.293-300.

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

YILMAZ, N.;SOLMAZ,M.; TÜRKEKUL, I. E ELMASTAS, M. 2006. Fatty acid composition in some wild edible mushrooms growing in the middle Black Sea region of Turkey. **Food Chemistry**, v.99, p.168-174.

ZADRAZIL, F. 1978. Cultivation of *Pleurotus*. In the biology and cultivation of edible Mushrooms. (Edi Chang S.T and Hayes, W.A).pp 521-538. **Acadenmc press**, New York.

ZHANG R, LI X, FADEL JG. 2002. Oyster mushroom cultivation with rice and wheat straw. **Bioresource Technol.**;82:277–84.

NARAYANASAMY, P.; SUGANTHAVEL, P.; SABARI, P.; DIVYA, D.; VANCHINATHAN, J.; KUMAR, M. 2009. Cultivation Of Mushroom (Pleurotus Florida) By Using Two Different Agricultural Wastes In Laboratory Condition. **The Internet Journal of Microbiology**. Vol. 7 n.2.

## Produção e caracterização de protease coagulante de basidiomas de *Pleurotus florida* DPUA 1534

Silva Neves, K.C.<sup>a</sup>; Palheta, R.A.<sup>b</sup>; Teixeira, M.F.S.<sup>b</sup>; Porto, A.L.F.<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Manaus, AM

<sup>b</sup> Coleção de Cultura DPUA/UFAM, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM

<sup>c</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE

### RESUMO

As proteases microbianas representam aproximadamente 60% do mercado mundial de enzimas e têm aplicação em diferentes segmentos industriais, a exemplo da quimosina, comumente utilizada no processo de coagulação enzimática do leite na produção de queijo. Este trabalho teve como objetivo a produção e caracterização parcial do extrato bruto proteolítico coagulante de *Pleurotus florida* DPUA 1534. O extrato enzimático de *P. florida* DPUA 1534 expressou alta atividade coagulante (AC) e baixa atividade proteolítica (AP), numa razão coagulante de 2,15. A atividade ótima foi encontrada em pH 7,0 e a 40 °C. A estabilidade dessas enzimas foi observada entre 25 °C e 40 °C e em pH levemente ácido, com retenção da atividade em torno de 27 a 46%. O extrato enzimático mostrou susceptibilidade aos inibidores das classes de serino-protease (85%), metaloprotease (91%), cisteíno-protease (90%) e protease aspártica (92%). O composto mais eficaz foi Pepstatin A, sugerindo a presença de protease aspártica, enzimas que apresentam resíduos aspárticos no sítio ativo, indicando a possibilidade de sua aplicação na indústria de laticínios.

**Palavras-chave:** proteases coagulantes; caracterização; *Pleurotus florida* DPUA 1534

---

### 1. INTRODUÇÃO

O uso de enzimas como catalisadores em processos industriais mostra-se vantajoso, pois são específicas, naturais e geralmente não apresentam toxicidade, características desejáveis tanto para a indústria quanto para a integridade do meio ambiente (ESPOSITO; AZEVEDO, 2010; COSTA et al, 2012).

Na indústria de laticínios, o coalho, protease de origem animal, apresenta capacidade de coagular o complexo caseínico do leite, hidrolisando a ligação peptídica Fenilalanina<sub>105</sub>-Metionina<sub>106</sub> para gerar κ-caseína e macropeptídeos, com aplicação fundamental na fabricação do queijo (KETHIREDDIPALLI et al, 2010).

Em virtude da grande demanda do consumo de queijos, preocupações éticas associadas à produção de coalhos extraídos do abomaso de bezerros têm levado à busca

por substitutos. Atualmente apenas 20 a 30% da demanda de coagulante do leite pode ser coberto pelo coalho, levando à utilização de outros coagulantes. Diversos países buscam encontrar novos coagulantes para o leite e contribuir com a redução dos custos e aumentar a oferta para a indústria de laticínios (BRUNO et al, 2010; JACOB et al, 2011).

As proteases coagulantes do leite podem ser de origem animal, como a quimosina e a pepsina; de origem vegetal, como a cardosina extraída da flor do cardo – *Cynara* sp.; ou de origem microbiana como quimosina obtida de organismos geneticamente modificados. A quimosina (EC 3.4.23.4) extraída do quarto estômago de bezerros é a protease preferida na produção do queijo devido à sua alta especificidade pela caseína, característica que proporciona que essa enzima seja a mais utilizada na coagulação do leite (RAO et al, 1998; CHAZARRA et al, 2007; PONTUAL et al, 2012).

A biotransformação de resíduos agroindustriais por fungos é uma alternativa biotecnológica para obtenção potencial de produtos com alto valor agregado e subprodutos de interesse econômico como as enzimas (SILVA et al, 2012). Cogumelos comestíveis são fungos superiores de fácil acesso, que tem valor nutricional e gastronômico bem conhecido, assim como também sintetizam e excretam compostos bioativos para diversas aplicações biotecnológicas (ELISASHVILI, 2012).

O presente trabalho tem como objetivo produzir e caracterizar extrato proteolítico obtido a partir da produção de *Pleurotus florida* DPUA 1534 em resíduos vegetais da Amazônia para aplicação como coagulante na indústria de laticínios.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1 Obtenção do basidioma**

#### *Reativação da cultura*

O isolado de *Pleurotus florida* DPUA 1534 foi cedido pela Coleção de Culturas do Departamento de Parasitologia da Universidade do Amazonas (DPUA), filiada ao World Data Centre for Microorganisms (WDCM) sob o n°. 715.

A reativação da cultura, preservada em óleo mineral, foi realizada pela transferência de fragmentos do micélio, para meio BDA (batata-dextrose-ágar), suplementado com YE (extrato de levedura) 0,5% (p/v) e incubado a 25 °C por 8 dias.

### *Produção do inóculo por fermentação submersa*

O inóculo foi obtido por fermentação submersa em frascos de Erlenmeyers contendo 50 mL de GYP (glicose, extrato de levedura, peptona). Nos frascos foram inoculados 20 discos miceliais ( $\varnothing = 10$  mm). A fermentação foi conduzida em agitador orbital, a 150 rpm, durante 5 dias. A biomassa de *Pleurotus florida* DPUA 1534 foi recuperada por filtração em peneira tipo crivo e transferida para o meio sólido.

### *Produção de basidiomas em cultivo axênico por fermentação semi-sólida*

O substrato foi composto por 90% de casca de cupuaçu (CC) e 10% de farelo de arroz (FA) e foram tratados (limpeza e esterilização) conforme padronização utilizada na coleção de cultura DPUA.

A fermentação semi-sólida foi conduzida conforme as recomendações de Castillo (2009). Após o período de produção foi realizada a colheita dos basidiomas de *Pleurotus florida* DPUA 1534 para posterior extração enzimática.

## **2.2 Extração da enzima proteolítica**

A extração enzimática foi realizada em Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de água destilada esterilizada a 121 °C por 15 minutos. Nos frascos foram inoculados 2g do basidioma triturado. A extração foi conduzida em agitador orbital, a 150 rpm, durante 12 horas a 25 °C. Após filtração dos extratos em tecido de algodão, os mesmos foram acondicionados em tubos falcon e armazenados a -20 °C.

## **2.3 Determinação da atividade proteolítica**

Para determinação da atividade proteolítica do extrato bruto de *P. florida* DPUA 1534 foi seguida a metodologia de Leighton et al (1973).

## **2.4 Determinação da atividade coagulante**

A atividade coagulante do extrato de *P. florida* DPUA 1534 foi determinada conforme o procedimento padronizado por Dahot et al (1990). A solução do substrato foi composta por uma solução 10% (p/v) de leite em pó desnatado e  $\text{CaCl}_2$  0,05 M foi utilizado como solvente.

A unidade de atividade de coagulação ou força do coagulante (F) do extrato foi definida como a quantidade de enzima que coagula 5,0 mL de leite em 40 minutos a 40 °C. conforme a seguinte fórmula: 
$$F = \frac{V * 2400}{v * t}$$

Onde:

F= Força do coagulante

V= volume de leite utilizado (mL)

v= volume de extrato utilizado (mL)

t= tempo inicial da coagulação (segundos)

## **2.5 Efeito do pH na atividade e estabilidade de protease**

Para determinar o efeito do pH na atividade proteolítica, o sistema de reação e o branco foram preparados em duplicata, utilizando-se azocaseína 1% (p/v) como substrato nas soluções tampões: Solução tampão citrato 0,1 M (pH 4-6), solução tampão fosfato 0,1M (pH 6-8) e Solução tampão Carbonato-bicarbonato de sódio 0,1M (pH 9-10), e incubados por 1 hora e após esse período foi determinada a atividade da protease.

Para os ensaios de estabilidade ao pH a solução da enzima foi incubada nas diferentes soluções tampões citadas acima. O tempo de incubação das amostras foi de 0 a 120 minutos para cada faixa de pH, determinando-se atividade enzimática a cada 30 minutos.

## **2.6 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade de protease**

Para avaliar o efeito da temperatura na atividade proteolítica, o sistema de reação e o branco foram realizados em triplicata e incubados a 25 °C, 37 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C e 80 °C por 1 hora e depois determinada a atividade enzimática. Para os ensaios de estabilidade o extrato enzimático foi incubado às temperaturas (25 °C, 37 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C e 80 °C) e o tempo de incubação das amostras foi de 0 a 120 minutos para cada temperatura, determinando-se atividade enzimática a cada 30 minutos.

## **2.7 Efeito de inibidores**

Para determinar a classe e a especificidade da protease, o extrato da enzima foi

incubado durante 60 minutos a 37 ° C com os inibidores e, em seguida, foi determinada a atividade enzimática. Foram utilizados 0,1 mM de phenylmethylsulphonylfluoride (PMSF), 0,1 mM de pepstatina A, 0,1 mM benzamidina solução em dimetilsulfóxido (DMSO), 0,1 mM de etilenodiamina tetracético (EDTA) e ácido iodoacético 0,1 mM.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade das proteases do extrato bruto do basidioma de *Pleurotus florida* DPUA 1534 foi de 31,42U/mL. A atividade coagulante foi igual a 67,68 UAC e a razão coagulante igual a 2,15. A razão coagulante é uma expressão significativa para selecionar coagulante para aplicação industrial, todavia o valor deste índice deve ser maior que 1, ou seja, expressar atividade coagulante maior do que a proteolítica, pois o alto valor na atividade proteolítica pode ocasionar sabor amargo no queijo (SHAMTSYAN et al., 2012).

Diversos extratos têm sido testados na busca de novas enzimas coagulantes para aplicação na fabricação de queijo, principalmente as de fungos microscópicos, todavia dos macrofungos os estudos são raros. Alguns trabalhos citam espécies do gênero *Pleurotus* como produtoras de enzimas coagulantes como é o caso de *P. sajor-caju*, *P. ostreatus*; *P. eryngii*, no entanto na Amazônia pesquisas são inexistentes (WANG & NG, 2001; MOHARIB, 2007).

Os resultados da caracterização enzimática estão descritos nas Figuras 1 e 2. Os dados demonstram que a 40 °C as enzimas expressaram a temperatura ótima de atividade (Figura 1A). Destaca-se que a temperatura entre 30-40 °C é comum nos processos de coagulação de diversos queijos. Além disso, a temperatura ótima de atividade destas proteases coagulantes de *P. florida* DPUA 1534 foi similar a da quimosina purificada, conforme as citações de El Baky et al (2011).

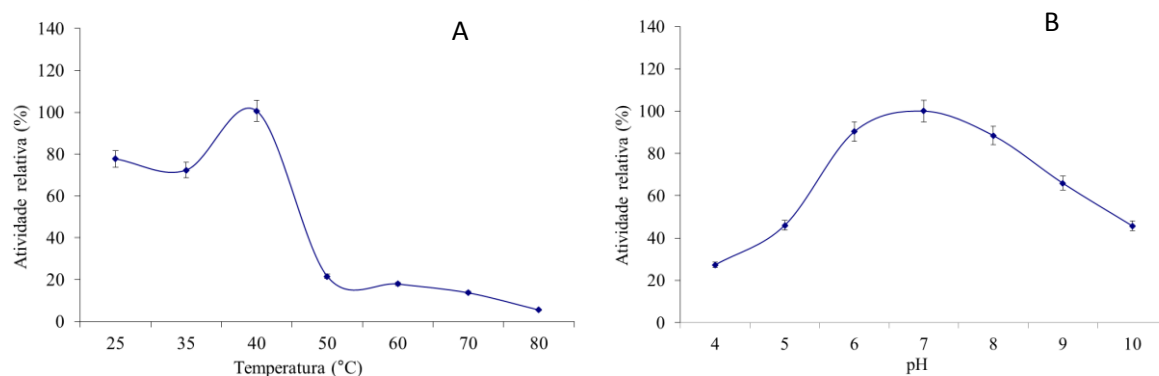
Em relação ao pH foi observado que as enzimas de *Pleurotus florida* DPUA 1534 foram ativas na faixa de pH 4 a 10, mas apresentaram atividade ótima em pH 7, permanecendo ativas em pH ácido a levemente ácido. Em pH levemente ácido (4 e 5) foi verificado que a atividade das enzimas foi de aproximadamente 27% a 46%. Já no pH levemente neutro (6 e 7) foi de 88% a 90% (Figura 1B). A atividade enzimática em ampla faixa de pH possibilita aplicação em diferentes ramos da indústria.

Estes resultados estão em concordância com os encontrados na literatura, uma vez que espécies do gênero *Pleurotus* apresentaram enzimas coagulantes com atividade



na faixa de pH desde o levemente ácido pH 5,0 para *Pleurotus eryngii* ao neutro pH 7 e 8 para *Pleurotus ostreatus* (WANG & NG, 2001).

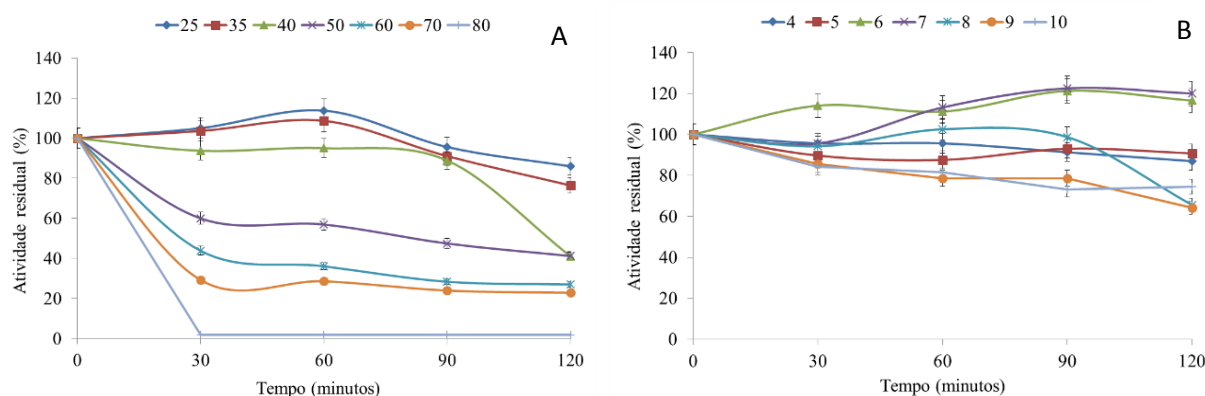
Figura 1. Temperatura ótima (A) e pH ótimo (B) do extrato bruto de *Pleurotus florida* DPUA 1534.



Na Figura 2 está demonstrado o perfil da termoestabilidade das proteases as quais apresentaram maior estabilidade quando o extrato foi submetido a 25 °C, 35 °C e 40 °C, retendo entre 100% e 114% da atividade durante os primeiros 60 minutos de incubação. Porém, quando submetido a 50 °C, 60 °C, 70 °C e 80 °C observou-se um decréscimo acentuado (80%) da atividade das proteases nos primeiros 30 minutos (Figura 2A).

Quanto ao pH observou-se que em todas as faixas de pH testados (4 a 10), as enzimas apresentaram cerca de 80% a 100% da atividade nos primeiros 90 minutos de incubação e retenção de cerca de 70% da atividade ao final dos experimentos (Figura 2B), demonstrando alta estabilidade. Enzimas coagulantes produzidas por *Pleurotus ostreatus* foram mais estáveis em pH 5 e as de *Pleurotus eryngii* bastante resistentes em faixa de pH 4 a 12 (WANG & NG, 2001). As características das enzimas de *P. florida* DPUA 1534 proporcionam a sua aplicação nos diferentes ramos da indústria, especialmente como coagulantes do queijo.

Figura 2. Estabilidade da temperatura (A) e do pH (B) do extrato bruto de *Pleurotus florida* DPUA 1534.



Nos ensaios de inibição (Tabela 1), as proteases de *P. florida* DPUA 1534 mostraram sensibilidade a todas as substâncias testadas, fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) e Pepstatin A, com variação da taxa de inibição de 85 a 92%. Destes, o composto mais eficaz foi Pepstatin A, sugerindo a presença de protease aspártica, enzimas que apresentam resíduos aspárticos no sítio ativo, indicando a possibilidade de sua aplicação na indústria de laticínios. Protease aspártica com atividade coagulante também já foi identificada em basidiomas de *Pleurotus eryngii* (Wang e Ng, 2001). A atividade de coagulação do leite está relacionada à presença de protease aspártica ou de serino proteases (PONTUAL et al., 2012; MAZORRA-MANZANO et al., 2013; MAZORRA-MANZANO et al., 2013; SABOTIC et al., 2007; SHAH et al., 2013).

Tabela 1. Efeito de inibidores na atividade de *Pleurotus florida* DPUA 1534.

Inibidor	Inibição (%)	Classe de enzimas inibidas
Controle (sem inibidor)	0	
EDTA	91	Cistéino
PMSF	85	Serino
Pepstatin A	92	Aspártica
Ácido Iodoacético	90	Metaló

Condições para análise: 60 minutos a 37 ° C.

#### 4. CONCLUSÃO

A caracterização do extrato bruto de *Pleurotus florida* DPUA 1534 sugeriu a presença de diferentes classes de protease. O extrato bruto mostrou atividade ótima em pH 7,0 e temperatura ótima a 40 °C. Demonstrou estabilidade entre 25 °C e 40 °C e em pH levemente ácido, com retenção da atividade em torno de 27 a 46%. Os resultados deste estudo sugerem a possibilidade da aplicação dessa protease coagulante na indústria de laticínios.

#### REFERÊNCIAS

- ALVES, T.M.D. et al. Biological screening of Brazilian medicinal plants. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v.95, n.3, p.367-73, 2000.
- BRUNO, M. A.; LAZZA, C. M.; ERRASTI, M. E.; . LOPEZ, L.M.I.; CAFFINI, N.O.; PARDO, M. F. Milk clotting and proteolytic activity of an enzyme preparation from *Bromelia hieronymi* fruits. **Food Science and Technology**. v. 43, 695–701p., 2010.
- CASTILO T.A. 2009. Basidiomicetos: caracterização fisiológica, produção de biocompostos e biomassa em substrato agroflorestal amazônico. Tese doutorado de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal do Amazonas.
- CHAZARRA, S., SIDRACH, L., LÓPEZ-MOLINA, D., RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J. N. Characterization of the milk-clotting properties of extracts from artichoke (*Cynara scolymus*, L.) flowers, *International Dairy Journal*, v.17, pp.1393–1400, 2007.
- COSTA, L. N. F.; MAGALHÃES, E. A.; MOTA, L. G. S. M.; ALMEIDA, L. M.; GUEDES, M. I. F.; MAGALHÃES, F. E. A. Bioprospecção de atividade lipolítica de fermentos biológicos comerciais (*Saccharomyces cerevisiae*) Dr. Oetker e Dona Benta. **Revista de Biologia e Farmácia**. v. 7, n. 1, 2012.
- DAHOT MU, KHAN MY, MEIMON N.A. Screening of some Pakistani Plants for milk clotting activity. **J. Islamic Acad. Sci.**, 3(4): 284-286, 1990.
- EL-BAKY, H.A.; LINKE, D.; NIMTZ, M.; BERGER, R.G. PsoP1, a milk-clotting aspartic peptidase from the basidiomycete fungus *Piptoporus soloniensis*. *J. Agric. Food Chem.* 28 (18), 10311-10316, 2011.
- ELISASHVILI, V. Submerged cultivation of medicinal mushrooms: bioprocesses and products (review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, 14 (3), 211–239, 2012.
- ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. 2 ed. Caxias do Sul: EducS, 2010.

FONTENELLE, A.J. et al. A Avaliação da toxicidade de extratos de plantas medicinais através de bioensaio com *Artemia salina* Leach. **Ciência e Cultura**, v.40, n.11, p.1109-11, 1988.

GRACIOLLI, L. A.; CAETANO, C.S.P.S.; LEONEL, M.; AGUIAR, E.B. Cultivo do cogumelo comestível *Pleurotus florida* em ramas de mandioca. **Revista Raízes e Amidos Tropicais**, Botucatu, v.6. p.26-39, 2010.

HATTI-KAUL, R. Aqueous two-phase systems. Hatti-Kaul, R. (editor). Methods in biotechnology - Aqueous two-phase systems : **Methods and protocols**. Human Press: New Jersey, v. 11, p. 1-10, 1999.

JACOB, M., JAROS, D., & ROHM, H. Recent advances in milk clotting enzymes. **International Journal of Dairy Technology**, 64, 14e32. 2011.

JAOUADI B, ABDELMALEK B, FODIL D, FERRADJI FZ, REKIK H, ZARAÏ N. Purification and characterization of a thermostable keratinolytic serine alkaline proteinase from *Streptomyces* sp. strain AB1 with high stability in organic solvents. **Bioresour Technol**. 101: 8361-8369, 2010.

KAVITHA A, PRABHAKAR P, VIJAYALAKSHMI M, VENKATESWARLU. Comparison of the milk-clotting properties of three plant extracts Miguel A. Mazorra-Manzano a,†, Teresa C. Perea-Gutiérrez a, María E. Lugo-Sánchez b, Juan C. Ramirez-Suarez b, María J. Torres-Llanez a, Aarón F. González-Córdova a, Belinda Vallejo-Cordoba. **Food Chemistry**. 41 1902–1907. 2013.

KETHIREDDIPALLI, P.; HILL, A.R.; DALGLEISH, D.G Protein interactions in heat-treated milk and effect on rennet coagulation. **International Dairy Journal**, 20 (12) pp. 838–843, 2010.

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*. **J. Mol. Biol.**, (76): 103-122. 1973.

MEYER B.N. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med**. 45:31-4, 1982.

MAZORRA-MANZANO, M. A.; MORENO-HERNÁNDEZ, J. M.; RAMÍREZ-SUAREZ, J. C.; TORRES-LLANEZ, M. J.; GONZÁLEZ-CÓRDOVA, A. F.; VALLEJO-CÓRDOBA, B. Sour orange *Citrus aurantium* L. flowers: A new vegetable source of milk-clotting proteases. **LWT - Food Science and Technology**, 54, p. 325-330. 2013.

MCLAUGHLIN, JL. The use of biological assays to evaluate botanicals. **Drug Inf J**. 32:513-24.1998.

PONTUAL, E. V.; CARVALHO, B.E.A.; BEZERRA, R.S.; COELHO, L.C.B.B.; NAPOLEÃO, T.H.; PAIVA, P.M.G. Caseinolytic and milk-clotting activities from *Moringa oleifera* flowers. **Food Chemistry** 135, 1848–1854, 2012.

RAO, M.B., TANKSALE, A.M., GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 62, 597-635p. 1998.

RAVIKUMAR, G.; GOMATHI D.; KALAISELVI M.; UMA, C. A protease from the medicinal mushroom *Pleurotus sajor-caju*; production, purification and partial characterization \* Department of Biochemistry, Karpagam University, Coimbatore - 641 021 India Asian Pacific **Journal of Tropical Biomedicine**, S411-S417. 2012.

RUIZ, A.L.T.G. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.2, p.98-102, 2005.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnol Adv** 27:85–194, 2009.

MANZOOR AHMAD SHAH, SHABIR AHMAD MIR, MOHD AMIR PARAY. Plant proteases as milk-clotting enzymes in cheesemaking: a review. **Dairy Science & Technology**. July, 2013.

SCHMIDT, A. S., VENTON, A. M., ASENJO, J. A. Partitioning and purification of  $\alpha$ -amylase in aqueous two-phase systems. *Enz. Microb. Technol.*, Surrey, v.16, p.131-142, 1994.

SILVA, J. J. da; SANTANA, T. T.; OLIVEIRA, A. C. C.; ALMEIDA, P. H. ; SOUZA, S. G. H.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B.; VALLE, J. S. Produção de lacase de fungos basidiomicetos por fermentação submersa com casca de café. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.** UNIPAR, Umuarama, v. 15, n. 2, supl. 1, p. 191-196, jul./dez. 2012.

SILVA, T. V. Z. M. T. Estudo do Efeito da Concentração Caseínica na Aptidão do Leite para a Coagulação Enzimática. Relatório do Trabalho de Fim de Curso de Engenharia Alimentar. Lisboa. p..74 il.,2004.

SOLIS, P. et al. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina*. **Planta Medica**, v.59, n.3, p.250-2, 1993.

TREMACOLDI, C. R.; CARMONA, E. C. Production of extracellular alkaline proteases by *Aspergillus clavatus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, n.2, p.169–172, 2005.

TROTTER, R.T. et al. Ethnography and bioassay: combined methods for a preliminary screen of home remedies for potential pharmacological activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.8, n.1, p.113-9, 1983.

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

## Caracterização toxicológica *in vivo* e *in vitro* do extrato proteolítico dos basidiomas de *Pleurotus florida* DPUA 1534

Silva Neves, K.C<sup>a</sup>; Palheta, R.A<sup>b</sup>; Silva, T.A<sup>b</sup>; Alecrim, M.M<sup>b</sup>; Teixeira, M.F.S<sup>b</sup>; Porto, A.L.F<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Manaus, AM

<sup>b</sup> Coleção de Cultura DPUA/UFAM, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM

<sup>c</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE

### RESUMO

Os cogumelos do gênero *Pleurotus* produzem proteases que podem ser utilizadas nas indústrias de laticínios, entretanto é necessário que o novo aditivo passe por uma série de avaliações toxicológicas. Portanto o objetivo desse trabalho foi avaliar a toxicidade *in vitro* e *in vivo* do extrato proteolítico de *Pleurotus florida* DPUA 1534 para o uso seguro em seres humanos. Foram realizados os testes de toxicidade frente à *Artemia salina*, de atividade hemolítica *in vitro* do extrato proteolítico em sangue comercial e de toxicidade aguda do extrato proteolítico de *P. florida* DPUA 1534 sobre os parâmetros clínicos, bioquímicos e hematológicos de ratos Wistar. Os resultados demonstraram que *P. florida* DPUA 1534 produz proteases com atividade biológica frente à *A. salina* e em sangue de carneiro comercial. O teste *in vivo* indicou que o extrato de *Pleurotus florida* DPUA 1534 quando administrado na dose de 1000 mg.Kg<sup>-1</sup> em ratos Wistar, não levou a óbito ou produziu sinais clínicos de toxicidade em nenhum dos animais tratados, não promoveu alterações significativas dos parâmetros hematológicos e bioquímicos, e as análises histológicas revelaram que não houve toxicidade aguda nas condições do experimento. Portanto, o extrato de *P. florida* DPUA 1534 apresenta potencial para utilização como aditivo alimentar.

**Palavras-chave:** *Pleurotus florida* DPUA 1534, toxicidade, extrato proteolítico

---

### 1. INTRODUÇÃO

Entre as enzimas hidrolíticas produzidas por *Pleurotus*, as proteases são as de maior valor econômico e maior comercialização para diversos fins, como aditivo para melhorar ou transformar produtos alimentícios, na indústria farmacêutica, no processamento de couro, na recuperação de prata de filmes de raios-x, tratamento de resíduos industriais e como aditivos de detergentes (RODARTE et al, 2011).

Contudo, o conhecimento do potencial tóxico de compostos com atividade biológica de cogumelos comestíveis ainda são escassos. O extrato aquoso de *Agaricus sylvaticus* quando a atividade hemolítica foi determinada em eritrócitos humanos não

observaram ação tóxica, sendo assim classificado como seguro para o consumo humano (ORSINE et al., 2012).

Em outra investigação quando avaliado o micélio de *Lentinus edodes* foi observado que o extrato testado em ratos Wistar, com doses diárias de 2000 mg/kg, durante 28 dias não houve ação tóxica significativa, diagnóstico confirmado através dos exames hematológicos, bioquímico sérico, peso dos órgãos, autópsia e histopatologia (YOSHIOKA et al., 2010).

Dos representantes do gênero *Pleurotus*, *Pleurotus florida* é um cogumelo comestível que ocorre em regiões de clima tropical e subtropical, seus basidiomas são brancos de textura e sabor agradável, sendo também citado como fonte de diversos compostos com atividade biológica (SHASHIREKHA et al., 2005; REIS et al., 2010).

Nas duas últimas décadas tem aumentado a pesquisa abrangendo espécies de *Pleurotus*, não só pelo valor nutricional e medicinal, mas também pela importância que esses fungos têm como fonte de aditivos alimentares, entre outros compostos para aplicação nos diversos ramos industriais. Contudo, outras abordagens são exigidas para exploração mais profunda das propriedades dos extratos, basidiomas e do micélio devido o potencial biotecnológico desses macrofungos (PATEL et al., 2012).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade *in vitro* e *in vivo* do extrato proteolítico de *Pleurotus florida* DPUA 1534.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Material biológico**

O isolado de *Pleurotus florida* DPUA 1534 foi cedido pela Coleção de Culturas do Departamento de Parasitologia da Universidade do Amazonas (DPUA), filiada ao World Data Centre for Microorganisms (WDCM) sob o n°. 715.

As culturas, preservadas em óleo mineral, foram reativadas pela transferência de fragmentos do micélio para batata-dextrose-ágar suplementado com extrato de levedura 0,5% (p/v) (BDA+YE), pH 6,0 e incubadas a 25°C por 8 dias.

Os basidiomas de *Pleurotus florida* DPUA 1534 foram produzidos em substrato natural de casca de cupuaçu suplementado com farelo de arroz 10%, com inóculo de 20 discos miceliais ( $\varnothing$ = 10 mm, cada). Os basidiomas *in natura* foram desidratados a 40°C e triturados.

## 2.2 Preparação do extrato proteolítico

Para extração das proteases 2g dos basidiomas foram transferidos para 50 mL de água destilada esterilizada. A extração foi realizada sob agitação (150 rpm), a 25 °C por 12 horas. O extrato bruto foi recuperado por filtração em tecido de algodão e em seguida centrifugado a 8000 x g por 10 minutos, a 4 °C.

## 2.3 Determinação da atividade de protease

A atividade proteolítica foi determinada conforme metodologia recomendada por Leighton et al (1973).

## 2.4 Bioensaio de toxicidade do extrato proteolítico bruto de *Pleurotus florida* DPUA 1534 frente à *Artemia salina*

O bioensaio com *Artemia salina* foi baseado na técnica descrita por Atayde et al (2011). Para determinação da porcentagem de indivíduos mortos foi utilizada a Equação I. Para o cálculo da determinação da CL<sub>50</sub> os valores da toxicidade foram convertidos utilizando-se os valores da tabela de Probit e a partir dos valores encontrados foi determinada a CL<sub>50</sub>.

Equação I:

$$\text{Mortalidade (\%)} = \frac{\text{número de indivíduos mortos}}{\text{número total de indivíduos}}$$

## 2.5 Ação citotóxica do extrato proteolítico em sangue comercial de carneiro

A atividade hemolítica do extrato bruto de *Pleurotus florida* DPUA 1534 contra hemácias de carneiro foi realizada pela técnica de hemólise em tubos contendo sangue de carneiro desfibrinado (Ebefarma) (CARNEIRO et al, 2011). Para determinação do índice de hemólise (Equação II) e o cálculo da concentração que produz 50% de hemólise (CH<sub>50</sub>), a leitura foi realizada a 540 nm após 60 minutos e 24 horas.

Equação II:

$$\text{Hemólise (\%)} = \frac{\text{Absorvância (teste)} - \text{Absorvância (HM)}}{\text{Absorvância (HT)} - \text{Absorvância (HM)}} \times 100$$



Onde:

HM- hemólise mecânica

HT- hemólise total

## **2.6 Avaliação de toxicidade aguda do extrato proteolítico de *Pleurotus florida* DPUA 1534 em ratos Wistar**

Para os testes *in vivo* de toxicidade aguda do extrato proteolítico de *Pleurotus florida* DPUA 1534 foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), saudáveis, adultos, machos e fêmeas, pesando em média  $233,22 \pm 41,83$ g, cedidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Amazonas/UFAM.

Os animais foram divididos em 2 grupos de fêmeas (n=3) e 2 grupos de machos (n=3), teste e controle, totalizando 12 ratos. Após sete dias de aclimação, os animais foram tratados por via oral (gavagem gástrica) com doses únicas do extrato proteolítico de *Pleurotus florida* DPUA 1534 [solução aquosa ( $1000 \text{ mg.Kg}^{-1}$ )], enquanto os grupos controles receberam apenas água. A avaliação clínica dos animais foi realizada durante 14 dias. Os sinais de toxicidade foram medidos por observação direta e registrados nos intervalos 0, 15, 30 e 60 minutos e a cada 4 horas (durante 24h) e diariamente até o 14º dia. O ganho de massa corpórea e o consumo de ração também foram registrados diariamente para acompanhamento da evolução ponderal dos animais.

Ao final do experimento os animais foram anestesiados e após perda dos reflexos dos indivíduos realizou-se a laparotomia longitudinal da cavidade abdominal para a coleta do sangue dos animais (2,5 mL) via punção cardíaca seguida de necrópsia para avaliação da morfologia macroscópica externa dos órgãos. O sangue coletado foi utilizado para as análises hematológicas [leucometria, hematimetria, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), *red cell distribution width* (RDW) e plaquetas] e bioquímicas [glicose, ácido úrico, bilirrubinas, creatinina, fosfatase alcalina,  $\gamma$ -glutamil transferase ( $\gamma$ -GT), transaminase glutâmico oxalacética (TGO/AST), transaminase glutâmico pirúvica (TGP/ALT), triglicerídeos e uréia]. O presente trabalho foi aprovado no Comitê de Ética no uso de Animais da Universidade Federal do Amazonas, protocolo 054/2011 (ANEXO I).

### 3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

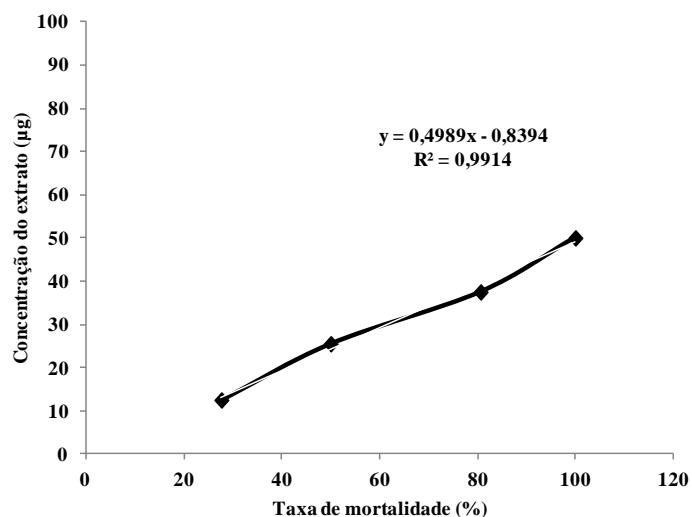
Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey (5%), utilizando o programa Minitab versão 16.0. Para os cálculos das  $CL_{50}$  e  $CH_{50}$  foi feita a análise de regressão Probit.

### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas análises de toxicidade no extrato bruto liofilizado e reconstituído em água destilada esterilizada, o valor da atividade proteolítica encontrado foi 46,73 U/mL. Quando este extrato foi avaliado frente à *Artemia salina*, 25,5 µg (Figura 1) foi a concentração que causou a mortalidade de 50% das larvas ( $CL_{50}$ ). Este dado provavelmente esteja associado à presença de outros compostos bioativos no extrato bruto proteolítico de *P. florida* DPUA 1534.

*Artemia salina* apresenta alta sensibilidade a uma ampla gama de compostos bioativos manifestada pela atividade tóxica no microcrustáceo (YOGA et al. (2007b); SASIDHARAN et al, 2011). Além disso, este método demanda pequenas quantidades de amostras que podem ser testadas em grande escala. Os extratos são considerados inativos quando todas as larvas sobreviverem a uma concentração de 1000 µg/ml (MEYER et al, 1982). Nieto et al. (2008) estudando extratos obtidos de basidiomas de diferentes espécies de *Pleurotus* encontraram concentração letal ( $CL_{50}$ ) maiores do que 1000µg. Segundo Meyer et al (1982) extratos brutos que apresentam  $CL_{50}$  superior a esse valor são considerados atóxicos.

Figura 1. Determinação da  $CL_{50}$  do extrato de *Pleurotus florida* DPUA 1534 frente ao microcrustáceo *Artemia salina*.



Os resultados referentes ao teste de hemólise *in vitro* (Tabela 1) mostraram que quando utilizado 0,1mL do extrato de *P. florida* DPUA 1534, não foi observada hemólise, provavelmente devido à reduzida concentração do biocomposto no extrato analisado. Entretanto, o extrato apresentou atividade positiva nas demais concentrações testadas, registrando-se variação em ordem crescente em relação à concentração do extrato. Entre as doses avaliadas, a partir 0,6 mL foi possível uma visualização mais nítida em relação ao referencial usado para a descrição da atividade hemolítica dos extratos (Figura 2). Dados da literatura mostram que proteínas hemolíticas estão associadas à formação dos primórdios e ao desenvolvimento dos basidiomas (TOMITA et al, 2004; BERNE et al, 2002; SHIBATA et al, 2010). Vários autores sugerem que o cálculo da CL<sub>50</sub> seja válido apenas para substâncias que apresentam uma concentração letal de 1 a 5000 mg/kg. Entretanto, instituições regulatórias internacionais recomendam o limite de 2000 mg/kg para o teste da CL<sub>50</sub> (ORSINE et al, 2012).

Tabela 1. Teste de atividade hemolítica do extrato de *Pleurotus florida* DPUA 1534 em sangue comercial de carneiro. Representação da avaliação da tonalidade vermelha do sobrenadante. C- controle negativo- solução salina) e C+ [controle positivo- Triton x-100 (1%)], HM (hemólise mecânica) e HT (hemólise total). Grau de hemólise: (0= negativo); (+ = muito fraco); (+= fraco); (+= moderado); [controle positivo (++++= total)].

C -	Extrato proteolítico de <i>Pleurotus florida</i> DPUA 1534 (mL)										C+
HM	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	HT
0	0	+	+	++	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++

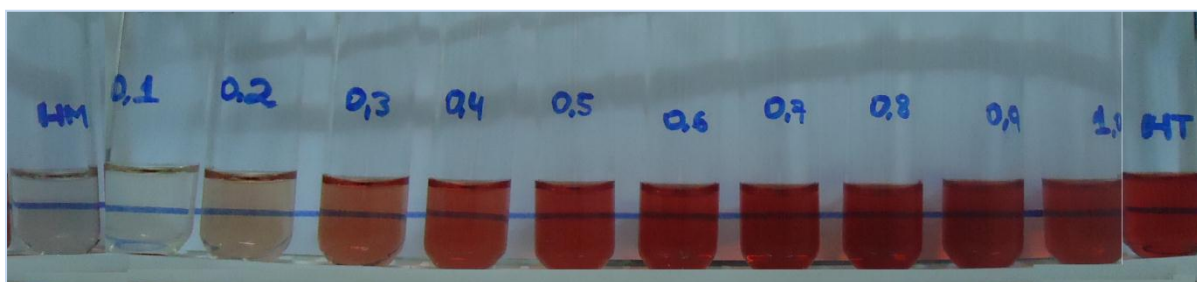


Figura 2. Atividade hemolítica qualitativa dos extratos de *Pleurotus florida* DPUA 1534 em diferentes concentrações utilizando sangue de carneiro desfibrinado comercial.

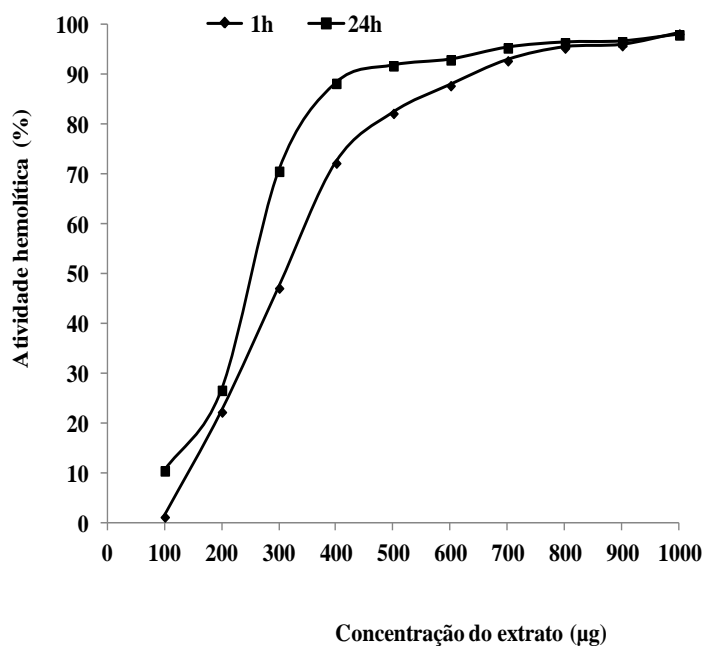
A variação do índice de hemólise durante os períodos de 1h e 24 h conforme a concentração examinada do extrato de *P. florida* DPUA 1534 está demonstrada na Figura 3. A CH<sub>50</sub> foi calculada baseada na equação da reta para o fenômeno observado.

A concentração necessária para causar hemólise de 50% das células durante os dois períodos testados foi de até 363,88 µg em 60 minutos e 241,51 µg em 24 horas.

Trabalhos realizados com diferentes espécies de *Pleurotus* demonstraram a identificação de biomoléculas com atividade hemolítica, proteínas conhecidas como hemolisinas, dentre as espécies foram citadas *Pleurotus ostreatus* (SEPCIC et al, 2003), *Pleurotus eryngii* (NGAI; NG 2006) e *Pleurotus nebrodensis* (LV et al, 2009). Dentre as hemolisinas, a ostreolisina isolada de *Pleurotus ostreatus* foi reportada como um agente hemolítico em sangue humano, bovino e de carneiro (SHIBATA et al, 2010; KURAHASHI et al, 2014).

Estudos indicam que a ação observada por proteínas hemolíticas de espécies de *Pleurotus* acontece em decorrência do aumento da permeabilidade da membrana celular de eritrócitos induzindo assim o extravasamento do íon potássio e a lise dessas células (LV et al., 2009). No entanto, não existem dados sobre a toxicidade de hemolisinas sintetizadas por *P. ostreatus* em consumidores de cogumelo ostra, uma espécie não-tóxica. Além disso, citação da literatura revela que hemolisinas são termo-lábeis e geralmente degradadas no trato gastrointestinal quando ingeridas (OECD, 2013).

Figura 3. Índice de hemólise (%) do extrato de *Pleurotus florida* DPUA 1534 em diferentes concentrações (µg) após os períodos de 1h e 24 h de incubação.



A administração do extrato de *Pleurotus florida* DPUA 1534 na concentração de 1000 mg.Kg<sup>-1</sup> não resultou em nenhum óbito durante o período de observação, como também não interferiu no desenvolvimento ponderal e consumo de ração pelos animais. De acordo com CUNHA et al. (2009), os sinais clínicos de toxicidade podem ser observados em função das alterações de comportamento, apatia e a presença de pelos arrepiados. Nenhum desses sinais foi observado nos grupos teste e controle nas análises realizadas nesta pesquisa.

Os animais que receberam o extrato também não apresentaram alterações macroscópicas nas vísceras (fígado e rins). O ganho de massa corporal (fêmeas que receberam extrato 25,667g ± 7,251g X fêmeas controle 31,833g ± 5,107g e machos que receberam extrato 44,833g ± 13,531g X machos controle 43,667g ± 4,193g) não apresentou alterações significantes.

O extrato de *P. florida* DPUA 1534 não alterou os parâmetros hematológicos avaliados, comparando-se os grupos tratados e os controles (Tabela 2). As alterações bioquímicas são consideradas como uma fonte potencial de indicadores biológicos de efeito. Os dados referentes aos parâmetros bioquímicos obtidos mostraram que não houve variação significativa dos parâmetros analisados quando comparados os resultados do grupo teste com o grupo controle (Tabela 3). Além disso, as análises histológicas posteriores do fígado e rins revelaram que não houve toxicidade do extrato nesses tecidos. Esses dados corroboram com os relatados pela OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development, 2013) onde a administração de extratos aquosos de *Pleurotus ostreatus* em ratos não demonstrou efeitos agudos e a alimentação oral repetida do cogumelo para roedores indicaram ausência de alterações histopatológicas do tecido cardíaco ou hepático (dados não mostrados).

Tabela 2. Análise hematológica do sangue de ratos Wistar, machos e fêmeas, tratados com extrato bruto proteolítico de *Pleurotus florida* DPUA 1534.

Parâmetros	Machos	Controle Machos	Fêmeas	Controle Fêmeas
Leucometria ( $10^6/\text{mm}^3$ )	4.2 <sup>a</sup> ± 1.33	3.2 <sup>a</sup> ± 0.07	3.9 <sup>a</sup> ± 0.14	3.4 <sup>a</sup> ± 0.35
Hematimetria ( $10^6/\text{mm}^3$ )	8.1 <sup>a</sup> ± 0.65	4.8 <sup>a</sup> ± 1.71	7.6 <sup>a</sup> ± 0.05	5.2 <sup>a</sup> ± 0.68
Hemoglobina (g/dL)	15.6 <sup>a</sup> ± 0.40	15.2 <sup>a</sup> ± 0.07	15.0 <sup>a</sup> ± 0.21	14.3 <sup>a</sup> ± 0.80
Hematócrito (%)	44.6 <sup>a</sup> ± 1.81	31.8 <sup>a</sup> ± 7.63	41.45 <sup>a</sup> ± 0.07	30.9 <sup>a</sup> ± 3.00
VCM ( $\mu\text{m}^3$ )	54.0 <sup>a</sup> ± 2.00	66.5 <sup>a</sup> ± 7.77	54.5 <sup>a</sup> ± 0.70	59 <sup>a</sup> ± 2.88
HCM (Pg)	19.1 <sup>a</sup> ± 1.12	33.4 <sup>a</sup> ± 11.59	19.8 <sup>a</sup> ± 0.14	25.8 <sup>a</sup> ± 4.37
CHCM (g/dL)	34.4 <sup>a</sup> ± 1.47	49.3 <sup>a</sup> ± 11.59	36.3 <sup>a</sup> ± 0.63	43.5 <sup>a</sup> ± 5.07
RDW (%)	14.5 <sup>a</sup> ± 0.10	12.8 <sup>a</sup> ± 1.20	14.6 <sup>a</sup> ± 0.07	14.3 <sup>a</sup> ± 0.50
Plaquetas ( $10^6/\text{mm}^3$ )	728 <sup>a</sup> ± 79.57	683.5 <sup>a</sup> ± 27.57	753 <sup>a</sup> ± 113.14	725 <sup>a</sup> ± 21.65

Letras iguais indicam que não há diferenças significativas pelo teste de Tukey (5%).

Tabela 3. Análise bioquímica do sangue de ratos Wistar, machos e fêmeas, tratados com extrato bruto proteolítico de *Pleurotus florida* DPUA 1534.

Parâmetros	Machos	Controle Machos	Fêmeas	Controle Fêmeas
Glicose (mg/dL)	161,67 <sup>a</sup> ± 20,21	167,67 <sup>a</sup> ± 55,72	110,67 <sup>a</sup> ± 26,50	174,00 <sup>a</sup> ± 45,13
Ácido Úrico (mg/dL)	1,46 <sup>a</sup> ± 0,28	1,60 <sup>a</sup> ± 0,36	2,23 <sup>a</sup> ± 1,35	1,43 <sup>a</sup> ± 0,15
Bil. Direta (mg/dL)	0,10 <sup>a</sup> ± 0,02	0,11 <sup>a</sup> ± 0,03	0,08 <sup>a</sup> ± 0,01	0,06 <sup>a</sup> ± 0,01
Bil. Total (mg/dL)	0,06 <sup>a</sup> ± 0,02	0,07 <sup>a</sup> ± 0,01	0,10 <sup>a</sup> ± 0,01	0,06 <sup>a</sup> ± 0,01
Creatinina (mg/dL)	0,66 <sup>a</sup> ± 0,11	0,53 <sup>a</sup> ± 0,05	0,56 <sup>a</sup> ± 0,05	0,53 <sup>a</sup> ± 0,11
Fosf. Alc. (U/L)	265,00 <sup>a</sup> ± 68,46	171,33 <sup>a</sup> ± 12,34	133,00 <sup>a</sup> ± 21,63	135,00 <sup>a</sup> ± 18,25
$\gamma$ -GT (U/L)	22,00 <sup>a</sup> ± 1,00	15,00 <sup>a</sup> ± 3,00	23,00 <sup>a</sup> ± 5,00	18,00 <sup>a</sup> ± 1,73
TGO/AST (U/L)	140,33 <sup>a</sup> ± 32,88	123,00 <sup>a</sup> ± 48,77	113,33 <sup>a</sup> ± 17,79	95,67 <sup>a</sup> ± 18,93
TGP/ALT (U/L)	56,33 <sup>a</sup> ± 10,69	40,00 <sup>a</sup> ± 7,93	36,66 <sup>a</sup> ± 6,42	36,00 <sup>a</sup> ± 7,81
Triglicérides (mg/dL)	46,66 <sup>a</sup> ± 4,72	42,00 <sup>a</sup> ± 2,64	38,66 <sup>a</sup> ± 15,04	42,66 <sup>a</sup> ± 9,50
Uréia (mg/dL)	48,33 <sup>a</sup> ± 5,50	40,66 <sup>a</sup> ± 3,78	48,00 <sup>a</sup> ± 1,73	46,33 <sup>a</sup> ± 2,51

Letras iguais indicam que não há diferenças significativas pelo teste de Tukey (5%).

## 5. CONCLUSÃO

O extrato proteolítico de *Pleurotus florida* DPUA 1534 demonstrou atividade biológica frente à *Artemia salina* e em sangue comercial de carneiro. Já nos testes de toxicidade aguda, não foram observados sinais clínicos de toxicidade em nenhum dos animais tratados, assim como, ocorreu a normalidade dos parâmetros hematológicos e bioquímicos, e a ausência de alterações nas análises histológicas. Portanto, este relato pioneiro do efeito do extrato dos basidiomas de *Pleurotus florida* DPUA 1534, sugere o uso potencial desse cogumelo para utilização como aditivo alimentar.

## REFERÊNCIAS

ATAYDE, H. M. ; CARNEIRO, A. L.B. ; MARTINS, M. S. ; PALHETA, R. A. . Bioensaios de toxicidade com espécies de *Artemia*. In: Maria Francisca Simas Teixeira; Taciana de Amorim Silva; Rosana Antunes Palheta; Ana Lúcia Basílio Carneiro; Hérlon Mota Atayde. (Org.). **Fungos da Amazônia: Uma riqueza inexplorada (Aplicações Biotecnológicas)**. 1 ed. Manaus: EDUA, v. 1, p. 190-207, 2011.

BERNE, S.; KRIZAJ, I.; POHLEVEN, F.; TURK, T.; MACCK, P.; SEPIC, K.; *Pleurotus* and *Agrocybe* hemolysins, new proteins hypothetically involved in fungal fruiting. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1570, p. 153-159, 2002.

CARNEIRO, A. L. B.; OLIVEIRA, V. M. A.; VASQUES, T. G. S.; MAGALHÃES, S. A.; ALVES, L. B.; BRANDÃO, P.C.; FREIRE, R. S.; SILVA, R.F. Testes de citotoxicidade (atividade hemolítica). Capítulo 12. Em: Teixeira *et al.* **Fungos da Amazônia: Uma riqueza inexplorada (Aplicações Biotecnológicas)**. Edua, Fapeam. 2011.

CUNHA, L. C.; AZEREDO, F. S.; MENDONÇA, A. C. V.; VIEIRA, M. S.; PUCCI, L. L.; VALADARES, M. C.; FREITAS, H. O. G.; SENA, A. A. S.; LINO JUNIOR, R. S. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 19 (2A): 403-411, 2009.

KURAHASHI, A.; SATO, M.; KOBAYASHI, T.; NISHIBORI, K.;FUJIMORI, F. Homologous genes, *Pe.pleurotolysin A* and *Pe.ostreolysin*, are both specifically and highly expressed in primordia and young fruiting bodies of *Pleurotus eryngii*. **Mycoscience**. v.55, 113-117p, 2014.

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*. **J. Mol. Biol.**, (76): 103-122. 1973.

LV H.; KONG, Y.; QING Y.; ZHANG, B.; LENG, F.; BIAN, H.; BALZARINI J.; DAMME, E.V.; BAO, J. Nebrodeolysin, a novel hemolytic protein from mushroom

*Pleurotus nebrodensis* with apoptosis-inducing and anti-HIV-1 effects. **Phytomedicine**, 16, 198–205, 2009.

MEYER BN. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med.** 45:31-4, 1982.

NGAI, P.H.; NG,T.B. A hemolysin from the mushroom *Pleurotus eryngii*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**72, 1185–1191, 2006.

NIETO, I. J. R. et al. Determinación de la toxicidad de *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Paxillus involutus* sobre *Artemia salina*. **Rev Iberoam Micol** 2008; 25: 186-187, 2008.

OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development. Consensus document on compositional considerations for new varieties of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*): key food and feeds nutrients, anti-nutrients and toxicants. **Series on the Safety of Novel Foods and Feeds** No. 26, p.42. ENV/JM/MONO 23, 2013.

ORSINE JV, COSTA RV, SILVA RC, SANTOS MF, NOVAES MR. The acute cytotoxicity and lethal concentration (LC50) of *Agaricus sylvaticus* through hemolytic activity on human erythrocyte. **Int J Nutr Metab.** 4(11):19-23, 2012.

PATEL P., DHARMIK, P., NATVARIA, P. Experimental investigation of anti-rheumatoid activity of *Pleurotus sajor-caju* in adjuvant-induced arthritic rats. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 10, n.4, p. 0269 – 0274, 2012.

REIS, M. F.; DUCCA, F.; FERDINANDI, D. M.; ZONETTI P. C.; ROSADO F. R. Análise de substratos alternativos para o cultivo de *Pleurotus ostreatoroseus* e *Pleurotus florida*. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.3, n.2, p. 79-91, maio/ago. – ISSN 1981-9951, 2010.

RODARTE, M.P, DIAS, D.R., VILELA, D.M.; SCHWAN, R.F. Proteolytic activities of bacteria, yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (*Coffea arabica* L. ). **Acta Scientiarum Agronomy** 33: 457-464, 2011.

SASIDHARAN, S.; JINXUAN, O.; LATHA, L.Y.; AMUTHA, S. In vivo toxicity study of *Ganoderma boninense*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**. v. 5(16), p. 1819-1823, 2011.

SEPCIC, K.; BEME, S.; POTRICH,C.; TURK, T.; MACEK, P.; MENES, G. Interaction of ostrolysin, a cytolytic protein from edible mushroom *Pleurotus ostreatus*, with lipid membranes and modulation by lysophospholipids. **Eur. J. Biochem.** 270: 1199-1210. 2003.

SHASHIREKHA, M.N.; RAJARATHNAM, S.; BANO, Z. Effects of supplementing rice straw growth substrate with cotton seeds on the analytical characteristics of the mushroom, *Pleurotus florida* (Block & Tsao). **Food Chemistry**, v.92, p.255-259, 2005.

SHIBATA, T., KUDOU, M.; HOSHI, Y.; KUDO, A.; NANASHIMA, N. Isolation and characterization of a novel two-component hemolysin, erylisin A and B, from an edible mushroom *Pleurotus eryngii*. **Toxicon**, 56: 1436-1442. 2010.



TOMITA, T.; NOGUCHI, K.; MIMURO, H.; UKAJI, F.; ITO, K.; SUGAWARA-TOMITA, N.; HASHIMOTO, Y. Plerotolysin, a novel sphingomyelin-specific two-component cytolysin from the edible mushroom *Pleurotus ostreatus*, assembles into a transmembrane pore complex. **J. Biol. Chem.** 279, 26972-26982, 2004.

YOGA, L.; SASIDHARAN, S.; SURYANI, Z.; SHIRLEY, L.; SANGETHA, S.; DAVASELVI, M. Antimicrobial activities and toxicity of crude extract of the *Psophocarpus tetragonolobus* pods. *Afr. J. Tradit. Complement Altern. Med.*, 4: 23-26, 2007b.

YOSHIOKA Y, TAMESADA M, TOMI H. A repeated dose 28-day oral toxicity study of extract from cultured *Lentinula edodes* mycelia in Wistar rats. **J Toxicol Sci.**,35(5):785-91, 2010.

#### *4. PATENTE DERIVADA DA TESE*

**Processo de produção de extrato bruto com protease coagulante,  
bioativo dos basidiomas de *Pleurotus florida*, extrato obtido e seu uso**

Silva Neves, K.C.<sup>a</sup>; Palheta, R.A.<sup>b</sup>; Teixeira, M.F.S.<sup>b</sup>; Porto, A.L.F.<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Manaus, AM

<sup>b</sup> Coleção de Cultura DPUA/UFAM, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM

<sup>c</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE

**Depósito de Patente Instituto Nacional de Propriedade Industrial INPI, sob  
Protocolo Geral: 08 NOV 2012 00045**

**DOCUMENTO CONFIDENCIAL**

**CIRCULAÇÃO RESTRITA**

ESTE DOCUMENTO É DESTINADO AO USO EXCLUSIVO DO INDIVÍDUO OU ENTIDADE À QUAL O MESMO É ENDEREÇADO E CONTÉM INFORMAÇÕES PRIVILEGIADAS, CONFIDENCIAIS E QUE NÃO DEVEM SER REVELADAS.

Se você ler este documento e não for o destinatário pretendido, estará por meio deste notificado de que qualquer disseminação, distribuição ou reprodução deste documento é estritamente proibida. Se você recebeu este documento por engano, por favor, notifique-me imediatamente através dos telefones +55(21)3212-8200 ou +55(11)3087-8200.

Obrigado por sua cooperação.

THIS DOCUMENT IS INTENDED ONLY FOR THE USE OF THE INDIVIDUAL OR ENTITY TO WHICH IT IS ADDRESSED AND CONTAINS INFORMATION THAT IS PRIVILEGED, CONFIDENTIAL AND EXEMPT FROM DISCLOSURE.

If the reader of this document is not the intended recipient, you are hereby notified that any dissemination, distribution or copying of this communication is strictly prohibited.

If you have received this document in error, please notify me immediately by telephone on +55(21)3212-8200 or +55(11)3087-8200.

Thank you for your co-operation.

## REIVINDICAÇÕES

PROCESSO DE PRODUÇÃO DE EXTRATO BRUTO COM PROTEASE COAGULANTE, BIOATIVO DOS BASIDIOMAS DE *PLEUROTUS FLORIDA*, EXTRATO OBTIDO E SEU USO

1. Processo de produção de proteases coagulantes caracterizado por compreender a adição dos basidiomas desidratados em água destilada esterilizada, sendo os basidiomas utilizados previamente cultivados em substrato orgânico para crescimento celular, no qual o substrato compreende plantas amazônicas e/ou derivados das mesmas.
2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por serem utilizadas de 80% a 90% de plantas amazônicas.
3. Processo, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por utilizar casca do cupuaçu como resíduo agroindustrial de plantas amazônicas.
4. Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por serem utilizados de 10% a 20% de suplementos.
5. Processo, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado por serem utilizados como suplemento liteira, farelo de arroz e/ou casca de arroz.
6. Processo de produção de extrato com atividade proteolítica caracterizado por compreender a etapa de produção de basidiomas em cultivo axênico por fermentação semi-sólida, no qual o cultivo é realizado em substrato orgânico para crescimento celular e desenvolvimento dos basidiomas, em que o substrato compreende plantas amazônicas e/ou derivados das mesmas.
7. Extrato com atividade proteolítica, caracterizado por ser obtido de acordo com a reivindicação 6.
8. Extrato, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por ser utilizado como proteolítico para proteínas do leite e/ou derivados.
9. Extrato, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado por ser utilizado sobre azo-caseína e sobre a caseína do leite.

### Resumo

PROCESSO DE PRODUÇÃO DE EXTRATO BRUTO COM PROTEASE COAGULANTE, BIOATIVO DOS BASIDIOMAS DE *PLEUROTUS FLORIDA*, EXTRATO OBTIDO E SEU USO

A presente invenção descreve um extrato com atividade proteolítico, além de processo de produção de extrato com atividade proteolítica obtido a partir do basidioma do fungo *Pleurotus florida* que se desenvolveu em substrato orgânico da Amazônia. O dito substrato, também objeto da presente invenção apresenta elementos orgânicos encontrados na Amazônia.

Secretaria de Planejamento e Desenvolvimento Tecnológico  
 Representação de Patentes - BEAM  
 Protocolo Geral nº 00045  
 Recebido Em 08/11/2012 às 11:27 hs  
 Espaço reservado ao protocolo

< Uso exclusivo do INPI >

**INPI** INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
 PROTOCOLO GERAL  
 08/11/2012 11:27 RERM  
 02412000045  
 BR 10 2012 029499 0  
 Espaço para etiqueta

**DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO**

**Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:**

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

**1. Depositante (71):**

- 1.1 Nome: FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DO AMAZONAS
- 1.2 Qualificação: INSTITUIÇÃO DE ENSINO SUPERIOR
- 1.3 CNPJ/CPF: 04378626000197
- 1.4 Endereço Completo: Av. General Rodrigo Octávio, 3000-Campus Universitário
- 1.5 CEP: 69077-000      1.6 Telefone: 92-33051758      1.7 Fax:
- 1.8 E-mail: intellectus@ufam.edu.br

continua em folha anexa

- 2. Natureza:**     Invenção       Modelo de Utilidade       Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada:

**3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):**

PROCESSO DE PRODUÇÃO DE EXTRATO BRUTO COM PROTEASE COAGULANTE, BIOATIVO DOS BASIDIOMAS DE PLEUROTUS FLORIDA, EXTRATO OBTIDO E SEU USO

continua em folha anexa

- 4. Pedido de Divisão:** do pedido Nº \_\_\_\_\_ Data de Depósito: \_\_\_\_\_

- 5. Prioridade:**       interna       unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

País ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

**6. Inventor (72):**

Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

- 6.1 Nome: MARIA FRANCISCA SIMAS TEIXEIRA
- 6.2 Qualificação: DOUTORA      6.3 CPF: 027574512-00
- 6.4 Endereço completo: RUA DAMASCO, Nº11, Q.23 - MANAUS - AM
- 6.5 CEP: 69045-070      6.6 Telefone: 92-81013100      6.7 Fax:
- 6.8 E-Mail: mteixeira@ufam.edu.br

continua em folha anexa

**INPI** INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

**7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:**

7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

em anexo

**8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial:** (Período de Graça):  
(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

em anexo

**9. Procurador (74)**

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço completo

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 Fax

9.8 E-Mail:

**10. Listagem de seqüências Biológicas** (documentos anexados) (se houver):

Listagem de seqüências em arquivo eletrônico: n° de CDs ou DVDs (original e cópia).

Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: fl.

Listagem de seqüências em formato impresso: fls.

Declaração de acordo com o artigo da Resolução INPI nº 228/09: fls.

**11. Documentos anexados** (assinale e indique também o número de folhas):

(Deverá ser indicado o n° total de somente uma das vias de cada documento)

<input checked="" type="checkbox"/>	11.1 Guia de Recolhimento	01	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.5 Relatório descritivo	13	fls.
<input type="checkbox"/>	11.2 Procuração		fls.	<input type="checkbox"/>	11.6 Reivindicações	02	fls.
<input type="checkbox"/>	11.3 Documentos de Prioridade		fls.	<input type="checkbox"/>	11.7 Desenhos	02	fls.
<input type="checkbox"/>	11.4 Doc. de contrato de trabalho		fls.	<input type="checkbox"/>	11.8 Resumo	01	fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar) D.O.U. (01f.) e Estatuto FUA (05 fl.5)					06	fls.

**12. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11):** 25 fls.

**13. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.**

P. Perais, 03 de novembro de 2012  
Local e Data

  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
Marcia Perales Mendes Silva  
Assessora de Inovação Tecnológica

## ANEXO DE INVENTORES

### 6. Inventor (72)

6.1 Nome: **Kilma Cristiane Silva Neves**

6.2 Qualificação: Mestre em Ciências do Alimento, Doutoranda em Biotecnologia, Estudante do curso de Doutorado do Programa RENORBIO – Rede Nordeste de Biotecnologia

6.3 CPF: 85703265487

6.4 Endereço: Rua F, nº 196, Bloco 3, Apto. 302, Parque 10 de Novembro,

6.5 CEP: 69055-692

6.6 Telefones: (92) 8186-2943 (92) 3236-2672

6.8 E-mail: [kicri@uol.com.br](mailto:kicri@uol.com.br)

### 6. Inventor (72)

6.1 Nome: **Ana Lúcia de Figueiredo Porto**

6.2 Qualificação: Professora Doutora da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Área de Fisiologia

6.3 CPF: 255 147 764-68

6.4 Endereço: Rua José Paraíso, 25, apto 1701, Boa Viagem, Recife-PE, Recife-PE

6.5 CEP: 51030-390

6.6 Telefones: (081) 9157-1637

6.7 E-mail: [analuporto@yahoo.com.br](mailto:analuporto@yahoo.com.br)

### 6. Inventor (72)

6.1 Nome: **Rosana Antunes Palheta**

6.2 Qualificação: Engenheira Agrônoma, Dra. em Diversidade Biológica

6.3 CPF: 071871007-01

6.4 Endereço: Condomínio Iuritá, 16 Coroado III

6.5 CEP: 69080-291

6.6 Telefones: (92) 8121-2665 (92) 3644-7491

6.7 E-mail: [rosanapalheta@ufam.edu.br](mailto:rosanapalheta@ufam.edu.br)

## *5. CONSIDERAÇÕES FINAIS*



## CONCLUSÃO

---

Com base na metodologia empregada e com os resultados obtidos, conclui-se que:

- O substrato casca de cupuaçu suplementado com farelo de arroz favorece o crescimento micelial vigoroso com eficiência biológica significativa de *Pleurotus florida* DPUA 1534;
- *Pleurotus florida* DPUA 1534 apresenta alto percentual de proteínas e carboidratos, além de minerais e aminoácidos essenciais, constituindo em um alimento de alto valor nutricional.
- *Pleurotus florida* DPUA 1534 constitui uma nova fonte alternativa de produção de proteases coagulante do leite com potencial para utilização na indústria de laticínios;
- As proteases apresentam atividade ótima em pH 7,0; 40°C e maior estabilidade em pH levemente ácido e neutro e a 25°C a 40°C;
- Os resíduos utilizados nos processos fermentativos são eficientes para a produção de enzimas proteolíticas coagulantes.
- O extrato proteolítico de *Pleurotus florida* DPUA 1534 demonstrou atividade biológica frente à *Artemia salina* e em sangue comercial de carneiro.
- Não foram observados sinais clínicos de toxicidade em nenhum dos animais tratados, assim como, a normalidade dos parâmetros hematológicos e bioquímicos, e a ausência de alterações nas análises histológicas.
- Portanto, este relato pioneiro do efeito do extrato dos basidiomas de *Pleurotus florida* DPUA 1534 sugere o potencial para sua utilização como aditivo alimentar.

*ANEXOS*



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA-UFAM)

---

## CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo n° 054/2011- CEEA, sobre "Avaliação de toxicidade aguda de extratos proteolíticos de *pleurotus spp*" sob responsabilidade de **MARIA FRANCISCA SIMAS**, está de acordo com a legislação Federal pertinente ao uso científico de animais e foi **APROVADO** pelo COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA-UFAM) em reunião de 29/09/2011.

Manaus, 04 de outubro de 2011

A handwritten signature in black ink, reading 'Fábio Tonissi Moroni'.

Prof. Fábio Tonissi Moroni  
Presidente da CEEA-UFAM