



UFAM

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

JORDANE PIMENTEL NÓBREGA

**PROTEASES DE ESPÉCIES DE COGUMELOS COMESTÍVEIS
GELATINOSOS REPRESENTANTES DA FAMÍLIA AURICULARIACEAE
Fr. ex Lindau (1897)**

MANAUS – AM

2021

JORDANE PIMENTEL NÓBREGA

PROTEASES DE ESPÉCIES DE COGUMELOS COMESTÍVEIS GELATINOSOS
REPRESENTANTES DA FAMÍLIA AURICULARIACEAE Fr. ex Lindau (1897)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação de Bacharelado em Ciências
Biológicas da Universidade Federal do Amazonas,
como requisito parcial à obtenção do título de
bacharel em Ciências Biológicas.

ORIENTADORA: MARIA FRANCISCA SIMAS TEIXEIRA

Manaus – AM

2021

Ficha Catalográfica

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

N999p Nóbrega, Jordane Pimentel
Proteases de espécies de cogumelos comestíveis gelatinosos
representantes da família Auriculariaceae Fr. ex Lindau (1897) /
Jordane Pimentel Nóbrega . 2021
31 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Maria Francisca Simas Teixeira
TCC de Graduação (Ciências Biológicas - Bacharelado) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Peptidases. 2. Basidiomicetos. 3. Fermentação submersa. 4.
Produção de hidrolases. I. Teixeira, Maria Francisca Simas. II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

DEDICATÓRIA

Ao meu pai e a minha mãe, minha força
inspiradora.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado forças para passar por todas as dificuldades, principalmente neste cenário de grande provação que está acontecendo no mundo todo.

Agradeço a minha orientadora Dra. Maria Francisca Simas Teixeira que se dispôs a me aceitar como aluna não apenas na disciplina de Estágio de Monografia, mas em vários outros trabalhos, sempre me ajudando quando eu errava ou quando estava com dúvidas, além de compartilhar seus conhecimentos comigo, se tornando um grande exemplo profissional para mim.

Agradeço a todos do laboratório da Micoteca DPUA que sempre me auxiliaram quando eu estava desenvolvendo meu trabalho no laboratório, dispondo tempo para me ensinar e sempre oferecendo ajuda em qualquer dificuldade que eu tivesse.

Agradeço a minha família, principalmente minha mãe que sempre me deu motivação e incentivos para seguir meus objetivos, agradeço também pelos sacrifícios feitos para que eu pudesse chegar onde estou agora, além de estar comigo nos momentos de dificuldade que tive ao longo da minha vida.

Agradeço aos meus amigos por todos os momentos que passamos juntos, seja nas horas de dificuldade ou de descontração, e sempre me alegrando quando estava com pouco ânimo, compartilhando momentos incríveis comigo que sempre guardarei na memória.

Agradeço a todos os professores do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas que disponibilizaram diversos recursos, seja conhecimento ou material, que me ajudaram no meu crescimento pessoal e profissional.

RESUMO

Proteases hidrolisam ligações peptídicas entre proteínas e cadeias de aminoácidos e são de grande importância industrial. Estes biocatalizadores oriundos de microrganismos são mais utilizados industrialmente por suas características desejáveis em biotecnologia. Dos fungos produtores de proteases, há carência de estudos em relação às proteases de cogumelos pertencentes ao gênero *Auricularia*. O objetivo deste trabalho foi investigar a produção de proteases de cogumelos comestíveis do gênero *Auricularia* para selecionar uma espécie produtora de proteases para futura aplicação biotecnológica. As espécies *A. delicata* e *A. fuscosuccinea* foram cultivadas em meio líquido Glicose-Extrato de Levedura-Peptona (GYP), e o bioprocesso foi conduzido a 150 rpm, a 30°C. Após 72 horas o extrato bruto foi recuperado por filtração a vácuo e, determinada a atividade qualitativa de proteases em Ágar leite, a atividade quantitativa foi definida usando como substrato azocaseína 1,0% (p/v). No extrato bruto obtido do cultivo da espécie que apresentou maior atividade proteolítica foi realizada a caracterização parcial quanto ao efeito do pH e temperatura na atividade das enzimas. Os resultados mostraram que, em meio sólido, as espécies de *Auricularia* se mostraram produtoras de enzimas proteolíticas e, em cultivo submerso, estatisticamente, o valor significativo da atividade proteolítica (44,33 U/mL) foi determinada no extrato bruto de *A. delicata*. Essas enzimas apresentaram atividade ótima em pH 5, a 50 e 60 °C, caracterizando-as como proteases ácidas, biocatalisadores que tem potencial para aplicação na indústria de alimentos.

Palavras-chave: Peptidases; Basidiomicetos; Fermentação submersa.

ABSTRACT

Proteases hydrolyze peptide bonds between proteins and amino acid chains, and have industrial importance. These biocatalysts from microorganisms are more used industrially due to their desirable characteristics in biotechnology. Of the fungi producing proteases, there is a lack of studies in relation to mushroom proteases belonging to the genus *Auricularia*. The objective of this work was to investigate the production of proteases from edible mushrooms of the genus *Auricularia* to select a protease-producing species for future biotechnological application. The species *A. delicata* and *A. fuscossuccinea* were cultivated in Glucose-Yeast Extract-Peptone (GYE) liquid medium, and the bioprocess was carried out at 150 rpm, at 30°C. After 72 hours the crude extract was recovered by vacuum filtration and, after determining the qualitative activity of proteases in milk agar, the quantitative activity was defined using azocasein 1.0% (w/v) as substrate. In the crude extract obtained from the cultivation of the species that showed the highest proteolytic activity, partial characterization was carried out regarding the effect of pH and temperature on enzyme activity. The results showed that, in solid medium, *Auricularia* species were shown to produce proteolytic enzymes and, in submerged culture, statistically, the significant value of proteolytic activity (44.33 U/mL) was determined in the crude extract of *A. delicata*. These enzymes showed optimal activity at pH 5, at 50 and 60 °C, characterizing them as acid proteases, biocatalysts that have potential for application in the food industry.

Keywords: Peptidases; Basidiomycetes; Submerged fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Auricularia auricula-judae</i>	15
Figura 2. Espécies de cogumelos do gênero <i>Auricularia</i>	17
Figura 3. Viabilidade do crescimento de espécies de <i>Auricularia</i> cultivadas em BDA + YE 0,5% (p/v) por oito dias, e determinação de atividade proteolítica em meio sólido.....	22
Figura 4. Efeito do pH (A) e da temperatura (B) na atividade proteolítica de <i>Auricularia delicata</i> AM 290 cultivada em meio líquido (GYP + gelatina 0,5 %, p/v).....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proteases produzidas por cogumelos comestíveis	14
Tabela 2. Atividade de proteases determinada pelo método de difusão em ágar utilizando discos miceliais dos cultivos de espécies de <i>Auricularia</i> pertencentes ao acervo da Coleção de Culturas DPUA/UFAM.....	22
Tabela 3. Atividade quantitativa de proteases de espécies de <i>Auricularia</i> pertencentes ao acervo da Coleção DPUA, utilizando como substrato azocaseína.....	23

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1. Proteases	12
2.2. Aplicações econômicas de proteases	12
2.3. Fontes de proteases	13
2.4. Cogumelos como fonte de proteases	13
2.5. Cogumelos do gênero <i>Auricularia</i>	14
3. OBJETIVOS	18
3.1. Objetivo Geral	18
3.2. Objetivos Específicos	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1. Cogumelos	19
4.2. Determinação da atividade de proteases em meio sólido	19
4.3. Produção das proteases por espécies de cogumelos do gênero <i>Auricularia</i>	19
4.4. Avaliação proteolítica quantitativa	20
4.5. Determinação do efeito do pH e da temperatura na atividade proteolítica	20
4.6. Análise estatística	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1. Cultivo de cogumelos e produção de proteases	22
5.2. Efeito do pH e da temperatura na atividade proteolítica	24
6. CONCLUSÃO	27
7. REFERÊNCIAS	28

1. INTRODUÇÃO

Proteases são enzimas da classe de hidrolases que clivam ligações peptídicas nas proteínas e fragmentos de proteínas, podem ser classificadas de acordo com o aminoácido ou íon metálico presente em seu sítio catalítico (serino, aspartato, cisteíno e metaloproteases), ou com a faixa de pH ótimo de atividade (ácidas em pH 2,0-5,0, neutras em pH 6,0-7,0 ou alcalinas em pH 8,0-11,0) (MARTIM *et al.*, 2015; SILVA, 2015).

Essas enzimas são aplicadas em diversos processos industriais, como na formulação de detergentes, na indústria alimentícia, principalmente na produção de queijo, em tratamento de couro, no setor farmacêutico e em processos terapêuticos (GURUMALLESH *et al.*, 2019). Entre as diversas fontes de proteases, aquelas oriundas de microrganismos são preferidas em função da diversidade genética, facilidade de manipulação, e de fácil recuperação no bioprocessamento (TEIXEIRA *et al.*, 2011).

Entre os fungos, certas espécies de basidiomicetos são excelentes fontes de diversos compostos com atividade biológica. *Ganoderma lucidum*, *Lentinus citrinus*, *L. crinitus*, *Pleurotus albidus*, *P. ostreatoroseus*, *P. eryngii*, *P. sajor-caju* são citados como produtores de compostos bioativos, a exemplo das proteases (SABOTIC *et al.*, 2007; FONSECA; BARRONCAS; TEIXEIRA, 2014; SILVA, 2015; MARTIM *et al.*, 2017).

Outras espécies comestíveis, em função de suas propriedades medicinais, são as representantes do gênero *Auricularia*, que possuem basidiomas gelatinosos com coloração, tamanho, forma e textura variada. Cogumelos desse grupo decompõem madeira, troncos, ramos e galhos, no entanto, algumas espécies são encontradas nos troncos das árvores vivas como parasitas (CHOUDHURY; SARMA, 2014).

Apesar de serem bastante conhecidas por seu valor nutricional e medicinal, raras são as citações revelando espécies de *Auricularia* como produtoras de enzimas. Alguns dados da literatura mostram que celulase e hemicelulase são produzidas por *A. polytricha* (JIANG *et al.*, 2020), e esta espécie também pode ser fonte de enzimas fibrinolíticas (ALI *et al.*, 2014).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Proteases

As proteases, também denominadas de peptidases, são enzimas que clivam ligações peptídicas em proteínas e fragmentos de proteínas. Segundo o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica Molecular (NC-IUBMB), tais enzimas pertencem à classe das hidrolases, subclasse das peptídeo-hidrolases (classe 3, subgrupo 4) (VERMELHO *et al.*, 2008).

Proteases são classificadas levando em conta seus atributos, podem ser divididas de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia peptídica, sendo consideradas **exopeptidases** caso clivem nas extremidades da cadeia peptídica, ou seja, ligações próximas ao grupo amino ou carboxi terminal. As proteases classificadas como **endopeptidases** clivam ligações peptídicas distantes do grupo terminal do substrato (CHAUD; VAZ; FELIPE, 2007).

Outra classificação das proteases foi feita de acordo com o grupo químico do centro ativo, seja aminoácidos (serino-, cisteíno-, aspartato-, treoninoprotease, e outros) ou íons metálicos (metaloprotease) (INÁCIO *et al.*, 2015). E outro tipo de classificação leva em conta a faixa de pH ótimo de atividade, com divisão em proteases ácidas (pH 2,0-5,0), neutras (pH 6,0-8,0) e alcalinas (pH 9,0-11,0) (RAZZAQ *et al.*, 2019).

2.2. Aplicações econômicas de proteases

As proteases são amplamente utilizadas no mercado mundial, representando cerca de 60% do total de enzimas aplicadas nas indústrias (GURUMALLESH *et al.*, 2019), e são utilizadas em diversos setores industriais. Na fabricação de detergentes, são utilizadas para facilitar a remoção de uma grande variedade de resíduos proteicos, como manchas devido a alimentos, sangue, e outras secreções corporais (SILVA, 2011).

Cerca de 45% das proteases produzidas no mercado são utilizadas como aditivos de detergentes, e nesse setor industrial são utilizadas, principalmente, proteases alcalinas com atividade em ampla faixa de temperatura (SILVA, 2015). Proteases alcalinas também são utilizadas na indústria de couros e tratamento de resíduos, removendo restos de pelos e melhorando a qualidade do couro, além de substituir aditivos químicos perigosos e reduzir a poluição ambiental (GURUMALLESH *et al.*, 2019).

Na indústria de alimentos, proteases são empregadas na coagulação do leite, em processos de fabricação de queijo, e também são aplicadas para modificar alimentos proteicos, melhorando sabor, aroma, textura e qualidade nutricional (VERMELHO *et al.*, 2008).

Na indústria farmacêutica, proteases alcalinas são utilizadas no tratamento de certas síndromes de deficiência de enzimas, e proteases fibrinolíticas são administradas na terapia trombolítica e na aplicação como fármaco anticâncer (RAZZAQ *et al.*, 2019). Outros estudos relatam a aplicação de proteases como anticoagulante, antibiótico, anti-inflamatório e no tratamento de distúrbios genéticos (GURUMALLESH *et al.*, 2019).

2.3. Fontes de proteases

As proteases ocorrem em praticamente todos os organismos vivos, pois são importantes no controle da síntese de proteínas que regulam diferentes processos fisiológicos, como formação, nascimento, envelhecimento e até morte (RAZZAQ *et al.*, 2019). Apesar da utilização de proteases de origem animal e vegetal, cerca de 90% das proteases comercializadas são produzidas por microrganismos, pois expressam características desejadas para aplicação biotecnológica, excretam as enzimas naturalmente para o meio externo, além da fácil recuperação das enzimas excretadas (TEIXEIRA *et al.*, 2011).

Em diversos setores industriais há uma crescente demanda em utilizar enzimas produzidas por fungos, incluindo enzimas proteolíticas, pois esses organismos predominam como fonte de proteases com atividade em um faixa de pH mais ampla que de bactérias, e uma mesma espécie de fungo, como *Aspergillus oryzae*, pode sintetizar proteases ácidas, neutras e alcalinas (RAO *et al.*, 1998; ENZYMES... 2020).

As proteases disponíveis atualmente não estão atendendo a demanda comercial para uso numa diversidade de processos industriais. Esta carência da disponibilidade de proteases incentiva a realização de estudos na busca por outras fontes dessas enzimas, em especial os fungos filamentosos, a exemplo dos cogumelos (BATISTA *et al.*, 2021; MADHUSANKHA; THILAKARATHNA, 2021).

2.4. Cogumelos como fonte de proteases

A maioria das proteases comerciais oriundas de fungos são produzidas por espécies filamentosas anamórficas, especialmente do gênero *Aspergillus* e *Trichoderma* (GURUMALLESH

et al., 2019). Cogumelos são estudados principalmente por seu valor nutricional e medicinal, entretanto, diversas espécies desses macrofungos são fontes de uma variedade de compostos bioativos, inclusive de proteases (Tabela 1).

Em relação a aplicabilidade industrial, ainda há poucos estudos que valorizam estes biocatalisadores, e os estudos da atividade proteolítica são limitados a decomposição da matéria orgânica por espécies saprofíticas, micorrízicas e ao fator de virulências de certos patógenos (SABOTIC *et al.*, 2007).

Tabela 1. Proteases produzidas por cogumelos comestíveis.

Cogumelo	Enzima	Referência
<i>Auricularia polytricha</i>	Protease fibrinolítica	Ali <i>et al.</i> (2014)
<i>Flammulina velutipes</i>	Metaloprotease neutra	Shin e Choi (1998)
<i>Ganoderma lucidum</i>	Metaloprotease fibrinolítica	Kumaran <i>et al.</i> (2011)
<i>Grifola frondosa</i>	Protease neutra	Nishiwaki <i>et al.</i> (2009)
<i>Lentinus citrinus</i>	Protease neutra	Kirsch <i>et al.</i> (2013)
<i>L. crinitus</i>	Metalo, cisteíno e serinoproteases ácidas	Magalhães <i>et al.</i> (2019)
<i>Pleurotus albidus</i>	Cisteíno e serinoproteases ácidas	Martim <i>et al.</i> (2017)
<i>P. citrinopileatus</i>	Serinoprotease alcalina	Cui <i>et al.</i> (2007)
<i>P. eryngii</i>	Serinoprotease fibrinolítica ácida	Cha <i>et al.</i> (2010)
<i>P. ostreatoroseus</i>	Cisteíno e serinoproteases neutras	Machado <i>et al.</i> (2017)
<i>P. ostreatus</i>	Metalo e serinoproteases neutras	Dohmae <i>et al.</i> (1995)
<i>P. sajor-caju</i>	Serinoprotease alcalina	Benmrاد <i>et al.</i> (2019)

2.5. Cogumelos do gênero *Auricularia*

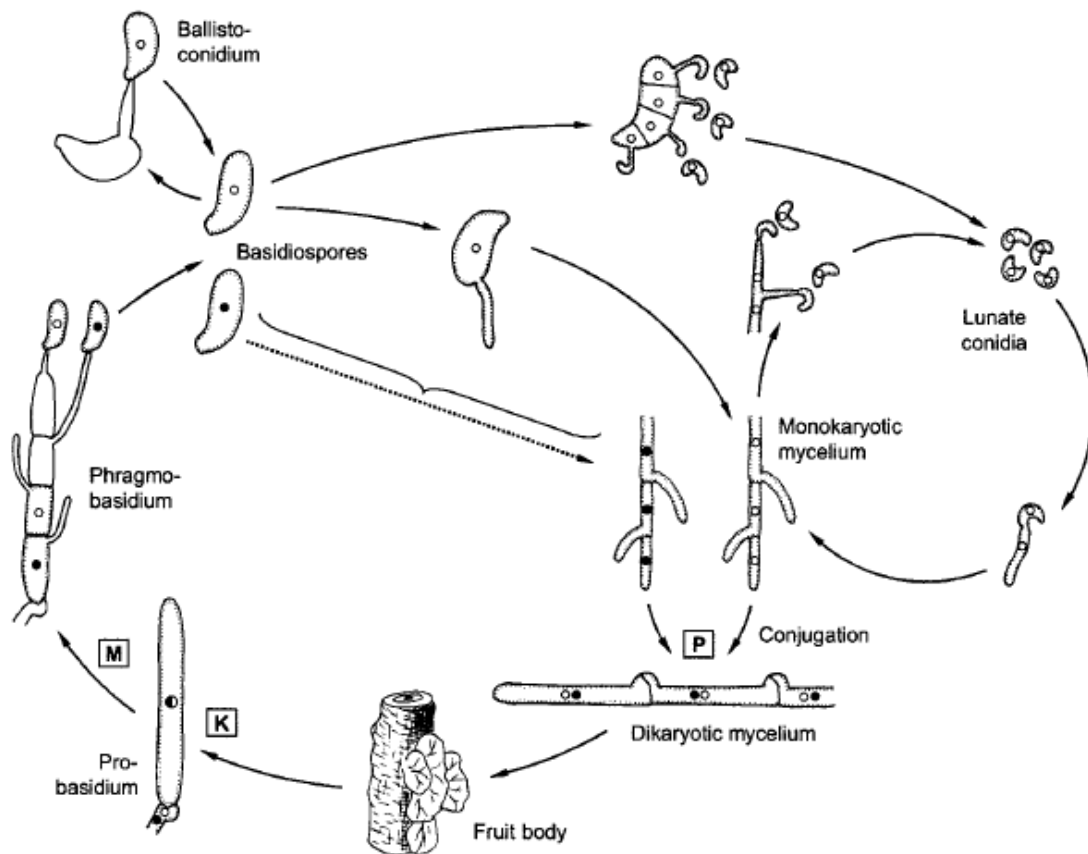
O gênero *Auricularia* (família Auriculariaceae) tem como característica basidiocarpo gelatinoso, coloração marrom ou preta, geralmente encontrados em troncos de árvores, com ocorrência em regiões de clima tropical, subtropical e temperado. O basidiocarpo, quando desidratado, endurece e seu tamanho diminui, porém, ao ser hidratado, rapidamente absorve a umidade e libera esporos em poucas horas (CHOUDHURY; SARMA, 2014). Os cogumelos desse gênero parecem orelhas humanas com sua consistência cartilaginosa, motivo pelo qual recebeu o nome *Auricularia* (lat. auris = orelha) (GARCIA *et al.*, 2012).

Os basídios (células reprodutivas) são cilíndricos, dividem-se em quatro células, e a germinação do basidiósporo pode ocorrer de diferentes formas dependendo do substrato em que se

encontra. Caso caia na superfície himenial do basidiocarpo, o basidiósporo germina repetidamente, produzindo um balistosporo por meio de um esterigma (WEBSTER; WEBER, 2007).

Os basidiósporos que são dispersados em uma superfície pobre em nutrientes formam três septos transversais, e cada uma das quatro células resultantes emitem uma ou mais extensões (denticulos) que produzem microconídios semilunares. Esse tipo de microconídio também pode ser formado por hifas ramificadas de um micélio monocariótico, formando denticulos laterais ou terminais que produzem aglomerados de microconídios semilunares. A germinação pode ocorrer também diretamente por meio de um tubo germinativo, e este modo de germinação é encontrado especialmente em substratos ligeiramente mais ricos (Figura 1) (WEBSTER; WEBER, 2007).

Figura 1. Ciclo de vida de *Auricularia auricula-judae*. Os principais eventos no ciclo de vida são plasmogamia (P), cariogamia (K) e meiose (M).



Fonte: Webster e Weber (2007).

A maioria das espécies de *Auricularia* é comestível e são produzidas comercialmente em larga escala. Embora não possuam um sabor característico, os basidiocarpos são altamente

nutritivos e possuem uma textura elástica que os torna ingredientes atraentes para sopas e saladas (CHOUDHURY; SARMA, 2014; SEKARA *et al.*, 2015). Apresentam também valor medicinal, produzindo compostos bioativos, como os polissacarídeos, os quais podem apresentar atividade imunomoduladora, antitumoral, antioxidante, anticoagulante, e função hipoglicêmica (BANDARA *et al.*, 2017; MIAO *et al.*, 2020).

2.5.1. *Auricularia fuscosuccinea* (Mont.) Henn.

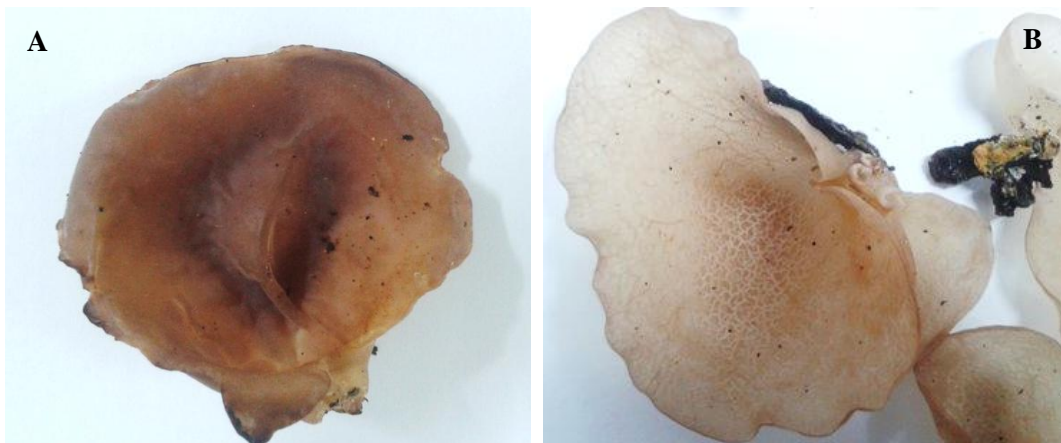
Na espécie *A. fuscosuccinea* (Figura 2-A), o basidiocarpo pode apresentar até 10 cm de comprimento, a superfície superior apresenta aspecto liso, com pelos muito curtos e de cor castanha, e a superfície inferior possui cor castanha, variando em tonalidades claras e escuras (de acordo com o grau de maturação, exposição, quantidade de água recebida, etc.) (GUERRERO; HOMRICH, 1999).

Os basidiocarpos estão reunidos em grandes conjuntos, às vezes, formando rosetas quando nascem de um mesmo ponto, e são notáveis quando úmidos. Esta espécie é comestível, e comumente é encontrada em lugares sombreados e em troncos caídos e árvores velhas, porém, pode ser coletada em troncos vivos com exposição direta de luz (GUERRERO; HOMRICH, 1999; ALVARENGA; NAVES; XAVIER-SANTOS, 2015).

2.5.2. *Auricularia delicata* (Mont. ex Fr.) Henn.

Espécie caracterizada por basidioma marrom amarelado quando maduro e seco, podendo apresentar cores esbranquiçadas ou rosadas quando fresco ou conservado de forma úmida. Considerada uma espécie comestível, possui distribuição cosmopolita, e geralmente são encontrados em grandes conjuntos sobre troncos, em lugares sombreados (Figura 2-B) (GUERRERO; HOMRICH, 1999; ALVARENGA; NAVES; XAVIER-SANTOS, 2015). Em análises moleculares, Looney, Birkebak e Matheny (2013) observaram a existência de dois clados: *A. delicata* clado I, *A. delicata* clado II.

Figura 2. Espécies de cogumelos do gênero *Auricularia*. (A) *A. fuscusuccinea*; (B) *A. delicata*.
Fonte: Herbário Micológico Jair Putzke, Universidade Federal do Amazonas - UFAM.



Fonte: Herbário Micológico Jair Putzke, Universidade Federal do Amazonas - UFAM.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar a produção de proteases de cogumelos comestíveis representantes do gênero *Auricularia* para selecionar uma espécie produtora de proteases para futura aplicação biotecnológica.

3.2. Objetivos Específicos

- Produzir proteases em meio líquido nas condições de laboratório;
- Determinar a atividade qualitativa e quantitativa das proteases das espécies de cogumelos do gênero *Auricularia*;
- Selecionar uma espécie promissora do gênero *Auricularia* quanto à produção de proteases;
- Caracterizar parcialmente quanto ao efeito do pH e temperatura na atividade das proteases da espécie selecionada.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Cogumelos

4.1.1. Reativação dos cogumelos

Nesta pesquisa foram avaliadas as espécies *Auricularia delicata* AM 290 (coletada em Coari), *A. delicata* AM 282 (coletada em Manaus) e *A. fuscosuccinea* AM 242, cedidas do acervo da Coleção de Culturas DPUA, da Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Das culturas selecionadas, preservadas sob refrigeração, foram retirados fragmentos miceliais para cultivo em ágar batata com extrato de levedura 0,5% [(p/v), BDA+YE 0,5%], em placa de Petri. Os cultivos foram mantidos a 25 °C por oito dias.

4.1.2. Análise da viabilidade e pureza das culturas

Para confirmar a viabilidade e a pureza das espécies de cogumelo na fase micelial, após crescimento em BDA+YE 0,5% (p/v), fragmentos miceliais retirados de cada colônia foram transferidos para lâminas de microscopia. As estruturas miceliais foram coradas com azul de lactofenol e observadas em microscópio óptico. A pureza da colônia foi confirmada pela presença de estruturas formadas apenas pelo filo Basidiomycota. Além desses procedimentos, as culturas foram observadas a cada 24h para monitoramento da pureza do cultivo (FERNANDÉZ; CAÑÓN; ENAO, 2017).

4.1.3. Preparo de culturas estoque

Para obtenção da cultura inóculo foram utilizadas as culturas puras e viáveis em BDA+YE 0,5%. Desses cultivos foram retirados discos miceliais de 8 mm e transferidos para BDA+YE 0,5% em Placa de Petri, e os cultivos foram mantidos a 25 °C por oito dias, observando a cada 24 horas.

4.2. Determinação da atividade de proteases em meio sólido

De cada cultura inóculo obtida do item 4.1.3 foram retirados três discos miceliais, medindo 8 mm de diâmetro, para inoculação na superfície de ágar leite, em placa de Petri. As placas foram mantidas a 37°C por 18 horas. A atividade enzimática foi determinada pelo tamanho do halo em milímetros (CHEN *et al.*, 2003).

4.3. Produção das proteases por espécies de cogumelos do gênero *Auricularia*

4.3.1. Cultivo em meio líquido (Fermentação Submersa)

As proteases foram produzidas por fermentação submersa em meio Glicose-Extrato de Levedura-Peptona (GYP) (g/L de água destilada): glicose (20,0); peptona (10,0); extrato de levedura (1,0); suplementado com gelatina 0,5% (p/v); pH 6,4. Em cada frasco de Erlenmeyer de 125mL contendo 50mL de meio líquido foram inoculados 5 discos miceliais de 8mm de diâmetro, retirados da cultura inóculo em BDA+YE 0,5%. A fermentação foi conduzida a 30 °C, a 150 rpm, por 72 horas.

4.3.2. Recuperação do extrato bruto

Ao término da fermentação, a biomassa foi separada do extrato bruto por filtração a vácuo, utilizando papel de filtro Whatman n. 1. Em seguida, as amostras de extrato foram novamente filtradas utilizando membranas de éster de celulose 0,45µm. Em cada amostra de extrato bruto foi determinada a atividade quantitativa das proteases.

4.4. Avaliação proteolítica quantitativa

A atividade proteolítica foi determinada quantitativamente segundo metodologia descrita por Kirsch *et al.* (2013). Em cada tubo do tipo Falcon foi adicionado 250 µL do substrato azocaseína 1,0% (p/v), em tampão 0,1M Tris-HCl, pH 7,2 a 150 µL dos extratos brutos. A mistura da reação foi incubada a 25 °C por uma hora em câmara escura. Em seguida foi adicionado 1,2 mL de ácido Tricloroacético 10% (p/v). Ao término da centrifugação a 4 °C, 10.000 xg, por 5 minutos, foram retirados 800 µL do sobrenadante para adição em 1,4 mL de NaOH 1M. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorvância de 0,01 em uma hora a 440 nm, expressa em U/mL.

4.5. Determinação do efeito do pH e da temperatura na atividade proteolítica

Na determinação do pH ótimo foram elaboradas soluções de azocaseína (1%, p/v) nos seguintes tampões (0,1 M): acetato de sódio (pH 5 e 6), Tris-HCl (pH 7 e 8) e Glicina-NaOH (pH 9 e 10). Em seguida, a atividade proteolítica foi determinada conforme descrito no item 4.4. No teste de determinação da temperatura ótima das enzimas, a mistura reacional [(azocaseína diluída em tampão de pH ótimo) + extrato enzimático] foi incubada nas seguintes temperaturas: 25, 30,

40, 50, 60 e 70°C, durante 60 minutos. Em seguida, a atividade proteolítica foi determinada conforme descrito no item 4.4 (KIRSCH *et al.*, 2013).

4.6. Análise estatística

Em todos os experimentos, os testes foram realizados em triplicata e os dados foram submetidos a análise estatística descritiva, ANOVA ($p \leq 5\%$) e Teste de Tukey utilizando o software MINITAB 16.

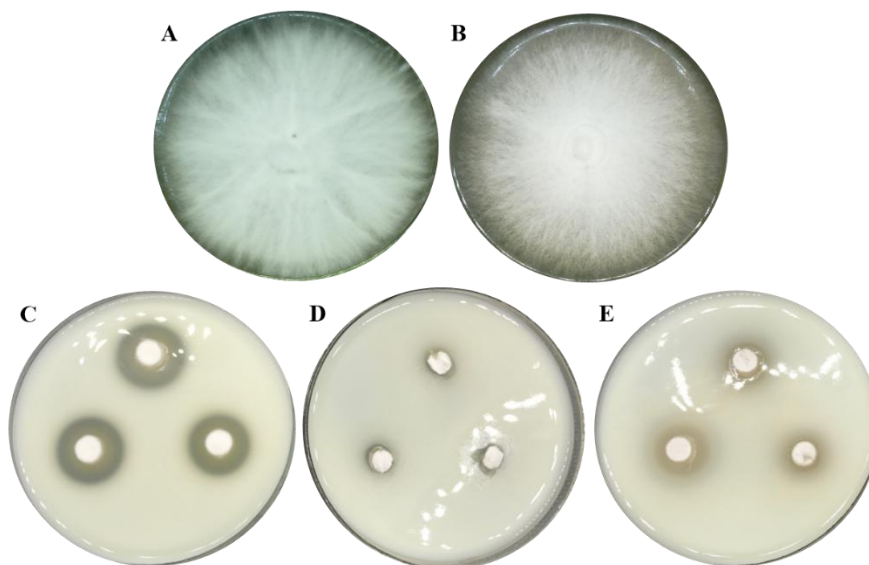
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Cultivo de cogumelos e produção de proteases

Estudos vêm sendo realizados para determinar as melhores condições de cultivo de *Auricularia*, considerando a importância nutricional da biomassa e o valor econômico das enzimas proteolíticas sintetizadas por cogumelos gelatinosos (XIAO *et al.*, 2021). Nas condições avaliadas, todas as espécies de *Auricularia* cultivadas em BDA + YE 0,5% (p/v) expressaram viabilidade de crescimento, sem contaminação na fase micelial. Na figura 3A-B estão apresentadas culturas que manifestaram crescimento micelial nas condições de cultivo em laboratório.

Em referência à atividade qualitativa das proteases dos cogumelos avaliados neste estudo, todos os representantes selecionados expressaram atividade de proteases pelo método de difusão em ágar (Figura 3C-D). Nas condições analisadas, o halo de atividade das proteases foi significativo para todas as espécies, variando de 11,83 mm a 12,50 mm (Tabela 2).

Figura 3. Viabilidade do crescimento de espécies de *Auricularia* cultivadas em BDA + YE 0,5% (p/v) por oito dias, e determinação de atividade proteolítica em meio sólido. (A e D) *A. delicata* AM 282, (B e E) *A. fuscusuccinea* AM 242, (C) *A. delicata* AM 290.



Fonte: Autora

Tabela 2. Atividade de proteases determinada pelo método de difusão em ágar utilizando discos miceliais dos cultivos de espécies de *Auricularia* pertencentes ao acervo da Coleção de Culturas DPUA/UFAM.

Espécies	Diâmetro do halo (mm)
<i>Auricularia delicata</i> AM 290	12,25 ± 1,25 ^a
<i>A. delicata</i> AM 282	11,83 ± 0,76 ^a
<i>A. fuscossuccinea</i> AM 242	12,50 ± 0,50 ^a

Médias que compartilham a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (p<0,05)

Coelho *et al.* (2021) verificaram a formação de halos de hidrólise para protease (17,67 mm) pela espécie *Pleurotus ostreatoroseus*, e Souza *et al.* (2008), ao utilizarem o ensaio qualitativo *cup plate* para detecção de enzimas, constataram diversas espécies de Basidiomicetos como fontes de proteases, com halos que variaram de 10,9 mm para *Trametes* sp. 11E4, a 23,8 mm para *Pycnoporus sanguineus* 12B.

Diversos são os métodos citados para determinação da atividade de proteases em meio sólido, entre esses, o método de difusão em ágar (técnicas do disco e do poço) é comumente utilizado em testes enzimáticos qualitativos. Entretanto, vários fatores podem causar interferência, como a composição do meio, pureza da cultura, condições de crescimento e organismo, o que pode resultar em dados não muito confiáveis ao relacionar a atividade enzimática com o tamanho do halo. Todavia, estudos demonstram que, o uso dessas técnicas permite selecionar microrganismos produtores de enzimas proteolíticas (ALVES *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2018).

De acordo com os dados obtidos (Tabela 3), nas condições de fermentação em meio líquido, a atividade significativa de proteases (44,33 U/mL ± 1,86) foi determinada no extrato bruto recuperado dos cultivos de *A. delicata* AM 290, a qual foi selecionada para caracterização parcial quanto ao pH e temperatura ótimos das proteases.

Tabela 3. Atividade quantitativa de proteases de espécies de *Auricularia* pertencentes ao acervo da Coleção DPUA, utilizando como substrato azocaseína.

Espécies	Atividade proteolítica (U/mL)	pH final do extrato
<i>Auricularia delicata</i> AM 290	44,33 ± 1,86 ^a	5,0
<i>A. delicata</i> AM 282	27,18 ± 0,63 ^b	5,0
<i>A. fuscossuccinea</i> AM 242	21,22 ± 0,65 ^c	4,0

Médias que não compartilham a mesma letra são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (p<0,05)

Em condições experimentais similares ao realizado neste estudo, Martim *et al.* (2017) relataram valores de atividade proteolítica para *Ganoderma lucidum* (23,50 U/mL) e *Lentinus crinitus* (27,20 U/mL), dados semelhantes ao encontrado em *A. delicata* AM 282 e *A. fuscusuccinea* AM 242. Silva *et al.* (2015), em processo de fermentação submersa semelhante, observaram atividade enzimática de 42,44 U/mL em extratos brutos de *Pleurotus albidus*, resultados próximos ao encontrado em *A. delicata* AM 290.

Ao final do processo de cultivo em meio líquido, também foi registrado mudança de pH nos extratos brutos das espécies, que inicialmente o valor correspondia a pH 6,4. Ambos os extratos de *A. delicata* sofreram uma redução do pH para 5, e o extrato de *A. fuscusuccinea* apresentou qualidade mais ácida, com pH 4. Essas variações observadas nos valores de pH estão associadas às características fisiológicas típicas de cada espécie de cogumelo (GARCIA *et al.*, 2012).

A. delicata e *A. fuscusuccinea* são comumente encontradas na Amazônia, e ainda que tenham distribuição cosmopolita, raros são os estudos que abordam a respeito de proteases produzidas por cogumelos desse gênero, sendo mais pesquisados por produzirem enzimas ligninolíticas e por seu valor alimentício (KALIYAPERUMAL; KEZO; GUNASEELAN, 2018). Neste estudo *A. delicata* AM 290 expressou quantitativos superiores as demais espécies, resultado que indica o potencial biotecnológico dessa espécie. E ainda que *A. fuscusuccinea* não tenha produzido valores significativamente altos da enzima, este é um dos raros trabalhos a observar que, nas condições experimentais, essa espécie expressou atividade de proteases.

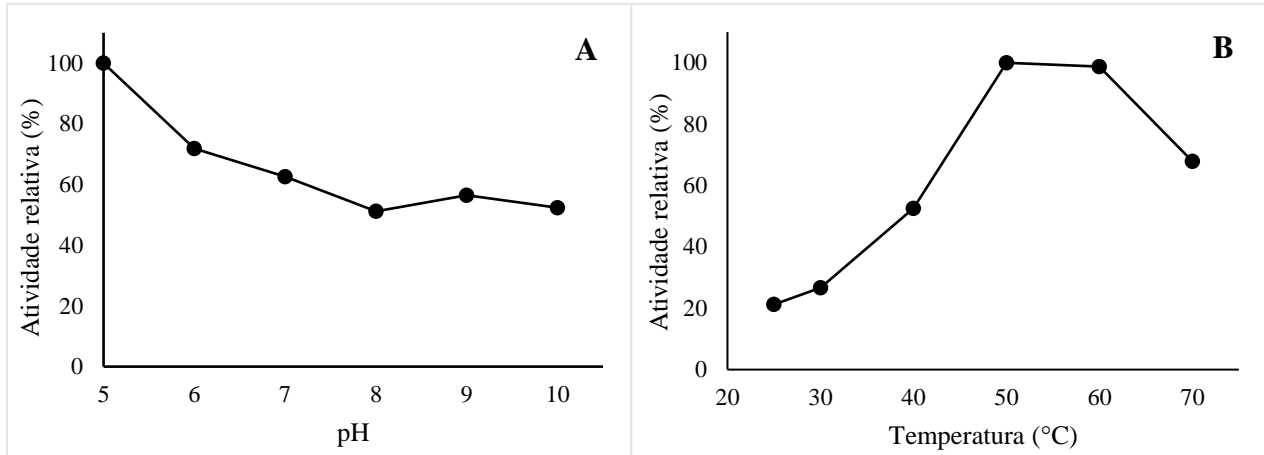
5.2. Efeito do pH e da temperatura na atividade proteolítica

A figura 4 mostra o efeito do pH e da temperatura na atividade proteolítica do extrato bruto de *A. delicata* AM 290. Segundo os dados obtidos, o extrato enzimático apresentou atividade em todas as faixas de pH testadas, porém, observou-se maior atividade em pH 5,0, o que confirma a predominância de proteases ácidas. Em valores superiores houve decréscimo de atividade, apresentando em pH 10,0 uma redução de até 52,39% da atividade máxima.

Tais resultados são semelhantes com estudos que avaliaram o pH ótimo de proteases de outras espécies de cogumelos, como *Pleurotus albidus* e *Lentinus crinitus*, que foram cultivados em condições semelhantes de fermentação submersa (MARTIM *et al.*, 2017; MAGALHÃES *et al.*, 2019). Em condições de cultivo em meio sólido, Cha *et al.* (2010) e Barbosa *et al.* (2020)

também relataram maiores atividades catalíticas em pH 5,0 nos extratos de *P. eryngii* e *P. ostreatoroseus*, respectivamente.

Figura 4. Efeito do pH (A) e da temperatura (B) na atividade proteolítica de *Auricularia delicata* AM 290 cultivada em meio líquido (GYP + gelatina 0,5 %, p/v).



Fonte: Autora

Proteases com atividade ótima nessa faixa de pH são consideradas enzimas ácidas ou fracamente ácidas. Esses biocatalisadores são aplicados principalmente na indústria de alimentos, para diminuir o sabor amargo dos alimentos ao realizar o processo de hidrólise de proteínas, aumentar a qualidade de cervejas e sucos, auxiliar na produção de temperos, de molhos de soja, melhorar a textura de pastas de farinha e amaciar fibras musculares (PIRES; FONSECA; SERUDO, 2019; RAZZAQ *et al.*, 2019).

Quanto ao efeito da temperatura, foi observada atividade catalítica máxima em duas temperaturas, 50 e 60 °C, não sendo significativamente diferentes. Em temperaturas superiores houve uma redução de atividade de até 67,85% na temperatura de 70 °C. Entretanto, em valores inferiores essa redução foi mais acentuada, chegando a ser 21,22% inferior ao valor encontrado em temperatura ótima.

Magalhães *et al.* (2019) e Brito *et al.* (2019) observaram atividade ótima a 50 °C em enzimas proteolíticas produzidas por *L. crinitus*, tanto em cultivo submerso, como em substrato sólido. Os cogumelos *P. ostreatoroseus* e *P. citrinopileatus* também apresentaram temperatura ótima a 50 °C (CUI *et al.*, 2007; SILVA, 2015), entretanto, tais dados diferem do resultado observado em *A. delicata* AM 290, pois nenhuma dessas espécies apresentou dois pontos de temperatura ótima.

A presença de dois picos de atividade ótima de temperatura pode indicar a existência de diferentes tipos de protease no extrato bruto, visto que Bakr *et al.* (2022) observaram em extratos brutos de *P. florida* uma ampla faixa de temperatura ótima entre 45 e 55 °C, entretanto, ao purificarem a enzima de interesse, relataram atividade ótima na temperatura de 50 °C. Silva (2015) também observou uma atividade ótima a 50 °C em extratos brutos de *P. ostreatoroseus*, seguida de um decréscimo a 60° C e um aumento súbito de atividade enzimática a 70 °C.

Fatores ambientais, como temperatura e pH, podem influenciar o metabolismo do microrganismo na produção de enzimas, e para obter rendimentos melhores de proteases comercialmente viáveis, é essencial otimizar os meios de fermentação para melhorar a produção de proteases (SHARMA *et al.*, 2017). Além disso, é importante conhecer as características bioquímicas para estimular, potencializar e otimizar a atividade de proteases, confirmando a viabilidade de biocatalizadores para aplicação em escala industrial (BARBOSA *et al.*, 2020).

6. CONCLUSÃO

Os cogumelos comestíveis *Auricularia delicata* AM 290, *A. delicata* AM 282 e *A. fuscusuccinea* AM 242 são espécies produtoras de proteases, e expressaram atividade proteolítica semelhante nos testes qualitativos em meio sólido. Entre as três espécies de *Auricularia* cultivadas em meio líquido, *A. delicata* AM 290 produziu enzimas proteolíticas em quantidade significativa, com ação em faixa ampla de pH e temperatura, com predominância de proteases ácidas com atividade ótima em pH 5,0 e temperatura a 50 e 60 °C. As enzimas produzidas por *A. delicata* AM 290 possuem potencial para aplicação industrial, principalmente na indústria de alimentos.

7. REFERÊNCIAS

- ALI, S. M. *et al.* Recovery and partial purification of fibrinolytic enzymes of *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc by aqueous two-phase system. **Separation and Purification Technology**, v. 122, p. 359-366, 2014.
- ALVARENGA, R. L. M.; NAVES, L. R. R.; XAVIER-SANTOS, S. The Genus *Auricularia* Bull. ex. Juss. (Basidiomycota) in Cerrado (Brazilian Savanna) areas of Goiás state and the Federal District, Brazil. **Mycosphere**, v. 6, n. 5, p. 532-541, 2015.
- ALVES, E. G. *et al.* Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, vol. 31, n. 5, p. 1224-1229, 2008.
- BAKR, A. *et al.* Purification and Characterization of Milk Clotting Enzyme from Edible Mushroom (*Pleurotus florida*). **Letters in Applied NanoBioScience**, v. 11, n. 2, p. 3362-3373, 2022.
- BANDARA, A. R. *et al.* Diversity of *Auricularia* (Auriculariaceae, Auriculariales) in Thailand. **PHYTOTAXA**, v. 292, n. 1, p. 019-034, jan. 2017.
- BARBOSA, E. E. P. *et al.* Cultivo de cogumelo comestível em resíduos lignocelulósicos de floresta tropical para produção de proteases. **Brazil Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 11, p. 92475-92485, nov. 2020.
- BATISTA, S. C. P. *et al.* Biomassa residual do processamento de produtos hortícolas da Amazônia para crescimento micelial e produção de proteases por uma espécie de cogumelo comestível. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 3, p.1-11, 2021.
- BENMRAD, M. O. *et al.* Purification and biochemical characterization of a novel thermostable protease from the oyster mushroom *Pleurotus sajor-caju* strain CTM10057 with industrial interest. **BMC Biotechnology**, v. 19, n. 43, p. 1-18, 2019.
- CHA, W. S. *et al.* Biochemical and enzymatic properties of a fibrinolytic enzyme from *Pleurotus eryngii* cultivated under solid-state conditions using corn cob, **Bioresource Technology**, v. 101, n. 16, p. 6475–6481, 2010.
- CHAUD, L. C. S.; VAZ, P. V.; FELIPE, M. G. Considerações sobre a produção microbiana e aplicações de proteases. **Nucleus**, v. 4, n.1-2, p. 87-97, 2007.
- CHEN, L.S. *et al.* Produção de enzimas proteolíticas neutras por fermentação fúngica em meio semissólido. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, nº 14, 2003, Florianópolis. **Anais [...]**. 2003.
- CHOUDHURY, M. P.; SARMA, T. C. Studies on Ear Fungus-*Auricularia* from the Woodland of Nameri National Park, Sonitpur District, Assam. **International Journal of Interdisciplinary and Multidisciplinary Studies (IJIMS)**, v. 1, n.5, 262-265, 2014.

COELHO, M. P. S. L. V. *et al.* Alternativa de fontes nutricionais para desenvolvimento da fase micelial e produção de hidrolases por cogumelo comestível de floresta tropical. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 7, n. 3, p. 22890-22907, mar. 2021.

CUI, L. *et al.* An alkaline protease from fresh fruiting bodies of edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 81-85, 2007.

DOHMAE, N. *et al.* Purification and characterization of intracellular proteinases in *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 59, n. 11, p. 2074-2080, 1995.

ENZYMES Market Size, Share & Trends Analysis Report by Type (Industrial, Specialty), By Product (Carbohydrase, Proteases), By Source (Microorganisms, Animals), By Region, And Segment Forecasts, 2021 – 2028. **GRAND VIEW RESEARCH**, 2021. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry>. Acesso em: 27 dez. 2021.

FERNANDÉZ, Y. M. N.; CAÑÓN, E. R. P.; ENAO, L. G. Aislamiento y producción de semilla de *Auricularia fuscosuccinea* (Mont.) Henn. y *Crepidotus palmarum* Sing. usados tradicionalmente en Pauna (Boyacá, Colombia). **Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas**, v. 11, n. 1, p. 151-158, jan./jun. 2017.

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

GARCIA, M. C. C. *et al.* **Biología de hongos**. Bogotá: Universidad de los Andes, Facultad de Ciencia, 2012.

GUERRERO, R. T.; HOMRICH, M. H. **Fungos macroscópicos comuns no Rio Grande do Sul** – Guia para Identificação. 2 ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 1999. 117 p.

GURUMALLESH, P. *et al.* A systematic reconsideration on proteases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 128, p. 254-267, 2019.

INÁCIO, F. D. *et al.* Proteases of wood rot Fungi with emphasis on the genus *Pleurotus*. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-10, 2015.

JIANG, S. *et al.* The products from fermentation of wheat bran by *Auricularia polytricha* strain and the effects of the products on rheological properties of dough sheet. **Food Science & Nutrition**, v. 8, p. 1345-1354, 2020.

KALIYAPERUMAL, M.; KEZO, K.; GUNASEELAN, S. **A Global Overview of Edible Mushrooms**. In: Singh B., Lallawmsanga, Passari A. (eds) *Biology of Macrofungi*. Fungal Biology. Springer, Cham. 2018.

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

KUMARAN, S. *et al.* Purification of an Intracellular Fibrinolytic Protease from *Ganoderma lucidum* Vk12 and its Susceptibility to Different Enzyme Inhibitors. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 4, p. 413-420, 2011.

LOONEY, B. P.; BIRKEBAK, J. M.; MATHENY, P. B. Systematics of the genus *Auricularia* with an emphasis on species from the southeastern United States. **North American Fungi**, v. 8, n. 6, p. 1-25, 2013.

MACHADO, A. R. G. *et al.* Production and characterization of proteases from edible mushrooms cultivated on amazonic tubers. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 46, p. 2160-2166, 2017.

MADHUSANKHA, G. D. M. P.; THILAKARATHNA, R. C. N. Meat tenderization mechanism and the impact of plant exogenous proteases: A review. **Arabian Journal of Chemistry**, vol. 14, p. 1-18, 2021.

MAGALHÃES, A. A. S. *et al.* Produção e caracterização de enzimas proteolíticas de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693 do bioma amazônico (Polyporaceae). **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais**, v. 14, n. 3, p. 453-461, 2019.

MARTIM, S. R. *et al.* Extração líquido-líquido de proteases de *Pleurotus albidus* (DPUA 1692) empregando sistema de duas fases aquosas (peg-fosfato). **Diversidade Microbiana da Amazônia**, Editora INPA, 2015.

MARTIM, S. R. *et al.* *Pleurotus albidus*: A new source of milk-clotting proteases. **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, n.7, p. 660-667, 2017.

MIAO, J. *et al.* Isolation, structural characterization and bioactivities of polysaccharides and its derivatives from *Auricularia* – A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 150, p. 102-113, 2020.

NISHIWAKI, T.; ASANO, S.; OHYAMA, T. Properties and substrate specificities of proteolytic enzymes from the edible basidiomycete *Grifola frondosa*. **Journal of Bioscience na Bioengineering**, v. 107, n. 6, p. 605-609, 2009.

PIRES, C. B. A.; FONSECA, J. S.; SERUDO, R. L. Proteases produzidas por microorganismos na região Amazônica. **Scientia Amazonia**, v. 8, n. 1, p. B15-B33, 2019.

RAO, M. B. *et al.* Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RAZZAQ, A. *et al.* Microbial Proteases Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, p. 1-20, 2019.

SABOTIC, J. *et al.* Basidiomycetes harbour a hidden treasure of proteolytic diversity. **Journal of Biotechnology**, v. 128, p. 297–307, 2007.

SEKARA, A. *et al.* *Auricularia* spp. – mushrooms as Novel Food and therapeutic agents – a review. **Sydowia**, v. 67, p. 1-10, 2015.

SHARMA, K. M. *et al.* Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, p. 115-126, 2017.

SHIN, H. H.; CHOI, H. S. Purification and Partial Characterization of a Metalloprotease in *Flammulina velutipes*. **Journal of Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 20-25, 1998.

SILVA, B. C. R. *et al.* Isolamento e seleção de micro-organismos produtores de enzimas de interesse comercial. **Scientia Plena**, vol. 14, n. 2, 2018.

SILVA, L. S. C. **Produção de proteases neutras de cogumelos para aplicação na indústria de detergente**. 2015. 58p. Dissertação (Mestrado em Diversidade Biológica) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

SILVA, L. S. C. *et al.* Comparação entre processos de fermentação na produção de enzimas por cogumelos comestíveis. **Diversidade Microbiana da Amazônia**, p. 361-365, 2015.

SILVA, R. R. **Fermentação, purificação e caracterização da protease produzida pelo fungo *Aspergillus fumigatus* Fresenius**. 2011. 60p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto.

SOUZA, H. Q. *et al.* Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, pg. 116-124, Campinas, SP, 2008.

TEIXEIRA, M. F. S. *et al.* **Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada** (Aplicações Biotecnológicas). Manaus: Edua, 2011. 255 p.

VERMELHO, A. B. *et al.* Enzimas proteolíticas: Aplicações Biotecnológicas. *In*: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia** – Produção, Aplicações e Mercado. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 273-287.

WEBSTER J.; WEBER, W. S. **Intriduction to Fungi**. Cambridge: Cambridge University Press, 3ed. 2007, 875 p.

XIAO, B. *et al.* The lipid lowering and antioxidative stress potential of polysaccharide from *Auricularia auricula* prepared by enzymatic method. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 187, p. 651-663, 2021.