UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

KAROLINE DOS SANTOS ARAÚJO

TECNOLOGIA DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE PROTEASES E PREBIÓTICOS DE COGUMELO COMESTÍVEL GELATINOSO DA ORDEM AURICULARIALES

MANAUS-AM
2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

KAROLINE DOS SANTOS ARAÚJO

TECNOLOGIA DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE PROTEASES E PREBIÓTICOS DE COGUMELO COMESTÍVEL GELATINOSO DA ORDEM AURICULARIALES

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

ORIENTADOR (A): DOUTORA MARIA FRANCISCA SIMAS TEIXEIRA
COORIENTADOR: DOUTOR SALOMÃO ROCHA MARTIM

MANAUS-AM
2025

Ficha Catalográfica

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

A663t Araújo, Karoline dos Santos

Tecnologia de cultivo para produção de proteases e prebióticos de cogumelo comestível gelatinoso da ordem Auriculariales. / Karoline dos Santos Araújo. - 2025.

53 f.: il., color.; 31 cm

Orientador(a): Maria Francisca Simas Teixeira.
Coorientador(a): Salomão Rocha Martim.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Manaus, 2025.

1. Bioativos. 2. Enzimas. 3. Auricularia. 4. Cultivo em dois estágios. I. Teixeira, Prof. Dr. Maria Francisca Simas. II. Martim, Prof. Dr. Salomão Rocha. III. Universidade Federal do Amazonas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título

KAROLINE DOS SANTOS ARAÚJO

TECNOLOGIA DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE PROTEASES E PREBIÓTICOS DE COGUMELO COMESTÍVEL GELATINOSO DA ORDEM AURICULARIALES

Dissertação apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em dez de março de dois mil e vinte e cinco.

BANCA EXAMINADORA

Doutor Salomão Rocha Martim (Presidente)

Universidade Nilton Lins

Doutora Ana Rita Gia Machado (Membro)

Centro Universitário Fametro

Doutora Kilma Cristiane Silva Neves (Membro)

Instituto Federal do Amazonas

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família, pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Chegar ao final desta jornada foi um sonho realizado, mas também um caminho repleto de desafios, aprendizados e superações. Esta dissertação é fruto do esforço coletivo de muitas pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este momento se tornasse realidade. É com o coração cheio de gratidão que registro aqui meus mais sinceros agradecimentos.

Primeiramente, agradeço a Deus e aos meus guias espirituais por me concederem força, saúde e sabedoria ao longo de todo o processo. Sem essa fonte infinita de inspiração e fé, nada disso seria possível. À minha família, que sempre foi minha base. Aos meus pais, Utarciso e Maria do Socorro, por todo o amor, compreensão e ensinamentos. Obrigada por acreditarem em mim e me incentivarem a buscar os meus sonhos, mesmo quando as adversidades pareciam intransponíveis. Vocês são meu porto seguro.

Á minha irmã Ane Beatriz que sempre teve palavras de incentivo e descontração para aliviar a tensão em meio as dificuldades. À uma pessoa especial, Gizelle Lima, cuja presença discreta e constante foi uma fonte de inspiração e equilíbrio. Sua companhia tornou essa jornada mais leve e significativa.

Ao meu primeiro orientador na jornada científica, Raimundo Felipe (*in memoriam*), a minha eterna gratidão por ter plantado essa semente na minha cabeça. À minha orientadora, Maria Francisca, por ter me acolhido novamente ao seu laboratório. Obrigada pelo apoio, paciência e confiança depositados em mim. Vocês foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por me guiarem e por acreditarem em meu potencial.

Meu profundo agradecimento aos meus amigos, em especial, a Elliza, por estarem ao meu lado em todas as situações, sejam elas de alegria ou dificuldade. Aos meus colegas de laboratório Victor, Salomão, Tiara, Ana, Samara e Laynah por todo o suporte e ajuda.

Agradeço à Universidade Federal do Amazonas, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec), ao Laboratório de Micologia Médica e Industrial da UFAM, à Coleção de Cultura (DPUA), e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Por fim, dedico este trabalho a todos aqueles que acreditam na importância do conhecimento científico como ferramenta de transformação social e ambiental. Que esta dissertação seja um pequeno contributo para um mundo mais justo e equilibrado.

A todos, meu mais profundo e sincero obrigada.

“Procure descobrir o seu caminho na vida. Ninguém é responsável por nosso destino, a não ser nós mesmos.”

Chico Xavier

RESUMO

Os microrganismos representam uma fonte promissora de proteases devido à sua ampla diversidade bioquímica. No entanto, estudos sobre a produção dessas enzimas por cogumelos do gênero *Auricularia* ainda são escassos. Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a atividade qualitativa prebiótica e a produção de proteases extracelulares por *Auricularia delicata* DPUA1625, visando a otimização das condições de cultivo e a caracterização parcial das enzimas produzidas. O isolado de *A. delicata* foi cedido pela Coleção de Culturas DPUA e mantido em meio Batata Dextrose Ágar (BDA), suplementado com 0,5% (p/v) de extrato de levedura, em placas de Petri. Os cultivos foram incubados a 25 °C, na ausência de luz, por oito dias. O crescimento micelial foi avaliado em sete diferentes meios de cultura, com o objetivo de selecionar o meio mais adequado para a obtenção do inóculo e sua posterior manutenção. Para a produção de proteases, os cultivos foram realizados por fermentação submersa em meio líquido GYP (glicose, extrato de levedura e peptona), suplementado com 0,5% (p/v) de gelatina, ajustado para pH 6,4. A fermentação foi conduzida a 28 °C, sob agitação de 150 rpm, por oito dias. Ao final do processo fermentativo, a biomassa fúngica foi separada do extrato bruto por filtração a vácuo. A otimização da produção de proteases foi realizada em duas etapas. Primeiramente, foi conduzido um pré-cultivo em 50 mL de meio GYP por quatro dias, nas mesmas condições de temperatura e agitação. A biomassa obtida foi transferida para uma nova fermentação, sob condições idênticas, compondo a segunda etapa do cultivo.

A atividade proteolítica foi determinada utilizando azocaseína a 1% (p/v) como substrato. A avaliação qualitativa da atividade prebiótica foi realizada em meio MRS (Man Rogosa and Sharpe), suplementado com o extrato bruto nas concentrações de 0,1%, 0,25% e 0,5% (v/v), utilizando *Lactobacillus casei* como microrganismo padrão. Os cultivos foram mantidos a 37 °C. Os resultados parciais indicaram que, entre os meios testados, o ágar BDA suplementado com extrato de levedura (BDA+YE) foi o mais eficiente para o crescimento micelial de *A. delicata*. A atividade máxima das proteases foi observada em pH 6,0 e a 60 °C, sugerindo que a enzima produzida apresenta perfil levemente ácido, com potencial aplicação nas indústrias alimentícia e cervejeira.

Palavras-chave: Bioativos; Enzimas; *Auricularia*; Cultivo em dois estágios.

ABSTRACT

Microorganisms represent an excellent source of proteases due to their great biochemical diversity. Among protease-producing fungi, few studies emphasize the relationship with the bioprocesses of mushrooms of the genus Auricularia. This research aimed to evaluate the qualitative activity of prebiotics and the production of extracellular proteases of Auricularia delicata DPUA1625 for the optimization of production and partial characterization of proteolytic enzymes under standardized conditions. The mushroom used in this study was provided by the DPUA Culture Collection and was subcultured on Potato Dextrose Agar (PDA) supplemented with 0.5% (w/v) yeast extract in Petri dishes. The cultures were maintained at 25ºC, in the absence of light, for 8 days. The mycelial growth of A. delicata was evaluated in seven culture media in order to select a medium for obtaining the inoculum culture and maintenance. After this procedure, protease production and mycelial growth were evaluated by submerged fermentation in cultures in GYP liquid medium (Glucose-Yeast Extract-Peptone, supplemented with 0.5% (w/v) gelatin); pH 6.4. Fermentation was carried out at 28 °C, at 150 rpm, for eight days. At the end of the bioprocess, the biomass was separated from the crude extract by vacuum filtration. The optimization of the culture conditions for protease production was performed by cultivation in two stages: initially, A. delicata was pre-cultivated in 50 mL of GYP for four days, at 28 °C, at 150 rpm, then the mycelial mass separated by vacuum filtration was transferred to the second stage culture and cultures were maintained under similar pre-cultivation conditions. Azocasein 1% (w/v) was used to determine the activity and partial characterization of the proteases. The qualitative activity The prebiotic activity was evaluated in liquid medium [MRS (Man Rugosa and Sharpe)], adding the crude extract (0.1%, 0.25% and 0.50%) recovered from the best fermentation process. Lactobacillus casei was used as standard. The cultures were maintained at 37 ºC. The partial result indicated that, among the media tested, PDA+YE agar was the medium in which A. delicata expressed the highest mycelial density. The optimum protease activity was observed at pH 6.0 and 60 ºC. These data indicate that A. delicata produces slightly acidic protease with importance for application in the food and beer industries.

Keywords: Bioactives, Enzymes, *Auricularia*, Two-step cultivation.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Espécies de cogumelos do gênero *Auricularia delicata*.....15

Figura 2. Ciclo de vida de *Auricularia Auricula-judae.* Os principais eventos no ciclo de vida são plasmogamia (P), cariogamia (K) e meiose (M).....16

Figura 3. Fluxograma das principais tecnologias de cultivo de cogumelos.....18

Tabela 1. Valor nutricional dos cogumelos.....20

Tabela 2. Meios de Cultura para crescimento de *A. delicata*.....24

CAPITULO 01

Tabela 1. Meios de cultura para avaliação do crescimento e vigor micelial de *A. delicata* DPUA 1625.....33

Tabela 2. Média da velocidade do crescimento micelial radial e vigor micelial de *A. delicata* DPUA 1625 cultivada em diferentes meios de cultura, na ausência ou presença de luz, durante oito dias.....36

Figura 1. *Auricularia delicata* DPUA 1625 cultivada na ausência de luz: (A) crescimento micelial significativo em MEA; (B) colônia expressando massa micelial fortemente adensada em BDA+ YE.....37

Tabela 3. Efeito do cultivo em duas etapas na atividade de proteases e produção de biomassa por *A. delicata* DPUA1625, em comparação com o cultivo em meio GYP.....38

Figura 2. Efeito do pH na atividade (A) e estabilidade (B) das proteases de *A. delicata* DPUA 1625.....39

Figura 3. Efeito da temperatura na atividade (A) e estabilidade (B) das proteases de *A. delicata* DPUA 1625.....39

Tabela 4. Efeito de íons e inibidores e íons metálicos na atividade proteolítica de *A. delicata* DPUA 1625.....40

Tabela 5. Atividade prebiótica do extrato de A. delicata DPUA 1625 obtido no Estágio II do cultivo em duas etapas..... 41

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 13
2. REVISÃO DE LITERATURA 15
2.1 Enzimas proteoliticas 15
2.2 Cogumelos como fonte de protease 16
2.3 Gênero *Auricularia* 17
2.4 Fermentação submersa 18
2.5 Tecnologia de cultivo de cogumelos 20
2.6 Valor nutricional dos cogumelos comestiveis 21
2.7 Prebioticos 22
2.8. Mecanismo de ação dos prebióticos 24
3. OBJETIVOS 26
3.1 Objetivo geral 26
3.2 Objetivo específicos 26
4. MATERIAL E MÉTODOS 27
4.1 Obtenção de cultura pura e viável 27
4.2 Seleção de meio de cultura sólido para obtenção da cultura inóculo e manutenção de *Auricularia delicata* 27
4.3 Produção das proteases por Fermentação Submersa 28
4.3.1 Inóculo 28
4.3.2 Obtenção de enzimas proteolíticas por FES 28
4.3.3 Produção das proteases por *Auricularia delicata* por Fermentação submersa 28
4.4 Tecnologia de cultivo: efeito do cultivo em duas etapas no crescimento e produção das proteases por A. delicata 28
4.4.1 Cultivo em dois estágios 28
4.4.1.1 Estágio I: preparação do inóculo 28
4.4.1.2 Estágio II: produção das enzimas proteolíticas e avaliação do crescimento micelial 28
4.5 Determinação da atividade quantitativa das proteases 29
4.5 Caracterização das Proteases 29
4.5.1 Determinação do efeito do pH e da temperatura na atividade e estabilidade da protease 29
4.5.2 Efeito de inibidores de proteases e íons metálicos na atividade proteolítica 29
4.6 Produção da biomassa de Auricularia delicata em escala ampliada 29
4.7 Determinação da composição centesimal da biomassa 30
4.8 Atividade Prebiótica 30
4.8.1. Avaliação in vitro das propriedades prebióticas do extrato 30

4.9 Análise estatística 31
CAPÍTULO 01 30
Estratégias de cultivo para crescimento de cogumelo gelatinoso e obtenção de extrato bruto com atividade proteolítica e prebiótica 32
1. INTRODUÇÃO 33
2. MATERIAL E MÉTODOS 34
2.1 Cogumelo 34
2.2 Seleção de meio de cultura sólido para obtenção da cultura inóculo *Auricularia delicata* DPUA 1625 34
2.3 Produção de proteases e biomassa de A. delicata DPUA 1625 por fermentação submersa 35
2.3.1 Fermentação submersa 35
2.3.2 Determinação do crescimento A. delicata DPUA 1625 com base no peso da biomassa desidratada 35
2.3.3 Determinação da atividade proteolítica 35
2.4 Avaliação do efeito do cultivo em duas etapas na produção de protease e biomassa por *A. delicata* DPUA 1625 36
2.5 Caracterização bioquímica das proteases 36
2.5.1 Efeito do pH e da temperatura na atividade e estabilidade da protease 36
2.5.2 Efeito de inibidores e íons metálicos na atividade proteolítica 37
2.6 Avaliação in vitro da propriedade prebiótica do extrato bruto de A. delicata DPUA 162 37
2.7 Análise estatística 37
3. RESULTADO E DISCUSSÃO 37
3.1 Crescimento micelial radial e vigor micelial de A. delicata DPUA 1625 35
3.2 Avaliação do cultivo em duas etapas na produção protease e biomassa 39
3.3. Caracterização bioquímica das proteases 40
3.3.1. Efeito do pH e da temperatura na atividade e estabilidade da protease 40
3.3.2 Efeito de inibidores e íons metálicos na atividade proteolítica de A. delicata DPUA 1625 42
3.3 Análise centesimal 43
3.4 Atividade prebiótica 44
4. Conclusão 44
5.Agradecimentos 45
6. Referências 45
6. CONCLUSÃO 48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 48

1 INTRODUÇÃO

O aproveitamento de fontes naturais para produção de novos bioprodutos é o principal incentivo para o desenvolvimento de diversos setores da indústria. A biodiversidade do Brasil apresenta grande potencial para a busca de novos compostos bioativos para transformação em produtos úteis e de maior valor agregado (Souza et al., 2020).

Entre as diversas alternativas disponíveis na indústria, as proteases, que são hidrolases que degradam proteínas, se sobressaem. Estas que correspondem a 75% das enzimas industriais, sendo 65% comercializadas mundialmente (Rosa, 2023). Apesar de as enzimas proteolíticas mais estudadas serem de origem animal ou vegetal, as de origem microbiana surgem como uma alternativa economicamente viável (Fernandes, 2020).

Enzimas de origem microbiana possuem diversas aplicações biotecnológicas, destacando-se por terem uma abordagem sustentável. Esses biocatalisadores vêm sendo amplamente utilizados na fabricação de detergentes, fármacos, cosméticos, têxteis, produtos de limpeza e na indústria química. No setor alimentício, as proteases desempenham um papel fundamental em processos como panificação, produção de bebidas, laticínios, processamento de carnes e fabricação de suplementos dietéticos (Gurumallesh et al., 2020).

As proteases disponíveis atualmente no mercado não suprem a demanda comercial para os diversos usos industriais. Essa limitação na oferta de proteases incentiva a realização de estudos em busca de outras fontes alternativas dessas enzimas, com destaque para os fungos filamentosos, a exemplo dos cogumelos (Batista et al., 2021; Madhusankha; Thilakarathna, 2021).

Os microrganismos representam uma excelente fonte de proteases devido a sua ampla diversidade bioquímica. Esses biocatalisadores são importantes no controle da síntese de proteínas que regulam diferentes processos fisiológicos, como formação, nascimento, envelhecimento e até morte (Razzaq et al., 2020).

Diferentes setores industriais têm demonstrado interesse crescente pelo uso de enzimas fúngicas, incluindo proteases. Entre os fungos, certas espécies de basidiomicetos são excelentes fontes de diversas compostos com atividade biológica. Exemplos notáveis incluem *Ganoderma lucidum, Lentinus citrinus, L. crinitus, Pleurotus albidus, P. ostreatoroseus P. eryngii, P. sajor-caju,* amplamente citados como produtores de compostos bioativos, a exemplo das proteases (Martim et al., 2017; Batista et al., 2020; Nóbrega, 2022).

Espécies de basidiomicetos comestíveis como as representantes do gênero *Auricularia*

apresentam excelentes propriedades medicinais. Esses cogumelos são reconhecidos por apresentarem 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 (Zhang, 2022).

Apesar de serem reconhecidas por seu valor nutricional e medicinal, são raros os relatos científicos que exploram espécies de *Auricularia* como potenciais produtoras de enzimas. Dados da literatura mostram *A. polytricha* pode sintetizar celulases e hemicelulases, além de enzimas fibrinolíticas, sugerindo seu potencial biotecnológico (Jiang et al., 2020).

Estudos recentes têm investigado fontes naturais de compostos prebióticos, incluindo espécies do gênero *Auricularia*. Esses cogumelos possuem polissacarídeos bioativos, como β-glucanas, que apresentam ação prebiótica e contribuem para o fortalecimento do sistema imunológico e prevenção de doenças metabólicas (Zhao et al., 2018).

Os prebióticos têm ganhado destaque no campo da biotecnologia devido ao seu papel na promoção da saúde intestinal e no equilíbrio da microbiota. São definidos como substâncias não digeríveis que estimulam seletivamente o crescimento ou a atividade de microrganismos benéficos no intestino, como bifidobactérias e lactobacilos (Gibson et al., 2017). Nesse contexto, a investigação do potencial de *Auricularia* na produção de compostos prebióticos abre novas perspectivas para o desenvolvimento de produtos funcionais e nutracêuticos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Enzimas proteolíticas

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) (Tomas, 2023).

As enzimas proteolíticas são classificadas com base em suas características e podem ser divididas de acordo com a posição da ligação peptídica que clivam na cadeia polipeptídica. Quando a clivagem ocorre nas extremidades da cadeia, próximas ao grupo amino ou carboxi-terminal, essas enzimas são denominadas exopeptidases. Já as endopeptidases atuam no interior da cadeia, rompendo ligações peptídicas distantes dos grupos terminais do substrato (Batista, 2021; Nóbrega, 2022).

Outra classificação das proteases leva em consideração o grupo químico do centro ativo, seja aminoácidos (serino-, cisteíno-, aspartato-, treoninoprotease, e outros) ou íons metálicos (metaloprotease) (Inácio et al., 2015). Uma outra forma de de classificação leva em conta a faixa de pH ótimo de atividade, sendo denominadas proteases ácidas (pH 2,0-5,0), neutras (pH 6,0-8,0) e alcalinas (pH 9,0-11,0) (Razzaq et al., 2019).

As proteases são amplamente utilizadas no mercado mundial, representando cerca de 75% do total de enzimas comerciais, com vasta aplicação em diversos setores industriais. Na fabricação de detergentes, são usadas para facilitar a remoção de resíduos proteicos, como manchas de alimentos, sangue e outras secreções corporais. Além disso, esses biocaliasadores se destacam no processamento de produtos de panificação, bebidas e na produção de queijos (Gurumallesh et al., 2019; Barbosa et al, 2020).

Aproximadamente 45% das proteases produzidas no mercado são utilizadas como aditivos de detergentes. Nesse setor industrial são utilizadas, principalmente, proteases alcalinas com atividade em ampla faixa de temperatura (Silva, 2015). As proteases alcalinas também são utilizadas na indústria de beneficiamento do couro, onde atuam na remoção de restos de pelos e melhoria da qualidade do produto. Essas enzimas também são aplicadas no tratamento de resíduos, além de substituirem aditivos químicos e auxiliarem na redução da poluição ambiental (Gurumallesh et al., 2019).

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 ou 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 (Batista et al., 2021).

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 (Benchaya et al., 2022).

As proteases disponíveis atualmente não atendem a demanda comercial para uso em 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).

2.2. Cogumelos como fonte de protease

A maioria das proteases comerciais oriundas de fungos é produzidas por espécies filamentosas anamórficas, especialmente do gênero *Aspergillus* e *Trichoderma*. 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 (Gurumallesh et al., 2019).

Tabela 1. Principais coguelos estudados por seus valores nutricionais e medicinais.

Fungos	Referência
Microfungos	
Amylomyces rouxii	Yu; Chou (2005)
Aspergillus flavo furcatis	Alecrim et al. (2015)
Aspergillus niger	Castro et al. (2014)
Aspergillus oryzae	Patil et al. (2012); Vishwanatha et al. (2010)
Cryptococcus sp	Rao et al. (2011)
Mucor mucedo	Ibrahim et al. (2015)
Penicillium oxalicum	Hashem (2000)
Rhizomcor miehei	Hayaloglu; Karatekin; Gurkan (2014); Foda et al. (2012)
Rhizomcor nainitalensis	Khadeim et al. (2013)
Rhizopus microsporus	Sun et al. (2012)
Rhizopus oryzae	Kumar et al. (2005)
Thermomcor indicae-seudaticae	Merheb-Dini et al. (2010)
Macrofungos	
Coprinus lagopides	Shamtsyan et al. (2014)
Hericium erinaceum	Nakamura et al. (2014)
Piptoporus soloniensis	El-Baky et al. (2011)

Fonte: Autoria própria

Pleurotus ostreatus	Yin et al. (2014); Lebedeva; Proskuryakov (2009)
Schizophyllum commune	Okamura-Matsui et al. (2001)

2.3. Gênero *Auricularia*

O gênero *Auricularia* 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; Xiao et al., 2020 Nóbrega,2022; Santos, 2023). As espécies desse gênero parecem orelhas humanas e possuem consistência cartilaginosa, motivo pelo qual recebeu o nome *Auricularia* (lat. *auris* = orelha) (Garcia et al., 2012; Nóbrega,2022).

Figura 1. Basidiocarpo de *Auricularia delicata*.

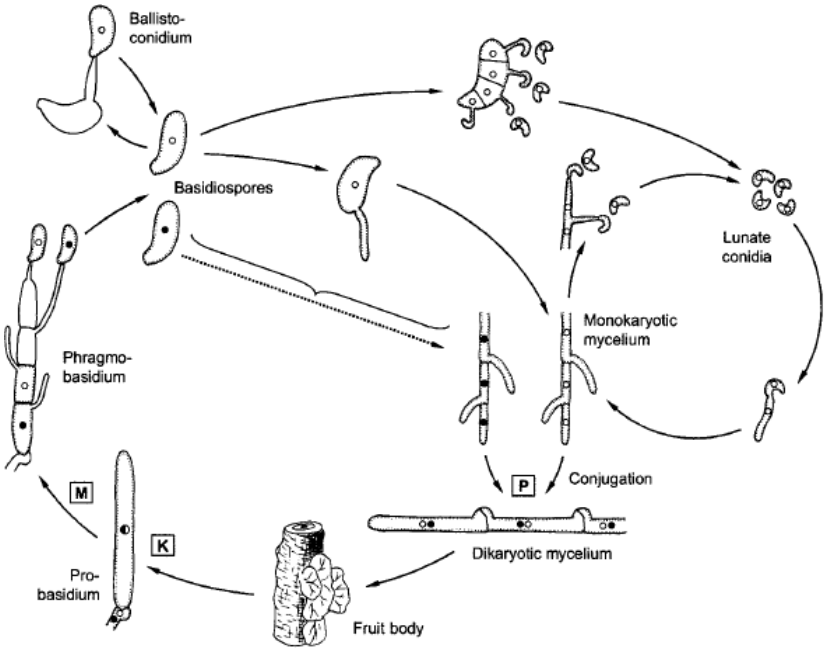
Fonte: Herbário Micológico Jair Putzke, Universidade Federal do Amazonas - UFAM.

Os basídios são cilíndricos, dividem-se em quatro células, e a germinação do basidiósporo pode ocorrer de diferentes formas dependendo do substrato no qual cresceram. Caso caia na superfície himenial do basidiocarpo, o basidiósporo germina repetidamente, produzindo um balistosporo por meio de um esterigma (Webster; Weber, 2007; Nóbrega, 2022).

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 (dentículos) que produzem microconídios semilunares. Esse tipo de microconídio também pode ser formado por hifas ramificadas de um micélio monocariótico, formando

dentículos 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 2) (Webster; Weber, 2007).

Figura 2. 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); Nóbrega (2021).

A maioria das espécies de *Auricularia* é comestível e possui produção comercial em larga escala. Apesar de não possuirem um sabor característico, os basidiocarpos são altamente nutritivos e possuem textura elástica que os torna ingredientes atraentes para sopas e saladas (Choudhury; Sarma, 2014; Sekara et al., 2015; Nóbrega, 2022). Apresentam também valor medicinal, produzindo compostos bioativos, como os polissacarídeos que podem apresentar atividade imunomoduladora, antitumoral, antioxidante, anticoagulante e função hipoglicêmica (Bandara *et al*., 2017; Miao et al., 2020; Nóbrega, 2022; Santos, 2023).

2.4. Fermentação submersa

Os processos fermentativos ocorrem desde a antiguidade, porém naquela época não se tinha o conhecimento de como a uva se transformava em vinho, a cevada em cerveja e a farinha

em pão. Posteriormente, pesquisadores começaram a esclarecer o fenômeno que estava envolvido nessas transformações, que então foi denominada de fermentação (Sanlier et al., 2020; Embrapa, 2023).

A fermentação é o mecanismo anaeróbico (sem oxigênio) de produção de energia que não envolve a cadeia respiratória. Consiste em um processo onde os microrganismos se reproduzem, a partir de fontes apropriadas de nutrientes, visando à obtenção de um bioproduto (Souza et al., 2017; Damaso e Couri, 2021).

Os processos fermentativos têm uma grande importância em vários setores de interesse para a sociedade como na indústria química, farmacêutica e na agricultura. Na indústria de alimentos, os bioprocessos são largamente empregados na produção de queijo, iogurte, manteiga, produtos de panificação, picles, carnes fermentadas, vinagres, enzimas, dentre outros (Grimm e Wosten, 2018).

O processo de fermentação é classificado em: fermentação submersa (FS) e a fermentação em estado sólido (FES). A FS ocorre em meio com presença de água livre e normalmente com substratos solúveis. Um exemplo clássico de meio para fermentação submersa é o caldo de cana-de-açúcar usado para produção de etanol (Embrapa, 2023).

A FES é definida como um processo fermentativo que ocorre na ausência ou quase ausência de água livre, onde o crescimento microbiano e a formação de produtos ocorrem na superfície de substratos sólidos. Nestes casos, a matéria-prima funciona como um suporte do microrganismo, dos substratos, do produto e da água adicionada para umedecer o suporte (Damaso & Couri, 2021).

O uso da FES oferece distintas vantagens sobre a FS, dentre as quais: a simplicidade do meio, principalmente para países com abundância de biomassa e de resíduos agroindustriais, e o uso de reatores menores, proporcionando economia de espaço. Destaca-se, ainda, a possibilidade de os rendimentos serem maiores que os obtidos em FS, além da ausência de formação de espuma, menor demanda de energia e, especialmente, a facilidade de controle de contaminação proporcionada devido a pouca quantidade de água no sistema (Embrapa, 2021).

A utilização da FES privilegia a sustentabilidade ambiental que vem sendo prioridade das políticas de pesquisa agropecuária em quase todo o mundo e se baseia na utilização racional dos recursos naturais e de resíduos agrícolas e industriais, viabilizando a obtenção de produtos com custo mais reduzido (Sanlier et al., 2019; Embrapa, 2021; Damaso e Couri, 2021).

2.5. Tecnologia de cultivo de cogumelos

A primeira espécie cultivada, de que se tem registro, foi *Auricularia auricula*, aproximadamente no ano de 600, seguida de *Flamulina velutipes*, no ano 800 e a terceira espécie foi *Lentinula edodes* e Shiitake, no ano de 900 (Silva, 2022).

A produção comercial de cogumelos começou a ser documentada por volta de 1700. O cultivo desses fungos ocorria em locais inusitados, como minas de carvão e calcário desativadas, antigas cervejarias, porões de residências, cavernas naturais, entre outras estruturas peculiares (Embrapa, 2023).

Nos séculos passados, diferentes culturas desenvolveram técnicas próprias para o cultivo de cogumelos. Os japoneses utilizavam troncos em decomposição, enquanto os chineses empregavam madeira e palha degradadas. Os europeus empregavam o cultivo ao ar livre, em bosques ou cavernas. No entanto, esses métodos eram lentos e demandavam um tempo considerável para o desenvolvimento do basidiocarpo. Para a produção em larga escala com finalidade industrial, tais técnicas seriam inviáveis devido à sua baixa eficiência e longo ciclo de cultivo (Urben e Uriartt, 2017; Embrapa, 2021).

Desta forma, pesquisas começaram a ser realizadas para a obtenção de novos substratos para o cultivo de cogumelos, tais como bagaço palha de arroz, carapaça da semente de algodão, caule de trigo, folha de bananeira e outras espécies vegetais. Na década de 1980, o desenvolvimento da técnica JunCao (Jun = cogumelo; Cao = gramíneas) promoveu a terceira grande mudança, pois uniu os benefícios sociais aos ecológicos e econômicos. Isso estabeleceu melhor equilíbrio ecológico entre plantas, fungos e animais. Inicialmente, o pesquisador Lin, fundador desta técnica, preocupou-se apenas em substituir parcialmente a madeira por outro material. Após muitos estudos, descobriu-se que Jun-Cao poderia substituir totalmente a serragem, assim como parte do farelo de trigo e de arroz, no substrato de cultivo (Embrapa, 2023).

As pesquisas utilizando gramíneas como substratos foram iniciadas a partir de espécies selecionadas, cultivando, colhendo e processando cada uma delas. Em seguida, testando-as com diversas espécies fúngicas. A escolha destas plantas foi devido à alta produtividade e riqueza em nutriente, bem como a alta capacidade de adaptação e ampla ocorrência, constituindo, portanto, substratos de boa qualidade para cultivo de ambos os tipos de cogumelo, comestíveis e medicinais (Urben, 2004).

À medida que a demanda por cogumelos continuou crescendo, novas tecnologias foram sendo exploradas (Figura 3) para melhorar a eficiência e a produtividade de seu cultivo. Embora as taxas de adesão tenham um longo caminho a percorrer, essas tecnologias tiveram o potencial de revolucionar significativamente a indústria de produção (Damaso e Couri, 2021; Silo, 2023).

Figura 3. fluxograma das principais tecnologia de cultivo de cogumelos.

Fonte: Própria autoria.

2.6. Valor nutricional dos cogumelos comestíveis

Do ponto de vista nutricional, os cogumelos são alimentos excepcionais, ricos em fibras, vitaminas, proteínas e minerais, além de apresentarem baixo valor calórico e teor reduzido de gordura. Em relação aos micronutrientes, destacam-se por suas propriedades bioativas. Além disso, por conterem todos os aminoácidos essenciais, são uma excelente opção para vegetarianos e veganos (Hilachuk e Paula,2022).

Os cogumelos *in natura* são fontes de vitaminas do complexo B, nomeadamente riboflavina (vitamina B2), niacina (vitamina B3) e ácido pantogénico (vitamina B5).

Curiosamente, as espécies silvestres são fontes alimentares de vitamina D de origem não animal (Haser, 2020).

Os basidiomas ainda fornecem minerais como o potássio que atua na regulação da pressão arterial, na redução do risco de doenças renais e coronárias e na melhoria do estado de saúde dos diabéticos. Além disso, são fontes de fósforo, cobre e selênio que possui funções estruturais e enzimáticas no organismo necessárias ao bom funcionamento do sistema imunológico (Meneses et al., 2021).

Os cogumelos também sintetizam diversas substâncias bioativas, como polifenóis, terpenóides, lactonas, agentes quelantes, polissacarídeos e glicoproteínas, algumas destas se destacam por sua elevada capacidade antioxidante e ação imunomoduladora (Plasek, 2019; Ribeiro, 2020). Desta maneira, os cogumelos são fontes de nutrientes que auxiliam e contribuem para a manutenção da saúde humana (Tabela 1).

Tabela 2. Valor nutricional dos cogumelos.

Valor nutricional	Cogumelo Branco	%DDR (adultos)	Cogumelos Shiitake	%DDR (adultos)	Cogumelo Castanho	%DDR (adultos)
Energia (kcal)	22	1%	34		27	1%
Lipídios (g)	0,3	1%	0,5		0,1	0
Ácidos saturados (g)	0	0	0	0	0	0
Hidratos de carbono (g)	3,3	1%	2,4	5%	4,1	1%
Açúcares (g)	1,7	--	3,6	--	1,7	--
Fibra (g)	1	4%	2,5	8%	0,6	2%
Proteínas (g)	3,1	6%	2,2	3%	2,5	5%
Riboflavina (mg)	0,4	29%	0,2	14%	0,5	36%
Niacina (mg)	3,6	23%	3,9	24%	3,8	24%
Ácido pantatênico(mg)	1,5	25%	3,6	60%	1,5	25%
Potássio (mg)	318	16%	304	15%	448	22%
Fósforo (mg)	86	12%	112	16%	120	17%
Selênio (µg)	9,3	17%	24,8	45%	26	47%
Cobre (mg)	0,3	30%	0,9	90%	0,5	50%

%DDR (Porcentagem da Dose Diária Recomendada)

Fonte: *Nutrition Data* e USDA *National Nutrient database for Standard Reference* (adaptada).

2.7. Prebioticos

O consumo regular dos alimentos funcionais pode auxiliar na manutenção da saúde, modulando a fisiologia do organismo, promovendo a manutenção dos níveis saudáveis de triglicerídeos, ação antioxidante e auxilia no bom funcionamento do intestino. Com isso, os alimentos contendo microrganismos probióticos representam uma grande oportunidade no

mercado de alimentos funcionais que proporcionam uma melhoria na saúde intestinal além de outros benefícios para os consumidores (Barros et al., 2021).

Os prebióticos são ingredientes alimentares não digeríveis, sendo a maior parte carboidratos, que auxiliam na proliferação de uma microbiota do cólon saudável a qual surte efeitos benéficos à homeostase sistêmica. Os prebióticos estimulam o crescimento preferencial de um número limitado de bactérias, especialmente, mas não exclusivamente, *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. (Cunningham et al., 2021), favorecendo a manutenção do microbioma intestinal saudável (Gibson et al., 2017; Kareb et al., 2018).

Para fornecerem benefícios, os galacto-oligossacarídeos se convertem em ácidos graxos de cadeia curta, entram no citosol das células epiteliais intestinais através de um mecanismo de transporte passivo (forma não ionizada) ou mecanismo de transporte ativo. Os ácidos graxos de cadeia curta, principalmente o butirato, suprimem a síntese de citocinas pró-inflamatórias e mediadores pró-inflamatórios. Além disso, reduzem o catabolismo das purinas e, em seguida, diminuem a formação e o acúmulo de ácido úrico e espécies reativas de oxigênio (Flesch et al., 2014; Hendler et al., 2018; Xinias et al., 2018).

O uso de prebióticos derivados da lactose está fortemente relacionado à prevenção do câncer de cólon e outras doenças que envolvem a inflamação gastrointestinal e/ou sistêmica como colites e doenças crônicas. Os mecanismos mais prováveis para esses efeitos são: modulação de enzimas xenobióticas; imunomodulação; supressão de espécies reativas de oxigênio; e modulação genética (Gibson et al., 2017; Hendler et al., 2018; Kareb et al., 2018).

Na prática clínica, o uso dos prebióticos está na maioria das vezes relacionado aos probióticos. Quando usados isoladamente e a longo prazo, estes têm demonstrado ótimos resultados na diminuição de risco de incidência de doenças malignas e na manutenção de uma saúde sistêmica geral (Gibson et al., 2017).

Os principais ensaios clínicos com prebióticos administrados por via oral abordam: obesidade, diabetes, síndrome metabólica, dislipidemia; saciedade; melhora da absorção de cálcio e outros minerais; saúde cutânea, aumento da retenção de líquidos; alergias; saúde urogenital; hábitos intestinais em crianças; diarreia; constipação e função imunológica em idosos (Gibson Gr et al., 2017; Zacheu, 2021)

Os únicos prebióticos disponíveis que possuem estudos para serem classificados como componentes ativos de alimentos funcionais são os frutooligossacarídeos (FOS) e a inulina. Ambos, são encontrados no trigo, frutas e vegetais como a cebola, chicória, alho, alcachofras, batata yacon, aspargos, beterraba, banana e tomate (Yang et al., 2021). Devido a sua estrutura,

são fermentados no cólon por bactérias endógenas, resultando em efeitos específicos sobre a fisiologia gastrointestinal, biodisponibilidade de minerais, sistema imune, gênese de tumores e regulação do colesterol sérico (Akalin,2017; Zacheu, 2021).

Adicionalmente, os prebióticos podem inibir a multiplicação de patógenos, garantindo benefícios adicionais à saúde do hospedeiro. Esses componentes atuam mais frequentemente no intestino grosso, embora possam apresentar algum impacto sobre os microrganismos do intestino delgado (Pimentel et al., 2005; Binns, 2020).

2.8 Mecanismo de ação dos prebióticos

Pelo fato de serem substâncias não-digeríveis, a ação dos prebióticos se dá por meio da estimulação do crescimento ou atividade das bactérias intestinais (Pimentel, 2005; Oliveira, 2008; Souza et al., 2010; Broers, 2020). A promoção do "efeito bifidogênico" relacionado à ação das bifidobactérias levaria a efeito semelhante ao descrito para os probióticos. Estudos em animais demonstraram ação estimuladora dos prebióticos sobre a diferenciação dos Th0 em Th1, na redução significativa dos níveis de IgE total, na modulação da resposta imunológica e na prevenção das doenças alérgicas (Teberga, 2017).

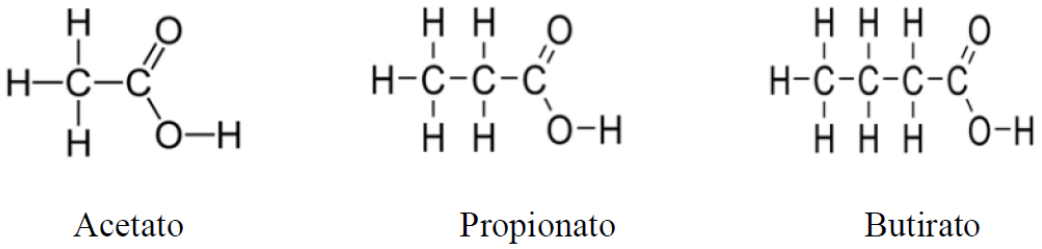
O aumento de bifidobactérias colônicas é considerado benéfico para a saúde humana graças à produção de compostos que inibem os patógenos potenciais, reduzindo os níveis sanguíneos de amônio e produzindo vitaminas e enzimas digestivas (Zacheu, 2021).

Em humanos, há evidências recentes de que o acréscimo de prebióticos às fórmulas infantis induz à produção de imunoglobulinas responsáveis pela modulação da tolerância oral em crianças com alto risco para o desenvolvimento de doenças alérgicas e reduz o risco do aparecimento de manifestações alérgica (Dias et al., 2021).

Atualmente, somente a inulina e o FOS (Frutooligossacarídeos) são conhecidos por apresentarem efeito bifidogênio, ou seja, estimulam o crescimento intestinal das bifidobactérias. Alguns estudos sugerem que 100% da inulina e dos FOS são fermentados no colón (Rosa et al, 2023).

A fermentação dos prebióticos no intestino leva à produção de ácido graxos de cadeia curta – AGCC (acetato, propianato e butirato) que são totalmente absorvidos pelo trato intestinal (Figura 4). Os AGCC têm um efeito sistêmico no metabolismo da glicose e dos lipídios causando diminuição da glicemia pós-prandial e reduzindo a concentração de triglicerídeos e colesterol sanguíneos (Capito e Filisetti, 1999).

Figura 4. Estrutura química dos ácidos graxos de cadeia curta.



Fonte: Adom; Nie, 2013.

Tanto os prebióticos como os probióticos e, principalmente, os simbióticos podem ser empregados como adjunto dietético em instituições hospitalares a fim de compor a dieta de convalescentes. A finalidade é recompor a microbiota intestinal do paciente e protegê-la do efeito deletério inevitável do consumo de antibióticos, prevenindo o estabelecimento de diarréias (Ferreira e Teshima, 2000).

3 OBJETIVOS

a. Objetivo geral

Avaliar a produção de proteases extracelulares por *Auricularia delicata* DPUA 1625, visando à otimização do processo produtivo, a caracterização parcial das enzimas proteolíticas, a obtenção de biomassa em condições padronizadas e a análise da atividade qualitativa de prebióticos

b. Objetivos específicos

- Verificar o crescimento micelial radial de *Auricularia delicata* DPUA 1625 em meio sólido para selecionar um meio formulado para manutenção da cultura matriz produtora de proteases;
- Avaliar a produção de proteases e de biomassa por fermentação em meio líquido utilizando o cultivo em duas etapas para selecionar o bioprocesso promissor;
- Proceder a caracterização bioquímica das proteases obtidas no bioprocesso selecionado;
- Determinar a composição da biomassa de *A. delicata* DPUA 1625 obtida em condições padronizadas;
- Avaliar a ação prebiótica do extrato bruto recuperado do bioprocesso selecionado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção de cultura pura e viável

A espécie de cogumelo comestível utilizada neste estudo, *Auricularia delicata* DPUA 1625, foi cedida pela Coleção de Culturas DPUA, da Universidade Federal do Amazonas-UFAM. As culturas conservadas foram reativadas em ágar Batata Dextrose (BDA), suplementada com Extrato de Levedura 0,5% (p/v), pH 5,6. Os cultivos foram preparados utilizando o meio de cultura sólido [BDA+YE 0,5 (p/v)], em placas de Petri, esterilizado a 121 ºC, por 15 minutos. Para crescimento do cogumelo, os cultivos foram mantidos a 25 ºC, na ausência de luz, por oito dias (Kirsch et al., 2011).

4.2 Seleção de meio de cultura sólido para obtenção da cultura inóculo e manutenção de *Auricularia delicata* DPUA 1625

O crescimento micelial de *A. delicata* DPUA 1625 foi avaliado em sete meios de cultura com a finalidade de selecionar um meio adequado para obtenção da cultura inóculo e manutenção desse cogumelo (Tabela 2).

Tabela 3. Meios de Cultura para crescimento de *Auricularia delicata*

Ordem	Meio de Cultura	Sigla
1	Ágar Batata Dextrose	BDA
2	Ágar Batata Dextrose + Extrato de Levedura (0,5 %, p/v)	BDA+ YE (0,5% p/v)
3	ágar Sabouraud	SDA
4	Ágar Sabouraud + Extrato de Levedura (0,5 %, p/v)	SDA+ YE (0,5% p/v)
5	Ágar extrato de malte	YM
6	Ágar extrato de malte + extrato de levedura (0,5 %, p/v)	YM+YE (0,5% p/v)
7	Ágar peptona e glicose +extrato de levedura (0,5 %, p/v)	GYP

Fonte: Própria autoria.

Os meios de cultura foram esterilizados a 121 ºC por 15 minutos e distribuídos em placas de Petri. O crescimento micelial foi observado a cada 24 horas nos cultivos deixados a 25 ºC, na ausência ou presença de luz, por oito dias. Nesses experimentos, o meio de cultura promissor foi definido com base no vigor do micélio, considerando-se o adensamento da massa micelial (critério subjetivo): nota 1,0 (micélio fracamente adensado); nota 2 (micélio mediamente adensado) e, nota 3 (micélio fortemente adensado), conforme a metodologia descrita por Martim, 2017.

4.3 Produção das proteases por Fermentação Submersa

4.3.1 Inóculo

Para obtenção do inóculo foram utilizados discos miceliais de 10 mm de diâmetro retirados do cultivo selecionado no item 4.2. As culturas foram mantidas por oito dias, a 25 ºC, na ausência de luz

4.3.2 Obtenção de enzimas proteolíticas por Fermentação submersa

4.3.3 Produção das proteases por *Auricularia delicata* por fermentação submersa

Para a obtenção das proteases foi utilizado o meio de fermentação GYP [Glicose-Extrato de Levedura-Peptona (GYP)] (g/L, água destilada), suplementado com gelatina 0,5% (p/v); pH 6,4. Em cada frasco de Erlenmeyer de 125mL contendo 50mL de meio líquido foi utilizado o inóculo selecionado no item 4.2. A fermentação foi conduzida a 28 °C, a 150 rpm, por oito dias. Ao término do bioprocesso, a biomassa foi separada do extrato bruto por filtração a vácuo, utilizando papel de filtro Whatman n 1. Posteriormente, as amostras de extrato foram novamente filtradas utilizando membranas de éster de celulose 0,45µm (Martim et al., 2017).

4.4 Tecnologia de cultivo: efeito do cultivo em duas etapas no crescimento e produção das proteases por *Auricularia delicata* DPUA 1625

4.4.1 Cultivo em dois estágios

O sistema de cultivo em duas etapas (Crotti, 1993) foi realizado com finalidade de verificar a influência na produção de massa micelial e das enzimas proteolíticas por *A. delicata* DPUA 1625, nas condições citadas no item 4.3.3.

4.4.1.1 <u>Estágio I:</u> preparação do inóculo

No estágio I um foi utilizado o inóculo do crescimento cultura significativo, citados no item 5.1.1. O inóculo selecionado foi transferido para Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL GYP, pH 6,4, mantidos a 28 ºC, 150 rpm. A influência da idade do inóculo foi testada no período de quatro e oito dias, simultaneamente.

4.4.1.2 <u>Estágio II:</u> produção das enzimas proteolíticas e massa micelial

Na segunda etapa, a massa micelial obtida no item 4.4.1.1 (Estágio I) foi lavada 10 vezes com água destilada esterilizada e suspensa em 50 mL de GYP, contendo 0,5% de gelatina, pH 6,5 e incubada novamente por 4 e 8 dias, a 30 ºC. A avaliação da produção de proteases e biomassa foram realizadas a cada 24 horas. A biomassa foi separada por filtração sob vácuo em papel de filtro Whatman no 1, seguindo as filtrações em membrana de éster de celulose de 0,45

μm (Ø) e em membrana polietersulfonica de 0,22 μm (Ø), respectivamente. No extrato bruto foi determinada a atividade proteolítica.

4.5 Determinação da atividade quantitativa das proteases

A atividade proteolítica foi determinada quantitativamente segundo metodologia descrita por Kirsch *et al.* (2013). Em cada tubo do tipo Falcon foi adicionado 250 μL da solução de azocaseína 1,0% (p/v), em tampão 0,1M Tris-HCl, pH 7,2 a 150 μL do extrato bruto. A mistura reacional foi incubada a 25 ºC, por uma hora, em câmara escura. Em seguida, foi adicionado 1,2 mL de ácido tricloroacético 10% (p/v). Essa mistura foi centrifugada a 4 ºC, 10.000 xg, por 5 minutos. Em seguida, 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 absorbância de 0,01 em uma hora a 440 nm, expressa em U/mL.

4.5. Caracterização das Proteases

4.5.1. Determinação do efeito do pH e da temperatura na atividade e estabilidade da protease

Para a determinação do pH ótimo, a atividade proteolítica foi determinada a 25 °C em diferentes valores de pH, utilizando-se as seguintes soluções-tampão a 0,1 M: acetato de sódio (pH 5 e 6), Tris-HCl (pH 7 e 8) e glicina-NaOH (pH 9 e 10). A temperatura ótima foi determinada pela incubação do extrato bruto em diferentes temperaturas (30 ºC a 80 °C). Para determinação da estabilidade ao pH, o extrato bruto foi diluído (1:1, v:v) nas seguintes soluções-tampão a 0,1 M: acetato de sódio (pH 5 e 6), Tris-HCl (pH 7 e 8) e glicina-NaOH (pH 9 e 10), mantido a 25 °C por uma hora. Na estabilidade térmica, o extrato foi incubado em diferentes temperaturas (30 a 70 °C), por uma hora (Barbosa et al., 2020).

4.5.2. Efeito de inibidores de proteases e íons metálicos na atividade proteolítica

O efeito de inibidores na atividade enzimática foi investigado utilizando na mistura reacional, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), ácido etileno-diaminotetracético (EDTA), ácido iodo acético (10 mM) e pepstatina (0,1 mM). Os íons metálicos utilizados foram $CaCl_2$, $CuSO_4$, $FeSO_4$, $MgSO_4$, $MnSO_4$, $ZnSO_4$, Na Cl e KCl (10 mM). As amostras foram incubadas nas condições ótimas de pH e de temperatura (Barbosa et al., 2020).

4.6 Produção da biomassa de *Auricularia delicata* DPUA 1625 em escala ampliada

Com base nos resultados obtidos da atividade quantitativa de proteases (item 4.4) a produção da biomassa de *A. delicata* foi realizada utilizando frascos Erlenmeyer em uma escala de 100ml, 200ml e 300ml. O meio de fermentação foi formulado conforme item 4.2. Neste foi adicionado inóculo conforme citado no item 4.2.1 a 12% do volume do meio de fermentação. A fermentação submersa foi conduzida sob as condições determinadas no item 4.2. Ao término do processo fermentativo a biomassa foi separada do extrato bruto e desidratada para quantificação e avaliação da composição centesimal.

4.7 Determinação da composição centesimal da biomassa

As análises de composição centesimal do cogumelo foram realizadas no laboratório de Tecnologia do Pescado da Universidade Federal do Amazonas-UFAM, citadas a seguir.

Umidade**:** determinada por dessecação em estufa com circulação de ar a 60 °C (método gravimétrico) até obtenção de peso constante (A.O.A.C, 2006).

Proteína total**:** determinada pela concentração de nitrogênio (%) segundo o método micro *Kjeldahl* e aplicando o fator de conversão 4,28 [valor adotado para a determinação da porcentagem de proteína para cogumelo, pois é admitido que apenas 70% dos compostos nitrogenados existentes nesses fungos sejam digeríveis pelo organismo humano (0,70*6,25=4,38) (Furlani e Godoy,2005).

Cinzas (resíduo mineral fixo): determinado por incineração do material em mufla a 550 °C-660 °C até obtenção de peso constante (A.O.A.C, 2006).

Lipídios**:** determinado de acordo com o método descrito por Bligh and Dyer (1959).

Fibras totais: A fibra bruta foi determinada através de digestão ácido-básica, segundo método de Weende estabelecido pela A.O.A.C (1997).

Carboidratos totais**:** estimados por diferença entre o somatório das porcentagens de umidade, proteína, lipídios, cinzas (Latinfoods 2002, Nepa 2006).

Energia: a energia total metabolizável = (4k de proteína) + (4kcal/g carboidratos totais) + (9kcal/g de lipídeos), preconizados pelo Latinfoods 2002; Nepa 2006.

4.8 Atividade Prebiótica

Na determinação da atividade de compostos com atividade prebiótica, foi utilizado o extrato bruto selecionado no item 4.4

4.8.1 Avaliação *in vitro* das propriedades prebióticas do extrato

O extrato selecionado no item 6 foi adicionado ao meio líquido MRS (Ágar De Man, Rogosa e Sharpe) em diferentes concentrações (0,1%, 0,25%, 0,50%). O meio MRS com glicose sem o *Lactobacillus casei* foi o controle negativo. O controle positivo foi o meio MRS líquido com o *L. casei*. No meio MRS contendo o extrato (10ml) foi inoculado com uma cultura da cepa probiótica *L. casei* na concentração de 10^8 células/ml. As soluções foram incubadas a 37°C por 48h em condições aeróbias. O crescimento das bactérias foi avaliado a 600 nm, a cada 24 horas (Hoseinifar et al., 2017).

4.9 Análise estatística

Os dados de todos os experimentos realizados em triplicata foram submetidos à análise de variância e às médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) utilizando Minitab, versão 19.0.

CAPÍTULO 01

K. S. ARAÚJO*, E. E. P. BARBOSA, T. S. CABRAL, L. PIMENTA, V. S. ALMEIDA, S. R. MARTIM, M. F. S. TEIXEIRA

Universidade Federal do Amazonas
ORCID ID: https://orcid.org/0000-0002-9568-5334 *
karoline.araujo@ufam.edu.br *

Estratégias de cultivo para crescimento de cogumelo gelatinoso e obtenção de extrato bruto com atividade proteolítica e prebiótica

RESUMO

Esta pesquisa teve como objetivo desenvolver estratégias *in vitro* para crescimento de *Auricularia delicata* integradando a seleção de tecnologia para obtenção de extrato proteolítico com ação prebiótica. O crescimento micelial foi avaliado em sete meios de cultura. A produção de proteases e o crescimento micelial foram realizados em fermentação submersa. A otimização das condições de cultivo para a síntese de proteases foi realizada por cultivo em duas etapas. A atividade prebiótica foi avaliada em meio Man Rugosa e Sharpe, adicionado de extrato bruto (0,1%, 0,25% e 0,50%). Em BDA+YE (ágar batata dextrose + extrato de levedura 0,5 %) *A. delicata* expressou maior densidade micelial. A produção significativa de protease (0,21 U/mL) foi determinada no extrato do cultivo em duas etapas. A atividade prebiótica significativa verificada com o uso de extrato bruto 0,50%. O extrato de *A. delicata* tem atividade proteolítica e prebiótica com importância para aplicação na indústria alimentícia.

PALAVRAS-CHAVE: Prebióticos Auricularia delicata, Cultivo em duas etapas, Fermentação submersa.

ABSTRACT

This research aimed to develop in vitro strategies for the growth of *Auricularia delicata*, integrating the selection of technology to obtain a proteolytic extract with prebiotic action. Mycelial growth was evaluated in seven culture media. Protease production and mycelial growth were performed in submerged fermentation. The optimization of culture conditions for protease synthesis was performed by two-stage cultivation. The prebiotic activity was evaluated in Man Rogosa and Sharpe medium, in addition to crude extract (0.1%, 0.25%, and 0.50%). In PDA+YE (potato dextrose agar + 0.5% yeast extract), *A. delicata* expressed higher mycelial density. Significant protease production (0.21 U/mL) was determined in the extract from the two-stage culture. Significant prebiotic activity was verified with the use of 0.50% crude extract. *A. delicata* extract has proteolytic and prebiotic activity with importance for application in the food industry.

KEYWORDS: *Auricularia delicata* Prebiotics, Two-stage cultivation, Submerged fermentation, Enzymes.

1. INTRODUÇÃO

Produtos alimentícios com propriedades funcionais são relevantes para o bem-estar e a prevenção do desenvolvimento de doenças. Os cogumelos comestíveis são alimentos que vêm se destacando porque contém substâncias bioativas com propriedades benéficas à saúde humana (Faraki *et al*., 2020). A diversidade de cogumelos está estimada em 140.000 espécies, mas apenas 10% são reconhecidas como alimento e fonte de compostos bioativos com propriedades terapêuticas (Soccol *et al*., 2017; Faraki *et al*., 2019).

Entre os macrofungos comestíveis, espécies de *Auricularia* têm destaque na medicina tradicional e como alimento funcional (Soccol *et al*., 2017; Faraki *et al*., 2019). Esses fungos crescem tipicamente no tronco das árvores e possuem basidiomas gelatinosos. Em relação ao valor nutricional, são constituídos principalmente por carboidratos (66,1%), proteínas (12,5%) cinzas (3,6%) e lipídeos (1,7%). Além desses nutrientes, os cogumelos são fontes de polissacarídeos hidrossolúveis, quitina e pectina, que atuam como prebióticos (Bandara *et al*., 2017; Faraki *et al*., 2019; Miao *et al*., 2020; Santos, 2023).

Os prebióticos são carboidratos não digeríveis de cadeia curta que alteram de forma benéfica a composição ou o metabolismo da microbiota intestinal, estimulando o crescimento de bactérias probióticas como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Estudos têm demonstrado que os prebióticos de cogumelos utilizados como ingredientes alimentares proporcionam benefícios à saúde do consumidor, atenuam várias doenças e ainda atuam nos mecanismos de imunorregulação da pneumonia pneumocócica, na aterosclerose e nas atividades antitumorais (Jayachandran *et al*., 2017; Balakrishnan *et al.*, 2021).

Os métodos tradicionais para produção de basidiocarpos de espécies de *Auricularia* apresentam desvantagens como o uso de grandes quantidades de madeiras utilizadas como substrato, longos períodos de cultivo e alta probabilidade de infecção por outros fungos filamentosos e bactérias (Regis; Geösel, 2024).

A fermentação submersa é vantajosa em relação aos processos fermentativos no estado sólido, pois favorece a obtenção de alto rendimento de biomassa com qualidade consistente, crescimento rápido e baixos riscos de contaminação (Hamza *et al*., 2024). Além disso, os extratos obtidos da massa micelial de espécies de *Auricularia* cultivadas em bioprocessos submersos contêm diversos compostos bioativos de importância industrial como ácidos

orgânicos, carboidratos com propriedades prebióticas e enzimas (Jacob *et al*., 2020).

As proteases catalisam a hidrólise de proteínas em aminoácidos e pepetideos. Essas enzimas continuam predominando no mercado de bioacatalisadores e representam 60% do total de enzimas comerciais vendidas anualmente (Pawar, Singh & Singh, 2023). Enzimas proteolíticas são amplamente utilizadas em diversas indústrias para a produção de detergentes, laticínios, alimentos, papel e celulose. A crescente demanda industrial estimula a busca por novas fontes e o desenvolvimento de bioprocessos eficazes para a produção de proteases (Santos *et al*., 2024).

Há carência de estudos reportando a produção de massa micelial de *Auricularia* isolada do bioma amazônico, em fermentação submersa, e seu desempenho como fonte de proteases e atividade prebiótica. Com base nas evidências da ação de compostos bioativos e propriedades nutracêuticas de espécies de *Auricularia*, esta investigação tem como objetivo desenvolver estratégias *in vitro* para crescimento de uma espécie representante desse gênero, integrando a avaliação da atividade proteolítica e da capacidade para estimular a multiplicação de bactéria prebiótica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cogumelo

Auricularia delicata DPUA 1625, cedida pela Coleção de Culturas DPUA, da Universidade Federal do Amazonas-UFAM foi cultivada em ágar batata dextrose (BDA) suplementado com extrato de levedura (YE) 0,5 % (p/v), pH 5,6, esterilizado a 121 ºC, por 15 minutos. Os cultivos foram realizados em placas de Petri e mantidos a 25 ºC, na ausência de luz, por oito dias (Barbosa *et al*., 2023).

2.2 Seleção de meio de cultura sólido para obtenção da cultura inóculo *Auricularia delicata* DPUA 1625

Para selecionar um meio de cultivo visando à obteção do inóculo, o crescimento de *A. delicata* DPUA 1625 foi avaliado em sete meios de cultura, pH 5,6, em placas de Petri. (Tabela 1). O crescimento micelial foi observado a cada 24 horas, a 25 ºC, na ausência ou presença de luz, durante oito dias. O fundamento base para a seleção do meio de cultura promissor foi o método subjetivo: nota 1,0 (micélio fracamente adensado); nota 2 (micélio mediamente adensado) e, nota 3 (micélio fortemente adensado) (Fonseca *et al*., 2014; Machado, Martim, Alecrim, & Teixeira, 2017). O meio de cultura selecionado nessa etapa foi utilizado nos demais

experimentos.

Tabela 1. Meios de cultura para avaliação do crescimento e vigor micelial de *Auricularia delicata* DPUA 1625.

Meio de Cultura	Sigla
Ágar Batata Dextrose	BDA
Ágar Batata Dextrose+Extrato de Levedura (0,5 %, p/v)	BDA+ YE
Ágar Sabouraud	SDA
Ágar Sabouraud + Extrato de Levedura (0,5 %, p/v)	SDA+ YE
Ágar extrato de malte	YM
Ágar extrato de malte + extrato de levedura (0,5 %, p/v)	YM+YE
Ágar peptona e glicose +extrato de levedura (0,5 %, p/v)	GYP

Fonte: Autores.

2.3 Produção de proteases e biomassa de *A. delicata* DPUA 1625 por fermentação submersa

2.3.1 Fermentação submersa

Em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50mL de meio GYP (Glicose-Extrato de Levedura-Peptona (GYP), suplementado com gelatina 0,5% (p/v) foram adicionados 10 discos miceliais (10 mm Ø) retirados do cultivo de crescimento micelial significativo. A fermentação foi conduzida a 28 °C, a 150 rpm, por oito dias. Ao término do bioprocesso, a biomassa foi separada do extrato bruto por filtração a vácuo, utilizando papel de filtro Whatman n° 1, de peso conhecido. O extrato bruto obtido foi filtrado em membranas de éster de celulose 0,45µm (Martim et al., 2017). A biomassa obtida foi utilizada para avaliar o crescimento de *A. delicata DPUA 1625* e, no extrato bruto, foi quantificada a atividade de proteases.

2.3.2 Determinação do crescimento *A. delicata* DPUA 1625 com base no peso da biomassa desidratada

A biomassa de *A. delicata* DPUA 1625 obtida da fermentação submersa foi lavada três vezes em água destilada, desidratada a 70 °C até obtenção de peso constante (Dong; Yao, 2005).

2.3.3 Determinação da atividade proteolítica

A determinação da atividade proteolítica foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Leighton *et al*. (1973), utilizando como substrato solução de azocaseína 1 % (p/v), em tampão Tris-HCl pH 7,2. Uma alíquota de 250 µL de azocaseína foi misturada a 150 µL do extrato enzimático bruto e incubados na ausência de luz, a 25 °C, durante 60 minutos. Após

este período, a reação foi interrompida pela adição de 1,2 mL de ácido tricloroacético 10% (p/v), seguido de centrifugação a 4 °C (8.000 x g/5 minutos). Do sobrenadante recuperado foi retirado 800 µL para homogeneização em 1,4 mL de NaOH 1M. Uma unidade de atividade de proteases foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir variação de absorbância igual a 0,1 em 60 minutos a 440 nm.

2.4 Avaliação do efeito do cultivo em duas etapas na produção de protease e biomassa por *A. delicata* DPUA 1625

O sistema de cultivo em duas etapas foi realizado com a finalidade de verificar a influência desse bioprocesso na produção de massa micelial e de proteases por *A. delicata* DPUA 162, em comparação com fermentação padrão realizada em meio GYP, conforme as citações de Crotti (1993).

Na etapa I (pré-cultivo), de cada cultura selecionada, em meio sólido, foram transferidos 10 discos miceliais (10 mm Ø) para Erlenmeyer de 125 ml contendo 50 ml GYP, pH 6,4. Os cultivos foram mantidos a 28 ºC, 150 rpm, durante quatro dias. Na etapa II (reinoculação), a massa micelial obtida na etapa I foi lavada 10 vezes com água destilada esterilizada e adicionada em 50 ml de GYP. O bioprocesso foi conduzido por quatro dias, a 28ºC. Ao final de cada bioprocesso foi avaliada a produção de massa micelial e de enzimas proteolíticas. As proteases do extrato com ação catalítica significativa foram submetidas à caracterização bioquímica

2.5 Caracterização bioquímica das proteases

2.5.1 Efeito do pH e da temperatura na atividade e estabilidade da protease

Para a avaliação do pH ótimo, a atividade proteolítica foi determinada a 25 °C utilizando-se as seguintes soluções-tampão a 0,1 M: acetato de sódio (pH 5 e 6), Tris-HCl (pH 7 e 8) e glicina-NaOH (pH 9 e 10). Na determinação da estabilidade ao pH, o extrato bruto foi diluído (1:1, v/v) nas mesmas soluções-tampão, por uma hora, a 25 °C (Barbosa *et al*., 2020).

A temperatura ótima foi determinada pela incubação do extrato bruto na faixa de 30 ºC a 80 °C. No teste de estabilidade térmica, o extrato foi incubado nas mesmas condições de temperatura, por uma hora (Barbosa *et al*., 2020).

2.5.2 Efeito de inibidores e íons metálicos na atividade proteolítica

O efeito de inibidores na atividade enzimática foi investigado utilizando fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), ácido etileno-diaminotetracético (EDTA), ácido iodo acético (10 mM) e pepstatina (0,1 mM). Os íons metálicos utilizados foram $CaCl_2$, $CuSO_4$, $FeSO_4$, $MgSO_4$, $MnSO_4$, $ZnSO_4$, Na Cl e KCl (10 mM). As amostras foram incubadas nas condições ótimas de pH e de temperatura, por uma hora (Barbosa *et al*., 2020).

2.6 Avaliação *in vitro* da propriedade prebiótica do extrato bruto de *A. delicata* DPUA 162

A determinação da atividade prebiótica foi realizada no extrato bruto obtido do bioprocesso que favoreceu a síntese a síntese de com atividade proteolítica significativa. Desse extrato, foram transferidas alíquotas para tubos de ensaio contendo o meio líquido MRS (Man, Rogosa e Sharpe), nas seguintes concentrações de 0,1%, 0,25%, 0,50%, totalizando volume final de 10 mL. Em seguida, foi adicionado como inóculo 1ml de suspensão celular de *L. casei* equivalente a 10^8 células/mL de meio. O meio MRS com glicose sem o *Lactobacillus casei* foi utilizado como controle negativo e, como padrão positivo, o cultivo de *L. casei* em MRS, sem glicose. Os cultivos foram incubados a 37 °C por 24 h, em condições aeróbias. O crescimento de *L. casei* foi avaliado a 600 nm (Hoseinifar *et al*., 2018).

2.7 Análise estatística

Os dados de todos os experimentos realizados em triplicata foram submetidos à análise de variância e às médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) utilizando Minitab, versão 19.0.

3. RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 Crescimento micelial radial e vigor micelial de *A. delicata* DPUA 1625

No presente estudo foi verificado que o crescimento e o vigor micelial de *A. delicata* DPUA 1625 foram influenciados pelos meios de cultivo e as condições de luminosidade (Tabela 1). Na ausência de luz, o valor significativo da VCM (7,70 mm/dia) foi determinado em MEA, com formação de micélio mediamente adensado. Na presença de luz, a VCM significativa (7,66 mm/dia) foi verificada em MEA+YE, mas com desenvolvimento de micélio fracamente adensado. Independente das condições de luminosidade, em BDA + YE foi observada a formação de micélio fortemente adensado e, nos meios GYP e BDA também houve

formação de micélio fracamente adensado. Com base nesses resultados, BDA + YE foi o meio de cultura selecionado para obtenção da cultura inóculo utilizada nos demais experimentos.

Tabela 2. Média da velocidade do crescimento micelial radial e vigor micelial de *Auricularia delicata* DPUA 1625 cultivada em diferentes meios de cultura, na ausência ou presença de luz, durante oito dias.

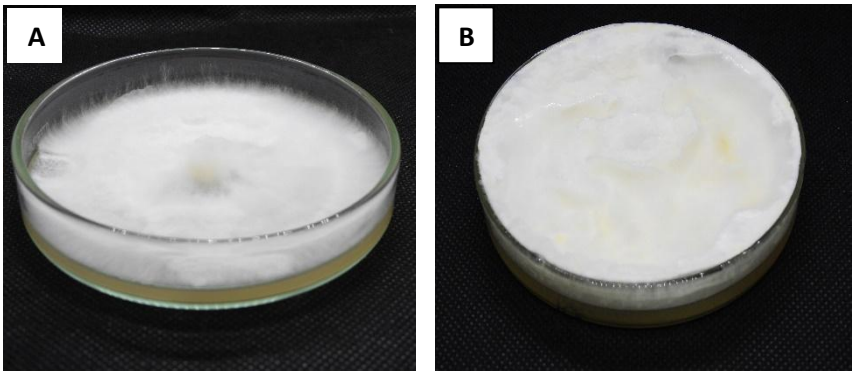
Meios Cultura (p/v)	**VCM (MM/DIA)**			
	Ausência de Luz		**Presença de Luz**	
	Velocidade do crescimento	**Vigor micelial**	**Velocidade do crescimento**	**Vigor micelial**
SAB	6,03 ± 0,11 [c,d]	Mediamente adensado	5,06± 0,05 [e]	Mediamente adensado
SAB+YE	5,70 ± 0,10 [d]	Fracamente adensado	5,36 ± 0,25 [d, e]	Fortemente adensado
GYP	5,06 ± 0,05 [e]	Fracamente adensado	5,80 ± 0,10 [c, d]	Fracamente adensado
BDA	6,00 ± 0,10 [c,d]	Fracamente adensado	6,06 ± 0,05 [c]	Fracamente adensado
BDA+YE	6,30 ± 0,10 [c]	Fortemente adensado	5,90 ± 0,17 [c,d]	Fortemente adensado
MEA	7,70 ± 0,10 [a]	Mediamente adensado	6,83 ± 0,05 [b]	Mediamente adensado
MEA +YE	6,96 ± 0,32[b]	Fracamente adensado	7,66 ± 0,55 [a]	Fracamente adensado

BDA+YE (Ágar batata dextrose + Extrato de levedura 0,5%); BDA (Ágar batata dextrose); SAB (Ágar Sabouraud); SAB+YE (Ágar Sabouraud + Extrato de levedura 0,5%); GYP (Glicose, peptona e extrato de levedura); MEA (Ágar Malte); MEA +YE (Ágar Malte + Extrato de levedura 0,5%). VCM (Velocidade de crescimento micelial. MM (milímetro). Letras

Os dados obtidos nesta pesquisa estão em concordância com os resultados obtidos por Nóbrega (2022), na investigação realizada para verificar a viabilidade do crescimento de *A. delicata*, em condições de laboratório. Xiao et al. (2022), avaliaram a influência de diferentes substratos no crescimento de *Auricularia vollosula* e detectaram que os meios contendo maltose, glicose e frutose, ou farelo de soja e extrato de levedura, apresentaram as melhores taxas de crescimento. Porém, Silva (2022) avaliou o crescimento micelial de *Auricularia auricularia-judae* em diferentes meios e verificaram que em BDA o crescimento foi superior em relação aos cultivos em ágar malte e substratos suplementados com peptona e extrato de levedura.

A figura 1A demonstra o resultado significativo do crescimento micelial em MEA e a figura 1B mostra a colônia expressando massa micelial fortemente adensada em meio BDA+ YE, ambos na ausência de luz. O vigor micelial comumente tem influência do aumento de carboidratos, aminoácidos e minerais fornecidos pelo substrato. Além disso, inóculos com elevado vigor micelial melhoram a produção, qualidade, sabor e a vida de prateleira de cogumelos (Lu; Bau; Ohga, 2017; Batista et al., 2021).

Figura 1. *Auricularia delicata* DPUA 1625 cultivada na ausência de luz: (A) crescimento micelial significativo em MEA; (B) colônia expressando massa micelial



Fonte: Autores (2024)

Estudos vêm sendo realizados para determinar as melhores condições de cultivo de *Auricularia*. Nessas investigações, os autores também destacam a importância nutricional da biomassa e o valor econômico das enzimas proteolíticas sintetizadas por cogumelos gelatinosos (Nobrega, 2022; Xiao et al., 2021). Segundo Barbosa et al. (2020), as diferentes densidades miceliais observadas estão relacionadas à qualidade e a concentração de nutrientes disponíveis em cada meio de cultivo, assim como, outros fatores que influenciam no desenvolvimento e vigor micelial, como pH, temperatura, luminosidade, umidade e oxigenação. As espécies de cogumelos com rápido crescimento e massa micelial densa são as indicadas para uso industrial, porque essas características proporcionam a redução da colonização de microrganismos contaminante (Barbosa et al., 2020; Batista et al., 2021).

3.2 Avaliação do cultivo em duas etapas na produção protease e biomassa

A. delicata DPUA 1625 sintetizou e excretou proteases em todos os bioprocessos submersos (Tabela 3). Porém, valor significativo de atividade proteolítica (0,21 U/mL) foi determinado na Etapa II do cultivo em duas etapas. Na Etapa I, o resultado de atividade proteásica foi 0,12 U/mL, valor 25% superior aos quantificados no cultivo contínuo tradicional em GYP (Tabela 3). Estes dados estão em concordância com os resultados encontrados por Nóbrega (2022), para proteases de *A. delicata*, recuperadas da fermentação em cultivo contínuo tradicional.

Tabela 3. Efeito do cultivo em duas etapas na atividade de proteases e produção de biomassa por *A. delicata* DPUA1625, em comparação com o cultivo em meio GYP.

Fermentação Submersa	**Tempo de fermentação (dias)**	**Atividade de Proteases (U/mL)**	**Biomassa (g)**
Cultivo em GYP	8	0,09 ± 0,11[c]	0,58 ± 0,31[b]
Cultivo em duas etapas			
Etapa I	4	0,12 ± 0,14[b]	0,12 ± 0,03[c]
Etapa II	4	0,21 ± 0,00[a]	1,22 ± 0,67[a]

Fonte: Autores (2024)

Quando *A. delicata* DPUA 1625 foi cultivada no bioprocesso em duas etapas, o quantitativo de biomassa significativo (1,22 g) foi determinado na Etapa I (Tabela 3). De acordo com Steffen et al. (2020), o cultivo de fungos em dois estágios visa a otimizar o crescimento e a produtividade de compostos bioativos por fungos comestíveis e medicinais, assim como, pode fornecer uma referência para a produção em larga escala. Ferreira (2017), cita que o cultivo em duas etapas é uma abordagem que continua a evoluir com o avanço da biotecnologia e o aumento do conhecimento em relação às necessidades fisiológicas dos fungos.

Nesse sentido, os resultados obtidos no presente estudo evidenciam a eficácia do cultivo em duas etapas como um método inovador e sustentável para a produção de enzimas proteolíticas e de biomassa por *A. delicata* DPUA 1625 e pode servir como parâmetro para a exploração do potencial biotecnológico de outras espécies do gênero *Auricularia*. Considerando os resultados obtidos, o extrato bruto obtido na etapa II do cultivo em duas etapas foi avaliado quanto às características bioquímicas das proteases e ao potencial prebiótico.

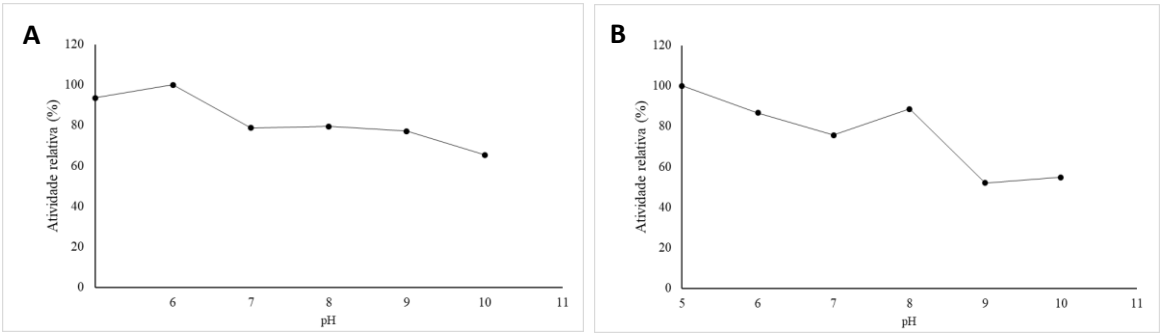
3.3. Caracterização bioquímica das proteases

3.3.1. Efeito do pH e da temperatura na atividade e estabilidade da protease

A figura 2 mostra o efeito do pH na atividade e na estabilidade das proteases de *A. delicata* DPUA 1625. As enzimas demonstraram atividade em todas as condições analisadas, mas a ação catalítica significativa foi determinada em pH 6,0 (Figura 2 A). Nóbrega et al. (2021), verificaram que as enzimas proteolíticas de *A. delicata* apresentam expressiva ação catalítica em pH 5,0. Benchaya et al. (2022), verificaram que a atividade proteolítica significativa de *A. clavato flavus* foi observada em pH 6,0. Proteases que apresentam atividade catalítica em pH 6,0 vem sendo utilizadas na produção de ração animal, queijos, cerveja, sucos, molhos e na remoção da prata contidas em filmes de raios-X (Benchaya et al., 2022).

Quanto à estabilidade ao pH, as proteases mantiveram atividade catalítica superior a 88,2% na faixa de pH 5,0 a 8,0 (Figura 2 B). Santana et al. (2022), citaram que as proteases de *P. eryngii* apresentaram atividade catalítica superior a 50% na faixa de pH 5,0 a 6,0. Machado et al. (2017), relataram elevada estabilidade as proteases de *P. albidus*, retendo, em média, 90,30% de atividade entre pH de 5 a 8.

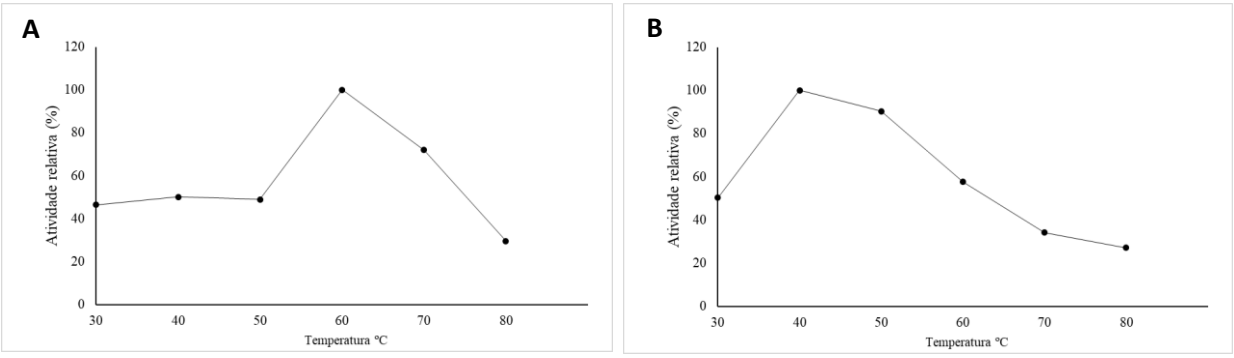
Figura 2. Efeito do pH na atividade (A) e estabilidade (B) das proteases de *Auricularia delicata* DPUA 1625.



O efeito da temperatura na atividade e na estabilidade proteolítica está demonstrado na figura 3. As proteases de *A. delicata* DPUA 1625 demonstraram atividade ótima a 60°C (Figura 3A). Estes resultados são similares aos reportados por Nóbrega et al. (2021) e Braga et al. (2020) ao avaliarem a ação da temperatura na atividade catalíticas das proteases de *A. delicata* e de *L. villosus*, respectivamente.

Fonte: Autores (2024)

Figura 3. Efeito da temperatura na atividade (A) e estabilidade (B) das proteases de *Auricularia delicata* DPUA 1625.



Fonte: Autores (2024)

Em relação a estabilidade à temperatura, as proteases exibiram maior estabilidade entre 40 a 50 °C, retendo, em média, 90,3% de atividade. Em temperaturas mais elevadas foi

evidenciado decréscimo de ação proteásica (Figura 3B). Batista et al. (2021) observaram atividade catalítica de 100% de proteases de *L. crinitus* na faixa de 40 a 50 ºC. Pimenta et al. (2021) verificaram que as peptidases de *P. albidus* mantiveram estabilidade de 90% na faixa de 40ºC a 60 ºC.

3.3.2 Efeito de inibidores e íons metálicos na atividade proteolítica de *A. delicata* DPUA 1625

O efeito de inibidores e íons metálicos na ação das enzimas proteolíticas de *A. delicata* DPUA 1625 está demonstrado na tabela 4. Todos os inibidores utilizados afetaram a atividade enzimática. Porém, Pepstatina e EDTA reduziram expressivamente a ação catalítica, causando inibição de 81,85% e 71,60%, respectivamente.

Tabela 4. Efeito de íons e inibidores e íons metálicos na atividade proteolítica de *Auricularia delicata* DPUA 1625.

Íons metálicos e Inibidores	Atividade Residual (%)
Controle	100
Ácido Iodoacético	45,06
EDTA	28,40
Pepstanina	18,15
PMSF	34,10
$CaCl_2$	64
KCl	68,40
NaCl	55,40
$CuSO_4$	0,0
$FeSO_4$	60,70
$MgSO_4$	45,10
$MnSO_4$	0,0
$ZnSO_4$	64,70

Fonte: Autores (2024)

Estes resultados sugerem a presença majoritária de aspático e metaloproteases no extrato bruto de *A. delicata*. Pimenta et al. (2021), observaram que EDTA causou a redução de 87,25% da atividade enzimática de *P. albidus*. Magalhães et al. (2019) também verificaram a presença de metaloproteases no extrato bruto de *L. crinitus*.

Os íons Cu^{+2} e Mn^{+2} causaram 100% de inibição da atividade enzimática das proteases de *A. delicata*. Enquanto, Zn^{+2} e K^{+} reduziu em 64,7% e 68,4% a ação proteásica (Tabela 4). Estes dados corroboram com as citações de Barbosa et al. (2020) que verificaram inibição total das proteases *de P. ostreatoroseus* na presença de Mn^{+2} e Fe^{+2}. Martim et al. (2019) citaram que Cu^{+2}, K^{+} promoveram discreta inibição da ação proteásica de *P. albidus* que

retiveram 91,50% e 87,65% de atividade, respectivamente. Contudo, Pimenta et al. (2021), observaram que Mn^{+2} causou redução de 63,25% da atividade enzimática de *P. albidus*.

3.3 Análise centesimal

Na tabela 5 estão apresentados os resultados da composição centesimal da biomassa desidratada em pó de *A. delicata* DPUA 1625. O teor de umidade da biomassa desidratada significativo de 35,12%.

Tabela 5. Composição centesimal da biomassa desidratada de *Auricularia delicata* DPUA 1625

Parâmetros	**Biomassa de *Auricularia delicata***
Umidade	3,51 ± 0,7
Cinzas	4,21 ± 0,01
Lipídios	1,50 ± 0,5
Nitrogênio	4,20 ± 0,01
Proteínas	18,63 ± 0,03
Fibras	16,84 ± 0,05
Carboidratos	56,20 ± 0,01
Energia (Kcal/100g)	413,50 ± 0,02

As porcentagens de cinzas (4,21%), proteínas (18,63 %) e lipídeos (1,50%) foram significativas, o teor de proteínas da biomassa de *A. delicata*, neste estudo, está dentro do registrado para o gênero *Auricularia*, os valores de energia (413,50 Kcal/100g) se destacaram significativamente para esta espécie (Tabela 3) (XIAO et al., 2020).

Barbosa et al. (2021), observaram que nos cultivos de P. ostreatoroseus, os resultados de proteína, lipídios e cinzas, respectivamente, foram inferiores 34,38%, 59,74%, 18,34%, comparados aos resultados obtidos no cultivo em exocarpo de cupuaçu com farelo de arroz. Jegadeesh et al. (2018) observaram que nos cultivos de *Pleurotus var. roseus* os valores de carboidratos foram inferiores (23,07%) em basidiomas maduros cultivados em palha de arroz e palha Ragi.

Embora apresentem uma variedade nutricional, os cogumelos comestíveis geralmente contêm baixos níveis de lipídios. Várias espécies se destacam por serem ricas em carboidratos, fibras e proteínas, possuindo até todos os aminoácidos essenciais. A principal função dos carboidratos é fornecer energia, enquanto as proteínas atuam como os nutrientes fundamentais para a construção do corpo (Jesus e Prado, 2023).

3.4 Atividade prebiótica

Na determinação da atividade prebiótica foi utilizado o extrato obtido na Etapa II do cultivo em duas etapas, que apresentou atividade proteolítica significativa (Tabela 5). A atividade prebiótica foi verificada em todas as concentrações do extrato avaliado e o valor significativo foi observado na concentração de 0,50% (v/v) de extrato.

Tabela 5. Atividade prebiótica do extrato de *A. delicata* DPUA 1625 obtido no Estágio II do cultivo em duas etapas

	Amostras	***L. casei* (Abs)**
Extrato Bruto /Meio de crescimento	Controle negativo	0,210 ± 0,244 [e]
	Controle positivo	0,860 ± 0,894 [d]
	0,1%	1,056 ± 1,090 [c]
	0,25%	1,207 ± 1,240 [b]
	0,50%	1,356 ± 1,390 [a]

Fonte: Autores (2024)

Sawangwan et al., (2018) verificaram que os extratos de *A. auricula* continham expressivos teores de galactose e maltotriose, carboidratos que estimularam o crescimento de *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus plantarum*. Além disso, Faraki et al. (2020), confirmaram que o extrato aquoso de *A. auricula* estimula o crescimento e a sobrevivência de *L. acidophilus*. Nasution et al. (2018) constataram o efeito positivo significativo de diferentes concentrações de *Auricularia polytricha* no crescimento de *Lactobacillus casei*.

O uso dos prebióticos na prática clínica está na maioria das vezes relacionado aos probióticos. Quando usados isoladamente e a longo prazo, estes têm se mostrado ótimos na diminuição de risco de incidência de doenças malignas e na manutenção de uma saúde sistêmica geral (Dias et al., 2021). Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que o extrato de *A. delicata* DPUA é fonte de prebióticos que estimulam o crescimento de microrganismos benéficos à saúde humana e possuem aplicabilidade no setor alimentício.

4. CONCLUSÃO

A composição nutricional dos meios de cultivo influencia na velocidade do crescimento e o desenvolvimento da massa micelial de *Auricularia delicata* DPUA 1625, um cogumelo comestível isolado da Amazônia. O cultivo em duas etapas o favorece o crescimento e a produção de proteases com características bioquímicas promissoras para uso no setor alimentício. O extrato proteolítico de *A. delicata* DPUA 1625 estimula o crescimento de

Lactobacillus casei. A tecnologia de cultivo em duas etapas se revelou como uma ferramenta biotecnológica promissora para a produção de compostos bioativos sintetizados por cogumelo gelatinoso.

5. AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Programa de pós-graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC), ao laboratório de Micologia médica e Industrial, a Coleção de cultura DPUA e à Universidade Federal do Amazonas (UFAM), pelo apoio técnico, científico e financeiro.

6. REFERÊNCIAS

BALAKRISHNAN, K.; DHANASEKARAN, D.; KRISHNARAJ, V.; ANBUKUMARAN A.; THIRUMURUGAN, R.; Muthuselvam, M. Edible Mushrooms: A Promising Bioresource for Prebiotics. Advances in Probiotics: Microorganisms in Food and Health, p.81-97. 2021.

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.

Barbosa, E., Pimenta , L. ., Brito , A. K. ., Batista , S. ., Martim, S. ., & Teixeira , M. . (2023). Salmon oyster mushroom: growth characteristics and protease production on a laboratory scale: Cogumelo ostra salmão: características de crescimento e produção de proteases em escala laboratorial . Concilium, 23(2), 367–379.

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.

control in aquaculture, a review of current knowledge and future perspectives. Frontiers

DIAS, J. A. R.; ABE, H. A.; SOUSA, N. C.; SILVA, R. D. F.; CORDEIRO, C. A. M.; GOMES, G. F. E.; READY, J. S.; MOURIÑO, J. L. P.; MARTINS, M. L.; CARNEIRO, P. C. F.; MARIA, A. N.; FUJIMOTO, R. Y. Enterococcus faecium as potential probiotic for ornamental neotropical cichlid fish, Pterophyllum scalare (Schultze, 1823). Aquaculture International, v. 27, p. 463-474, 2021.

Dong, C.H.; Yao, Y.J. 2005. Nutritional requirements of mycelial growth of Cordyceps sinensis in submerged culture. Journal of Applied Microbiology, 99 (3): 483-492.

Faraki, A., Noori, N., Gandomi, H., Banuree, S.A.H., Rahmani, F. (2020). Effect of *Auricularia auricula* aqueous extract on survival of *Lactobacillus acidophilus La-5* and

Bifidobacterium bifidum Bb-12 and on sensorial and functional properties of synbiotic yogurt. Food Science & Nutrition published by Wiley Periodicals, Inc. 2020;8:1254–1263.

FARAKI, Azita et al. Effect of Auricularia auricula aqueous extract on survival of Lactobacillus acidophilus La-5 and Bifidobacterium bifidum Bb-12 and on sensorial and functional properties of synbiotic yogurt. **Food science & nutrition**, v. 8, n. 2, p. 1254-1263, 2020.

Ferreira, Francisca et al. Otimização das condições de crescimento de fungos degradadores de madeira. Marupiara | Revista Científica do CESP/UEA, [S.l.], n. 1, maio 2017. ISSN 2527-0753.

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.

HAMZA, Arman et al. Submerged production of mycelium biomass and bioactive compounds from P. ostreatus in a controlled fermentation medium. **Food and Humanity**, v. 2, p. 100302, 2024.

Hoseinifar SH, Sun YZ, Wang A, Zhou Z. Probiotics as Means of Diseases Control in Aquaculture, a Review of Current Knowledge and Future Perspectives. Front Microbiol. 2018 Oct 12; 9:2429. doi: 10.3389/fmicb.2018.02429. PMID: 30369918; PMCID: PMC6194580.

JACOB, Muharagi Samwel et al. Studies on optimization of culture conditions and medium components for the production of mycelial biomass of Auricularia delicata under submerged fermentation. **Asian Journal of Biology**, v. 10, n. 4, p. 56-67, 2020.

Jayachandran, M., Xiao, J., & Xu, B. A Critical Review on Health Promoting Benefits of Edible Mushrooms through Gut Microbiota. International journal of molecular sciences, n.18, v.9, p.1934. 2017. https://doi.org/10.3390/ijms18091934

Lu, T., Bau, T., & Ohga, S. (2017). Physiological study of the wild edible mushroom Leucocalocybe mongolica. Journal- Faculty of Agriculture Kyushu University, 62(1), 1-8.

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.

Martim, S. R., Silva, L. S. C., Alecrim, M. M., Souza, B. C., Oliveira, I. M. A., & Teixeira, M. F. S. (2017). Proteases ácidas de cogumelo comestível da Amazônia para aplicabilidade industrial. Boletim Museu Paraense Emílio Goeldi, 12(3), 353-362.

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.

Nasution, H., Rahayu, R., & Nasution, M. R. (2018). Prebiotic test of three variety of mushrooms (Auricularia polytricha, Agaricus bisporus, and Peluretus cystidiosus) towards

“Lactobacillus casei” bacteria. CELSciTech towards Downstream and Commercialization of Research, 3, 75–79.

NÓBREGA, J. P. Proteases de espécies de cogumelos comestíveis gelatinosos representantes da família Auriculariaceae Fr. ex Lindau (1897). riu.ufam.edu.br, 10 ago. 2022.

Pawar, K. S., Singh, P. N., & Singh, S. K. (2023). Fungal alkaline proteases and their potential applications in different industries. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1138401.

REGIS, Mary Ann Jully; GEÖSEL, András. Cultivation of Auricularia species: a review of the history, health benefits, principles, practices, environmental conditions, research methods, and recent trends. **Sydowia**, v. 76, p. 21, 2024.

SANTOS, E. S. A importância do cogumelo Auricularia: uma revisão bibliográfica. ISB - Instituto de Saúde e Biotecnologia (Coari), 2023.

Santos, M. P. F., de Souza Junior, E. C., Villadóniga, C., Vallés, D., Castro-Sowinski, S., Bonomo, R. C. F., & Veloso, C. M. (2024). Proteases: Importance, Immobilization Protocols, Potential of Activated Carbon as Support, and the Importance of Modifying Supports for Immobilization. *BioTech*, *13*(2), 13.

Sawangwan, T., Wansanit, W., Pattani, L., & Noysang, C. (2018). Study of prebiotic properties from edible mushroom extraction. Agriculture and Natural Resources, 52(6), 519–524. https://doi.org/10.1016/j. anres.2018.11.020

SILVA NETO, C. DE M. E et al. Food and nutritional potential of two mushrooms native species to the Brazilian savanna (Cerrado). Food Science and Technology, v. 42, 2022.

SOCCOL, Carlos Ricardo; VÍTOLA, Francisco Menino Destéfanis; RUBEL, Rosália; FALBO, Margarete Kimie; LETTI, Luiz Alberto Junior; BELLETTINI, Marcelo; SOCCOL, Vanete Thomaz; "Cogumelos: uma fonte promissora de compostos ativos para o desenvolvimento de produtos farmacêuticos e nutracêuticos", p. 315 -360. In: **Biotecnologia Aplicada à Agro & Indústria – v. 4.** São Paulo: Blucher, 2017.

STEFFEN, Gerusa Pauli Kist et al. Produção de cogumelos comestíveis em substratos orgânicos. Porto Alegre: DDPA, 2020.

Xiao B, Huang Q, Chen S, Yao J, Zeng J, Shen J, Wang G, Wang W, Zhang Y. Comparison on chemical features and antioxidant activity of polysaccharides from Auricularia auricula by three different enzymes. J Food Biochem. 2022 May;46(5):e14051. doi: 10.1111/jfbc.14051. Epub 2022 Feb 10. PMID: 35142368.

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.

6. CONCLUSÃO

Os resultados alcançados demonstraram que *A. delicata* DPUA 1625 cresceu em todos os meios sintéticos. O meio que apresentou maior velocidade de crescimento foi ágar malte. No entanto, ágar batata dextrose adicionando extrato de levedura 0,5% foi o meio promissor com relação ao vigor micelial

A composição nutricional dos meios de cultivo influencia na velocidade do crescimento e o desenvolvimento da massa micelial de *Auricularia delicata* DPUA 1625, um cogumelo comestível isolado da Amazônia. O cultivo em duas etapas favorece o crescimento e a produção de proteases com características bioquímicas promissoras para uso no setor alimentício

As proteases apresentaram atividade ótima em pH 6,0 e a 60 ºC, classificadas em aspartoprotease e metaloproteases. A ação destes biocatalisadores é fortemente inibida por Cu^{+2} e Mn^{+2}.As enzimas proteolíticas de *A. delicata* possuem potencial para aplicação industrial, principalmente na indústria de alimentos.

O extrato proteolítico de *A. delicata* DPUA 1625 estimula o crescimento de *Lactobacillus casei*. A tecnologia de cultivo em duas etapas se revelou como uma ferramenta biotecnológica promissora para a produção de compostos bioativos sintetizados por cogumelo gelatinoso. Dessa forma, evidencia que o cogumelo comestível *A. delicata* pode ser utilizado como, por exemplo, suplemento para enriquecer nutricionalmente produtos alimentícios para consumo humano.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bandara, A. R. *et al.* Diversity of *Auricularia* (Auriculariaceae, Auriculariales) in Thailand. PHYTOTAXA, v. 292, n. 1, p. 019-034, jan. 2017.

Bano, S. et al. (2019). Characterization of crude protease produced by *Pleurotus eryngii* ATCC 90888. *Pak. J. Biotechnol.* 13, 193-198.

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.

Bellettini, M. B., Fiorda, F. A., Maieves, H. A., Teixeira, G. L., Ávila, S., Hornung, P. S., Maccari Junior, A., & Ribani, R. H. Factors affecting mushroom *Pleurotus* spp. (2019). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(4), 633-646.

BINNS Nino. Probióticos, prebióticos e a microbiota intestinal. Monografias Concisas do ILSI Europe. ILSI Brasil – International Life Sciences Institute do Brasil. Disponível em: <http://ilsi.org/europe/wpcontent/uploads/sites/3/2016/05/Probi%C3%B3ticos.pdf> Acesso em: 12 set. 2020.

Broers, J; Van Den Broucke, S et al. Determinants of prebiotic vegetable consumption: the extended theory of planned behaviour. Archives of Public Health. Vol.78. 1-9, 2020

Cabrera, L. C. et al. Caracterização da produção de cogumelos comestíveis: estudo de caso na região de Londrina, Paraná. Research, Society and Development, v. 9, n. 7, p. e612974416, 27 maio 2020.

Capra, S.; Tonin, F. Ascensão do cultivo de cogumelos comestíveis no brasil.[s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.jornacitec.fatecbt.edu.br/index.php/VIIIJTC/VIIIJTC/paper/viewFile/1755/2174>.

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.

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.

Clementino, L.S; Rosado, F.R. Cultivo submerso de *Ganodermalucidum* (curt. ex fr.) karstem diferentes meios de cultura. Revista em Agronegócios e Meio Ambiente, v.4, n.1, p. 131-144, jan./abr. 2011 - ISSN 1981-9951.

de Araújo, F. S., Souza, I. H. S., & Freitas, A. C. 2020. Estudo das condições de PH e temperatura para máxima atividade de protease de *Aspergillus oryzae* NRRL 1911. *Brazilian Journal of Development*, 6, (1), p. 3077-3091

Dias, D.C.G. et al. Probióticos, prebióticos e simbióticos em uso clínico:Uma revisão sistemática. Brazilian Journal of Health Review, Curitiba, v.4, n.4, p. 18276 18287 jul./aug. 2021.

Fermentação - Portal Embrapa. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/tecnologia-de-alimentos/processos/tipos-de-processos/fermentacao#:~:text=A%20fermenta%C3%A7%C3%A3o%20submersa%20ocorre%20em>. Acesso em: 26 jun. 2023.

FILHO, D. C. O. *et al*. Síntese de proteases por uma espécie de fungo filamentoso anamórfico para aplicação em processo industrial. Research, Society and Development, v. 11, n. 16, e548111638526, 2022 (CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i16.38526.

G. Olveira Fuster e I. González-Molero. Eva Gimeno Creusa. Nutrición clinica. 2007.

Gabriella et al. Proteases de uma espécie da família Trichocomaceae para aplicação na indústria de alimentos. Research, Society and Development, v. 11, n. 16, p. e547111638525-e547111638525, 17 dez. 2022.

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

Grimm, D.; Wösten, H. A. B. Mushroom cultivation in the circular economy. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 102, n. 18, p. 7795–7803, 19 jul. 2018.

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

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.

Lu, T., Bau, T., & Ohga, S. (2017). Physiological study of the wild edible mushroom Leucocalocybe mongolica. Journal- Faculty of Agriculture Kyushu University, 62(1), 1-8.

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., Silva, T. A., Teixeira, M. F.S., Cruz, R. F., Filho, Silva, S. D., Gomes, D. M. D., & Pereira, J. O. (2019). Produção e caracterização de enzimas proteolíticas de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693 do bioma amazônico (*Polyporaceae*). *Boletim Museu Paraense Emílio Goeldi*, 14(3), 453- 461.

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.

Martim, S. R., Silva, L. S. C., Alecrim, M. M., Souza, B. C., Oliveira, I. M. A., & Teixeira, M. F. S. (2017). Proteases ácidas de cogumelo comestível da Amazônia para aplicabilidade industrial. *Boletim Museu Paraense Emílio Goeldi*, 12(3), 353-362.

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.

Nóbrega, J. P. Proteases de espécies de cogumelos comestíveis gelatinosos representantes da família Auriculariaceae Fr. ex Lindau (1897). riu.ufam.edu.br, 10 ago. 2022.

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

Pimenta, L. Avaliação da produção de proteases e exopolissacarídeos por Pleurotus ostreatus E Pleurotus eryngii. Universidade do estado do amazonas, 2018.

Rao, M. B. *et al*. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. Microbiology and Molecular Biologogy 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.

Rodrigues, G. DE M.; Okura, M. H. Cogumelos comestíveis no Brasil: uma revisão bibliográfica. Research, Society and Development, v. 11, n. 8, p. e24711830830, 17 jun. 2022.

Şanlier N, Gökcen BB, Sezgin AC. Health benefits of fermented foods. Crit Rev Food Sci Nutr. 2019;59(3):506-527. doi: 10.1080/10408398.2017.1383355. Epub 2017 Oct 20. PMID: 28945458.

Santos, E. S. A importância do cogumelo *Auricularia*: uma revisão bibliográfica. ISB - Instituto de Saúde e Biotecnologia (Coari), 2023.

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

Siala, R., Frikha, F., Mhamdi, S., Nasri, M., & Kamoun, A. S. (2012). Optimization of Acid Protease Production by *Aspergillus niger* I1 on Shrimp Peptone Using Statistical Experimental Design. *The Scientific World Journal*.

Silva Neto, C. DE M. E et al. Food and nutritional potential of two mushrooms native species to the Brazilian savanna (Cerrado). Food Science and Technology, v. 42, 2022.

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.

Tavano, O. L., Berenguer-Murcia, A., Secundo, F., & Fernandez-Lafuente, R. (2018). Biotechnological applications of proteases in food technology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17, 412-436.

Teberga, P.M.F. Avaliação do efeito de diferentes prebióticos sobre o desenvolvimento de cepas de Lactobacillus. Escola de engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. Ed. Reimp, 2017.

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

Urben, A. F. Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada: biotecnologia e aplicações na agricultura e na saúde. Editora técnica. 3. ed. rev. e ampl. – Brasília, DF: Embrapa, 2017. 274 p. ISBN 978-85-7035-651-2.

Urben, A. F.; Oliveira, H. C. B.; Vieira, W.; Correia, M. J.; Uriartt, H. A.; Santos, J. K. P.; Ribeiro, V. L. Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. p. 187.

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, Huang Q, Chen S, Yao J, Zeng J, Shen J, Wang G, Wang W, Zhang Y. Comparison on chemical features and antioxidant activity of polysaccharides from Auricularia auricula by three different enzymes. J Food Biochem. 2022 May;46(5):e14051. doi: 10.1111/jfbc.14051. Epub 2022 Feb 10. PMID: 35142368.

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.