

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

ELLIZA EMILY PERRONE BARBOSA

BIORREFINARIA: EXPLORAÇÃO SUSTENTÁVEL DE RESÍDUOS
LIGNOCELULÓSICOS PARA A PRODUÇÃO DE COGUMELO E BIOPRODUTO
COMESTÍVEL

MANAUS-AM

2021

ELLIZA EMILY PERRONE BARBOSA

BIORREFINARIA: EXPLORAÇÃO SUSTENTÁVEL DE RESÍDUOS
LIGNOCELULÓSICOS PARA A PRODUÇÃO DE COGUMELO E BIOPRODUTO
COMESTÍVEL

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): DR^a MARIA FRANCISCA SIMAS TEIXEIRA

MANAUS-AM

2021

ELLIZA EMILY PERRONE BARBOSA

BIORREFINARIA: EXPLORAÇÃO SUSTENTÁVEL DE RESÍDUOS
LIGNOCELULÓSICOS PARA A PRODUÇÃO DE COGUMELO E BIOPRODUTO
COMESTÍVEL

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.

Aprovado em vinte e nove de Julho de dois mil e vinte e um.

BANCA EXAMINADORA

Doutora Maria Francisca Simas Teixeira (Presidente)

Universidade Federal do Amazonas

Doutora Waldireny Rocha Gomes (Membro)

Universidade Federal do Amazonas

Doutora Raiane Áila Teixeira Souza (Membro)

Fundação de Vigilância em Saúde do Estado do Amazonas

Ficha Catalográfica

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

E53b Barbosa, Elliza Emily Perrone
 Biorrefinaria: exploração sustentável de resíduos
 lignocelulósicos para a produção de cogumelo e bioproduto
 comestível / Elliza Emily Perrone Barbosa . 2021
 102 f.: il. color; 31 cm.

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

 1. substrato. 2. panificação. 3. protease. 4. bioproduto. I.
 Teixeira, Maria Francisca Simas. II. Universidade Federal do
 Amazonas III. Título

Dedicatória

Dedico aos meus pais e a minha família por todo amor, suporte e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradecer a Deus não é um clichê, é o puro sentimento de que alguém está sob o controle de tudo. Pois sem ele, nada seria. Gratidão aos meus pais Iza e Ellinaldo, pelo seu infinito amor e dedicação para que eu sempre seguisse o melhor caminho nos estudos e na vida, para que eu tivesse as melhores condições para estudar e que não desistisse dos meus sonhos, sem eles eu jamais conseguiria.

Aos meus irmãos Junior e Humberto que sempre tiveram palavras de incentivo e descontração para aliviar a tensão das dificuldades. Meu profundo agradecimento por todo o apoio, incentivo e ajuda de Sharima, Adriele, Alexandra, Yasmin, Denis, Dib, Laynah, Ana, Samara, Fabiano, Socorro, Salomão, Raimundo Felipe (*in memoriam*), a minha gratidão, pois sempre se dispuseram a ajudar quando precisei, todos foram essenciais na minha trajetória.

Agradeço a minha orientadora, Maria Francisca, por sua profunda empatia e dedicação desde o início da minha vida acadêmica. Por ser a professora que “mostra o que estamos olhando mas não diz o que precisamos ver”, por instigar a cientista que existe em mim, por sempre estar disposta a responder meus questionamentos e dúvidas. Por ser exigente e dura quando preciso, por sentar ao meu lado e fazer o papel de melhor orientadora que já tive, na verdade, por ser mais do que uma orientadora, ser uma “mãe acadêmica”.

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.

Certamente enfrentar um desafio requer esforços, abdicação e foco. Concluir a caminhada não é fácil, e ser atingido por uma pandemia, muito menos. Não esperava que viver um momento histórico seria tão difícil, e que ultrapassar esse avalanche iria requerer esforços triplicados. Saber tantas notícias ruins sobre saúde e/ou perdas de parentes, amigos, professores e conhecidos com certeza atrapalhou metade do processo, mas mesmo assim saber que temos com quem contar fez esse caminho ser menos tortuoso.

Chegando ao fim desse percurso posso dizer que há sempre motivos para continuarmos e, um deles está no que eu carrego comigo durante todo esse período, concluo esta etapa cheia de aprendizados. Pois ser cientista é isso, é viver em constante aprendizagem, é viver de ciclos, é saber que uns se encerram e outros começam, é viver cheio de perguntas concretas, mas não tão concretas assim, de conviver com a incerteza e falar: “sempre há uma exceção”. É viver sempre em busca de mais. Por fim, o sentimento é este: *gratidão*.

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.

Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.”

Cora Coralina

RESUMO

O atual conceito de Biorrefinaria consiste na exploração sustentável dos resíduos lignocelulósicos, a fim de gerar produtos de valor agregado. Por esse motivo, os cogumelos comestíveis estão sendo visados, pois são capazes de colonizar diferentes resíduos, permitindo a produção e o reaproveitamento de substratos provenientes da natureza e, reduzindo os impactos ambientais. Esta pesquisa teve como finalidade avaliar o crescimento de *P. ostreatoroseus* em diferentes meios de cultivo, produção de proteases em resíduo lignocelulósico e identificar um substrato promissor para produção de basidiomas para desenvolvimento de bioproduto alimentício. *P. ostreatoroseus* foi cedido pela coleção de culturas DPUA - Universidade Federal do Amazonas, e cultivado em ágar BDA suplementado com extrato de levedura 0,5 % (p/v). Para obtenção de inóculo do cogumelo, foram utilizados cinco meios suplementados com extrato de levedura (0,5 %, p/v): ágar Batata Dextrose (BDA), ágar GYP (glicose, extrato de levedura e peptona), ágar Extrato de Malte (MEA), ágar Extrato de Inhame roxo [(EIR) *Dioscorea alata*], ágar extrato de Cará-de-espinho [(CEIN) *Dioscorea altissima*], ágar extrato de Ariá [(EA) *Calathea allouia*]. A fermentação em estado sólido na concentração 2:1 (p/p), umidade 60% nos resíduos: exocarpo de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), resíduo de processamento de açaí (*Euterpe oleracea*), casca de abacaxi (*Ananas comosus*) e serragem, suplementados com farelo de arroz (*Oryza sativa*) ou farelo de trigo (*Triticum aestivum*) 0,5 % (p/v), esterilizados a 121 °C por dois dias consecutivos. Para produção do cogumelo utilizou-se o resíduo significativo nos critérios de densidade micelial. Determinou-se eficiência biológica, produtividade, taxa de produção e perda de matéria orgânica, qualidade microbiológica e o valor nutricional do resíduo, basidioma e do produto. As proteases foram extraídas em água destilada esterilizada sob agitação de 180 rpm, a 30 °C. A atividade proteolítica, efeito de inibidores e íons foi determinada em solução de azocaseína 1% (p/v). O produto de panificação foi elaborado como base a biomassa desidratada, em escala laboratorial. Entre os meios testados, ágar GYP foi o meio de expressiva densidade micelial. A mistura de substrato eficiente para a produção de *P. ostreatoroseus* foi observada em resíduo de processamento de açaí e farelo de arroz. A atividade ótima de proteases foi observada em pH 5,0 e 40 °C. *P. ostreatoroseus* tem alto potencial na indústria farmacêutica, têxtil, alimentícia e química. Os basidiomas produzidos apresentaram conteúdo de cinzas, proteínas, lipídeos significativos. Em comparação ao pão padrão, o produto de panificação com adição de cogumelo apresentou dados significativos quanto ao valor nutricional.

Palavras-chave: substrato, proteolítica, panificação.

ABSTRACT

The current concept of Biorefinery consists in the sustainable exploration of lignocellulosic waste in order to value-added products. Because of that, edible mushrooms are being increasingly targeted, because they are able to colonize different wastes, allowing the production in wastes from nature, ensuring the reuse and reduce environmental impacts. This research aimed to evaluate the growth of *P. ostreatoroseus* in different culture media, protease production in lignocellulosic waste and to identify a promising waste for basidiome production for food bioproduct development. *P. ostreatoroseus* was provided by DPUA culture collection from Federal University of Amazonas, and grown on BDA agar supplemented with 0.5% (w/v) yeast extract. The inoculum of *P. ostreatoroseus* was obtained in five media supplemented with yeast extract (0,5%, w/v): Batata Dextrose agar (BDA), GYP agar (glucose, yeast extract and peptone), Malt Extract agar (MEA), Purple Yam extract agar [(EIR) *Dioscorea alata*], Cará-de-espinho extract agar [(CEIN) *Dioscorea altissima*], Arya extract agar [(EA) *Calathea allouia*]. Solid state fermentation at 2:1 (w/w) concentration, 60% moisture in the residues: cupuaçu exocarp (*Theobroma grandiflorum*), processing waste of açaí (*Euterpe oleracea*), pineapple peel and sawdust (*Ananas comosus*), supplemented with rice bran (*Oryza sativa*) or wheat bran (*Triticum aestivum*) 0,5% (w/v), sterilized at 121 °C for two consecutive days. For mushroom production, the criteria was used is the significant mycelial density. Biological efficiency, productivity, production rate and loss of organic matter, microbiological quality and the nutritional value of wastes, basidiome and product were determined. Proteases were extracted in sterile distilled water under 180 rpm agitation at 30 °C. Proteolytic activity, effect of inhibitors and ions was determined in 1% (w/v) azocasein solution. The bakery product was prepared as the basis of dehydrated biomass on laboratory scale. Among the media tested, GYP agar was the medium expressing mycelial density. The efficient substrate mixture for *P. ostreatoroseus* production was observed in açaí processing waste and rice bran. The optimum activity of proteases was observed at pH 5.0 and 40 °C. *P. ostreatoroseus* has high potential in pharmaceutical, textile, food and chemical industries. The basidiomes produced presented significant content of ash, protein, lipids and fiber. Compared to standard bread, the bakery product with added mushroom presented significant data regarding nutritional value.

Keywords: waste, proteolytic, bakery.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Características macroscópicas de <i>Pleurotus ostreatoroseus</i> . A – Basidioma sem presença de véu e lamelas não intervenosas; B – Conjunto de basidiomas.....	18
Tabela 1. Cogumelos do Gênero <i>Pleurotus</i> produzidos em diferentes resíduos lignocelulósicos.....	23
Tabela 2. Meios de cultura utilizados para o cultivo de <i>P. ostreatoroseus</i>	26
Tabela 3. Substratos utilizados para avaliar o crescimento micelial vertical.....	28
Tabela 4. Quantitativo de ingredientes utilizados na preparação do produto de panificação.....	31

CAPITULO 01

Figura 1. (A) Efeito do pH e temperatura (B) na atividade proteolítica de <i>Pleurotus ostreatoroseus</i>	41
Figura 2. (A) Efeito da estabilidade do pH e temperatura (B) na atividade proteolítica de <i>P. ostreatoroseus</i>	42
Tabela 1. Média de atividade quantitativa de proteases produzidas por <i>P. ostreatoroseus</i> em diferentes resíduos lignocelulósicos.....	40
Tabela 2. Efeito de íons metálicos na atividade proteolítica de <i>P. ostreatoroseus</i>	43

CAPITULO 02

Figura 1. Densidade do micélio de <i>P. ostreatoroseus</i> nos cultivos em: (A) GYP (Glicose, peptona e extrato de levedura); (B) BDA+YE (Ágar batata dextrose + Extrato de levedura 0,5%); (C) MEA (Ágar Malte + Extrato de levedura 0,5%); (D) EIR (Ágar Extrato de Inhame roxo + Extrato de levedura 0,5%), (E) CEIN (Ágar extrato de Cará-de-espinho + Extrato de levedura 0,5%), (F) EA (Ágar extrato Ariá + Extrato de levedura 0,5%), a 25 °C após oito dias de crescimento.....	54
Tabela 1. Substratos utilizados para avaliar o crescimento micelial vertical.....	52
Tabela 2 – Média da velocidade do crescimento micelial radial de <i>Pleurotus ostreatoroseus</i> cultivado, a 25 °C por oito dias, em meios de cultura suplementados com extrato de levedura 0,5%(p/v).....	53
Tabela 3. Média da atividade qualitativa de proteases por <i>P. ostreatoroseus</i> DPUA 1720.....	55
Tabela 4. Média da velocidade do crescimento micelial vertical e vigor micelial de <i>P. ostreatoroseus</i> DPUA 1720 em resíduos agroindustriais.....	56

CAPITULO 03

Figura 1. Fases de desenvolvimento e características morfológicas dos basidiomas *in natura* de *P. ostreatoroseus* em resíduo do processamento do açaí com farelo de arroz: (A) Primórdios em desenvolvimento; (B) Desenvolvimento dos basidiomas; (C) Primeiro fluxo formação de basidiomas imaturos; (D) Basidiomas imaturos; (E) Basidiomas maduros, antes da colheita; (F) Segundo fluxo de produção, basidiomas com corpo de frutificação maduro.....64

Figura 2. Características do pão com e sem adição de cogumelo (*P. ostreatoroseus*). (A) Pão sem adição de cogumelo (padrão); (B) Pão com 10% biomassa triturada de cogumelo. (C) Comparativo do aspecto da massa pão com adição de cogumelo (à esquerda) e pão controle (à direita).....72

Tabela 1. Quantitativo de ingredientes utilizados na preparação do produto de panificação.....65

Tabela 2 – Ciclo de cultivo *P. ostreatoroseus* em substrato lignocelulósico.....67

Tabela 3.Composição centesimal da biomassa desidratada em pó de *P.ostreatoroseus* e de ervilha em vagem, valores médios expressos em base seca.....68

Tabela 4. Composição centesimal da biomassa desidratada em pó e produtos de panificação elaborados com biomassa desidratada em pó de *P. ostreatoroseus* (g/100g de produto).....71

Tabela 5. Informação nutricional do produto de panificação (Padrão).....73

Tabela 6. Informação nutricional do produto com adição de cogumelo comestível *P. ostreatoroseus*.....74

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Gênero <i>Pleurotus</i> (Fries) P. Kummer	17
2.2 <i>Pleurotus ostreatoroseus</i> Singer.....	18
2.3 Importância e valor nutricional dos cogumelos	19
2.4 Economia circular	20
2.5 Biorrefinaria.....	20
2.6 Cultivo de cogumelos em Resíduos Lignocelulósicos.....	22
2.7 Fermentação semi-sólida ou em estado sólido.....	23
2.8 Enzimas.....	24
3. OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo geral.....	25
3.2 Objetivos específicos	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 Cultivo e manutenção de <i>Pleurotus ostreatoreoseus</i>	26
4.2 Seleção de meio de cultura para cultivo de <i>P. ostreatoroseus</i>	26
4.2.1 Preparação do Inóculo	26
4.2.2 Avaliação do crescimento de <i>P. ostreatoroseus</i> em meio sintético e natural	26
4.3 Seleção de resíduos lignocelulósicos para a produção de <i>P. ostreatoroseus</i>	27
4.4 Avaliação do crescimento micelial vertical de <i>P. ostreatoroseus</i> em tubo de ensaio	28
4.5 Produção de <i>P. ostreatoroseus</i> em matriz sólida.....	28
4.5.1 Preparação do inóculo em meio líquido.....	28
4.5.2 Cultivo em grãos de trigo (Spawn)	29
4.5.3 Produção dos basidiomas de <i>P. ostreatoroseus</i> em resíduo lignocelulósico	29
4.5.4 Quantificação, caracterização, desidratação e trituração dos basidiomas produzidos	29
4.5.5 Determinação da composição centesimal da biomassa.....	30
4.6 Elaboração do produto de panificação suplementado com basidioma de <i>Pleurotus ostreatoroseus</i>	31
4.6.1 Matéria Prima.....	31
4.6.2 Formulação do produto de panificação	31
4.7 Análise da qualidade microbiológica da biomassa	31
4.7.1 Avaliação da qualidade microbiológica dos basidiomas e do produto final do cogumelo comestível.....	31

4.8 Determinação da Atividade Enzimática.....	32
4.8.1 Determinação da Atividade Enzimática Qualitativa de proteases (Método bloco de Gelose)	32
4.8.2 Determinação da Atividade Quantitativa das Proteases.....	32
4.9. Caracterização parcial das enzimas	33
4.9.1 Determinação do Efeito da Temperatura e pH na Atividade das Proteases.....	33
4.9.2 Determinação da Estabilidade ao Temperatura e pH das Proteases.....	33
4.9.3 Determinação do efeito de inibidores e íons metálicos.....	33
4.10 Análise Estatística.....	34
CAPÍTULO 01	35
Cultivo de cogumelo comestível em resíduos lignocelulósicos de floresta tropical para produção de proteases.....	35
1 Introdução.....	37
2. Material e Métodos	38
2.1 Cultivo e manutenção do Cogumelo.....	38
2.2 Produção de enzimas proteolíticas por fermentação no estado sólido.....	38
2.3 Extração das enzimas proteolíticas	38
2.4 Determinação quantitativa da Atividade das Proteases	38
2.5 Caracterização das proteases.....	39
2.5.1 Determinação do efeito do pH e da temperatura na atividade e estabilidade da protease.....	39
2.6 Efeito de inibidores de proteases e íons metálicos na atividade proteolítica	39
2.7 Análise estatística.....	39
3 Resultados e Discussão.....	40
4 Conclusão	44
5 Agradecimentos	44
6 Referências	44
CAPÍTULO 02	47
Cultivo de cogumelo ostra salmão comestível e produção de proteases extracelulares em resíduos lignocelulósico	47
2.1 Cultivo e Manutenção de <i>Pleurotus ostreoreoseus</i>	50
2.2 Seleção de meio de cultura para cultivo de <i>P. ostreoreoseus</i>	50
2.2.1 Preparação do Inóculo.....	50
2.2.2 Avaliação do crescimento de <i>P. ostreoreoseus</i> em meio sintético e natural	50

2.3 Determinação da Atividade Enzimática Qualitativa de proteases (Método bloco de Gelose)	51
2.4 Seleção de resíduos lignocelulósicos para a produção de <i>P. ostreatoroseus</i>	51
2.5 Avaliação do crescimento micelial de <i>P. ostreataorseus</i> em resíduo lignocelulósico em tubo de ensaio	52
2.6 Análise Estatística	53
6 Conclusão	57
CAPITULO 03	60
Biorrefinaria lignocelulósica: produção de cogumelo comestível como tecnologia ecoamigável integrada à economia circular	60
1 Introdução	62
2 Material e Métodos	63
2. 1 Cultivo e Manutenção de <i>Pleurotus ostreatoreoseus</i>	63
2.2 Produção de <i>P. ostreatoroseus</i> em matriz sólida	63
2.2.1 Preparação do inóculo em meio líquido	63
2.2.2 Cultivo em grãos de trigo (Spawn)	63
2.2.3 Produção dos basidiomas de <i>P. ostreatoroseus</i> em resíduo lignocelulósico	63
2.2.4 Quantificação, caracterização, desidratação e trituração dos basidiomas	64
2.2.5 Determinação da composição centesimal da biomassa	64
2.3 Elaboração do produto de panificação suplementado com biomassa de <i>Pleurotus ostreatoroseus</i>	65
2.3.1 Matéria Prima	65
2.3.2 Formulação do produto de panificação	65
2.4 Análise da qualidade microbiológica da biomassa	66
2.4.1 Avaliação da qualidade microbiológica dos basidiomas e do produto final do cogumelo comestível	66
2.5 Análise Estatística	66
3 Resultados e discussão	66
3.1 Cultivo de <i>P. ostreatoroseus</i> em resíduo de processamento de açaí com farelo de arroz	66
3.2 Bioproduto de panificação suplementado com Basidioma de <i>P. ostreatoroseus</i>	71
4 Conclusão	74
5 Referências	75
5 CONCLUSÃO	83
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

1 INTRODUÇÃO

A Biorrefinaria integra a exploração sustentável dos resíduos lignocelulósicos, a fim de gerar a produção de cogumelos comestíveis em um espectro de produtos comercializáveis de valor agregado tais como alimentos, rações, materiais e químicos. Assim, uma biorrefinaria pode ser uma instalação, um processo, ou um conjunto de instalações para a conversão de biomassa (HASSAN et al., 2019).

Para expandir esse conceito, a biorrefinaria está classificada com base no tipo de matéria-prima usado, o tipo de intermediários gerados, processos de conversão (termoquímico, bioquímico, plataforma dupla) e o status da execução da tecnologia (convencional, avançado etc.) (TAKKELLAPATI et al., 2018).

O uso de resíduos lignocelulósicos para cultivo de cogumelos está classificado como Biorrefinaria fase III (Biorrefinaria lignocelulósica). Este processo tecnológico reduz impactos ambientais, substitui o uso de pré-tratamentos físicos ou químicos, sendo economicamente lucrativo. Atua como uma estratégia inteligente no reaproveitamento de resíduos lignocelulósicos e está incluído nos conceitos modernos de Biorrefinaria (WANZENBÖCK et al., 2017; RASHAD et al., 2019; TAKKELLAPATI et al., 2018).

Nesse contexto, em função do caráter fisiológico diversas espécies de cogumelos estão sendo cultivadas em resíduos lignocelulósicos (agrícola e agroindustrial), devido a sua tecnologia de produção simples, baixo custo e alta eficiência biológica (POSTEMSKY et al., 2017; SARDAR et al., 2017; COSTA et al., 2018).

De forma especial, *Pleurotus* (Fries.) P. Kummer. degradam seletivamente constituintes da lignina, sendo excelentes candidatos para aplicação em biorrefinaria lignocelulósica. Atualmente, várias espécies do gênero *Pleurotus* têm alta importância comercial no mercado mundial de cogumelos comestíveis, ocupam o segundo lugar na produção mundial e, são populares, principalmente na Ásia, nas Américas e Europa (SALMONES, 2017; SEKAN et al., 2019).

Pleurotus são macrofungos, membros da classe Basidiomycetes, família Pleurotaceae que tem hábito sapróbio e, absorvem nutrientes dos substratos com capacidade de colonizar e degradar uma grande variedade de materiais lignocelulósicos. Comumente, os *Pleurotus* spp. apresentam uma grande variedade de cores, do branco ao cinza-escuro, marrom, amarelo, salmão entre outras (BARH et al., 2019). Além de serem fonte de proteínas, fibras, minerais (P,

Ca, Fe, K e Na) e vitaminas (tiamina, riboflavina, ácido fólico e niacina) (CORRÊA et al., 2016, ROYSE et al., 2017).

Uma espécie do gênero *Pleurotus* que se destaca pela coloração rósea, sabor, textura e alto valor gastronômico é *Pleurotus ostreatoroseus* Singer. Trata-se de um cogumelo comestível com propriedade nutricional, medicinal e uma opção para uso em biorremediação. Ocorre em áreas tropicais, cresce em temperaturas superiores a 20 °C. Está descrito como fonte de proteínas, carboidratos, vitaminas e minerais (CORRÊA et al., 2016; REIS et al., 2016; ALVES et al., 2017).

Além do uso dos cogumelos na gastronomia são considerados fontes de compostos bioativos e são adaptados a teores reduzidos de nutrientes, condição que favorece a adaptação desses fungos em meios naturais ou sintéticos. No entanto, necessitam de substâncias para o seu desenvolvimento tais como: carbono, nitrogênio, vitaminas e minerais, exigem equilíbrio no substrato do teor de carbono/nitrogênio (BELLETINI et al., 2019).

Os cogumelos comestíveis são potenciais produtores de metabólitos, a exemplo de enzimas que são sintetizadas e secretadas durante a degradação do substrato, apresentam natureza altamente seletiva e com elevada atividade em concentrações muito baixas. Todavia, as enzimas tem alto custo de produção, o que tem sido resolvido a partir da utilização de resíduos agrícolas, florestais e agroindustriais, este que é um bioprocesso economicamente viável e limpo (RAJORIYA et al., 2016; SOUZA et al., 2016; WANG et al., 2017).

Entre as enzimas, as proteases tem destaque comercial e correspondem 75% do mercado global (INÁCIO et al., 2015; GURUMALLESH et al., 2019). A preferência no uso de proteases microbianas tem crescido devido a fácil manipulação dos microrganismos, a capacidade de aplicação biotecnológica, baixo custo, curto tempo de geração e características não-tóxicas (WANG et al., 2017; GURUMALLESH et al., 2019).

Com base no exposto, esta pesquisa tem como finalidade avaliar o crescimento de *P. ostreatoroseus* em diferentes meios de cultivo, assim como a produção de proteases em resíduo lignocelulósico e identificar um substrato promissor para produção de basidiomas a fim de desenvolver um bioproduto alimentício.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Pleurotus* (Fries) P. Kummer

O gênero *Pleurotus* (Fries) P. Kummer pertencente a classe dos basidiomicetos e a família Pleurotaceae. Conhecidos popularmente como os fungos de “podridão branca”, por apresentar o micélio branco e decompor a lignina da madeira, podem ser encontrados em florestas temperadas, tropicais e subtropicais crescendo em tronco úmido de madeira de árvores e decomposição orgânica (MACHADO et al., 2016; SALMONES, 2017; BARH et al., 2019).

Com relação as características morfológicas, as espécies de *Pleurotus* apresentam diferença na forma, tamanho e coloração que vão do branco puro, intermediando entre o creme, castanho, amarelo e rosa. Possuem basidioma do tipo pleurotoide e carnoso, medindo aproximadamente de 5 a 15 cm, com píleo camoso em forma de concha, estipe curta, excêntrica, véu ausente, lamelas não intervenosas, esporos geralmente cilíndricos (RAMOS et al., 2015; PUTZKE et al., 2018)

O grande potencial de *Pleurotus* spp. é a capacidade de degradar uma grande variedade de resíduos lignocelulósicos, por esse motivo são os preferidos para cultivo. Espécies de *Pleurotus* são cultivadas em grande escala, usando diferentes resíduos agrícolas com técnicas de produção simples e de baixo custo. Cerca de 998 milhões de toneladas de agoresíduos são produzidos anualmente, que incluem arroz, trigo e palhas de cereais. Estes cogumelos utilizam esses resíduos agrícolas como substratos para o seu crescimento, atuando na reciclagem de resíduos (SADH et al., 2018; RAMAN et al., 2021).

Além disso, são amplamente conhecidos pelo seu valor nutricional, pois apresentam alto teor de proteínas, carboidratos, aminoácidos essenciais, ácidos graxos insaturados, minerais, vitaminas e baixo teor de gordura sendo utilizados na indústria alimentícia como suplemento alimentar ou alimento funcional. Ademais, também possuem potencial nutracêutico e diversas aplicações biotecnológicas em diversos setores industriais (SOUZA et al., 2016; GURUMALLESH et al., 2019).

Em 2020 o Index Fungorum lista cerca de 759 registros de espécies de *Pleurotus*. No entanto, os que se destacam comercialmente são: *P. ostreatus* (cogumelo ostra), *P. eryngii* (cogumelo rei ou “cardoncello”), *P. pulmonarius* (cogumelo fênix), *P. ostreatoroseus* (cogumelo-ostra rosa), *P. sajor-caju* (ostra indiana), *P. cystidiosus* (cogumelo ostra abalone), *P. citrinopieatus* (cogumelo-ostra dourado) (BELLETTINI et al., 2019).

2.2 *Pleurotus ostreatoroseus* Singer.

O cogumelo comestível em destaque, *Pleurotus ostreatoroseus* Singer., apresenta coloração rósea e esporada rosada conhecido popularmente como “shimegi rosa” ou “cogumelo ostra salmão”. É nativo do Brasil, encontrado em florestas subtropicais, sob temperaturas superiores a 20°C. Foi descrito por Singer (1960), a partir do material coletado no Parque Estadual de dois Irmãos (Mata Atlântica Brasileira), Recife, PE, Brasil (CORREA et al., 2015; SALMONES, 2017). Lechner, et al. (2004) citam *P. ostreatoroseus* como *P. djamor* var. *roseus* Corner, no entanto, segundo os obtidos por Silva et al. (2021) verificaram que *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 apresenta características genéticas bem definidas.

Trata-se de um cogumelo comestível com basidioma carnoso de coloração rosa quando jovem e esbranquiçada ou amarelada após o envelhecimento. Segundo Putzke et al. (2018) a espécie apresenta véu ausente, lamelas não intervenosas e decorrentes, camada cortical de píleo com elementos de parede lisa, estipe excêntrica e esporos geralmente cilíndricos (Figura 1). Essa espécie está sendo visada pois demonstra alta atividade biotecnológica com capacidade de produção de enzimas e bioativos (FONSECA et al., 2015).



Figura 1. Características macroscópicas de *Pleurotus ostreatoroseus*. A – Basidioma sem presença de véu e lamelas não intervenosas; B – Conjunto de basidiomas. Fonte: Fonseca.

Nos últimos anos *P. ostreatoroseus* está sendo produzido principalmente para fins comerciais, pois apresenta colonização rápida e vigorosa, com potencial de competição e resistência contra outros fungos e bactérias, além de garantir fluxos de produção, com alta eficiência biológica e rendimento superior comparado a outras espécies, podendo ser cultivado em diferentes resíduos lignocelulósicos. Além disso, apresenta composição em compostos bioativos que contribuem com a promoção de efeito antioxidante e antiproliferativo sobre células vegetais (REIS et al., 2016; MACHADO et al., 2017; JUNIOR et al., 2021).

2.3 Importância e valor nutricional dos cogumelos

Ao decorrer dos anos o consumo de cogumelos comestíveis aumentou consideravelmente por ser um alimento funcional importante e por apresentar diversas aplicações terapêuticas e biotecnológicas. Em destaque, espécies de *Pleurotus* spp. contém três propriedades essenciais requeridas nos alimentos, como: capacidade de nutrição, sabor e funções fisiológicas (LAVELLI et al., 2018; RAMAN et al., 2021).

Os cogumelos comestíveis são apreciados por suas características sensoriais e excelente perfil nutricional. Os terpenos, lactonas, aminoácidos, e carboidratos de sua composição determinam uma variedade de aromas preciosos e características de sabor do basidioma. Dentre os componentes do sabor, destacam-se os ligados ao sabor *umami* (CORREA et al., 2016; RATHORE et al., 2017). Descoberto por Kikunae Ikeda em 1908, o sabor *umami* é o quinto gosto básico, descrito como delicioso ou saboroso remetendo ao sabor das proteínas (HARADA-PADERMO et al., 2020).

Ademais, o sabor e aroma *umami* dos cogumelos enriquece as qualidades sensoriais, tornando fatores importantes que afetam na escolha do consumidor (SUN et al., 2020). Estudos demonstraram que a substituição parcial de cogumelos em pratos que apresentavam carne como proteína causaram a redução de sódio e aumentaram a aceitação do consumidor final (CHUN et al., 2020).

Além disso, as proteínas das espécies de *Pleurotus* são 90% iguais às das plantas e 99% comparável à carne. No entanto, foi relatado que o conteúdo proteico dos cogumelos são afetados por uma série de fatores a saber: o tipo de cogumelo, o estágio de maturação, parte do corpo do cogumelo, disponibilidade de conteúdo de nitrogênio no meio e no local da colheita (MAFTOUN et al., 2015).

O carboidrato é o principal componente dos cogumelos e o conteúdo total varia de 35% a 70% do peso seco com variações em diferentes espécies. A maioria dos carboidratos nos cogumelos são oligossacarídeos, como trealose e polissacarídeos da parede celular, como quitina, β -glucanos e mananos (BIAO et al., 2019).

Da mesma forma que a água é um componente essencial para todos os seres vivos, é o constituinte principal dos cogumelos, em média o teor de água dos corpos de frutificação pode chegar até 90% nas espécies. Assim como o potássio pode ser considerado o principal e o primeiro componente mineral de todos os cogumelos (VETTER et al., 2019).

2.4 Economia circular

O termo Economia circular foi proposto por Boulding (1966) no livro intitulado: “*The Economics of the Coming Spaceship Earth*”. Baseado nos preceitos proposto por Boulding definições surgiram ao longo dos anos e muitas permeiam propor uma economia sustentável (GEISENDORF et al., 2018).

A economia circular é definida como o modelo econômico voltado para uso eficiente de recursos em um ciclo fechado de produtos, com o potencial de levar o desenvolvimento sustentável a partir do reaproveitamento de materiais e, conseqüentemente, evitar o esgotamento de recursos e a degradação ambiental (KORHONEN et al., 2018; MORSELETTTO, 2020).

O conceito de economia circular apresenta grande relevância na evolução da economia global, pois é uma alternativa à economia linear na utilização de fontes renováveis e na conversão de recursos de base biológica, como alimentos, rações, bioquímicos e bioenergia, que promete reduzir os efeitos das mudanças climáticas, proporcionando um fonte de carbono renovável (biomassa), bem como a criação de negócios e oportunidades de emprego, especialmente nas áreas rurais (UBANDO et al., 2020).

Este modelo de economia evidencia o comprometimento e preocupação com os recursos globais, uma vez que otimiza os seus rendimentos através da fabricação de produtos reutilizáveis e com menor geração de resíduos. A ideia da economia circular é justamente utilizar os produtos durante sua vida útil e reutilizar totalmente no fim do ciclo, a fim de manter o ciclo continuo de aproveitamento de matérias-primas (LIGUORI et al., 2016). Ademais, os conceitos de economia circular também agregam as biorrefinarias como uma atividade importante para reverter a degradação ambiental (PHILIPPINI et al., 2020).

2.5 Biorrefinaria

A biorrefinaria está inserida no conceito atual de sistemas sustentáveis. Semelhante ao conceito das refinarias de petróleo tradicionais, a biorrefinaria está voltada para a biomassa, ou seja, a matéria-prima renovável que compreende todo o material orgânico derivado de plantas (incluindo algas), árvores, colheitas e resíduos lignocelulósicos obtidos de forma sustentável para ser convertido em produtos comercializáveis (DE PRETTO et al., 2017).

Este conceito leva em consideração a gestão de todos os recursos de sustentabilidade em termos de economia, meio ambiente e sociedade. Essa nova abordagem, vai muito além de uma simples definição. É uma estratégia valiosa para focar na “economia verde”, esta que terá papel fundamental para as próximas gerações (FERREIRA et al., 2007; MOHAN et al., 2016).

As biorrefinarias podem ser descritas como indústrias integradas de base biológica, usando uma variedade de tecnologias para fabricar produtos químicos, biocombustíveis, ingredientes para alimentos, rações, biomateriais, fibras, calor e energia, visando maximizar o valor agregado nos três pilares da sustentabilidade (Meio ambiente, economia e sociedade) (FAVA et al., 2015).

Para expandir essa abordagem, as biorrefinarias são classificadas com base no tipo de matéria-prima utilizada, no tipo de intermediários gerados, processos de conversão (termoquímico e bioquímico) e o status da execução da tecnologia (convencional ou avançado). Assim, as biorrefinarias são classificadas em três tipos diferentes: Biorrefinaria fase I, Biorrefinaria fase II, Biorrefinaria fase III (TAKKELLAPATI et al., 2018).

A biorrefinaria de Fase I utiliza apenas um material de matéria-prima, possui capacidade de processamento fixa e, um único produto primário, como exemplo o biodiesel de origem vegetal, fábricas de óleo, celulose e papel. A fase II é semelhante ao tipo I, usando apenas uma matéria-prima, contudo é capaz de produzir vários produtos, tendo como exemplo os produtos químicos advindos do amido e bioetanol. Por fim, a fase III compreende a utilização de vários tipos de matérias-primas, tecnologias de processamento e produzem múltiplos tipos de produtos (AREVALO et al., 2017; TAKKELLAPATI et al., 2018; HASSAN et al., 2019).

Segundo Clark et al. (2008) a fase III compreende quatro classes, sendo elas: biorrefinaria de culturas inteiras, biorrefinaria verde, biorrefinaria lignocelulósica e plataformas de biorrefinaria. O uso de resíduos lignocelulósicos para cultivo de cogumelos está classificado como Biorrefinaria lignocelulósica.

A biorrefinaria lignocelulósica utiliza uma matéria-prima proveniente da lignina e pode produzir um amplo espectro de produtos através de vários processos e abordagens. Essas matérias-primas lignocelulósicas podem ser madeira, palha, serragem, gramíneas e outros (HASSAN et al., 2019).

A classe da biorrefinaria lignocelulósica propôs o uso dessa plataforma para abordar o desenvolvimento sustentável dos produtos afim de reciclar biomassa e seus resíduos, bem como a integração de diferentes tecnologias de conversão através da integração de diferentes processos sendo capaz de melhorar o tratamento das matérias-primas (BHOWMICK et al., 2018; UBANDO et al., 2020; PHILIPPINI et al., 2020).

A produção de cogumelos em resíduos lignocelulósicos adentra os atuais conceitos de biorrefinaria, criando aspirações amplas em direção a tecnologias cada vez mais integradas, pois esses substratos lignocelulósicos podem ser usados como fonte renovável para produção

de produtos, valorizando o processo de integração da biotecnologia verde nos conceitos de bioeconomia e biorrefinaria (VENKATA et al., 2016; AREVALO et al., 2017; BHOWMICK et al., 2018; TAKKELLAPATI et al., 2018).

2.6 Cultivo de cogumelos em Resíduos Lignocelulósicos

O cultivo de cogumelos varia de uma atividade agrícola relativamente primitiva a uma indústria altamente tecnológica. Desse modo, cerca de 200 espécies de cogumelos comestíveis são cultivados experimentalmente, 100 economicamente cultivados, cerca de 60 cultivadas comercialmente e, mais de 10 produzidas em escala industrial em diferentes países (CHANG et al., 2017).

Diversas pesquisas sobre técnicas de cultivo, composição química, perfil nutricional, capacidade biotecnológica do gênero *Pleurotus* tem sido realizada nos últimos anos, este é o terceiro tipo de cogumelo mais amplamente produzido no mundo (MAFTOUN et al., 2015; CORRÊA et al., 2016; ROYSE et al., 2017).

Os cogumelos do gênero *Pleurotus* spp. são valorizados por requererem um curto tempo de crescimento, em comparação a outros. Seu corpo de frutificação não é frequentemente atacado por doenças e pragas e pode ser cultivado de maneira simples e barata, com alto rendimento, maior utilização de substrato, ampla escala de temperatura e tolerância química, além de biorremediação ambiental (BELLETTINI et al., 2019).

Para o sucesso no cultivo, as indústrias tem optado pelo uso de resíduos lignocelulósicos até mesmo para reduzir os custos e garantir os lucros no processo, pois além de serem substratos mais eficazes para o crescimento dos cogumelos, também possuem baixo custo e estão disponíveis localmente. Diversos estudos estão sendo realizados com espécies do gênero *Pleurotus* sobre a produção de cogumelos em resíduos lignocelulósicos (Tabela 1) com a finalidade de testar a eficiência e produtividade desses cogumelos (YAMAUCHI et al., 2018).

Alguns resíduos são ricos em carbono e possuem baixo teor de proteína, fator que não é suficiente para o crescimento e desenvolvimento dos basidiomas dos cogumelos. Dessa forma, é necessário suplementar esses resíduos com adição de nitrogênio, fosfato, potássio e/ou vitaminas para aumentar a eficiência dos substratos para cultivo (SALAMI et al., 2018; RAMAN et al., 2021). Ou seja, para melhor rendimento do cultivo de cogumelos, o requisito nutricional deve ser atendido de maneira ideal em concentração de níveis de carbono e nitrogênio (KAMTHAN et al., 2017).

Tabela 1. Cogumelos do Gênero *Pleurotus* produzidos em diferentes resíduos lignocelulósicos.

Cogumelos	Resíduos Lignocelulósicos	Referência
<i>Pleurotus ostreatoroseus</i> (DPUA 1720)	Exocarpo de Cupuaçu.	Fonseca et al.(2015)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Mix de Serragem de madeira.	Amirta et al.2016)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Palha de cana e capim.	Vieira et al.(2016)
<i>Pleurotus eryngii</i>	Serragem de madeira; palha de trigo; palha de cevada.	Jeznabadi et al.(2016)
<i>Pleurotus columbinus</i>	Palha de arroz e milho.	Mohamed et al.(2016)
<i>Pleurotus pulmonarius</i> e <i>Pleurotus ostreatus</i> (cepa HK-35)	Palha de trigo; casca de girassol.	Myronycheva et al.(2017)
<i>Pleurotus djamor</i> , <i>Pleurotus citrinopileatus</i> e <i>Pleurotus eryngii</i>	Casca de girassol e serragem de carvalho.	Atila et al.(2017)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Serragem e palha de arroz.	Paul et al.(2017)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Serragem e bambu.	Yamauchi et al.(2018)
<i>Pleurotus djamor</i>	Gramma e serragem.	Rabuske et al.(2019)
<i>Pleurotus sajor-caju</i> (Cepa PSC96/03)	Bagaço de cana; capim elefante; palha de arroz.	Bernardi et al.(2019)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Resíduo de dendê e amêndoa de cacau.	Silva et al.(2020)

O uso de procedimentos biotecnológicos e de bioconversão de diferentes resíduos está fazendo o cultivo de cogumelos apresentar cada vez mais relevância, principalmente pela questão ecológica da reciclagem desses resíduos em insumos agrícolas úteis. O substrato residual, obtido do cultivo também pode ser usado como condicionador de solo, fertilizante natural ou alimento para animais, reciclando assim diferentes matérias-primas, fortalecendo os conceitos de economia circular (SALAMI et al., 2018).

2.7 Fermentação semi-sólida ou em estado sólido

A fermentação semi-sólida e/ou em estado sólido é comumente conhecida pelo crescimento de microrganismos na superfície de substratos sólidos, apresentando a capacidade de se desenvolver na ausência de água livre. É uma técnica que tem se mostrado vantajosa, apresentando alta capacidade de produção enzimática, menor susceptibilidade a inibição e maior estabilidade de enzimas as variações de pH e temperatura (SADH et al., 2018).

Os resíduos lignocelulósicos são excelentes substratos na fermentação, são compostos de celulose e hemicelulose como fonte de carbono e, lignina como indutor para a produção de enzimas (GUPTA et al.,2018; AKPINAR et al., 2017). Essas matérias-primas lignocelulósicas podem vir de diferentes fontes como madeira, bagaço de cana, palha de milho, milho, espigas, farelo e palha de trigo, cascas de frutas e resíduos (SPERANDIO et al., 2019).

Substratos têm composições que podem dar origem a diferentes produtos valiosos. Esta fermentação têm forte potencial nas novas aplicações usando a bioconversão de resíduos agroindustriais em biocombustíveis, na biorrefinaria lignocelulósica e em outros produtos de alto valor agregado (COSTA et al., 2018; SADH et al., 2018).

Esses resíduos apresentam uma composição rica em açúcares fermentáveis e nutrientes, dessa forma, se tornando uma fonte importante para os microrganismos, pois a partir do processo fermentativo estes seres tem a capacidade de converter os nutrientes em diversos produtos, tais como as enzimas (PANDA et al., 2016).

2.8 Enzimas

As enzimas são catalisadores naturais, cada vez mais necessárias em vários campos industriais e bioprocessos. Hoje, os pesquisadores se concentram na detecção de novas enzimas dotadas de propriedades extremamente satisfatórias para aplicações comerciais (BEMNRAD et al., 2019).

O uso de enzimas no processo industrial tem um grande número de vantagens, pois tem alta especificidade e geram menores custos. Além disso, podem ser biodegradáveis causando menos poluição ambiental e preservadas por um longo tempo (BEMNRAD et al., 2019).

Dentre as diversas enzimas disponíveis, as proteases se destacam por ser um grupo importante de enzimas, com alto valor econômico e forte aplicação industrial e comercial. Elas são classificadas com base na natureza química do sítio catalítico, tipo de reação química catalisada e estrutura. São subdivididas em duas classes principais, as exopeptidases e endopeptidases (BANO et al., 2018; BANERJEE et al., 2017).

As proteases têm importante caráter biotecnológico, pois permitem aplicações em reações químicas e bioquímicas em alimentos, bebidas, produtos farmacêuticos e cosméticos. Representam um dos maiores grupos de enzimas industriais do mundo, com perspectiva de aumento de produção em torno de 7% até 2020 (MACHADO et al., 2017).

O uso das proteases de origem fúngica tem expandido nos últimos anos e, dentre as diversas fontes desses biocatalisadores, estão os basidiomicetos (BANERJEE et al., 2017). Estes ganharam reconhecimento global por seu uso difundido em vários setores industriais, tais como na indústria alimentícia, química, agricultura e biotecnologia (CHOI et al., 2017; GURUMALLESH et al., 2019). Devido à crescente procura por enzimas de origem microbiana as proteases têm representado 75 % do comércio de vendas (INÁCIO et al., 2015; GURUMALLESH et al., 2019).

As proteases podem ser obtidas através da fermentação submersa e/ou fermentação em estado sólido, processo no qual fungos, bactérias ou leveduras crescem comumente, em condições padronizadas para síntese de enzimas. Este método demonstra ser vantajoso para a produção eficiente e, em larga escala de biomassa micelial, têm alto rendimento e, são fáceis para modificação e otimização do produto devido à diversidade bioquímica e suscetibilidade à manipulação genética. Entre as enzimas proteolíticas industriais, 50% correspondem as proteases produzidas por fungos, 35% por bactérias, e os 15% restantes obtidas das plantas (CUI et al., 2015; LIU et al., 2017; BENMRAD et al., 2019).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o crescimento de *Pleurotus ostreatoroseus* em diferentes meios de cultivo, assim como a produção de proteases em resíduo lignocelulósico e identificar um substrato promissor para produção de basidiomas com a finalidade de desenvolver um bioproduto alimentício.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o crescimento de *Pleurotus ostreatoroseus* em meio de cultura sintético e natural para selecionar o meio eficiente para produção de massa micelial;
- Selecionar substrato para a produção de basidiomas de *P. ostreatoroseus* utilizando o resíduo do beneficiamento da fruticultura Amazônica;
- Analisar a produção de *P. ostreatoroseus* em resíduo lignocelulósico promissor para obtenção de biomassa;
- Determinar a atividade e caracterizar parcialmente proteases quanto ao pH e temperatura ótima, estabilidade ao pH, temperatura e ação de inibidores;
- Elaborar um bioproduto de panificação utilizando biomassa de *P. ostreatoroseus*;
- Determinar a composição centesimal dos basidiomas desidratados de *P. ostreatoroseus* e do bioproduto em condições padronizadas;
- Analisar as características microbiológicas da biomassa desidratada e do produto alimentício elaborado.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultivo e manutenção de *Pleurotus ostreatoroseus*

Para a realização desta pesquisa foi utilizado *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720, cedido pela Coleção de Culturas DPUA, da Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil. Para obtenção da cultura matriz, o cogumelo foi cultivado em ágar Batata Dextrose (BDA), com extrato de levedura 0,5 % (p/v). Os cultivos foram mantidos a 28 °C por oito dias, na ausência de luz e umidade 60 %.

4.2 Seleção de meio de cultura para cultivo de *P. ostreatoroseus*

4.2.1 Preparação do Inóculo

Para a preparação do inóculo da cultura obtida no item 4.1 foi transferido um disco micelial de 10 mm de diâmetro para a superfície dos meios, estes que foram suplementados com extrato de levedura 0,5 % (p/v) citados na tabela 2. Os meio foram esterilizados a 121 °C por 15 minutos, mantidos a 25 °C.

Tabela 2. Meios de cultura utilizados para o cultivo de *P. ostreatoroseus*.

Meio Sintético	Meio Natural
Ágar Batata Dextrose (BDA)	Ágar Extrato de Inhame roxo [(EIR) <i>Dioscorea alata</i>]
Ágar GYP (glicose, extrato de levedura e peptona)	Ágar extrato de Cará-de-espinho [(CEIN) <i>Dioscorea altissima</i>]
Ágar Extrato de Malte (MEA)	Ágar extrato de Ariá [(AE) <i>Calathea allouia</i>]

Os tubérculos de cada espécie de hortaliça foram higienizados com desinfetante para hortifrutículas (COALA®) de acordo com a recomendação do fabricante. Foi utilizado 200 g de cada tubérculo *in natura* em 500 mL de água, que posteriormente foi submetido a cocção durante 10 minutos. Em seguida, a separação do resíduo sólido foi realizada por filtração em gaze dobrada, o extrato recuperado foi completado para 1000 mL e, acrescentado o ágar para ser dissolvido em banho-maria. Ao término deste procedimento foi adicionada a glicose e o meio foi esterilizado 120 °C por 15 minutos (LACAZ et al., 2002)

4.2.2 Avaliação do crescimento de *P. ostreatoroseus* em meio sintético e natural

No cultivo de *P. ostreatoroseus* foi utilizado como inóculo um disco micelial de 10 mm de diâmetro retirado da cultura obtida no item 4.2.1. Após semeadura do disco micelial

superficialmente nos meios, os cultivos em placa de Petri (100 mm x 15 mm) foram mantidos na ausência de luz, a 28 °C por oito dias. Todos os cultivos foram preparados em quintuplicata (CASTILLO et al., 2018).

No crescimento radial da massa micelial *P. ostreatoroseus* foi avaliado, em placa de Petri de 100 mm x 15 mm (meios citados no item 4.2.1). Após semeadura do basidiomiceto, os cultivos em quintuplicata, foram mantidos na ausência de luz, 28 °C, durante oito dias. A velocidade de crescimento radial foi avaliada segundo as recomendações de Castillo et al. (2018). O crescimento micelial foi observado a cada 24 horas, o diâmetro da colônia, valor do obtido em milímetros, foi dividido pelo tempo de cultivo para determinação da velocidade de crescimento radial (mm/dia), segundo equação I.

O crescimento micelial de *P. ostreatoroseus* foi classificado pelo método subjetivo de notas, onde: fracamente, mediantemente e fortemente adensado, equivaleram as notas 1, 2, 3, respectivamente (BUMANLAG et al., 2018). O meio de cultura promissor com maior vigor micelial foi utilizado nos experimento citados a seguir (item 4.3).

$$\text{Equação I: Velocidade do crescimento radial/VCR} = \frac{\text{Diâmetro colônia (mm)}}{\text{Tempo de cultivo (dia)}}$$

4.3 Seleção de resíduos lignocelulósicos para a produção de *P. ostreatoroseus*

Para selecionar uma mistura de substrato adequado para o desenvolvimento micelial de *P. ostreatoroseus* (DPUA 1720) foram utilizados como substrato suporte: Exocarpo de Cupuaçu [(CC) *Theobroma grandiflorum*], Resíduo de processamento de açaí [(Sac) *Euterpe oleracea*], Casca de Abacaxi [(CsAb) *Ananas comosus*] e Serragem (SER), 80 % (p/v), suplementados com farelo de arroz [(FA) *Oryza sativa*] ou farelo de trigo [(FT) *Triticum aestivum*] 20 % (p/v) (Tabela 3).

As amostras dos substratos foram trituradas em partículas de 3 cm e, posteriormente, foram tratadas com solução desinfetante para hortifrutícolas (COALA[®]), conforme as recomendações do fabricante. O excesso de água foi drenado, a umidade ajustada para 60 % e o pH aferido para 6,5.

Para uso dos substratos como meio de cultura as formulações foram armazenadas em tubos de ensaio de 200 mm x 25 mm, formando uma coluna de 15 cm. A esterilização foi realizada a 121 °C, 60 minutos, por três dias consecutivos, procedendo ao resfriamento por 24 horas.

Tabela 3. Substratos utilizados para avaliar o crescimento micelial vertical.

Experimentos	Substratos suporte ¹	(%)	Suplementos ²	(%)
1	Sac	80	FA ou FT	20
2	CC	80	FA ou FT	20
3	CsAb	80	FA ou FT	20
4	SER	80	FA ou FT	20

(1) Substrato suporte (Sac– Resíduo de processamento de açaí, CC – Exocarpo de cupuaçu, CsAb – Casca de Abacaxi, SER – Serragem) e (2) Substrato suplementar (FA – Farelo de Trigo e FT – Farelo de Arroz).

Os cultivos foram incubados a 25 °C, umidade ambiental 60 %, na ausência de luz. O crescimento micelial vertical foi determinado em centímetros, a cada 24 horas durante 15 dias. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.4 Avaliação do crescimento micelial vertical de *P. ostreatoroseus* em tubo de ensaio

Para avaliação do crescimento micelial vertical de *P. ostreatoroseus*, da cultura matriz (item 4.2.2) foram retirados dois discos miceliais medindo 10 mm de diâmetro para inoculação na superfície do substrato esterilizado e resfriado. Os cultivos foram mantidos a 25 °C, na ausência de luz, umidade ambiental 60 %. A velocidade de crescimento micelial vertical (VMC) foi determinada em centímetros de acordo com a equação II, mensurada a cada 24 horas durante 15 dias. A expressão do crescimento foi avaliada com base no vigor, e classificado pelo método subjetivo de notas, onde: fracamente, mediamente e fortemente adensado, equivaleram as notas 1, 2, 3, respectivamente (BUMANLAG et al., 2018). A seleção do resíduo lignocelulósico foi realizada com base no vigor micelial.

$$\text{Equação II: VMC} = \frac{V_f - V_i}{T_f}$$

[VMC = Velocidade média do crescimento micelial ao dia; V_f = medida do crescimento micelial no tempo final (cm); V_i = medida do crescimento micelial no tempo inicial (cm); T_f = Tempo final (dias)].

4.5 Produção de *P. ostreatoroseus* em matriz sólida

4.5.1 Preparação do inóculo em meio líquido

O inóculo foi preparado em extrato de GYP (glicose, extrato de levedura e peptona) esterilizado a 121 °C por 15 minutos. Em cada frasco de Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido foram inoculados 15 discos miceliais (10 mm de diâmetro) retirados da

cultura matriz selecionada no item 4.2.2. Os cultivos foram incubados a 28 °C, 150 rpm por oito dias.

4.5.2 Cultivo em grãos de trigo (Spawn)

Os grãos de trigo foram adquiridos no comércio local, lavados e deixados em imersão em água. Após 12 h, o excesso da água foi retirado, seguindo a imersão em solução desinfetante para hortifrutícolas (COALA[®]) por 30 minutos. Ao término do tratamento, os grãos foram pré-cozidos por 15 minutos e drenado o excesso de água. Os grãos foram armazenados em sacos de polietileno de 1000 g para esterilização a 121 °C durante 15 minutos. Após resfriamento foi inoculada nos grãos a massa micelial obtida em meio líquido (item 4.5.1). Os cultivos foram mantidos a 28 °C, na ausência de luz até completa colonização do substrato (FONSECA et al., 2015).

4.5.3 Produção dos basidiomas de *P. ostreatoroseus* em resíduo lignocelulósico

Para produção dos basidiomas de *P. ostreatoroseus* foi utilizado o substrato selecionado no item 4.4, higienizado com solução de hipoclorito 1 % (v/v) por 30 minutos, (ROLLAN, 2003). Após o tratamento, o excesso de água foi drenado e o substrato misturado com farelo de arroz, concentração 2:1 (p/p), umidade 60 %. A mistura de resíduo (1000 g) foi acondicionada em embalagens de polietileno transparentes de 3 kg. O substrato foi esterilizado a 121 °C, por uma hora, por três dias consecutivos. A fermentação foi realizada a 25 °C até completa miceliação do resíduo, em ambiente sem luz, umidade ambiente 80 %. A embalagem dos cultivos foi perfurada após 72 horas. Após a indução dos primórdios a 12 °C, os cultivos foram expostos à luz difusa por 12 horas, 25 °C, em ambiente com umidade 90 % (ROLLAN, 2003; FONSECA et al., 2015).

4.5.4 Quantificação, caracterização, desidratação e trituração dos basidiomas produzidos

Ao término da produção após colheita, os basidiomas totalmente desenvolvidos foram contados e separados daqueles que apresentaram deformidades, para posterior determinação do peso médio (peso médio de cada fluxo/número de basidiomas). Outras características foram determinadas, como comprimento, largura e espessura dos píleos e hastes (mm), eficiência biológica, produtividade e taxa de produção de acordo com Fonseca et al., (2015). Em seguida os basidiomas foram desidratados a 40 °C até umidade final de 5 %. Ao término, os basidiomas foram triturados e embalados em recipiente de vidro com tampa rosqueável para a determinação

da eficiência biológica (Equação III), rendimento (Equação IV) e produtividade (Equação V). A determinação de perda de matéria orgânica (PMO) foi realizada com base no peso seco dos resíduos não degradados (Equação VI) (FONSECA et al., 2015).

$$\text{Equação III. Eficiência biológica (\%)} = \frac{\text{peso do basidioma fresco}}{\text{peso de substrato seco}} \times 100$$

$$\text{Equação IV. Rendimento (\%)} = \frac{\text{peso do basidioma fresco}}{\text{peso de substrato utilizado}} \times 100$$

$$\text{Equação V. Produtividade (g/dia)} = \frac{\text{eficiência biológica}}{\text{dias de cultivo}}$$

$$\text{Equação VI. Perda da matéria orgânica (PMO)} = \frac{\text{Massa do substrato residual (base seca)}}{\text{Massa residual inicial (base seca)}} \times 100$$

4.5.5 Determinação da composição centesimal da biomassa

As análises de composição centesimal do cogumelo e do bioproduto foram realizadas no laboratório de Tecnologia do Pescado da Universidade Federal do Amazonas-UFAM, Manaus, Brasil, citadas a seguir:

Umidade: determinada por dessecação em estufa com circulação de ar 105 °C (método gravimétrico) até obtenção de peso constante (A.O.A.C, 2005).

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 et al.,2007).

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, 2005).

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, TACO, 2006).

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

4.6 Elaboração do produto de panificação suplementado com basidioma de *Pleurotus ostreatoroseus*

4.6.1 Matéria Prima

O produto de panificação foi elaborado tendo como base a biomassa desidratada e triturada em pó de *P. ostreatoroseus*. As análises de composição centesimal do produto de panificação foram realizadas conforme citado no item 4.5.5.

4.6.2 Formulação do produto de panificação

O produto de panificação adicionado de cogumelo possui duas formulações diferentes: ① O produto padrão contendo farinha de arroz, ② Formulação contendo farinha de arroz e biomassa do cogumelo [*P. ostreatoroseus*] triturada, desidratada em pó 10% (p/p). Na tabela 4 constam os ingredientes utilizados na formulação do produto de panificação e padrão.

Os ingredientes foram pesados em balança analítica e posteriormente misturados. A massa do produto de panificação foi acondicionada em formas medindo 7 cm de diâmetro e 5 cm de altura. O cozimento do bioproducto foi a 180 °C por 15 min.

Tabela 4. Quantitativo de ingredientes utilizados na preparação do produto de panificação

Ingredientes	Formulação	
	Padrão	Produto de Panificação 10% biomassa cogumelo desidratada em pó
Ovo	1 unidade	1 unidade
Clara	25,601g	25,601g
Farinha de arroz	68g	61,2 g
Biomassa de cogumelo triturada e desidratada em pó	-	6,8g
Sal	1,7g	1,7g
Óleo de coco	10g	10g
Leite em pó	10g	10g
Fermento	6,5g	6,5g

4.7 Análise da qualidade microbiológica da biomassa

4.7.1 Avaliação da qualidade microbiológica dos basidiomas e do produto final do cogumelo comestível

Para determinação de mesófilos, coliformes totais, termotolerantes e *Salmonella* sp. e *Shigella* sp. da biomassa desidratada de *P. ostreatoroseus* e do produto alimentício foi realizada pelo método de diluição sucessiva como citada por Massaguer (2005) e Ali (2016). De cada

amostra de biomassa desidratada e triturada foi utilizado 25 g para ser homogeneizado com 225 ml de água peptonada (diluição 10^{-1}). Desta suspensão foram preparadas diluições sucessivas, transferindo 1000 μL para 9000 μL de água peptonada 0,1 % (p/v), até obtenção da diluição 10^{-3} . As diluições foram submetidas a agitação por dois minutos em agitador de tubo. De cada diluição foi transferido 100 μL para superfície de SS ágar modificado, Mannitol Salt ágar e EMB Levine ágar (KASVI[®]).

4.8 Determinação da Atividade Enzimática

4.8.1 Determinação da Atividade Enzimática Qualitativa de proteases (Método bloco de Gelose)

Para a determinação da atividade enzimática qualitativa em ágar Leite pelo método bloco de gelose foi utilizando como inóculo as culturas obtidas no item 4.2.2 (BONA et al., 2014; PRADO et al., 2017). O meio de cultura foi distribuído em placas de Petri de 15 mm x 100 mm, formando uma camada de 4 mm, após solidificação foram inoculados os discos miceliais e os cultivos mantidos a 37 °C. Para evitar evaporação do filtrado da cultura, as placas foram protegidas com papel alumínio. Após 18 horas a atividade enzimática será determinada pelo tamanho do halo em milímetros.

4.8.2 Determinação da Atividade Quantitativa das Proteases

As enzimas foram extraídas dos resíduos lignocelulósicos (item 4.4), em água destilada esterilizada na proporção 1:5 (resíduo miceliado/mL de água destilada) em frascos de Erlenmeyer de 500 mL. Os frascos foram mantidos em agitador orbital, 180 rpm, a 30 °C, por 30 minutos. Ao término desta etapa, os extratos brutos foram recuperados por filtração em tecido tipo musseline, seguido em papel de filtro por filtração a vácuo e centrifugados a 4000x para obtenção do extrato bruto.

Para determinação quantitativa das proteases foram adicionados 250 μL de solução de azocaseína 1 % (p/v) em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,2 em 150 μL de extrato bruto. Os tubos de reação foram incubados por 1 hora a 25 °C em câmara escura. Para a interrupção da reação foram adicionados 1,2 mL de ácido tricloroacético 10 % (p/v) e em seguida foi realizada a centrifugação por 10 minutos a 10000 rpm, a 4 °C. Posteriormente, de cada sobrenadante foram retirados 0,8 mL e transferidos para tubos de ensaio contendo 1,4 mL de hidróxido de sódio 1 M. Como branco foi utilizada solução de azocaseína 1 % (p/v) em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,2 (MACHADO et al., 2017). A leitura das amostras foi realizada a 440 nm em

espectrofotometro. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorvância de 0,1 em uma hora.

4.9. Caracterização parcial das enzimas

4.9.1 Determinação do Efeito da Temperatura e pH na Atividade das Proteases

Para investigar o efeito do pH e da temperatura na atividade proteolítica foi selecionado o extrato bruto com atividade proteolítica significativa (item 4.5.2). O efeito do pH foi determinado na faixa de pH 5,0 a 10,0 utilizando o sistema de reação formulado com azocaseína 1%. Os tampões utilizados foram: Citrato Fosfato 0,2 M (pH 5,0-6,0), Tris-HCl 0,2M (pH 7,0-8,0), Glicina-NaOH (pH 9,0 - 10,0). Os sistemas foram incubados durante 60 minutos na ausência de luz, a 25 °C. Em seguida, foi determinada a atividade proteolítica. O efeito da temperatura na atividade das enzimas foi determinado nas seguintes temperaturas: 30 °C a 80 °C, em 60 minutos. O branco e os sistemas de reação foram preparados em triplicata. A atividade das proteases foi determinada conforme descrito no item 4.8.2 (MACHADO et al., 2017).

4.9.2 Determinação da Estabilidade ao Temperatura e pH das Proteases

Na determinação do efeito da estabilidade ao pH foi utilizado os extratos obtidos no item 4.8.2. Para os ensaios de estabilidade ao pH o extrato bruto foi incubado por 60 minutos nos respectivos tampões de uso: Citrato Fosfato 0,2 M (pH 5,0-6,0), Tris-HCl 0,2M (pH 7,0-8,0), Glicina-NaOH (pH 9,0- 10,0). Ao término do tempo de incubação foi determinada a atividade das enzimas (MARTIM et al., 2017). A estabilidade à temperatura foi determinada na faixa de 30 °C a 80 °C por 60 minutos e atividade proteolítica foi determinada conforme descrito no item 4.8.2.

4.9.3 Determinação do efeito de inibidores e íons metálicos

Para a determinação do efeito de inibidores na atividade das proteases foi utilizado Etilenodiaminotetracético (EDTA 5 Mm), fenilmetilsulfonil fluride (PMSF 1 Mm), ácido iodo acético 0,05 mM, pepstatina 1 mM. Os íons metálicos utilizados na concentração de 10 mM, na mistura reacional, foram: CaCl₂, CuSO₄, FeSO₄, MgSO₄, MnSO₄, ZnSO₄, NaCl e KCl. A mistura reação, incluindo o controle, foi incubada durante 30 minutos nas condições ótimas de temperatura e pH. A atividade proteolítica foi mensurada como citado no item 4.8.2. A atividade enzimática residual foi comparada com o controle, incubado sem os inibidores ou íons metálicos (MARTIM et al., 2017).

4.10 Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise estatística descritiva média, desvio padrão, gráficos e os cálculos de atividade enzimática ($R^2 \geq 95\%$) por análise de variância (Anova) e teste Tukey ($p < 0,05$) para comparação de médias, utilizando o software Minitab ® versão 17.0.

CAPÍTULO 01

(Artigo publicado)

Brazilian Journal of Development

Braz. J. of Develop., Curitiba, v. 6, n. 11, p.92475-92485, nov. 2020. ISSN 2525-8761

Cultivo de cogumelo comestível em resíduos lignocelulósicos de floresta tropical para produção de proteases

Mushroom cultivation edible in lignocellulosic residues from rainforest for protease production

DOI:10.34117/bjdv6n11-598

Recebimento dos originais: 19/10/2020

Aceitação para publicação: 27/11/2020

Elliza Emily Perrone Barbosa¹

Graduada em Ciências Biológicas

Instituição: Universidade Federal do Amazonas- UFAM

Endereço: Av. Gen. Rodrigo Octávio 6200 (Bairro Coroado I) 69080-900, Manaus-AM

Email: elliza.perrone01@gmail.com

Laynah Pimenta²

Graduada em Ciências Biológicas

Instituição: Universidade Federal do Amazonas- UFAM

Endereço: Av. Gen. Rodrigo Octávio 6200 (Bairro Coroado I) 69080-900, Manaus-AM

Email: laynahpimenta7@gmail.com

Ana Kézia Pimentel de Brito³

Graduada em Ciências Biológicas

Instituição: Universidade Federal do Amazonas- UFAM

Endereço: Av. Gen. Rodrigo Octávio 6200 (Bairro Coroado I) 69080-900, Manaus-AM

Email: anakeziapimentel@gmail.com

Salomão Rocha Martim⁴

Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia

Instituição: Universidade Nilton Lins

Endereço: Av. Prof. Nilton Lins, 3259 (Bairro Flores) 69058-030, Manaus – AM

E-mail: salomao.martim@gmail.com

Maria Francisca Simas Teixeira⁵

Doutora em Ciências Biológicas

Instituição: Universidade Federal do Amazonas-UFAM

Endereço: Av. Gen. Rodrigo Octávio 6200 (Bairro Coroado I) 69080-900, Manaus-AM

E-mail: mteixeira@ufam.edu.br

Resumo

A demanda por enzimas nos setores industriais está aumentando nos últimos anos devido as diversas vantagens econômicas. Entre a variedade de enzimas, as proteases ganharam atenção especial nos setores industriais. Dentre as inúmeras fontes desses biocatalisadores estão os Basidiomycetes. Dessa forma, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a produção e caracterizar as proteases sintetizadas por *Pleurotus ostreatoroseus* Singer. DPUA 1720. A cultura matriz, preparada em ágar batata dextrose, suplementado com 0,5% (p/p) de extrato de levedura, foi mantida por oito dias a 25 °C. Em seguida, o cogumelo foi cultivado em resíduo de mistura de Exocarpo de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), açaí (*Euterpe oleracea*), abacaxi (*Ananas comosus*) e serragem, suplementados com farelo de arroz (*Oryza sativa*) ou farelo de trigo (*Triticum aestivum*) 0,5% (p/v) por 15 dias a 25 °C. As proteases foram extraídas em água destilada esterilizada e, no extrato bruto, foi determinada a atividade proteolítica, utilizando-se como substrato azocaseína 1 % (p/v). As proteases demonstraram as seguintes características bioquímicas: pH ótimo 5,0, temperatura ótima 40 °C, estabilidade em pH 5,0-6,0 e temperatura na faixa de 30-40 °C. A ação das enzimas proteolíticas é fortemente inibida por Fe^{+2} e Mn^{+2} . Estes biocatalisadores indicam que *P. ostreatoroseus* tem alto potencial na indústria farmacêutica, têxtil, alimentícia e química.

Palavras-chave: enzimas, resíduo, basidiomycetes.

Abstract

Industrial enzymes has been increasing nowadays due to their economic advantages. Among the variety of enzymes proteases have a special attention in industrial sectors and Basidiomycetes are the sources of these enzymes. The aim of this research was to evaluate the production and characterization of proteases of *Pleurotus ostreatoroseus* Singer. DPUA 1720. In this study, potato dextrose agar was supplemented with 0.5% (w/w) yeast extract for 8 days at 25 °C. The edible mushroom was grown in a mixture of cupuaçu exocarp (*Theobroma grandiflorum*), açaí (*Euterpe oleracea*), pineapple (*Ananas comosus*) and sawdust, supplemented with rice bran (*Oryza sativa*) or wheat bran (*Triticum aestivum*) 0.5% (w/ v) for 15 days at 25 °C. Proteases were extracted in distilled water and the proteolytic activity of crude extract was determined with 1% (w/v) azocaseine as substrate. Proteolytic enzymes showed that biochemical characteristic was optimal activity of these enzymes at pH 5.0 at 40 °C and stability at pH 5.0-6.0 at 30-40 °C. Proteases were classified as serine and asparto protease. This study suggests the potential use of *Pleurotus ostreatoroseus* proteases for application in the food, pharmaceutical, and chemical industries.

Keywords: enzyme, waste, basidiomycetes.

1 Introdução

Fungos filamentosos são adaptados ao crescimento em suportes sólidos lignocelulolíticos, fenômeno associado à sua forma de crescimento e estrutura celular (MANAN et al., 2017). Resíduos lignocelulósicos são substratos constituídos por celulose, hemicelulose, lignina, além de proteínas e minerais (INACIO et al., 2015; GUPTA et al., 2018; AKPINAR et al., 2017).

A atividade agrícola proporciona a geração de diversos resíduos lignocelulósicos. No Brasil predominam a cana-de-açúcar, soja e milho (MAGALHÃES et al., 2019). Na Amazônia, os substratos de maior disponibilidade são exocarpo de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Willd. ex Spreng Schum.) e semente de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), subprodutos resultantes do processamento ou consumo do fruto (NASCIMENTO et al., 2019).

O aproveitamento de substratos lignocelulósicos para crescimento de microrganismos é um processo de baixo custo e, uma alternativa que contribui para redução da poluição ambiental. Neste processo, a fermentação ocorre na ausência ou quase ausência de água livre e o organismo converte a biomassa em nutrientes assimiláveis, por ação de enzimas hidrolíticas extracelulares (GAO et al., 2020; HAN et al., 2020).

Entre as enzimas de origem microbiana, nos fungos as proteases têm diversas funções, como regular a morfogênese, fisiologia e metabolismo. Esses biocatalisadores constituem um grupo complexo de enzimas com especificidade de substrato, sítio ativo, mecanismo catalítico, pH e temperatura ideal e, perfil de estabilidade (MACHADO et al., 2016; SILVA et al., 2017).

Proteases representam 75% do comércio mundial de vendas, têm aplicações no processamento de alimentos, panificação, sucos e produção de queijos, por isso predominam no mercado mundial de enzimas, estimado em bilhões de dólares. O interesse por essas enzimas está relacionado não somente ao papel vital que exercem nas atividades metabólicas, mas também à ampla utilização em processos industriais (INÁCIO et al., 2015; ALI et al., 2016; RAZZAQ et al., 2019).

Cogumelos do gênero *Pleurotus* são representados por mais de 30 espécies conhecidas como fungo da “podridão branca”, ocorrem em regiões tropicais e subtropicais. Destas diversas espécies comestíveis, a comercialização está avaliada em \$ 42 bilhões em 2018, com crescimento estimado para \$ 69 bilhões em 2024 (SHELDRAKE, 2020).

Pleurotus são de fácil cultivo artificialmente e reconhecidos por sintetizar enzimas extracelulares que degradam compostos orgânicos complexos em nutrientes assimiláveis (YANG et al., 2015; FONSECA et al., 2015; BEMNRAD et al., 2019). Esta investigação

apresenta a produção de proteases em resíduo lignocelulósicos e a caracterização parcial dessas enzimas sintetizadas por *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. DPUA 1720.

2. Material e Métodos

2.1 Cultivo e manutenção do Cogumelo

Pleurotus ostreatoroseus DPUA 1720 foi cedido do acervo da Coleção de Culturas DPUA, da Universidade Federal do Amazonas – UFAM. A cultura viável foi obtida em ágar GYP [Glicose, peptona e extrato de levedura 0,5% (p/v)], em placas de Petri (90x15mm). Os cultivos foram mantidos a 25 °C por oito dias, para posterior processamento e utilização nos experimentos subsequentes (MACHADO et al., 2017).

2.2 Produção de enzimas proteolíticas por fermentação no estado sólido

Para o bioprocesso em matriz sólida foram utilizados diferentes resíduos lignocelulósicos e suplementos: Exocarpo de Cupuaçu [(EC) *Theobroma grandiflorum*], Resíduo de processamento de açaí [(Sac) *Euterpe oleracea*], Casca de Abacaxi [(CsAb) *Ananas comosus*] e Serragem (SER), 80% (p/v), suplementados com farelo de arroz [(FA) *Oryza sativa*] ou farelo de trigo [(FT) *Triticum aestivum*] 20% (p/v), umidade 60%, pH 6,0. A mistura de substrato foi armazenada em frascos de Erlenmeyer para esterilização a 121 °C por 60 minutos, durante dois dias consecutivos. Da cultura de *P. ostreatoroseus* foram retirados dois discos miceliais (10 mm) e inoculados nas misturas de substratos. A fermentação foi realizada a 25 °C, na ausência de luz, umidade ambiental de 60 % durante 15 dias.

2.3 Extração das enzimas proteolíticas

De cada mistura de substrato, as enzimas foram extraídas em água destilada esterilizada [1:5 (resíduo miceliado/mL de água destilada) p:v] em frascos de Erlenmeyer de 500mL. Os frascos foram mantidos em agitador orbital, 180 rpm, a 30 °C, por 30 minutos. A recuperação das enzimas foi realizada por filtração a vácuo, em tecido tipo musseline, seguido em papel de filtro Whatman n° 1 e, centrifugação a 4000x. O extrato bruto foi utilizado para determinação da atividade proteolítica.

2.4 Determinação quantitativa da Atividade das Proteases

A atividade proteolítica foi determinada conforme metodologia descrita por Machado et al. (2017), utilizando solução de azocaseína 1% (p/v) como substrato. Uma unidade de

atividade de proteases foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir uma variação de absorbância igual a 0,01 em 60 minutos.

2.5 Caracterização das proteases

2.5.1 Determinação do efeito do pH e da temperatura na atividade e estabilidade da protease

Para ensaio 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 (5 e 6), Tris-HCl (7 e 8) e glicina-NaOH (9 e 10). A temperatura ótima foi determinada pela incubação do extrato bruto em diferentes temperaturas (30 °C a 80 °C).

Para determinação da estabilidade ao pH, o extrato bruto foi diluído (1:1) nas seguintes soluções-tampão a 0,1 M: acetato de sódio (5 e 6), Tris-HCl (7 e 8) e glicina-NaOH (9 e 10), mantido a 25 °C por uma hora. Na estabilidade térmica, o extrato foi incubado em diferentes temperaturas (30°C a 80 °C), por uma hora (MARTIM et al., 2017).

2.6 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 iodoacético (10 mM) e pepstatina (0,1 mM). Os íons metálicos utilizados foram CaCl₂, CuSO₄, FeSO₄, MgSO₄, MnSO₄, ZnSO₄, NaCl e KCl (10 mM). As amostras foram incubadas nas condições ótimas de pH e de temperatura (MARTIM et al., 2017).

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 17.0.

3 Resultados e Discussão

Nas condições testadas *Pleurotus ostreatoroseus* sintetizou proteases em todos os resíduos lignocelulósicos (Tabela 1), cuja atividade proteolítica significativa, em média, foi verificada em Sac+FA ($26,53 \pm 0,4$ U/mL). O menor valor de atividade de proteases foi observado em CsAb+FA ($5,15 \pm 0,4$ U/mL) (Tabela 1). Dados similares foram obtidos por Machado et al. (2017), na caracterização das proteases de *P. ostreatoroseus* quando cultivado em tubérculos Amazônicos. Nesta pesquisa os autores citam que o valor significativo de atividade das proteases ($142,22 \pm 0,8$ U/mL) foi determinado nos cultivos em *Dioscorea alata* (DA) sem suplementação de fontes de carbono.

Tabela 1. Média de atividade quantitativa de proteases produzidas por *P. ostreatoroseus* em diferentes resíduos lignocelulósicos.

Substratos suporte/Suplemento	Atividade proteolítica (U/mL)
Sac+FA	$26,53^a \pm 0,4$
EC+FA	$22,75^b \pm 0,8$
SER+FA	$18,82^c \pm 0,1$
CsAb+FA	$5,15^f \pm 0,4$
Sac+FT	$24,40^b \pm 0,2$
EC+FT	$20,04^c \pm 0,1$
SER+FT	$14,86^d \pm 0,1$
CsAb+FT	$12,64^e \pm 0,3$

Sac + FA = Resíduo de processamento de açaí + farelo de arroz; EC + FA= Exocarpo de cupuaçu + farelo de arroz; SER + FA= Serragem + farelo de arroz; CsAb+ FA= Exocarpo de abacaxi + farelo de arroz; Sac + FT = Resíduo de processamento de açaí + farelo de trigo; EC + FT= Exocarpo de cupuaçu + farelo de trigo; SER + FT= Serragem + farelo de trigo; CsAb + FT= Exocarpo de abacaxi + farelo de trigo. Médias seguidas por letras iguais não são diferentes significativamente pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

As características bioquímicas das proteases são importantes parâmetros para fins de comercialização, pois confirmam a viabilidade de biocatalisadores para inserção no mercado (SHARMA et al., 2017). Além disso, para aplicação das enzimas em escala industrial, as características essenciais são condições ideais de pH, temperatura e estabilidade (ABDEL-RAHMAN et al., 2018).

O efeito do pH e da temperatura na atividade de proteases de *P. ostreatoroseus* em extrato de Sac+FA está demonstrado na figura 1-A. As enzimas demonstraram atividade de proteases em todos os pH e temperatura testados. A atividade ótima foi observada em pH 5,0 ($55,35 \pm 0,6$ U/mL), seguida de decréscimo em pH alcalino, apresentando somente 34% de

atividade em pH alcalino. No entanto, houve aumento de 14% na atividade enzimática em pH 9,0 (Figura 1-A), resultado que pode ser explicado devido o pH ótimo de atividade ser influenciado pela natureza do substrato, pela concentração, tipo de solução tampão utilizada e presença de agentes redutores (SANTOS et al., 2009).

A alteração na atividade enzimática em função do pH deve-se à presença de grupos ionizáveis na estrutura da enzima, uma vez que as enzimas sofrem mudanças em sua conformação dependendo do pH, modificando sua capacidade de ligação ao substrato, afetando a sua atividade catalítica (LIU et al., 2017). Na pesquisa realizada por Martim et al. (2017) as proteases de *Pleurotus albidus* apresentaram maior atividade em pH 5,0.

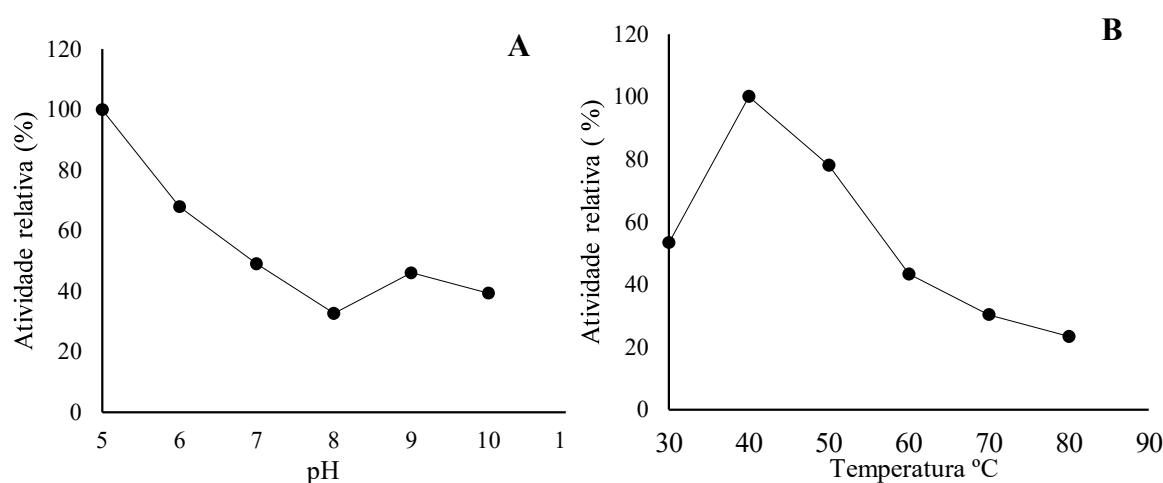


Figura 1. (A) Efeito do pH e temperatura (B) na atividade proteolítica de *Pleurotus ostreatoroseus*.

Machado et al.(2017) afirmaram que fungos produzem proteases ácidas, neutras e alcalinas. As proteases que apresentam atividade catalítica ótima em pH 5 a 8 têm aplicação em diversos segmentos industriais, como na indústria alimentícia, têxtil, farmacêutica e detergentes (BANERJEE et al., 2017). Com ênfase nas proteases neutras com aplicação na indústria alimentícia, estas têm forte potencial no processamento de alimentos, na produção de ração animal, e até mesmo para o tratamento de resíduos agroindustriais e, na panificação (MACHADO et al., 2017).

O efeito da temperatura na atividade enzimática está demonstrado na figura 1-B. A atividade proteolítica foi observada em todas as temperaturas testadas. Na presente pesquisa, foi verificada a atividade catalítica máxima de proteases de *P. ostreatoroseus* em 40 °C, com declínio de 30% e 23% nas faixas de temperatura de 70 °C e 80 °C, respectivamente. O valor de temperatura ótima encontrado no presente estudo está de acordo com aqueles reportados por

Leonhardt et al. (2016), Machado et al. (2017), Martim et al. (2017) nos estudos com *P. pulmonarius*, *P. ostreatoroseus* e *P. albidus*, respectivamente.

A temperatura é um parâmetro essencial para a atividade e estabilidade da enzima, a taxa de reação enzimática aumenta com a temperatura em função do aumento da colisão de moléculas e da energia de ativação (BANO et al., 2018). Estudos mostram que, dependendo da fisiologia microbiana, durante o processo de produção de proteases, a temperatura influencia diretamente na atividade enzimática (SILVA et al., 2016; LIU et al., 2017; BRAGA et al., 2020).

Os resultados relacionados à estabilidade das enzimas estão demonstrados na figura dois. As proteases de *P. ostreatoroseus* mantiveram maior estabilidade na faixa de pH 5, houve redução de atividade nas faixas de pH superiores, tanto que em pH 10 a retenção da atividade relativa foi de 39% (Figura 2-A).

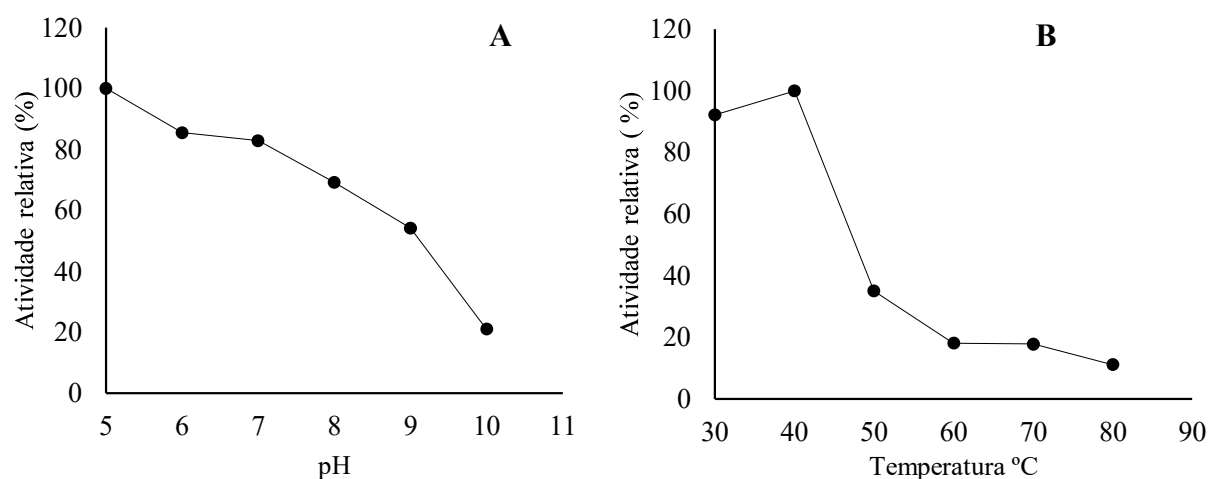


Figura 2. (A) Efeito da estabilidade do pH e temperatura (B) na atividade proteolítica de *Pleurotus ostreatoroseus*.

Na pesquisa realizada por Machado et al.(2017) foram reportadas que as proteases de *P. ostreatoroseus* são estáveis em pH 8. Nos estudos de Silva (2015) verificaram que as enzimas proteolíticas de *P. ostreatoroseus* mantiveram estabilidade na faixa de pH 7 e 9 com 97% de atividade por 60 minutos. Martim et al.(2017) e Bano et al. (2018) observaram a estabilidade das proteases de *P. albidus* na faixa de pH 5 e *P. eryngii* em pH 8.

A estabilidade das proteases de *P. ostreatoroseus* em diferentes temperaturas está demonstrada na figura 2-B. A maior estabilidade proteolítica foi demonstrada na faixa de 30 °C e 40 °C, com 92,25 % de atividade relativa. Na faixa de temperatura de 80 °C, foi verificado decréscimo acentuado na ação catalítica, em que a enzima reteve 11,28% de atividade relativa. Nos estudos de Machado et al. (2017) proteases de *P. ostreatoroseus* mantiveram a estabilidade

entre 40°C e 50 °C. Martim et al.(2017) e Abdel-Rahman et al. (2018) também demonstraram que as proteases de *P. albidus* apresentaram estabilidade na faixa de 40 °C a 50 °C. A demanda de proteases estáveis ao pH e ao calor tem continuamente aumentando devido ao alto valor no processamento industrial. Recentemente, diversas proteínas estão sendo empregadas com a finalidade de aumentar a tecnologia enzimática de acordo com a necessidade industrial (BANO et al., 2018).

Os resultados referentes a ação dos íons metálicos na atividade de proteases estão demonstrados na tabela dois. Os íons Mn^{+2} e Fe^{+2} inibiram completamente a atividade enzimática das proteases de *P. ostreatoroseus*. Enquanto Zn^{+2} e o Cu^{+2} reduziram a ação enzimática em 59,32% e 52,0%, respectivamente. Na presença dos demais íons, a retenção da atividade foi superior a 75%. Martim et al.(2017) verificaram que Cu^{+2} e Zn^{+2} promoveram discreta inibição das peptidases ou proteases de *P. albidus*. Entretanto, Choi et al.(2017) e Machado et al.(2017) relataram que Cu^{+2} e Zn^{+2} causaram redução de 95% e 60% na atividade proteolítica de *P. ostreatoroseus* e *P. ferulae*, respectivamente.

O efeito de inibidores na atividade de proteases de *P. ostreatoroseus* estão demonstrados na tabela dois. No teste de estabilidade frente aos inibidores foi verificado que o inibidor de serinoprotease (PMSF) e asparticoprotease (Pepstatina) causaram a redução da atividade de 49,04 % e 72,66%, respectivamente.

Tabela 2. Efeito de íons metálicos na atividade proteolítica de *P. ostreatoroseus*.

Inibidores	Atividade Residual (%)
Íons (10 mM)	
Controle	100
CaCl ₂	75,85 ± 0,4
KCl	86,83 ± 0,1
NaCl	89,84 ± 0,1
CuSO ₄	42,87 ± 0,4
FeSO ₄	00,00 ± 0,1
MgSO ₄	88,80 ± 0,2
MnSO ₄	00,00 ± 0,1
ZnSO ₄	40,68 ± 0,4
Substâncias	-
EDTA (10 mM)	86,15 ± 0,4
PMSF (10 mM)	52,96 ± 0,2
Ácido Iodoacético (10 mM)	100 ± 0,9
Pepstanina (1 mM)	27,34 ± 0,4

As proteases não foram afetadas por Ácido Iodoacético e EDTA, nesta condição, a retenção da atividade foi superior a 100% e 85 %, respectivamente. Os resultados obtidos sugerem que, entre as proteases de *P. ostreatoroseus* há predominância de aspártico e

serinoproteases (Tabela 2). Estes dados corroboram com os achados de Machado et al.(2017) e Martim et al.(2017) que verificaram a presença de serinoproteases no extrato bruto de *P. ostreatoroseus* e *P. albidus*, respectivamente. Abdel-Rhaman et al.(2018) citaram que no extrato de *P. albidus* também houve a presença significativa de serinoproteases.

4 Conclusão

O substrato promissor na síntese de proteases por *Pleurotus ostreatoroseus* foi o resíduo de processamento de açaí suplementado com farelo de arroz. Nas condições experimentais, as proteases apresentaram atividade ótima em pH 5,0 e a 40 °C, classificadas como serinoprotease e aspartoprotease. A ação destes biocatalisadores é fortemente inibida por Fe^{+2} e Mn^{+2} . Com essas características, proteases de *P. ostreatoroseus* têm potencial para uso na indústria farmacêutica, têxtil, alimentícia e química.

5 Agradecimentos

À Coleção de Culturas DPUA e ao Laboratório de Microbiologia Industrial e Médica, da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), por terem disponibilizado o cogumelo, além de todos os materiais e equipamentos necessários ao desenvolvimento da pesquisa.

6 Referências

- ABDEL-RAHMAN, T. M. et al. Biological and Chemical Sciences Purification and characterization of Milk -Clotting Enzyme from the edible mushroom *Pleurotus albidus*. **Research Journal of Pharmaceutical**, September – October. v. 9, n. 49, p. 49–63, 2018.
- AKPINAR, M.; UREK, R.O. Induction of fungal laccase production under solid state bioprocessing of new agroindustrial waste and its application on dye decolorization. **Biotech.** 7:98. 2017.
- ALI, R. et al. Detection and enumeration of Enteric bacteria associated with food handlers and surfaces of food manufacturing industry located in Hub city, Pakistan. **WSN World Scientific News**, v. 49, n. 48, p. 192–203, 2016.
- BANERJEE, G.; RAY, A. K. Impact of microbial proteases on biotechnological industries. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 33, n. 2, p. 119–143, 2017.
- BANO, S. et al. Characterization of crude protease produced by *Pleurotus eryngii* ATCC 90888. **Pak. J. Biotechnol.** v. 13, p. 193-198, 2018.
- BEMNRAD, O. M. et al. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable protease from the oyster mushroom *Pleurotus sajor-caju* strain CTM10057 with industrial interest. **BMC Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 1–18, 2019.

- BRAGA, R. S. et al. *Lentinus villosus* Klotzsch (1833) AM 169: a natural and renewable source of alkaline protease. **Braz. J. of Develop.** Curitiba, v. 6, n. 11, p.85867-85883, nov. 2020.
- CHOI, J. H. et al. Purification and partial characterization of a fibrinolytic enzyme from the fruiting body of the medicinal and edible mushroom *Pleurotus ferulae*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, n. 6, p. 539–546, 2017.
- FONSECA, T. R. B. et al. Cultivation and nutritional studies of an edible mushroom from North Brazil. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 30, p. 1814–1822, 2015.
- GAO, M. et al. Electricity Enhancement by MFCs from Food Waste Ethanol Fermentation Recycle Stillage Effect of Dilution Ratio and Addition of Tween 80. **Chemistry select**, 2020.
- GUPTA, A.; JANA, A. K. Effects of wheat straw solid contents in fermentation media on utilization of soluble/insoluble nutrient, fungal growth and laccase production. **3 Biotech**, v. 8, n. 1, 2018.
- HAN W. et al. Bioethanol production from waste hamburger by enzymatic hydrolysis and fermentation, **Journal of Cleaner Production**, v. 264, 2020.
- INACIO, F. D. et al. Proteases of wood rot fungi with emphasis on the genus *Pleurotus*. **BioMed Research International**, v.2015, 2015.
- LIU, X.; KOKARE, C. Microbial Enzymes of Use in Industry. **Biotechnology of Microbial Enzymes**, p. 267–298, 2017.
- LEONHARDT, R. H. et al. Heterologous production of the stain solving peptidase PPP1 from *Pleurotus pulmonarius*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, n. 5, p. 845–853, 2016.
- MACHADO, A. R. G. et al. Nutritional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 621–627, 2016.
- MACHADO, A. R. G. et al. Production and characterization of proteases from edible mushrooms cultivated on amazonic tubers. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 46, p. 2160–2166, 2017.
- MAGALHÃES, A. A. S. et al. Produção e caracterização de enzimas proteolíticas de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693 do bioma amazônico (Polyporaceae). **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Cienc. Nat.**, Belém, v. 14, n. 3, p. 453-461, set.-dez. 2019.
- MARTIM, S. R. et al. Proteases ácidas de cogumelo comestível da Amazônia para aplicabilidade industrial. **Mus. Para. Emílio Goeldi. Cienc. Nat.** v. 12, n. 3, p. 353–362, 2017
- NASCIMENTO, J. F. et al. Avaliação físico-química de polpas de cupuaçu, *Theobroma grandiflorum* Schum, industriais e artesanais. **PUBVET** v.13, n.3, a300, p.1-6, Mar., 2019
- RAZZAQ, A. et al. Microbial proteases applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, n. JUN, p. 1–20, 2019.

SANTOS, A. F.; ALVES, R. S.; LEITE, N. S.; FERNANDES, R. P. M. Estudos bioquímicos da enzima bromelina do Ananas comosus (abacaxi). v. 5, n. August, p. 1–6, 2009. **Microbial Enzymes of Use in Industry**. Elsevier Inc., 2017.

SHARMA, V. P. et al. Status of mushroom production in India. **Mushroom Research**, v. 26, n. 2, p. 111–120, 2017.

SHELDRAKE, M. *Entangled Life: How Fungi Make Our Worlds, Change Our Minds and Shape Our Futures* (Hardback). v. 1, p.5 (368 pgs), 2020.

SILVA, G. M. DE M. E et al. Screening, production and biochemical characterization of a new fibrinolytic enzyme produced by *Streptomyces* sp. (Streptomycetaceae) isolated from Amazonian lichens. **Acta Amazonica**, v. 46, n. 3, p. 323–332, 2016.

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

SILVA, R. R., 2017. Bacterial and fungal proteolytic enzymes: production, catalysis and potential applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 183(1): 1-19. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2427-2>.

MANAN, M. A.; WEBB, C. Design aspects of solid state fermentation as applied to microbial bioprocessing. **Appl Biotechnol Bioeng**. 2017;4(1):511–532.

YANG, D et al. Tea waste: an effective and economic substrate for oyster mushroom cultivation. **J. Sci. Food Agric**. 1: 1-5. 2015.

CAPÍTULO 02

(Artigo a ser submetido)

Cultivo de cogumelo ostra salmão comestível e produção de proteases extracelulares em resíduos lignocelulósicos

Elliza Emily Perrone Barbosa¹

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2832-2629>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: elliza.perrone01@gmail.com

Laynah Pimenta²

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9962-0397>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: laynah.pimenta7@gmail.com

Ana Kezia Pimentel de Brito³

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7925-4908>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: anakeziapimentel@gmail.com

Samara Claudia Picanço Batista⁴

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7430-6104>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: samara.claudia18@gmail.com

Maria do Perpétuo Socorro de Lima Verde Coelho⁵

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0626-3456>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: lvcoelho1@gmail.com

Salomão Rocha Martim⁶

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0789-2411>

Universidade Nilton Lins, Brasil

E-mail: salomao.martim@gmail.com

Maria Francisca Simas Teixeira⁷

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9703-1932>

Universidade Federal do Amazonas, Brasil

E-mail: mteixeira@ufam.edu

O artigo será submetido na Revista: Research, Society and Development

Resumo

Pleurotus se destacam pela facilidade de cultivo e pelas propriedades nutracêuticas e são alternativa viável para o reaproveitamento de resíduos lignocelulósicos. Deste modo, esta pesquisa tem por finalidade avaliar o crescimento de *P. ostreatoroseus* em diferentes resíduos lignocelulósicos como substratos alternativos para o cultivo e a produção de proteases extracelulares. O cogumelo foi cultivado em ágar batata dextrose (BDA) suplementado extrato de levedura (YE) 0,5% (p/v). Para avaliar a velocidade do crescimento micelial radial (VCR) e densidade micelial, *P. ostreatoroseus* foi cultivado em cinco meios contendo YE 0,5% (p/v): ágar Batata Dextrose (BDA), ágar GYP (glicose, extrato de levedura e peptona), ágar Extrato de Malte (MEA), ágar Extrato de Inhame roxo [(EIR) *Dioscorea alata*], ágar extrato de Cará-de-espinho [(CEIN) *Dioscorea altissima*], ágar extrato de Ariá [(EA) *Calathea allouia*]. A atividade proteolítica foi determinada pelo método de bloco de gelose. Na avaliação do crescimento micelial vertical (VCM) foram utilizados: Exocarpo de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), açaí (*Euterpe oleracea*), abacaxi (*Ananas comosus*) e serragem, suplementados com farelo de arroz (*Oryza sativa*) ou farelo de trigo (*Triticum aestivum*). As proteases foram extraídas em água destilada esterilizada sob agitação de 180 rpm, a 30 °C. A VCR significativa foi observada em MEA+YE ($12,32 \pm 0,10$ mm/dia). No entanto, entre os meios testados, ágar GYP foi o meio que apresentou forte densidade micelial. A mistura de substrato significativa e com forte densidade micelial para a produção de *P. ostreatoroseus* foi observada em AS+FA ($0,61 \pm 0,09$ cm/dia). Os meios testados são eficientes para a produção de proteases extracelulares por este cogumelo.

Palavras-chave: açaí, cogumelo, enzimas.

Abstract

Pleurotus stand out by the ease of cultivation and nutraceutical properties, also they are viable alternative for reuse of lignocellulosic waste. Thus, this research aims to evaluate the growth of *P. ostreatoroseus* on different lignocellulosic waste as alternative substrates for cultivation and production of extracellular proteases. The mushroom was grown on potato dextrose agar (BDA) supplemented with yeast extract (YE) 0.5% (w/v). To evaluate the radial mycelial growth velocity (RCV) and mycelial density, *P. ostreatoroseus* was grown on five media containing 0.5% (w/v) YE: Potato Dextrose agar (BDA), GYP agar (glucose, yeast extract and peptone), Malt Extract agar (MEA), Purple Yam extract agar [(EIR) *Dioscorea alata*], Cará-de-espinho extract agar [(CEIN) *Dioscorea altissima*], Ariá extract agar [(EA) *Calathea allouia*]. Proteolytic activity was determined by the gelose block method. In the evaluation of vertical mycelial growth (VCM), cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), açaí (*Euterpe oleracea*), pineapple (*Ananas comosus*) and sawdust exocarp were used, supplemented with rice bran (*Oryza sativa*) or wheat bran (*Triticum aestivum*). Proteases were extracted in sterile distilled water under 180 rpm agitation at 30 °C. Significant VCR was observed in MEA+YE (12.32 ± 0.10 mm/day). However, among the tested media, GYP agar was the medium that showed strong mycelial density. The significant substrate mixture with strong mycelial density for *P. ostreatoroseus* production was observed in Sac+FA (0.61 ± 0.09 cm/day). The tested media are efficient for the production of extracellular proteases by this mushroom.

Keywords: açaí, mushroom, enzyme.

1. Introdução

A exploração de resíduos lignocelulósicos está promovendo o desenvolvimento de produtos inovadores e estimulando novas oportunidades de negócio (SIQUEIRA et al., 2017; KORHONEN et al., 2018). Com essa finalidade, a busca por substratos alternativos para produção de cogumelos está em ascensão por ser uma solução ecologicamente correta e promover a redução do impacto ambiental negativo.

No Brasil, a estimativa de produção agrícola de resíduos excede 200 milhões de toneladas por ano. Partes desses resíduos são aproveitados em biorrefinaria, tecnologia que promove processamento de grande volume da biomassa lignocelulósica e o restante depositado em aterros sanitários e usinas de incineração ou queimado no campo após colheita (ARAÚJO et al., 2018).

Nesse contexto, os fungos comestíveis são ferramentas promissoras, em função do crescimento desses organismos em substratos lignocelulósicos, condição que possibilita a produção de biocompostos, incluindo enzimas lignocelulósicas que degradam lignina, celulose, entre outros polímeros usados para seu desenvolvimento e reprodução (RABUSKE et al., 2019; RITOTA et al., 2019).

Cogumelos têm despertado interesse como novas fontes nutricionais em associação a textura e características sensoriais que são atributos gastronômicos atrativos para o consumidor (RAMOS et al., 2015; CHANG et al., 2018). Estima-se que o consumo per capita mundial de cogumelos aumentou 4,7 vezes desde 1978, em consequência dos efeitos nutricionais, nutracêuticos que esses fungos proporcionam ao homem e demais animais (RATHORE et al., 2019).

Cogumelos comestíveis, fungos de podridão branca, representados por *Pleurotus* são comercialmente importantes, cultivados globalmente e ocorrem em florestas temperadas, tropicais e subtropicais, degradam celulose, hemicelulose, lignina e também são fontes de outras enzimas, como proteases, celulasas e amilases (BARH et al., 2019; RAMAN et al., 2021, BRITO et al., 2021).

Pleurotus ostreatus Singer. tem facilidade de crescimento, se destaca pela coloração rósea, sabor, textura e como produto alimentício fornece compostos nutricionais como proteínas e fibras (FONSECA et al., 2014, REIS et al., 2016). Em função dessas características *P. ostreatus* tem sido valorizado nas pesquisas objetivando a produção de alimento rico em proteínas, e como fonte biotecnológica de enzimas de valor econômico (FONSECA et al., 2015, MACHADO et al., 2016). Desse modo, esta pesquisa teve por

objetivo avaliar o crescimento de *P. ostreatoroseus* em diferentes resíduos lignocelulósicos como substratos alternativos para o cultivo e a respectiva produção de proteases extracelulares.

2. Material e Métodos

2.1 Cultivo e Manutenção de *Pleurotus ostreatoroseus*

Pleurotus ostreatoroseus DPUA 1720, cedido pela Coleção de Culturas DPUA, da Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil. Para obtenção de cultura pura, o cogumelo foi cultivado em ágar Batata Dextrose (BDA), com extrato de levedura 0,5 % (p/v). Os cultivos foram mantidos a 28 °C por oito dias, na ausência de luz e umidade a 60 %.

2.2 Seleção de meio de cultura para cultivo de *P. ostreatoroseus*

2.2.1 Preparação do Inóculo

Para a preparação do inóculo da cultura obtida no item 2.1 foi transferido um disco micelial de 10 mm de diâmetro para a superfície dos meios, suplementados com extrato de levedura 0,5 % (p/v): ①[Meios sintéticos, (ágar Batata Dextrose (BDA); ágar GYP (glicose, extrato de levedura e peptona); ágar Extrato de Malte (MEA)], ②Meios naturais [ágar Extrato de Inhame roxo, *Dioscorea alata* (EIR)]; ágar extrato de Cará-de-espinho, *Dioscorea altissima* (CEIN)] e ágar extrato de Ariá, *Calathea allouia* (AE)]. Os meios foram esterilizados a 121 °C por 15 minutos, mantidos a 25 °C.

Os tubérculos de cada espécie de hortaliça foram higienizados com desinfetante para hortifrutículas (COALA®) de acordo com a recomendação do fabricante. De cada tubérculo *in natura* foi utilizado 200g, em 500 mL de água que posteriormente foi submetidas a cocção durante 10 minutos. Em seguida, a separação do resíduo sólido foi realizada por filtração em gaze dobrada uma vez, o extrato recuperado foi completado para 1000 mL e, acrescentado o ágar para ser dissolvido em banho-maria. Ao término deste procedimento foi adicionada a glicose e o meio esterilizado a 120 °C por 15 minutos (LACAZ et al., 2002).

2.2.2 Avaliação do crescimento de *P. ostreatoroseus* em meio sintético e natural

No cultivo de *P. ostreatoroseus* foi utilizado como inóculo um disco micelial de 10 mm de diâmetro retirado da cultura obtida no item 2.2.1. Após semeadura do disco micelial nos meios superficialmente, os cultivos em placa de Petri (100 mm x 15 mm) foram mantidos na ausência de luz, a 28 °C por 8 dias. Todos os cultivos preparados em quintuplicata (CASTILLO et al., 2018). *P. ostreatoroseus* foi avaliado com base no crescimento radial em cada meio de

cultura (item 2.2.1), em placa de Petri de 100 mm x 15 mm. Após semeadura do cogumelo, os cultivos em quintuplicata, foram mantidos na ausência de luz, a 28 °C, durante oito dias. A velocidade de crescimento radial foi avaliado segundo as recomendações de Castillo et al. (2018). A cada 24 horas, o crescimento micelial foi avaliado por determinação do diâmetro da colônia em milímetros (mm/dia), conforme equação I.

$$\text{Equação I: Velocidade do crescimento radial/VCR} = \frac{\text{Diâmetro colônia (mm)}}{\text{Tempo de cultivo (dia)}}$$

O crescimento micelial de *P. ostreatoroseus* foi classificado pelo método subjetivo de notas, onde: fracamente, mediantemente e fortemente adensado, equivaleu as notas 1, 2, 3, respectivamente (BUMANLAG et al., 2018). O meio de cultura promissor com maior vigor micelial foi utilizado nos experimentos citados a seguir (item 2.4).

2.3 Determinação da Atividade Enzimática Qualitativa de proteases (Método bloco de Gelose)

Para a determinação da atividade enzimática qualitativa em ágar Leite pelo método bloco de gelose foi utilizando como inóculo as culturas obtidas no item 2.2.2 (BONA et al., 2014; PRADO et al., 2017). O meio de cultura foi distribuído em placas de Petri de 15 mm x 100 mm, formando uma camada de 4 mm, após solidificação foram inoculados os discos miceliais e os cultivos mantidos a 37 °C. Para evitar evaporação do filtrado da cultura, as placas foram protegidas com papel alumínio. Após 18 horas a atividade enzimática foi determinada pelo tamanho do halo em milímetros.

2.4 Seleção de resíduos lignocelulósicos para a produção de *P. ostreatoroseus*

Para selecionar uma mistura de substrato adequado para o desenvolvimento micelial de *P. ostreatoroseus* (DPUA 1720) foram utilizados como substrato suporte: Exocarpo de Cupuaçu [(EC) *Theobroma grandiflorum*], Resíduo de processamento de açaí [(Sac) *Euterpe oleracea*], Casca de Abacaxi [(CsAb) *Ananas comosus*] e Serragem (SER), 80 % (p/v), suplementados com farelo de arroz [(FA) *Oryza sativa*] ou farelo de trigo [(FT) *Triticum aestivum*] 20 % (p/v) (Tabela 1).

As amostras dos substratos foram trituradas em partículas de 3 cm e, posteriormente foram tratadas com solução desinfetante para hortifrutícolas (COALA®), conforme as recomendações do fabricante. O excesso de água foi drenado, a umidade ajustada para 60 % e o pH aferido para 6,5. Para uso dos substratos como meio de cultura as formulações foram

armazenadas em tubos de ensaio de 200 mm x 25 mm, formando uma coluna de 15 cm. A esterilização foi realizada a 121 °C, 60 minutos, por três dias consecutivos, procedendo ao resfriamento por 24 horas.

Tabela 1. Substratos utilizados para avaliar o crescimento micelial vertical

Experimentos	Substratos suporte ¹	(%)	Suplementos ²	(%)
1	Sac	80	FA ou FT	20
2	CC	80	FA ou FT	20
3	CsAb	80	FA ou FT	20
4	SER	80	FA ou FT	20

(1) Substrato suporte (Sac– Resíduo de processamento de açaí, CC – Exocarpo de cupuaçu, CsAb – Casca de Abacaxi, SER – Serragem) e (2) Substrato suplementar (FA – Farelo de Trigo e FT – Farelo de Arroz).

Os cultivos foram incubados a 25 °C, umidade ambiental 60 %, na ausência de luz. O crescimento micelial vertical foi determinado em centímetros, a cada 24 horas durante 15 dias. Todos os experimentos realizados em triplicata.

2.5 Avaliação do crescimento micelial de *P. ostreatoroseus* em resíduo lignocelulósico em tubo de ensaio

Para avaliação do crescimento micelial de *P. ostreatoroseus* em resíduo lignocelulósico, da cultura matriz (item 2.2.1) foram retirados dois discos miceliais medindo 10 mm de diâmetro para inoculação na superfície do resíduo, esterilizado e resfriado. Os cultivos foram mantidos a 25 °C, na ausência de luz, umidade ambiental 60 %. A velocidade de crescimento micelial (VMC) foi determinada em centímetros de acordo com a equação II, mensurada a cada 24 horas durante 15 dias. A expressão do crescimento foi avaliada com base no vigor, e classificada pelo método subjetivo de notas, onde: fracamente, mediamente e fortemente adensado, equivaleu as notas 1, 2, 3, respectivamente (BUMANLAG et al., 2018). A seleção do resíduo lignocelulósico foi realizada com base no vigor micelial.

$$\text{Equação II: VMC} = \frac{V_f - V_i}{T_f}$$

[VMC = Velocidade média do crescimento micelial ao dia; V_f = medida do crescimento micelial no tempo final (cm); V_i = medida do crescimento micelial no tempo inicial (cm); T_f = Tempo final (dias)].

2.6 Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise estatística descritiva média, desvio padrão, gráficos e os cálculos de atividade enzimática ($R^2 \geq 95\%$) por análise de variância (Anova) e teste Tukey ($p < 0,05$) para comparação de médias, utilizando o software Minitab® versão 17.0.

3. Resultados e discussão

Os dados referentes ao crescimento micelial radial de *P. ostreatoroseus* estão demonstrados na Tabela 2. O crescimento micelial significativo de *P. ostreatoroseus* foi observado em ágar Malte (MEA) suplementado com extrato de levedura 0,5 % (p/v), em média, VCM igual a 12,32 mm/dia. Os valores de VCM em ágar GYP e BDA foi 11,31 mm/dia e 11,37 mm/dia, respectivamente. Nesses cultivos foi observada a densidade do micélio fortemente adensada em GYP, mediantemente adensado em MEA e AE, nos demais meios, fracamente adensado (Figura 1).

Nos meios contendo extrato de Inhame roxo, Cará-de-Espinho e Extrato de Ariá, *P. ostreatoroseus* exibiu crescimento, mas com VCM inferior ao crescimento em ágar Malte, com variação de aproximadamente 8,47% a 93,19%, respectivamente (Tabela 2).

Em ágar GYP e ágar BDA, o crescimento de *P. ostreatoroseus* foi superior 39,50% e 42,08%, respectivamente (COELHO et al., 2021). Em condições semelhantes, em um estudo feito com *P. djamor*, foi observado crescimento inferior 11,91% em relação ao de *P. ostreatoroseus* (BRITO et al., 2021). Machado et al. (2017), cita que *P. ostreatoroseus* quando cultivado em ágar BDA, a VCM foi igual a 64,0 mm/dia e em ágar Extrato de Aveia (OMYA) 67,0 (mm/dia).

Tabela 2 – Média da velocidade do crescimento micelial radial de *P. ostreatoroseus* cultivado, a 25 °C por oito dias, em meios de cultura suplementados com extrato de levedura 0,5% (p/v).

Meios	Velocidade de crescimento micelial VCM (mm/dia)	Micélio Densidade
Meios sintéticos		
GYP	11,31 ± 0,43 ^{b, c}	Fortemente adensado
BDA+YE	11,37 ± 0,34 ^b	Fracamente adensado
MEA+YE	12,32 ± 0,10 ^a	Mediantemente adensado
Meios naturais		
EIR +YE	11,23 ± 0,69 ^{b, c, d}	Fracamente adensado
CEIN +YE	10,51 ± 0,44 ^{c, d}	Fracamente adensado
AE +YE	10,46 ± 0,43 ^d	Mediantemente adensado

GYP (Glicose, peptona e extrato de levedura), BDA+YE (Ágar batata dextrose + Extrato de levedura 0,5%); MEA (Ágar Malte + Extrato de levedura 0,5%), EIR (Ágar Extrato de Inhame roxo + Extrato de levedura 0,5%), CEIN (Ágar extrato de Cará-de-espinho + Extrato de levedura 0,5%), AE (Ágar extrato Ariá + Extrato de levedura 0,5%). Nota 1: Fracamente adensado; Nota 2: Mediantemente adensado; Nota 3: Fortemente adensado. Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo método de Tukey ($p < 0,05$)

Hakobyan et al. (2012) e Castillo et al. (2018) citam que, espécies de *Pleurotus* quando cultivadas em meios enriquecidos com o extrato de levedura, que este fator fornece aminoácidos, vitaminas, entre outros, que promovem o crescimento celular.

A tendência do crescimento dos fungos é exponencial, mas esse padrão pode ser modificado, pois a forma como os fungos interagem com o seu ambiente de crescimento não depende só da genética da espécie, mas também de parâmetros físicos (temperatura, luz, umidade e aeração), além dos nutrientes que afetam a ramificação do micélio (GRIFFIN, 1994; HOA et al., 2015; SILVA et al., 2016; DULAY et al., 2017; ROYSE et al., 2017; WALKER E WHITE, 2018).

Além dos fatores mencionados, carbono e nitrogênio são fatores cruciais para o sucesso do crescimento da massa micelial. Desse modo, cogumelos precisam encontrar um equilíbrio com a proporção de carbono e nitrogênio para que haja crescimento satisfatório (BELLETINI et al., 2019). Albuquerque et al. (2012) afirmam que espécies de cogumelos com rápido crescimento e massa micelial densa são as indicadas para uso industrial, uma vez essas características proporcionam a redução da colonização de microrganismos contaminantes.

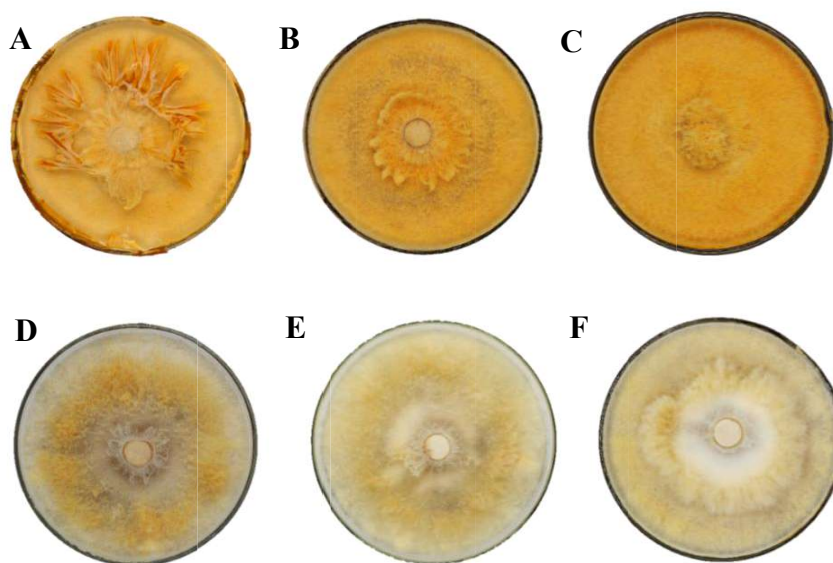


Figura 1. Densidade do micélio de *P. ostreatoroseus* nos cultivos em: (A) GYP (Glicose, peptona e extrato de levedura); (B) BDA+YE (Ágar batata dextrose + Extrato de levedura 0,5%); (C) MEA (Ágar Malte + Extrato de levedura 0,5%); (D) EIR (Ágar Extrato de Inhame roxo + Extrato de levedura 0,5%), (E) CEIN (Ágar extrato de Cará-de-espinho + Extrato de levedura 0,5%), (F) EA (Ágar extrato Ariá + Extrato de levedura 0,5%), a 25 °C após oito dias de crescimento.

Na tabela 3 está apresentada a atividade qualitativa de proteases determinada nos cultivos de *P. ostreatoroseus*. A atividade significativa de protease ($17,6 \pm 0,05$ mm de diâmetro) foi observada em ágar Extrato Inhame roxo. Os halos variaram de 14,6 mm a 12,3 mm de diâmetro, determinado em ágar BDA+YE e ágar Extrato Ariá+YE, respectivamente.

Nos trabalhos de Rahi et al. (2018) foi relatado atividade de proteases de $0,34 \pm 2$ mm de diâmetro para *Pleurotus pulmonarius*, quando cultivado em ágar Batata Dextrose suplementado com 1% (p/v) de caseína. Coelho et al., (2021) observaram atividade significativa de proteases (17,67 mm) em ágar GYP para *P. ostreatoroseus*. Brito et al., (2021) determinaram atividade das proteases inferior nos cultivos de *Pleurotus djamor* em ágar Extrato Inhame Roxo ($14,6 \pm 0,07$ mm) e Ágar cará-de-espinho ($14,0 \pm 0,9$ mm), respectivamente.

Tabela 3. Média da atividade qualitativa de proteases de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720.

Meios de Cultura	Atividade de Proteases [Diâmetro do halo (mm)]
BDA+YE	$14,6 \pm 0,05^b$
GYP	$14,3 \pm 0,15^b$
MEA+YE	$13,3 \pm 0,05^b$
EIR+YE	$17,6 \pm 0,05^a$
CEIN +YE	$14,3 \pm 0,15^b$
AE+YE	$12,3 \pm 0,05^b$

GYP (Glicose, peptona e extrato de levedura), BDA+YE (Ágar batata dextrose + Extrato de levedura 0,5%); MEA (Ágar Malte + Extrato de levedura 0,5%), EIR (Ágar Extrato de Inhame roxo + Extrato de levedura 0,5%), CEIN (Ágar extrato de Cará-de-espinho + Extrato de levedura 0,5%), AE (Ágar extrato Ariá + Extrato de levedura 0,5%). Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo método de Tukey ($p < 0,05$)

As enzimas são catalisadores naturais, cada vez mais necessárias em vários setores industriais e bioprocessos. Atualmente, os pesquisadores se concentram na detecção de novas enzimas dotadas de propriedades extremamente satisfatórias para aplicações comerciais (BENMRAD et al., 2019). A maioria das proteases utilizadas são as de origem microbiana, produtos que ganharam reconhecimento global por seu uso difundido em vários processos industriais, tais como na indústria alimentícia, química, na agricultura, e na biotecnologia (CHOI et al., 2015).

Na indústria de alimentos as proteases estão relacionadas ao valor nutricional e funcional dos produtos, incluindo a digestibilidade e a qualidade sensorial dos alimentos, bem como proporcionar benefícios à saúde, reduzindo compostos alergênicos (RAMOS et al., 2015; GURUMALLESH et al., 2019).

Com a finalidade de selecionar uma mistura de substrato para produção de *P. ostreatoroseus* foram avaliados resíduos lignocelulósicos, nos cultivos em tudo de ensaio.

Nestes experimentos foram utilizados como inóculo os discos miceliais retirados dos cultivos de GYP, meio que *P. ostreatoroseus* demonstrou forte densidade micelial.

Os resultados apresentados na tabela 4 são relacionados a velocidade média do crescimento micelial vertical (VMC) e o vigor micelial de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 observado nos substratos lignocelulósicos. Nestes experimentos, o crescimento significativo foi observado em serragem misturada com farelo de arroz [VMC = 0,78 (cm/dia)] e o vigor micelial, classificado como fracamente adensado.

Nos demais resíduos testados a velocidade do crescimento micelial de *P. ostreatoroseus* variou de 0,76 a 0,29 (cm/dia), com densidade micelial mediantemente ou fracamente adensada (Tabela 4). Os dados obtidos evidenciaram que o resíduo do processamento do açaí em associação com farelo de arroz ou farelo de trigo são fontes nutricionais eficientes, o vigor micelial nesses substratos foi do tipo fortemente adensado, embora o crescimento do cogumelo tenha sido reduzido a 21,79 % em relação ao desenvolvimento em serragem misturada com farelo de arroz.

Tabela 4. Média da velocidade do crescimento micelial vertical e vigor micelial de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 em resíduos agroindustriais.

Substratos (Resíduo Lignocelulósico)	Média do VMC (cm/dia)	Vigor Micelial
Sac+FA	0,61 ± 0,09 ^{a, b}	Fortemente adensado
Sac+FT	0,52 ± 0,15 ^{a, b, c}	Fortemente adensado
CC+FA	0,76 ± 0,02 ^a	Fracamente adensado
CC+FT	0,66 ± 0,08 ^{a, b}	Mediantemente adensado
CsAb+FA	0,29 ± 0,03 ^c	Mediantemente adensado
CsAb+FT	0,45 ± 0,04 ^{b, c}	Mediantemente adensado
SER+FA	0,78 ± 0,01 ^a	Fracamente adensado
SER+FT	0,59 ± 0,22 ^{a, b, c}	Fracamente adensado

Sac + FA = Resíduo de processamento de açaí + farelo de arroz; Sac+ FT = Resíduo de processamento de açaí + farelo de trigo; CC + FA= Exocarpo de cupuaçu + farelo de arroz; CC + FT= Exocarpo de cupuaçu + farelo de trigo; SER + FA= Serragem + farelo de arroz; SER+ FT= Serragem + farelo de trigo; CsAb+ FA= Exocarpo de abacaxi Farelo de arroz; CsAb + FT= Exocarpo de abacaxi+ farelo de trigo. Médias seguidas por letras iguais não são diferentes significativamente pelo Teste de Tukey (p<0,05).

Fonseca et al. (2015) obteve resultados positivos nos cultivos de *P. ostreatosoreus*, em exocarpo de cupuaçu com farelo de arroz, o vigor micelial foi fortemente adensado e a velocidade do crescimento micelial inferior 50% aos resultados obtidos nessa pesquisa em serragem misturada com farelo de arroz.

A variação do crescimento de cogumelos em resíduos lignocelulósicos varia de substrato para substrato, cada espécie tem seletividade pelos componentes estruturais dos

resíduos vegetais e depende das condições de incubação (tempo de cultivo e temperatura), entre outros fatores (KUIJK, 2016).

6 Conclusão

Os resultados obtidos demonstraram a influência da qualidade nutricional dos meios de cultura no crescimento de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720. Entre os meios avaliados, ágar malte e ágar GYP foram os meios eficientes para crescimento e expressão da densidade micelial, respectivamente. E a mistura de resíduos lignocelulósicos apropriadas para crescimento e produção de *P. ostreatoroseus* foram resíduo de processamento de açaí suplementado com farelo de arroz ou farelo de trigo.

7 Referências

- ALBUQUERQUE, M. P. DE; MARINS, R.; PEIL, N. Mycelial growth of *Lentinus sajor caju* (Fr.) Fr. and *Pleurotus* spp. in different agricultural wasteS. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 28, n. 5, p. 895-902, 2012.
- ARAÚJO, D. J. C.; MACHADO, A. V.; VILARINHO, M. C. L. G. Availability and Suitability of Agroindustrial Residues as Feedstock for Cellulose-Based Materials: Brazil Case Study. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 10, p. 2863–2878, 2019.
- BARH, A. et al. Genetic improvement in *Pleurotus* (oyster mushroom): a review. **3 Biotech**, v. 9, n. 9, 2019.
- BELLETTINI, M. B. et al. Factor's affecting mushroom *Pleurotus* spp. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 4, p. 633–646, 2019.
- BENMRAD, M. et al. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable protease from the oyster mushroom *Pleurotus sajor-caju* strain CTM10057 with industrial interest. **BMC Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 1–18, 2019.
- BONA, E. A. M. DE et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 218–225, 2014.
- BRITO, A. K. P. DE et al. Avaliação de substratos de floresta tropical para cultivo e produção de proteases por *Pleurotus djamor*. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 3, p. e31810313385, 2021.
- BUMANLAG, C. P. B. et al. Optimum conditions for mycelia growth and basidiocarp production of *Pleurotus djamor* on corn based media. **International Journal of Biology**. Issn: 2277–4998. v. 7, n. April, p. 558–575, 2018.

CASTILLO, T. A. et al. Mycelial growth and antimicrobial activity of *Pleurotus* species (Agaricomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 20, n. 2, p. 191–200, 2018.

CHANG, S. T.; WASSER, S. P. Current and future research trends in agricultural and biomedical applications of medicinal mushrooms and mushroom products (Review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 20, n. 12, p. 1121–1133, 2018.

CHOI, J.M. et al. Industrial applications of enzyme biocatalysis: status and future aspect. **Biotechnol Adv.** v. 33, p. 1443–1454, 2015.

COELHO, M. P. S. L.V. et al. Alternativa fontes nutricionais para desenvolvimento da fase micelial e produção de hidrolases por cogumelo comestível de floresta tropical / Alternative of nutritional sources for the development of the mycellial phase and production of hydrolases by edible mushroom from tropical forest. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 22890–22907, 2021.

DULAY, R. M. R.; RIVERA, A. G. C.; GARCIA, E. J. B. Mycelial growth and basidiocarp production of wild hairy sawgill *Lentinus strigosus*, a new record of naturally occurring mushroom in the Philippines. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 10, n. March, p. 242–246, 2017.

FONSECA, T. R. B. DA; BARRONCAS, J. F.; TEIXEIRA, M. F. S. Produção Em Matriz Sólida E Caracterização Parcial Das Proteases De Cogumelo Comestível Da Floresta Amazônica. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 8, n. 1, 2014.

FONSECA, T. R. B. et al. Cultivation and nutritional studies of an edible mushroom from North Brazil. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 30, p. 1814–1822, 2015.

GRIFFIN, D. H. Fungal physiology (2nd Edition). **J. Wiley & Sons, Inc.**, New York, p. 458. 1994.

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

HAKOBYAN, L., YAN, G., ARMEN, T. Yeast extract as an effective nitrogen source stimulating cell growth and enhancing hydrogen photoproduction by *Rhodobacter sphaeroides* strains from mineral springs. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 6519–6526, 2012.

LACAZ, C. S. et al. Tratado de micologia médica Lacaz. **Sarvier**. v. 1, p. 304, 2002.

KORHONEN, J.; HONKASALO, A.; SEPPÄLÄ, J. Circular Economy: The Concept and its Limitations. **Ecological Economics**, v. 143, p. 37–46, 2018.

KUIJK, S. J. A. Fungal treatment of lignocellulosic biomass fungal treatment of lignocellulosic biomass. Tese de Doutorado. p.192. 2016.

MACHADO, A. R. G. et al. Nutritional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 621–627, 2016.

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

MAFTOUN, P. et al. The Edible Mushroom *Pleurotus* spp.: I. Biodiversity and Nutritional Values. **International Journal of Biotechnology for Wellness Industries**, v. 4, n. 2, p. 67–83, 2015.

PRADO, F. B. et al. Production of bioactive compounds by *Aspergillus* kept under two preservation conditions. **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Cienc. Nat.**, Belém, v. 12, n. 1, p. 37–47, jan.-abr. 2017.

RABUSKE, E. R. et al. Substratos alternativos para o cultivo do cogumelo comestível ostra salmão: *Pleurotus djamor*. **Caderno de Pesquisa**. Santa Cruz do Sul, v. 31, n. 2, p. 22–24, mai./ago. 2019.

RAHI, D. K.; THAKUR, S.; MALIK, D. Comparative qualitative profile of various extracellular enzymes produced by two indigenous fungus *Lentinus cladopus* and *Pleurotus pulmonarius*. **International Journal of Scientific Research in Biological Sciences**, v. 5, n. 3, p. 85–87, 2018.

RAMAN, J. et al. Cultivation and Nutritional Value of Prominent *Pleurotus* Spp.: An Overview. **Mycobiology**, v. 49, n. 1, p. 1–14, 2021.

RAMOS, A.C. et al. Cogumelos - Produção, Transformação e Comercialização. Portugal. **Publinsustria**. 2015.

RITOTA, M.; MANZI, P. *Pleurotus* spp. cultivation on different agri-food by-products: Example of biotechnological application. **Sustainability (Switzerland)**, v. 11, n. 18, 2019.

ROYSE, D. J.; BAARS, J.; TAN, Q. Current Overview of Mushroom Production in the World. **Edible and Medicinal Mushrooms**, v. 2010, p. 5–13, 2017.

SILVA, G. M. DE M. E et al. Screening, production and biochemical characterization of a new fibrinolytic enzyme produced by *Streptomyces* sp. (*Streptomycetaceae*) isolated from Amazonian lichens. **Acta Amazonica**, v. 46, n. 3, p. 323–332, 2016.

SIQUEIRA, F. G.; ROMERO PELAEZ, R. D.; GONÇALVES, C. C.; CONCEIÇÃO, A. A.; MARQUEZ, A. F.; MENDONÇA, S. Simpósio Nacional sobre Cogumelos Comestíveis e Encontro de Biotecnologia da UNIFESP, São José dos Campos, SP. Anais Brasília, DF: **Embrapa**, p.91-102. 2017.

WALKER, G. M.; WHITE, N. A. Introduction to Fungal Physiology. Fungi: Biology and Applications, Third Edition. Edited by Kevin Kavanagh. **John Wiley & Sons, Inc.** Published 201

CAPITULO 03

(Artigo a ser submetido)

Biorrefinaria lignocelulósica: produção de cogumelo comestível como tecnologia ecoamigável integrada à economia circular

Elliza Emily Perrone Barbosa¹, Laynah Pimenta², Ana Kézia Pimentel de Brito³, Maria Francisca Simas Teixeira⁴.

¹Universidade Federal do Amazonas – UFAM/Manaus- Brasil – elliza.perrone01@gmail.com

²Universidade Federal do Amazonas – UFAM/Manaus -Brasil – laynahpimenta7@gmail.com

³Universidade Federal do Amazonas – UFAM/Manaus-Brasil – anakeziapimentel@gmail.com

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

Resumo

A produção de cogumelos integra o novo conceito de biorrefinaria lignocelulósica que utiliza resíduos lignocelulósicos como matérias-primas para conversão em produtos de base biológica, priorizando o desenvolvimento sustentável dos produtos a fim de reciclar biomassa e garantir a economia circular. Esta pesquisa tem como finalidade avaliar o cultivo de *P. ostreatoroseus* em resíduo lignocelulósicos para a produção de basidiomas a fim de desenvolver um bioproduto alimentício. *P. ostreatoroseus* foi cedido pela Coleção de Culturas DPUA, da Universidade Federal do Amazonas e, cultivado em ágar GYP (glicose, extrato de levedura e peptona) suplementados com extrato de levedura (0,5 %, p/v). O crescimento e a produção foram avaliados por fermentação em estado sólido em Exocarpo de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), açaí (*Euterpe oleracea*), abacaxi (*Ananas comosus*) e serragem, suplementados com farelo de arroz (*Oryza sativa*) ou farelo de trigo (*Triticum aestivum*) 0,5 % (p/v), esterilizados a 121 °C por dois dias consecutivos, concentração 2:1 (p/p) umidade 60%. O bioprocesso foi conduzido a 25 °C, por 15 dias na ausência de luz. O produto de panificação foi elaborado tendo como base a biomassa desidratada, em escala laboratorial. A partir da produção do basidioma no substrato promissor determinou-se eficiência biológica, produtividade, taxa de produção e perda de matéria orgânica, bem como a qualidade microbiológica e o valor nutricional dos basidiomas e do produto de panificação. Os basidiomas produzidos apresentaram cinzas, proteínas, lipídeos significativos. O produto de panificação com adição de cogumelo, apresentou ótimo valor nutricional para consumo e atendeu as exigências higiênico sanitárias evidenciando que o cogumelo comestível tem potencial para suplementação alimentar humana.

Palavras-chave: resíduo, cultivo, bioproduto.

Abstract

Mushroom cultivation integrates the new concept of lignocellulosic biorefinery that uses lignocellulosic waste as raw materials for conversion into biobased products, prioritizing the sustainable development of products in order to recycle biomass and ensure circular economy. This research aims to evaluate the cultivation of *P. ostreatoroseus* in lignocellulosic waste for cultivation of basidiomes to develop a bioproduct. *P. ostreatoroseus* was provided by the DPUA Culture Collection, Federal University of Amazonas and cultivated in GYP agar (glucose, yeast extract and peptone) supplemented with yeast extract (0.5%, w/v). Growth and production was evaluated by solid state fermentation on Exocarp of cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), açaí (*Euterpe oleracea*), pineapple (*Ananas comosus*) and sawdust, supplemented with rice bran (*Oryza sativa*) or wheat bran (*Triticum aestivum*) 0.5 % (w/v), sterilized at 121 °C for two consecutive days, concentration 2:1 (w/w) moisture 60%. The bioprocess was conducted at 25 °C, for 15 without light. The bakery product was prepared based on the dehydrated biomass, in laboratory scale. The biology efficiency, productivity, production rate and loss of organic matter were determined, as well as the microbiological quality and nutritional value of the basidiom and the bakery product. Cultivation of basidiomes have presented significant ash, protein and lipids. The bakery product with added mushroom showed great nutritional value for consumption and met the hygienic requirements showing that the edible mushroom has potential for human food supplementation.

Keywords: waste, cultivation, bioproduct.

1 Introdução

A economia circular utiliza o modelo econômico voltado para o uso eficiente de recursos por meio da diminuição de resíduos, para propiciar o desenvolvimento sustentável enquanto dissocia o esgotamento de recursos e degradação ambiental (MORSELETTTO, 2020; UBANDO et al., 2020). Para geração de recursos, na biorrefinaria, o sistema econômico funciona em modelo de fluxo cíclico, em que cada resíduo gerado é reaproveitado no final da formação de cada produto (MOHAN et al, 2016; GEISENDORF et al., 2018; KORHONEN et al., 2018).

No contexto da economia circular, as biorrefinarias destacam-se, pois tem como base os preceitos baseados no uso de materiais renováveis como matéria-prima, a fim de otimizar o uso de recursos e minimizar o desperdício, maximizando os benefícios e a rentabilidade. Em grande escala, a biorrefinaria permite a fabricação de produtos de alto valor de base biológica e está classificada com base no tipo de matéria-prima utilizado (FERREIRA et al., 2007; TAKKELLAPATI et al., 2018; PHILIPINI et al.,2020).

Na biorrefinaria lignocelulósica utilizam materiais lignocelulósicos, tais como biomassa de floresta, bagaço, resíduos de processamento de alimentos (orgânicos), cascas e serragem (FARIA et al., 2018; PHILIPINI et al.,2020). O alto potencial nutricional dos resíduos agroindustriais como açúcares na forma de polissacarídeos, fibras, proteínas e minerais, despertam o interesse para o bioprocesso (DEL CERRO et al., 2021).

Em função do caráter fisiológico diversas espécies de cogumelos comestíveis estão sendo cultivados em resíduos lignocelulósicos, devido a capacidade destes organismos em utilizar biomassa lignocelulósica como fonte de carbono ou matéria prima de valor agregado (VILAR et al., 2021; DEL CERRO et al., 2021).

A comercialização destes está sendo avaliada em aproximadamente 63 bilhões de dólares/ano. Deste total, 54 % equivale 34 bilhões de dólares correspondente a comercialização de cogumelos comestíveis. Dentre estes destacam-se os cogumelos pertencentes ao gênero *Pleurotus* (ROYSE et al., 2017).

Pleurotus ostreatoroseus Singer. cogumelo comestível de coloração rósea e excelente sabor do corpo de frutificação, é conhecido pelas suas propriedades nutricionais e capacidade de adaptação em diferentes resíduos agroindustriais para cultivo *in vitro*, este que apresenta colonização rápida e vigorosa e garante alta eficiência biológica (FONSECA et al., 2015; REIS et al., 2016). Desse modo, o objetivo da pesquisa é cultivar *Pleurotus ostreatoroseus* em resíduo lignocelulósico para a produção de basidioma afim de desenvolver um bioproduto alimentício.

2 Material e Métodos

2.1 Cultivo e Manutenção de *Pleurotus ostreatoroseus*

Para a realização desta pesquisa foi utilizado *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720, cedido pela Coleção de Culturas DPUA, da Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas, Brasil. Para obtenção de cultura pura, o cogumelo foi cultivado em ágar Batata Dextrose (BDA), com extrato de levedura 0,5 % (p/v). Os cultivos foram mantidos a 28 °C por oito dias, na ausência de luz e umidade a 60 %.

2.2 Produção de *P. ostreatoroseus* em matriz sólida

2.2.1 Preparação do inóculo em meio líquido

O inóculo foi preparado em extrato de GYP (glicose, extrato de levedura e peptona) esterilizado a 121 °C por 15 minutos. Em cada frasco de Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido foram inoculados 15 discos miceliais (10 mm de diâmetro) retirados da cultura matriz selecionada no item 2.1. Os cultivos foram incubados a 28 °C, 150 rpm por oito dias.

2.2.2 Cultivo em grãos de trigo (Spawn)

Os grãos de trigo foram adquiridos no comércio local, lavados e deixados em imersão em água. Após 12h, o excesso da água foi retirado, seguindo a imersão em solução desinfetante para hortifrutícolas (COALA[®]) por 30 minutos. Ao término do tratamento, os grãos foram pré-cozidos por 15 minutos e drenado o excesso de água. Os grãos foram armazenados em sacos de polietileno de 1000 g para esterilização a 121 °C durante 15 minutos. Após resfriamento foi inoculada nos grãos a massa micelial obtida em meio líquido (item 2.2.1). Os cultivos foram mantidos a 28 °C, na ausência de luz até completa colonização do substrato (FONSECA et al., 2015).

2.2.3 Produção dos basidiomas de *P. ostreatoroseus* em resíduo lignocelulósico

Para produção dos basidiomas de *P. ostreatoroseus* foi utilizado o substrato de resíduo de processamento de Açaí (Sac), higienizado com solução de hipoclorito 1 % (v/v) por 30 minutos, (ROLLAN, 2003). Após o tratamento, o excesso de água foi drenado e o substrato misturado com farelo de arroz (FA), concentração 2:1 (p/p), umidade 60 %. A mistura de resíduo (1000 g) foi acondicionada em embalagens de polietileno transparentes de 3 kg. O substrato foi esterilizado a 121 °C, por uma hora, por três dias consecutivos. A fermentação foi

realizada a 25 °C até completa miceliação do resíduo, em ambiente sem luz, umidade ambiente 80%. A embalagem dos cultivos foi perfurada após 72 horas. Após a indução dos primórdios a 12 °C, os cultivos foram expostos à luz difusa por 12 horas, 25 °C, em ambiente com umidade 90 % (ROLLAN, 2003; FONSECA et al., 2015).

2.2.4 Quantificação, caracterização, desidratação e trituração dos basidiomas

Ao término da produção após colheita, os basidiomas totalmente desenvolvidos foram contados e separados daqueles que possivelmente apresentaram deformidades, para posterior determinação do peso médio (peso médio de cada fluxo/número de basidiomas). Neste bioprocessos foi avaliada a formação e desenvolvimento dos primórdios e tempo total de cultivo, e outras características foram determinadas, como eficiência biológica, produtividade, taxa de produção e perda da matéria orgânica de acordo com Fonseca et al., (2015). Em seguida os basidiomas foram desidratados a 40 °C até umidade final de 5 %. Ao término, os basidiomas foram triturados e embalados em recipiente de vidro com tampa rosqueável para a determinação da eficiência biológica (Equação I), rendimento (Equação II) e produtividade (Equação III). A determinação de perda de matéria orgânica (PMO) foi realizada com base no peso seco dos resíduos não degradados (Equação IV) (FONSECA et al., 2015).

$$\text{Equação I. Eficiência biológica (\%)} = \frac{\text{peso do basidioma fresco}}{\text{peso de substrato seco}} \times 100$$

$$\text{Equação II. Rendimento (\%)} = \frac{\text{peso do basidioma fresco}}{\text{peso de substrato utilizado}} \times 100$$

$$\text{Equação III. Produtividade (g/dia)} = \frac{\text{eficiência biológica}}{\text{dias de cultivo}}$$

$$\text{Equação IV. Perda da matéria orgânica PMO)} = \frac{\text{Massa do substrato residual (base seca)}}{\text{Massa residual inicial (base seca)}} \times 100$$

2.2.5 Determinação da composição centesimal da biomassa

O resíduo agroindustrial e os basidioma foram desidratados e triturados para a determinação dos seguintes parâmetros: teor de umidade, proteína, cinzas, lipídios, carboidratos, fibra e valor calórico no Laboratório Tecnologia de Pescado – Universidade Federal do Amazonas. O teor de proteína bruta (total) foi 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 ($0,70 \times 6,25 = 4,38$), e 6,25 para os substratos (BLIGH E DYER, 1959; A.O.A.C, 1997; LATINFOODS, 2002; A.O.A.C, 2005; TACO, 2006; FURLANI et al., 2005).

2.3 Elaboração do produto de panificação suplementado com biomassa de *Pleurotus ostreatoroseus*

2.3.1 Matéria Prima

O produto de panificação foi elaborado tendo como base a biomassa desidratada e triturada de *P. ostreatoroseus*. As análises de composição centesimal do produto de panificação foram realizadas conforme citado no item 2.3.2

2.3.2 Formulação do produto de panificação

O produto de panificação adicionado de cogumelo apresenta duas formulações diferentes: ① Formulação do produto padrão contendo farinha de arroz, ② Formulação do bioproduto contendo farinha de arroz e biomassa do cogumelo [*P. ostreatoroseus*] triturada, desidratada em pó 10% (p/p).

Na tabela 1 constam os ingredientes utilizados na formulação do bioproduto de panificação e padrão, os ingredientes utilizados foram pesados em balança analítica e posteriormente misturados. A massa do produto de panificação foi acondicionada em formas medindo 7 cm de diâmetro e 5 cm de altura. O cozimento do bioproduto foi realizado em forno elétrico a 180 °C por 15 min.

Tabela 1. Quantitativo de ingredientes utilizados na preparação do produto de panificação

Ingredientes	Formulação	
	Padrão	Produto de Panificação 10% biomassa cogumelo desidratada em pó
Ovo	1 unidade	1 unidade
Clara	25,601g	25,601g
Farinha de arroz	68g	61,2 g
Biomassa de cogumelo desidratada e triturada em pó	-	6,8g
Sal	1,7g	1,7g
Óleo de coco	10g	10g
Leite em pó	10g	10g
Fermento	6,5g	6,5g

2.4 Análise da qualidade microbiológica da biomassa

2.4.1 Avaliação da qualidade microbiológica dos basidiomas e do produto final do cogumelo comestível

Para determinação de mesófilos, coliformes totais, termotolerantes e *Salmonella* sp. e *Shigella* sp. da biomassa desidratada de *P. ostreatoroseus* e do produto alimentício foi realizada pelo método de diluição sucessiva como citada por Massaguer (2005) e Ali (2016). De cada amostra de biomassa desidratada e triturada foi utilizado 25 g para ser homogeneizado com 225 ml de água peptonada (diluição 10^{-1}). Desta suspensão foram preparadas diluições sucessivas, transferindo 1000 μ L para 9000 μ L de água peptonada 0,1 % (p/v), até obtenção da diluição 10^{-3} . As diluições foram submetidas a agitação por dois minutos em agitador de tubo. De cada diluição foi transferido 100 μ L para superfície de SS ágar modificado, Mannitol Salt ágar e EMB Levine ágar (KASVI[®]).

2.5 Análise Estatística

Os dados foram submetidos à análise estatística descritiva média, desvio padrão, gráficos e os cálculos de atividade enzimática ($R^2 \geq 95\%$) por análise de variância (Anova) e teste Tukey ($p < 0,05$) para comparação de médias, utilizando o software Minitab[®] versão 17.0.

3 Resultados e discussão

3.1 Cultivo de *P. ostreatoroseus* em resíduo de processamento de açaí com farelo de arroz

Nos cultivos de *P. ostreatoroseus* em resíduo de processamento de açaí com farelo de arroz (Sac+FA), a miceliação e formação dos primórdios foi verificada em 14 e 16 dias, respectivamente (Tabela 2, Figura 1 A-B). O tempo de produção consistiu de dois fluxos, o primeiro ocorreu em 19 dias e o segundo em 26 dias (Figura 1 C-F). Na pesquisa de produção de *P. djamor* a média da corrida micelial foi de 14 dias em grama e serragem. *P. ostreatoroseus* quando cultivado em exocarpo de cupuaçu e farelo de arroz o tempo de cultivo total foi aproximadamente 36,8 e 35,6 dias nas pesquisas realizadas por Fonseca et al. (2015) e Rabuske et al. (2019), respectivamente.

Reis (2010) e Picornell-Buendía (2016) afirmaram que as espécies do gênero *Pleurotus*, quando adaptadas ao substrato, parecem exigir 15 a 30 dias para desenvolvimento micelial e necessitam de 5 a 10 dias para emissão dos primórdios.

A eficiência biológica, produtividade e o rendimento foram de 76,02%, 3,99 (g/dia) e 70,3%, respectivamente (Tabela 2). Dados similares foram obtidos na produção de *Pleurotus*

ostreatoroseus em exocarpo cupuaçu e farelo de arroz, e *Pleurotus ostreatus* em resíduo agroindustrial de dendê e amêndoa de cacau (FONSECA et al., 2015; SILVA et al., 2020).

A porcentagem de matéria orgânica degradada no substrato Sac + FA foi de 63,6% nos cultivos de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 (Tabela 2). Fonseca et al. (2015) verificaram que *P. ostreatoroseus* degradou 37,68% em exocarpo de cupuaçu suplementado com farelo de arroz. Nas pesquisas de Martins et al. (2018) e Zárate-Salazar (2020) verificaram que *P. ostreatus* degradaram 31,68%, 29% e 49%, nos cultivos em bagaço de cana, serragem de eucalipto, farelo de soja, composto sobrefértil, calcário calcítico, substrato de milho e palha de arroz, respectivamente.

Tabela 2 – Ciclo de cultivo *P. ostreatoroseus* em substrato lignocelulósico.

Parâmetros	Resíduo do Processamento de Açaí + Farelo de Arroz
Miceliação Precocidade (dias)	14,0 ± 1,0
Formação Primórdios	16,0 ± 0,6
Tempo de produção (dias)	19,0 ± 1,2
Eficiência Biológica (%)	76,02 ± 1,7
Produtividade (g/dia)	3,99 ± 2,1
Rendimento (%)	70,3 ± 0,6
Perda da Matéria Orgânica (%)	63,6 ± 0,5

Entre as duas colheitas, os basidiomas apresentaram coloração rósea, com variação de tamanho, maturidade, odor agradável e textura rígida (Figura 1 C-F). Ao término da frutificação, os cogumelos apresentaram características típicas de *P. ostreatoroseus* como véu ausente, lamelas não intervenosas e decorrentes (Figura 1-E) (PUTZKE et al., 2018).

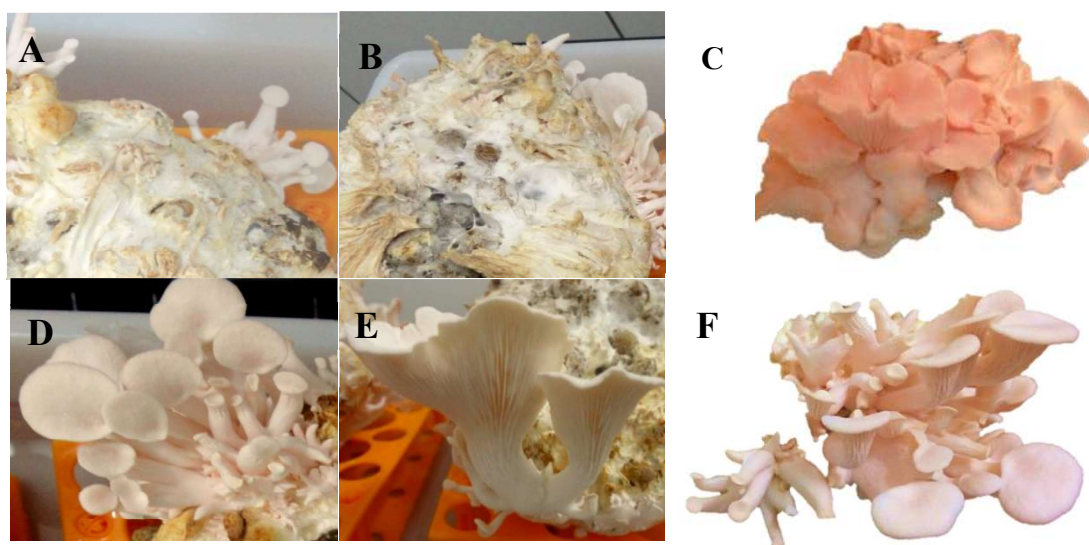


Figura 1. Fases de desenvolvimento e características morfológicas dos basidiomas *in natura* de *P. ostreatoroseus* em resíduo do processamento do açaí com farelo de arroz: (A) Primórdios em desenvolvimento; (B) Desenvolvimento dos basidiomas; (C) Primeiro fluxo formação de basidiomas imaturos; (D) Basidiomas imaturos; (E) Basidiomas maduros, antes da colheita; (F) Segundo fluxo de produção, basidiomas com corpo de frutificação maduro.

Mkhize et al. (2017) afirma que os parâmetros como rendimento e eficiência biológica são importantes a serem levados em consideração para o sucesso no cultivo de cogumelos, tendo em vista que a eficiência biológica indica a capacidade do cogumelo de frutificar no substrato. Bem como é influenciada pela qualidade de nutrientes, umidade, temperatura, luminosidade, pH, tipo e porcentagem de semente e linhagem do fungo.

Uma eficiência biológica de 100% significa que a massa de cogumelos frescos colhidos é igual ao peso seco do substrato. Dado o conteúdo de água de cogumelos de cerca de 90%, cultivadores qualificados produzem cogumelos com um (EB) entre 70% e 125% (GRIMM et al., 2021).

Na produção de cogumelos, índices promissores dependem da capacidade de decomposição do substrato pelo fungo para formação de micélio vigoroso. As espécies de *Pleurotus* spp., por exemplo, tem a habilidade de desenvolvimento em diferentes condições, geralmente eles requerem condições nutricionais, como o substrato metabolizável, com altos teores de oxigênio, um limite de nitrogênio e outras condições padrões de cultivo (RABUSKE et al., 2019, RAMAN et al., 2021).

Na tabela 3 estão apresentados os resultados da composição centesimal da biomassa desidratada em pó de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720. O teor de umidade da biomassa desidratada (10,49%) foi significativo, valor que atende a legislação brasileira, que determina valor máximo para esse parâmetro 12,0% (g/100g) (BRASIL, RDC nº 272/2005).

Tabela 3. Composição centesimal da biomassa desidratada em pó de *P. ostreatoroseus* e de ervilha em vagem, valores médios expressos em base seca.

Parâmetros	<i>P. ostreatoroseus</i>	<i>Pisum sativum</i> (Ervilha, em vagem) *
	100g de produto (base seca)	
Umidade	10,49± 0,7	76,8%
Cinzas	1,19 ± 0,01	1,0
Lípideos	1,97±0,4	0,5g
Nitrogênio	3,76± 0,01	-
Protein/Nx 4,38	15,44 ± 0.02	7,5g
Fibras	12,86 ± 0,9	9,7g
Carboidratos	58,17±0,01	14,2g
Energia (Kcal)	311,0±0,02	88kcal

N= nitrogênio. *Dados obtidos da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2011)

As porcentagens de cinzas (1,19%), proteínas (15,44 %) e lipídeos (1,97%) foram significativas, o teor de proteínas da biomassa de *P. ostreatoroseus*, neste estudo, está dentro

do registrado para o gênero *Pleurotus* (10,5 a 30,4%), os valores de energia (311,0%) se destacaram significativamente para esta espécie (Tabela 3) (FURLANI E GODOY, 2005).

Os valores de carboidratos (58,17%) e energia (311,0%) se destacaram significativamente (Tabela 3). Para *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 [800:200, (p/p)] (FONSECA et al., 2015). 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.

Apesar da diversificação nutricional, espécies de cogumelos comestíveis comumente têm baixo teor de lipídios. Muitas espécies se destacam como fonte de carboidratos, fibra e proteínas, inclusive apresentam todos os aminoácidos essenciais. Os carboidratos têm como função principal fornecer energia e as proteínas são nutrientes construtores do organismo (ossos, pele e músculos) (CONDÉ et al., 2017; RAMAN et al, 2021).

Nos fungos, as fibras alimentares estão representadas pelas glucanas [β -glucanas β -(1 $\rightarrow$ 3; 1 $\rightarrow$ 6) e α -glucanas (1 $\rightarrow$ 3)], têm função estrutural na parede celular e podem estar livres ou associadas às proteínas, lípideos e outros polissacarídeos. Na base da parede celular, as β -glucanas estão ligadas à quitina e proteínas formando um complexo (FURLANI E GODOY, 2007; FRAGA et al., 2013; KUMARI, 2020). Os cogumelos têm fibra alimentar comestível e são boas fontes de compostos alimentares essenciais que são valiosos para a nutrição humana, os cogumelos comestíveis fornecem até 25% da fibra dietética recomendada (RAMAN et al., 2021).

Além disso, as fibras alimentares ou fibras dietéticas promovem efeitos positivos na prevenção e tratamento de certas doenças, são utilizadas pela microbiota intestinal como substrato para crescimento, proporcionando inúmeros efeitos positivos para o organismo humano, incluindo prevenção de certas doenças crônicas (doença arterial coronariana, acidente vascular cerebral, auxiliarem na redução da pressão arterial, diabetes mellitus, no controle do peso e algumas desordens gastrointestinais) (MAGALHÃES et al., 2016; TOLERA et al., 2017; KUMARI, 2020).

Neste estudo a comparação nutricional de *P. ostreatoroseus* foi feita com ervilhas, devido estas serem tradicionalmente consumidas em saladas como vegetais e verduras (Tabela 3). Os resultados revelaram que o cogumelo em questão, destacou-se em relação a ervilha, pois

na sua composição apresentam valores significativos de cinzas, fibras, proteínas, carboidratos e energia.

Semelhante aos vegetais e verduras, o consumo gastronômico dos cogumelos comumente está sendo utilizado em molhos, saladas, pizzas e cremes. O destaque para essa forma de consumo está ligado à capacidade de adicionar o sabor *umami*, conhecido como o sabor que tem em carnes e outras fontes de proteínas (SUN et al., 2020; HARADA-PADERMO et al., 2020).

A composição de aminoácidos dos cogumelos facilita a expressão desse sabor. O conteúdo proteico dos cogumelos geralmente é superior a outros vegetais. Como consequência, cogumelos tornam-se opções gastronômicas interessantes para grupos vegetarianos ou apenas para enriquecer a composição de proteínas e o sabor de pratos à base de verduras e vegetais (TACO, 2011; HARADA-PADERMO et al., 2020).

O conteúdo de nutrientes dos cogumelos, a exemplo de *Pleurotus* pode variar de acordo com as características da espécie, composição do substrato, condição a que são submetidos para desenvolvimento dos basidiomas, características ambientais, época de cultivo, manuseio e colheita, armazenamento pós-colheita, transporte, entre outros fatores (CHANG E MILES, 2004; HELM et al, 2009; LIMA et al., 2017).

O crescimento do micélio do cogumelo requer nutrientes, temperatura adequada, umidade e ar. O micélio geralmente busca altas concentrações de carbono, nitrogênio, oxigênio, enxofre, fósforo, e potássio e carboidratos (glicose, celulose, amido e lignina) que são a fonte de carbono e energia (SILVERMAN et al., 2020).

Outra vantagem resultante do cultivo de cogumelos consiste na biotransformação de resíduos lignocelulósicos em alimentos para humanos e ração animal, bioprocesso que proporciona a redução do impacto ambiental causado pelo descarte inadequado desses resíduos (BENTO et al., 2012; SAAD et al., 2017). Os processos de biotransformação de resíduos atualmente conhecidos por biorrefinarias estão ganhando força nos últimos anos, pois este processo permite a reutilização e aproveitamento de difentes biomassas, e na conversão destas em combustíveis, eletricidade, calor, produtos químicos de alto valor e outros produtos de base biológica (PHILIPPINI et al., 2020).

Com base nos resultados desta pesquisa, *P. ostreatoroseus* cultivado em resíduo de processamento de açaí e farelo de arroz é o cogumelo comestível com características nutricionais essenciais para utilização como alimento para consumo humano, além de propiciar a biotransformação de resíduos lignocelulósicos.

3.2 Bioproduto de panificação suplementado com Basidioma de *P. ostreatoroseus*

A composição centesimal dos produtos de panificação padrão e do suplementado com biomassa desidratada em pó de *P. ostreatoroseus* estão apresentados na tabela 4. A umidade no produto padrão foi significativa (56,08%), valor superior (24,84%) ao do produto contendo biomassa de *P. ostreatoroseus*.

Quanto aos nutrientes, cinzas, lipídeos, proteínas, fibras, carboidratos foram significativos nos dois produtos. Todavia, no produto contendo biomassa do cogumelo, lipídeos foi inferior 25,52%, já o conteúdo de carboidrato e fibras, foi de 28,40% e 22%, em relação ao padrão, respectivamente (Tabela 4). Esses resultados demonstram que a adição do cogumelo no produto de panificação influenciou de forma positiva na composição final do produto.

Tabela 4. Composição centesimal da biomassa desidratada em pó e produtos de panificação elaborados com biomassa desidratada em pó de *P. ostreatoroseus* (g/100g de produto).

Parâmetros	Pão sem cogumelo (padrão)	Pão + biomassa seca em pó de <i>P. ostreatoroseus</i> 10% (p/p)
Umidade	(56,08 ± 0,2) ^a	(42,15 ± 0,3) ^b
Cinzas	(0,3 ± 0,03) ^a	(0,4 ± 0,05) ^a
Lipídeos	(17,16 ± 0,2) ^a	(12,78 ± 0,07) ^a
Nitrogênio	(4,41 ± 0,02) ^b	(5,98 ± 0,01) ^a
Protein/Nx 6,25	(5,45 ± 0,7) ^a	(5,62 ± 0,07) ^a
Fibras	(1,45 ± 0,2) ^a	(1,86 ± 0,02) ^a
Carboidratos	(24,07 ± 0,0) ^b	(33,62 ± 0,0) ^a
Energia (Kcal)	(274,91 ± 0,0) ^a	(309,914 ± 0,0) ^b

N= nitrogênio; Valores seguidos pela mesma letra, não diferem estatisticamente entre si no teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Na pesquisa realizada por Biao (2019) para criar uma versão mais saudável de biscoitos, foi substituída a farinha de trigo por um nutracêutico rico em farinha de cogumelos e obteve níveis cinco vezes maiores de fibra alimentar e minerais à farinha de trigo, onde a suplementação da farinha de cogumelo forneceu a melhoraria do perfil nutricional dos cookies, corroborando com as observações realizadas nesta pesquisa no produto de panificação elaborado.

A farinha de arroz, um dos ingredientes do produto de panificação apresentou a seguinte composição centesimal (g/100 de produto): umidade 10,95%, que atende a legislação brasileira, que determina valor máximo de 15,0 % (g /100 g) (RDC 264/2005).

Nas análises da composição centesimal da farinha de arroz utilizadas na formulação do produto os componentes como: Cinzas (0,03%), lipídeos (3,07%), proteínas (6,02%),

nitrogênio (13,64%), fibras (0,33%), carboidratos (82,12%) e energia (359,08%), são quantitativos próximos aos citados para farinha de arroz pela TACO, 2011.

A concentração de nutrientes em arroz pode ser comprometida devido a fatores ambientais (adubação nitrogenada, radiação solar e temperatura) durante o desenvolvimento do grão, além das características genótípicas e do processamento (WALTER et al., 2008; CHATURVEDI et al., 2017; KUMARATHILAKA et al., 2018).

A farinha de arroz está sendo uma das principais substituintes da farinha de trigo em produtos de panificação sem glúten (*gluten-free*), pois pode ser utilizada como matéria prima alternativa nas dietas por ser um carboidrato de fácil digestão, versátil, textura fina e sabor suave (RICO et al., 2019; WU et al., 2019). Além do uso das leveduras estão utilizando determinadas estruturas de fungos macroscópicos (cogumelos) adicionais ao pão, como forma de melhorar a composição de produtos (CHIEN et al., 2016; GÓMEZ et al., 2020).

Na figura 2 estão apresentadas as características físicas do produto de panificação (padrão) e com adição de cogumelo. O tempo de preparo do produto foi de 1 hora, compreendendo a etapa de pesagem e mistura dos ingredientes, 15 minutos para crescimento da massa e 15 minutos para cozimento.

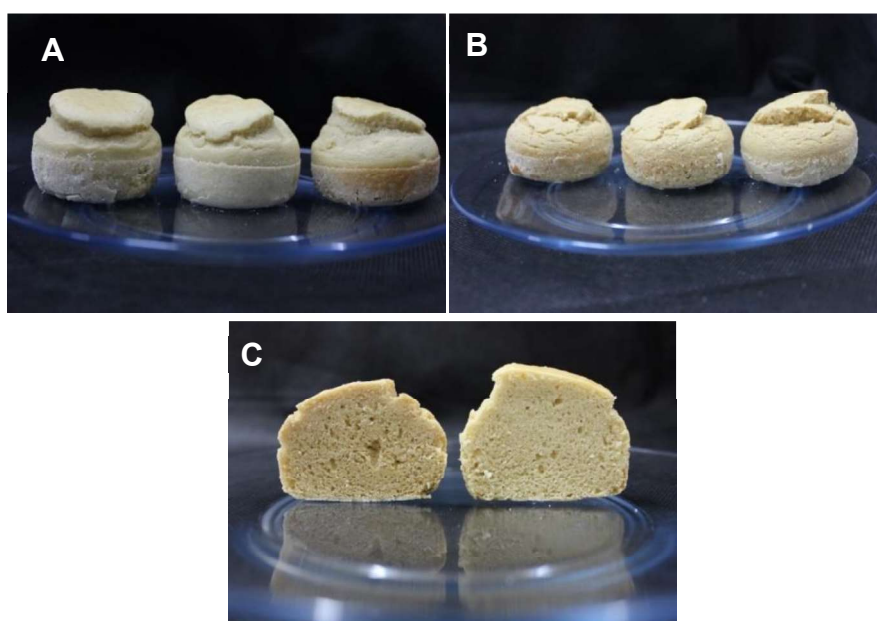


Figura 2. Características do pão com e sem adição de cogumelo (*P. ostreatoroseus*). (A) Pão sem adição de cogumelo (padrão); (B) Pão com 10% cogumelo. (C) Comparativo do aspecto da massa pão com adição de cogumelo (à esquerda) e pão controle (à direita).

O tamanho do produto de panificação adicionado de *P. ostreatoroseus* e do padrão foi semelhante, 7,0 cm de diâmetro e altura 4,0 cm, antes do cozimento. Após o processo de cozimento a altura, em média correspondeu a 4,06 cm para o produto suplementado com o

cogumelo e o padrão 4,57cm (Figura 2). Estas características observadas no produto podem estar associadas a concentração de carboidrato presente no cogumelo. A concentração de carboidrato interfere no crescimento da massa, pois quanto maior a concentração de carboidrato menor o crescimento da massa. A redução de carboidrato aumenta o crescimento da massa, proporcionando maior elasticidade e maciez (SILVA et al., 2003; MILLAR et al., 2019).

O produto de panificação contendo cogumelo desidratado em pó proporcionou alteração das características da massa, como consistência, deixando-o macio e com porosidade, característica observada na figura 2-C. O pão com adição de *P. ostreatoroseus* tem maior porosidade em relação ao pão padrão, resultado que demonstrou a eficiência do cogumelo na melhoria da consistência da massa. A aeração começa com a mistura dos ingredientes, fator que influencia na textura do produto final, ou seja, o ar é incorporado no sistema de massa sob a forma de bolhas, formando poros (PEIGHAMBARDoust et al., 2010; Ktenidouaki et al., 2011; Godswill et al., 2019; Packkia-Doss et al., 2019).

Com base nos valores obtidos nessa pesquisa, os dados foram expressos na forma de composição nutricional por 50g de porção do produto (Tabela 5 e 6). Neste contexto, essa informação proporciona ao consumidor conhecimento da composição nutricional do produto, como forma de escolha para aquisição de alimentos saudáveis e de adequado valor nutricional em benefício da sua saúde e bem estar (Cavada et al., 2012; Lehmann et al., 2017).

Cogumelos do gênero *Pleurotus* são considerados alimentos saudáveis e de expressivo valor nutricional para ser utilizado em dietas hiperproteicas e hipolipídicas, devido a composição de proteínas, carboidratos e valor energético, além de valores baixos de lipídios (Bernardi et al., 2007; Raman et al., 2021) (Tabela 6).

Tabela 5. Informação nutricional do produto de panificação (Padrão)

INFORMAÇÃO NUTRICIONAL Porção 50g (2 fatias)		
Quantidade por porção		% VD (*)
Valor energético	136Kcal = 569 kj	7
Carboidratos	12g	4
Proteínas	2,8g	4
Gorduras totais	8,6g	16
Gorduras saturadas	**	**
Gorduras trans	**	**
Fibra alimentar	0,7g	2,8

(*) Valores diários de referência com base em uma dieta de 2.000 kcal ou 8400 kj;

** VD não estabelecido.

Tabela 6. Informação nutricional do produto com adição de cogumelo comestível *P. ostreatoroseus*

INFORMAÇÃO NUTRICIONAL Porção 50g (2 fatias)		
Quantidade por porção		% VD (*)
Valor energético	138Kcal = 577 kj	7
Carboidratos	17g	6
Proteínas	3g	4
Gorduras totais	6,4g	12
Gorduras saturadas	**	**
Gorduras trans	**	**
Fibra alimentar	1g	4

(*) Valores diários de referência com base em uma dieta de 2.000 kcal ou 8400 kj;

** VD não estabelecido.

Na análise microbiológica dos basidiomas desidratados de *P. ostreatoroseus*, bem como, do produto de panificação com e sem adição do cogumelo observou-se a ausência de coliformes totais – *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Staphylococcus aureus*, bolores e leveduras. Estes resultados mostraram que a qualidade do produto está em conformidade com as exigências da legislação brasileira, segundo preconizado pela qualidade higiênico-sanitária da amostra na Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, RDC nº 331 de 23 de Dezembro de 2019 e na Instrução normativa nº 60, de 23 de dezembro de 2019.

4 Conclusão

Os basidiomas desidratados de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 produzidos em resíduos lignocelulósicos demonstraram conteúdo de cinzas, proteínas, lipídeos significativos e característica higiênico-sanitárias compatíveis a produtos alimentícios para consumo. No produto de panificação, a adição do cogumelo proporcionou o aumento do teor de carboidratos, cinzas, fibras lipídios e proteínas, agregando qualidade nutricional ao produto final, evidenciando que *P. ostreatoroseus* pode ser utilizado não somente como alimento mas como suplemento para enriquecer nutricionalmente produtos para consumo humano.

5 Referências

A.O.A.C. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 16^a ed., Estados Unidos da América: Arlington, MA: **AOAC International**. p. 1141, 1997.

A.O.A.C. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of AOAC International. 18.ed. atual. Gaithersburg, MA: **AOAC International**, 2005.

ALI, R. et al. Detection and enumeration of Enteric bacteria associated with food handlers and surfaces of food manufacturing industry located in Hub city, Pakistan. **WSN World Scientific News**, v. 49, n. 48, p. 192–203, 2016.

BENTO, C. CASARIL, K. Bioconversão de resíduos agroindustriais ligninocelulósicos por fungos causadores da podridão branca: uma alternativa à produção de alimentos. **Revista Faz Ciencia FC**. Vol14. N 19. pp. 151-180. 2012.

BERNARDI, E. Utilização de diferentes substratos para a produção de inóculo de *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. **Revista Ciência Agronômica**, v. 38, n. 1, p. 84–89, 2007.

BIAO, Y. et al. Impact of mushroom (*Pleurotus eryngii*) flour upon quality attributes of wheat dough and functional cookies-baked products. **Food Science and Nutrition**, v. 8, n. 1, p. 361–370, 2019.

BLIGH, E. G., DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can J Biochem Physiol**.37:911–7. 1959.

BRASIL. Resolução RDC nº 12 ANVISA/MS, de 02 de janeiro de 2001. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF. Acessi em: 01 de Janeiro de 2020.

BRASIL. Resolução RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005. Aprova o “Regulamento técnico produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos” constante do anexo desta Resolução. Órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária Disponível em: legis.anvisa.gov.br/leisref/public >. Acesso em: 19 de dezembro de 2019.

BRASIL. Resolução RDC nº 331, de 23 de Dezembro de 2019. Dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação. Órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-331-de-23-de-dezembro-de-2019-235332272>>. Acesso em: 03 de Março de 2020.

CAVADA, G. PAIVA, F., HELBIG, F. Rotulagem nutricional: você sabe o que está comendo? **Braz. J. Food Technol.** IV SSA, p. 84-88 <http://dx.doi.org/10.1590/S1981-67232012005000043>. 2012.

CHANG, S. MILES, G. P. et al. Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effects and Environmental Impact. **Boca Raton, FL: CRC Press**, p. 436, 2004.

CHANG, S. T. MILES, T. Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact. 2 nd ed. 1989.

CHATURVEDI, A. K. et al. Elevated CO₂ and heat stress interactions affect grain yield, quality and mineral nutrient composition in rice under field conditions. **Field Crops Research**, v. 206, p. 149–157, 2017.

CHIEN R. C, ULZIJARGAL E., MAU, J. L. Quality of Bread Supplemented with *Antrodia* and *Salmonea*-Fermented Grains. **Food Technology and Biotechnology**.54(2):180-188. Doi:10.17113/ftb.54.02.16.4336. 2016.

CHUN, S. S.; CHAMBERS, E.; HAN, I. Development of a sensory flavor lexicon for mushrooms and subsequent characterization of fresh and dried mushrooms. **Foods**, v. 9, n. 8, 2020.

CONDÉ, F., et al. Farinha de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. (Cogumelo Hiratake) enriquecido em ferro. **Ciência e Natura [online]**,39. Enero- ISSN 0100-8307.2017.

DEL CERRO, C. et al. Intracellular pathways for lignin catabolism in white-rot fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 118, n. 9, p. 1–10, 2021.

FARIA, E. O.; CALDEIRA-PIRES, A. Economia Circular e Bioeconomia: Como as Abordagens se Relacionam? **International Workshop Advances in Cleaner production**, 2018.

FERREIRA, A. F. Biorefinery Concept. **Lecture Notes in Energy**. p. 1–6, 2007.

FONSECA, T. R. B. et al. Cultivation and nutritional studies of an edible mushroom from North Brazil. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 30, p. 1814–1822, 2015.

FRAGA, S. Fibra dietética de cogumelo como ingrediente alimentar. **Agrote: revista técnico científica agrícola**. n. 8, 2013.

FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis: Uma revisão. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 64(2), p. 149-154, 2005.

FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n.1, p.154-157. 2007.

GEISENDORF, S.; PIETRULLA, F. The circular economy and circular economic concepts—a literature analysis and redefinition. **Thunderbird International Business Review**, v. 60, n. 5, p. 771–782, 2018.

GODSWILL, C.; SOMTOCHUKWU, V.; KATE, C. the Functional Properties of Foods and Flours. **International Journal of Advanced Academic Research | Sciences**, v. 5, n. 11, p. 2488–9849, 2019.

GÓMEZ, M.; GUTKOSKI, L. C.; BRAVO-NÚÑEZ, Á. Understanding whole-wheat flour and its effect in breads: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 6, p. 3241–3265, 2020.

GRIMM, D.; KUENZ, A.; RAHMANN, G. Integration of mushroom production into circular food chains. **Organic Agriculture**, v. 11, n. 2, p. 309–317, 2021.

HARADA-PADERMO, S. DOS S. et al. Umami Ingredient: Flavor enhancer from shiitake (*Lentinula edodes*) byproducts. **Food Research International**, v. 137, n. June, p. 109540, 2020.

HASSAN, S. S.; WILLIAMS, G. A.; JAISWAL, A. K. Lignocellulosic Biorefineries in Europe: Current State and Prospects. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 231–234, 2019.

HELM, C., CORADIN, J. KESTRING, D. Avaliação da Composição Química dos Cogumelos Comestíveis *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Agaricus bisporus portobello*, *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus*. **Comunicado técnico**. ISSN 1517-5030 Colombo, PR. 2009.

JEGADEESH, R. et al. Cultivation of Pink Oyster mushroom *Pleurotus djamor var. roseus* on various agro-residues by low cost technique. n. **J. Mycopathol. Res.** 56(3): 213-220, 2018; (ISSN 0971-3719), December, 2018.

KORHONEN, J.; HONKASALO, A.; SEPPÄLÄ, J. Circular Economy: The Concept and its Limitations. **Ecological Economics**, v. 143, p. 37–46, 2018.

KTENIOUDAKI, F. BUTLER, E. GALLAGHER, D. Characteristics of Irish wheat varieties II. Aeration profile and baking quality. **LWT Food Sci. Technol.** 44 (3) (2011), pp. 602-610.2011.

KUMARATHILAKA, P. et al. Arsenic accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) is influenced by environment and genetic factors. **Science of the Total Environment**, v. 642, p. 485–496, 2018.

KUMARI, K. Mushrooms as source of dietary fiber and its medicinal value: A review article. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 9, n. 2, p. 2075–2078, 2020.

LATINFOODS. **Tabla de composición de alimentos de América Latina**. 2002. (<http://www.fao.org/LAmerica/grupo>). Acesso em 17/08/2019.

LEHMANN, U. et al. Nutrient profiling for product reformulation: Public health impact and benefits for the consumer. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 76, n. 3, p. 255–264, 2017.

LIMA, S. Farinha de trigo enriquecida com pó de *Pleurotus sajor-caju*. **Brazilian Journal of Food Research**, Campo Mourão, v. 8 n. 4, p. 104-127. 2017.

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

MAGALHAES, B. et al. Consumo de fibras alimentares entre indivíduos adultos em um supermercado de são luís, maranhão. **Rev Pesq Saúde**, 17(3): 137-140, set-dez, 2016.

MARTINS, O. G. et al. Sobra de alimentos como alternativa para a formulação de novos substratos para o cultivo de food surplus as an alternative for the elaboration of new substrates for the cultivation of *Pleurotus*. **Revista Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 11, p. 505–518, 2018.

MASSAGUER, P.R. Microbiologia dos processos alimentares. São Paulo: **Varela**, p. 258, 2005.

MILLAR, K. A. et al. Dough properties and baking characteristics of white bread, as affected by addition of raw, germinated and toasted pea flour. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 56, n. June, p. 102189, 2019.

MKHIZE, S. Performance of *Pleurotus pulmonarius* mushroom grown on maize stalk residues supplemented with various levels of maize flour and wheat bran. **Food Sci. Technol.** vol.37, n.4 [cited 2018-08-28], pp.570-577. ISSN 0101-2061. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457x.27216>. 2017.

MOHAN, V. S. et al. Waste biorefinery models towards sustainable circular bioeconomy: Critical review and future perspectives. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 2–12, 2016.

MORSELETTO, P. Targets for a circular economy. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 153, n. November 2019, p. 104553, 2020.

NEPA–UNICAMP. TACO - **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. 4 ed. São Paulo: Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação, 2011.

PACKKIA-DOSS, P. P. et al. Effect of supplementation of wheat bran on dough aeration and final bread volume. **Journal of Food Engineering**, v. 252, n. December 2018, p. 28–35, 2019.

PEIGHAMBARDOUST, S.H. et al. Aeration of bread dough influenced by different way of processing. **J. Cereal Sci.** **51**, 89e95.<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2009.10.002>, 2010.

PHILIPPINI, R. R. et al. Agroindustrial Byproducts for the Generation of Biobased Products: Alternatives for Sustainable Biorefineries. **Frontiers in Energy Research**, v. 8, n. July, p. 1–23, 2020.

PICORNELL-BUENDÍA, M. R.; PARDO-GIMÉNEZ, A.; DE JUAN-VALERO, J. A. Qualitative parameters of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) p. kumm. Mushrooms grown on supplemented spent substrate. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 16, n. 1, p. 101–117, 2016.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T. L. Cogumelos no Brasil – Fungos Agaricales s. l. **LupaGraf**, v. 3, n. 1, p. 67-75, 2018.

RABUSKE, E. R. et al. Substratos alternativos para o cultivo do cogumelo comestível ostra salmão: *Pleurotus djamor*. **Caderno de Pesquisa**. Santa Cruz do Sul, v. 31, n. 2, p. 22-24, mai./ago, 2019.

RAMAN, J. et al. Cultivation and Nutritional Value of Prominent *Pleurotus* spp.: An Overview. **Mycobiology**, v. 49, n. 1, p. 1–14, 2021.

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

RICO, D; et al. Development of healthy gluten-free crackers from white and brown tef (*Eragrostis tef* Zucc.) flours. *Heliyon*. v.5, ed 10, 2019

ROLLAN, M. G. Cultivo de Setas y Trufas. 4ª ed., Espanha: **Artes Gráficas Cuesta S.A.**, p. 239, 2003.

ROYSE, D. J.; BAARS, J.; TAN, Q. Current Overview of Mushroom Production in the World. **Edible and Medicinal Mushrooms**, v. 2010, p. 5–13, 2017.

SAAD, A., et al. Aproveitamento de resíduos agrícolas no cultivo do cogumelo medicinal *Ganoderma lucidum* utilizando a tecnologia chinesa “Jun-Cao”. **Ambiência Guarapuava (PR)** v.13 n.3 p. 271 - 283 Set/Dez 2017 ISSN 1808 – 0251. DOI:10.5935/ambiencia.2017.03.03.2017.

SILVA, M., YONAMINE, G.H, MITSUIKI, L.Desenvolvimento e avaliação do pão francês caseiro sem sal. **Braz. J. Food Technol.**6(2):229-36. 2003.

SILVA, R. M. DA et al. Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated in agroindustrial wastes of palm oil fruits and cocoa almonds. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 87, p. 1–10, 2020.

SILVERMAN, J.; CAO, H.; COBB, K. Development of Mushroom Mycelium Composites for Footwear Products. **Clothing and Textiles Research Journal**, v. 38, n. 2, p. 119–133, 2020.

SUN, L. BIN et al. Advances in umami taste and aroma of edible mushrooms. **Trends in Food Science and Technology**, v. 96, n. October 2019, p. 176–187, 2020.

TACO. **Tabela de composição de alimentos**. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação. UNICAMP. Campinas, São Paulo, Brasil., 105 p. 2006.

TACO. Tabela brasileira de composição de alimentos. **Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação** - UNICAMP NEPA – UNICAMP. - 4. ed. rev. e ampl. -- Campinas: NEPA-UNICAMP, 161 p. 2011.

TAKKELLAPATI, S.; LI, T.; GONZALEZ, M. A. An overview of biorefinery-derived platform chemicals from a cellulose and hemicellulose biorefinery. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 20, n. 7, p. 1615–1630, 2018.

TOLERA, K. D.; ABERA, S. Nutritional quality of Oyster Mushroom (*Pleurotus Ostreatus*) as affected by osmotic pretreatments and drying methods. **Food Science and Nutrition**, v. 5, n. 5, p. 989–996, 2017.

UBANDO, A. T.; FELIX, C. B.; CHEN, W. H. Biorefineries in circular bioeconomy: A comprehensive review. **Bioresource Technology**, v. 299, n. November 2019, 2020.

VILAR, D S. et al. Lignin-modifying enzymes: a green and environmental responsive technology for organic compound degradation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, n. February, 2021.

VILAR, D S. et al. Lignin-modifying enzymes: a green and environmental responsive technology for organic compound degradation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, n. February, 2021.

WU, T. et al. Effect of milling methods on the properties of rice flour and gluten-free rice bread. **Lwt**, v. 108, n. March, p. 137–144, 2019.

WALTER, M., MARCHEZAN, E., AVILA, L. Arroz: composição e características nutricionais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.4, p.1184-1192, jul, ISSN 0103-8478. 2008.

ZÁRATE-SALAZAR, J. R. et al. Use of lignocellulosic corn and rice wastes as substrates for oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus* Jacq.) cultivation. **SN Applied Sciences**, v. 2, n. 11, p. 1–10, 2020.

5 CONCLUSÃO

Os resultados alcançados demonstraram que *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 cresceu em todos os meios sintéticos e naturais, a maior velocidade de crescimento foi identificada em ágar Malte. No entanto, ágar GYP foi o meio promissor com relação ao vigor micelial. A mistura de substrato eficiente para a produção de *P. ostreatoroseus* foi observada em Resíduo de processamento de açaí suplementado com farelo de arroz (Sac+FA), devido a densidade micelial.

As proteases apresentaram atividade ótima em pH 5,0 e a 40 °C, classificadas como serinoprotease e aspartoprotease. A ação destes biocatalisadores é fortemente inibida por Fe^{+2} e Mn^{+2} . As proteases de *P. ostreatoroseus* têm potencial para uso na indústria farmacêutica, têxtil, alimentícia e química.

O substrato promissor na síntese de proteases por *Pleurotus ostreatoroseus* foi o resíduo de processamento de açaí suplementado com farelo de arroz. *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 desenvolveu basidiomas na mistura de Sac+FA com conteúdo de cinzas, proteínas, lipídeos significativos e característica higiênico-sanitárias compatíveis a produtos alimentícios.

O produto de panificação com adição de cogumelo, apresentou ótimo valor nutricional, pois o cogumelo proporcionou o aumento do teor de carboidratos, cinzas, fibras lipídios e proteínas, agregando qualidade nutricional ao produto final. Dessa forma, evidencia que o cogumelo comestível *P. ostreatoroseus* pode ser utilizado não somente como alimento mas como suplemento para enriquecer nutricionalmente produtos alimentícios para consumo humano.

Os dados obtidos na pesquisa sugere que o uso de resíduos lignocelulósicos para produção de enzimas e basidiomas é um bioprocesso viável e ecológico, nos quais adentra os preceitos da biorrefinaria e economia circular e pode resultar em bioprodutos comercializáveis com ótima qualidade nutricional.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.O.A.C. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 16^a ed., Estados Unidos da América: Arlington, **MA: AOAC International**. p. 1141, 1997.

A.O.A.C. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of AOAC International. 18.ed. atual. Gaithersburg, **MA: AOAC International**, 2005.

ABDEL-RAHMAN, T. M. et al. Biological and Chemical Sciences Purification and characterization of Milk -Clotting Enzyme from the edible mushroom *Pleurotus albidus*. **Research Journal of Pharmaceutical**, September – October. v. 9, n. 49, p. 49–63, 2018.

AKPINAR, M.; UREK, R.O. Induction of fungal laccase production under solid state bioprocessing of new agroindustrial waste and its application on dye decolorization. **Biotech**. 7:98. 2017.

ALBUQUERQUE, M. P. DE; MARINS, R.; PEIL, N. Mycelial growth of *Lentinus sajor caju* (Fr.) Fr. and *Pleurotus* spp. in different agricultural wasteS. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 28, n. 5, p. 895-902, 2012.

ALI, R. et al. Detection and enumeration of Enteric bacteria associated with food handlers and surfaces of food manufacturing industry located in Hub city, Pakistan. **WSN World Scientific News**, v. 49, n. 48, p. 192–203, 2016.

ALVES R.P. et al. A Potential use of edible mushrooms *Pleurotus ostreatoroseus* Singer. (*Pleurotaceae*) and *Lentinus sajor-caju* (Fr.) Fr. (*Polyporaceae*) in metal remediation processes. **Revista de Biologia Neotropical**. v.:82-90, 2017.

AMIRTA, R. et al. Two-steps Utilization of Shorea Wood Waste Biomass for the Production of Oyster Mushroom and Biogas – A Zero Waste Approach. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 9, n. December, p. 202–208, 2016.

ARAÚJO, D. J. C.; MACHADO, A. V.; VILARINHO, M. C. L. G. Availability and Suitability of Agroindustrial Residues as Feedstock for Cellulose-Based Materials: Brazil Case Study. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 10, p. 2863–2878, 2018.

AREVALO-GALLEGOS, A. et al. Lignocellulose: A sustainable material to produce value-added products with a zero waste approach—A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 99, p. 308–318, 2017.

ATILA, F. Evaluation of Suitability of Various Agro-Wastes for Productivity of *Pleurotus djamor*, *Pleurotus citrinopileatus* and *Pleurotus eryngii* Mushrooms. **Journal of Experimental Agriculture International**, v. 17, n. 5, p. 1–11, 2017.

BANERJEE, G.; RAY, A. K. Impact of microbial proteases on biotechnological industries. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 33, n. 2, p. 119–143, 2017.

BANO, S. et al. Characterization of crude protease produced by *Pleurotus eryngii* ATCC 90888. **Pak. J. Biotechnol.** v. 13, p. 193-198, 2018.

BARH, A. et al. Genetic improvement in *Pleurotus* (oyster mushroom): a review. **3 Biotech**, v. 9, n. 9, 2019.

BELLETTINI, M. B. et al. Factor's affecting mushroom *Pleurotus* spp. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 4, p. 633–646, 2019.

BEMNRAD, O. M. et al. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable protease from the oyster mushroom *Pleurotus sajor-caju* strain CTM10057 with industrial interest. **BMC Biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 1–18, 2019.

BENTO, C. CASARIL, K. Bioconversão de resíduos agroindustriais ligninocelulósicos por fungos causadores da podridão branca: uma alternativa à produção de alimentos. **Revista Faz Ciencia FC**. Vol14. N 19. pp. 151-180. 2012.

BERNARDI, E. Utilização de diferentes substratos para a produção de inóculo de *Pleurotus ostreatoroseus* Sing. **Revista Ciência Agronômica**, v. 38, n. 1, p. 84–89, 2007.

BERNARDI, E. et al. Productivity, biological efficiency and bromatological composition of *Pleurotus sajor-caju* growth on different substrates in Brazil. **Agriculture and Natural Resources**, v. 53, n. 2, p. 99–105, 2019.

BHOWMICK, G.; SARMAH, A. K.; SEN, R. Lignocellulosic biorefinery as a model for sustainable development of biofuels and value added products. **Bioresource Technology**, v. 247, n. June 2017, p. 1144–1154, 2018.

BIAO, Y. et al. Impact of mushroom (*Pleurotus eryngii*) flour upon quality attributes of wheat dough and functional cookies-baked products. **Food Science and Nutrition**, v. 8, n. 1, p. 361–370, 2019.

BLIGH, E. G., DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can J Biochem Physiol.**37:911–7. 1959.

BONA, E. A. M. DE et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 218–225, 2014.

BRAGA, R. S. et al. *Lentinus villosus* Klotzsch (1833) AM 169: a natural and renewable source of alkaline protease. **Braz. J. of Develop.** Curitiba, v. 6, n. 11, p.85867-85883, nov. 2020.

BRASIL. Resolução RDC nº 12 ANVISA/MS, de 02 de janeiro de 2001. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF. Acesso em: 1 de Janeiro de 2020.

BRASIL. Resolução RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005. Aprova o “Regulamento técnico produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos” constante do anexo desta Resolução. Órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária Disponível em: legis.anvisa.gov.br/leisref/public >. Acesso em: 19 de dezembro de 2019.

BRASIL. Resolução RDC nº 331, de 23 de Dezembro de 2019. Dispõe sobre os padrões microbiológicos de alimentos e sua aplicação. Órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-331-de-23-de-dezembro-de-2019-235332272>>. Acesso em: 03 de Março de 2020.

BRITO, A. K. P. DE et al. Avaliação de substratos de floresta tropical para cultivo e produção de proteases por *Pleurotus djamor*. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 3, p. e31810313385, 2021.

BUMANLAG, C. P. B. et al. Optimum conditions for mycelia growth and basidiocarp production of *Pleurotus djamor* on corn based media. **International Journal of Biology**. Issn: 2277-4998. v. 7, n. April, p. 558-575, 2018.

CAVADA, G. PAIVA, F., HELBIG, F. Rotulagem nutricional: você sabe o que está comendo? **Braz. J. Food Technol.** IV SSA, p. 84-88. <http://dx.doi.org/10.1590/S1981-67232012005000043>, 2012.

CHANG, S. MILES, G. P. et al. Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effects and Environmental Impact. **Boca Raton, FL: CRC Press**, p. 436, 2004.

CHANG, S. T. et al. The Cultivation and Environmental Impact of Mushrooms. **Environmental Science**. p1-38. 2017.

CHANG, S. T. MILES, T. Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact. 2 nd ed. 1989.

CHANG, S. T.; WASSER, S. P. Current and future research trends in agricultural and biomedical applications of medicinal mushrooms and mushroom products (Review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 20, n. 12, p. 1121-1133, 2018.

CHATURVEDI, A. K. et al. Elevated CO₂ and heat stress interactions affect grain yield, quality and mineral nutrient composition in rice under field conditions. **Field Crops Research**, v. 206, p. 149-157, 2017.

CHIEN R. C, ULZIJARGAL E., MAU, J. L. Quality of Bread Supplemented with Antrodia^[1]Salmonella-Fermented Grains. **Food Technology and Biotechnology**.54(2):180-188. Doi:10.17113/ftb.54.02.16.4336. 2016.

CHOI, J. H. et al. Purification and partial characterization of a fibrinolytic enzyme from the fruiting body of the medicinal and edible mushroom *Pleurotus ferulae*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, n. 6, p. 539–546, 2017.

CHOI, J.M. et al. Industrial applications of enzyme biocatalysis: status and future aspect. **Biotechnol Adv.** v. 33, p. 1443–1454, 2015.

CLARK, J.H.; DESWARTE, F.E.I. The biorefinery concept—an integrated approach. In: Clark JH, Deswarte FEI (eds) Introduction to chemicals from biomass. **Wiley library**, Chichester, p. 1–20, 2008.

CASTILLO, T. A. et al. Mycelial growth and antimicrobial activity of *Pleurotus* species (Agaricomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 20, n. 2, p. 191–200, 2018.

COELHO, M. P. S. L.V. et al. Alternativa fontes nutricionais para desenvolvimento da fase micelial e produção de hidrolases por cogumelo comestível de floresta tropical / Alternative of nutritional sources for the development of the mycelial phase and production of hydrolases by edible mushroom from tropical forest. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 22890–22907, 2021.

CONDÉ, F., et al. Farinha de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. (Cogumelo Hiratake) enriquecido em ferro. **Ciência e Natura [online]**,39. Enero- ISSN 0100-8307.2017.

CORRÊA, R. C. G. et al. Bioactive formulations prepared from fruiting bodies and submerged culture mycelia of the Brazilian edible mushroom *Pleurotus ostreatoroseus* Singer. **Food and Function**, v. 6, n. 7, p. 2155–2164, 2015.

CORRÊA, R. C. G. et al. Biotechnological, nutritional and therapeutic uses of *Pleurotus* spp. (Oyster mushroom) related with its chemical composition: A review on the past decade findings. **Trends in Food Science and Technology**, v. 50, p. 103–117, 2016.

CHUN, S. S.; CHAMBERS, E.; HAN, I. Development of a sensory flavor lexicon for mushrooms and subsequent characterization of fresh and dried mushrooms. **Foods**, v. 9, n. 8, 2020.

COSTA, J. et al. Intelligent mushroom harvest prediction system proposal. **Iberian Conference on Information Systems and Technologies (CISTI)**, pp. 1-7. 2018.

CUI, M. et al. Submerged fermentation production and characterization of intracellular triterpenoids from *Ganoderma lucidum* using HPLC-ESI-MS. **Journal of Zhejiang University Science B**. v. 12, p.998-1010, 2015.

DE PRETTO, C. et al. Possibilities for Producing Energy, Fuels, and Chemicals from Soybean: A Biorefinery Concept. **Waste and Biomass Valorization**, v. 9, n. 10, p. 1703–1730, 2017.

DEL CERRO, C. et al. Intracellular pathways for lignin catabolism in white-rot fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 118, n. 9, p. 1–10, 2021.

DULAY, R. M. R.; RIVERA, A. G. C.; GARCIA, E. J. B. Mycelial growth and basidiocarp production of wild hairy sawgill *Lentinus strigosus*, a new record of naturally occurring mushroom in the Philippines. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. 2017.

FARIA, E. O.; CALDEIRA-PIRES, A. Economia Circular e Bioeconomia: Como as Abordagens se Relacionam? **International Workshop Advances in Cleaner production**, 2018.

FAVA, F. et al. Biowaste biorefinery in Europe: Opportunities and research & development needs. **New Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 100–108, 2015.

FERREIRA, A. F. Biorefinery Concept. **Lecture Notes in Energy**. p. 1–6, 2007.

FONSECA, T. R. B.; BARRONCAS, J. F.; TEIXEIRA, M. F. S. Produção em matriz sólida e Caracterização parcial das proteases de cogumelo comestível da Floresta Amazônica. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 8, n. 1, 2014.

FONSECA, T. R. B. et al. Cultivation and nutritional studies of an edible mushroom from North Brazil. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 30, p. 1814–1822, 2015.

FRAGA, S. Fibra dietética de cogumelo como ingrediente alimentar. **Agrote: revista técnico científica agrícola**. n. 8, 2013.

FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis: Uma revisão. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 64(2), p. 149-154, 2005.

FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n.1, p.154-157. 2007.

GAO, M. et al. Electricity Enhancement by MFCs from Food Waste Ethanol Fermentation Recycle Stillage Effect of Dilution Ratio and Addition of Tween 80. **Chemistry select**, 2020.

GEISENDORF, S.; PIETRULLA, F. The circular economy and circular economic concepts—a literature analysis and redefinition. **Thunderbird International Business Review**, v. 60, n. 5, p. 771–782, 2018.

GODSWILL, C.; SOMTOCHUKWU, V.; KATE, C. the Functional Properties of Foods and Flours. **International Journal of Advanced Academic Research | Sciences**, v. 5, n. 11, p. 2488–9849, 2019.

GÓMEZ, M.; GUTKOSKI, L. C.; BRAVO-NÚÑEZ, Á. Understanding whole-wheat flour and its effect in breads: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 6, p. 3241–3265, 2020.

GRIFFIN, D. H. Fungal physiology (2nd Edition). **J. Wiley & Sons, Inc.**, New York, p. 458. 1994.

GRIMM, D.; KUENZ, A.; RAHMANN, G. Integration of mushroom production into circular food chains. **Organic Agriculture**, v. 11, n. 2, p. 309–317, 2021.

GUPTA, A.; JANA, A. K. Effects of wheat straw solid contents in fermentation media on utilization of soluble/insoluble nutrient, fungal growth and laccase production. **3 Biotech**, v. 8, n. 1, 2018.

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

GUTIÉRREZ, C. D. B.; SERNA, D. L. R.; ALZATE, C. A. C. A comprehensive review on the implementation of the biorefinery concept in biodiesel production plants. **Biofuel Research Journal**, v. 4, n. 3, p. 691–703, 2017.

HAKOBYAN, L., YAN, G., ARMEN, T. Yeast extract as an effective nitrogen source stimulating cell growth and enhancing hydrogen photoproduction by *Rhodobacter sphaeroides* strains from mineral springs. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 37, p. 6519–6526, 2012.

HAN W. et al. Bioethanol production from waste hamburger by enzymatic hydrolysis and fermentation, **Journal of Cleaner Production**, v. 264, 2020.

HARADA-PADERMO, S. DOS S. et al. Umami Ingredient: Flavor enhancer from shiitake (*Lentinula edodes*) byproducts. **Food Research International**, v. 137, n. June, p. 109540, 2020.

HOA, H., CHUN-LI, W. The Effects of Temperature and Nutritional Conditions on Mycelium Growth of Two Oyster Mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus Cystidiosus*). **Mycobiology March**, 43(1): 14-23, 2015.

HASSAN, S. S.; WILLIAMS, G. A.; JAISWAL, A. K. Lignocellulosic Biorefineries in Europe: Current State and Prospects. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 3, p. 231–234, 2019.

HELM, C., CORADIN, J. KESTRING, D. Avaliação da Composição Química dos Cogumelos Comestíveis *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Agaricus bisporus portobello*, *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus*. **Comunicado técnico**. ISSN 1517-5030 Colombo, PR. 2009.

INACIO, F. D. et al. Proteases of wood rot fungi with emphasis on the genus *Pleurotus*. **BioMed Research International**, v.2015, 2015.

JEGADEESH, R. et al. Cultivation of Pink Oyster mushroom *Pleurotus djamor var. roseus* on various agro-residues by low cost technique. n. **J. Mycopathol. Res.** 56(3): 213-220, 2018; (ISSN 0971-3719), December, 2018.

JEZNABADI, E. K.; JAFARPOUR, M.; EGHBALESAIED, S. King oyster mushroom production using various sources of agricultural wastes in Iran. **International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture**, v. 5, n. 1, p. 17–24, 2016.

JUNIOR, E. S. R. et al. Composição Química, Efeito Antioxidante e Antiproliferativo Do Cogumelo Brasileiro *Pleurotus ostreatoroseus* Singer Chemical Composition, Antioxidant And Anti Proliferative Effect Of Brazilian Mushroom *Pleurotus Ostreatoroseus* Singer. p. 34642–34656, 2021.

KAMTHAN, R.; TIWARI, I. Agricultural Wastes- Potential Substrates For Mushroom Cultivation. **European Journal of Experimental Biology**, v. 7, n. 5, p. 3–6, 2017.

KORHONEN, J.; HONKASALO, A.; SEPPÄLÄ, J. Circular Economy: The Concept and its Limitations. **Ecological Economics**, v. 143, p. 37–46, 2018.

KTENIOUDAKI, F. BUTLER, E. GALLAGHER, D. Characteristics of Irish wheat varieties II. Aeration profile and baking quality. **LWT Food Sci. Technol.** 44 (3) (2011), pp. 602–610.2011.

KUIJK, S. J. A. Fungal treatment of lignocellulosic biomass fungal treatment of lignocellulosic biomass. Tese de Doutorado. p.192. 2016

KUMARATHILAKA, P. et al. Arsenic accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) is influenced by environment and genetic factors. **Science of the Total Environment**, v. 642, p. 485–496, 2018.

KUMARI, K. Mushrooms as source of dietary fiber and its medicinal value: A review article. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 9, n. 2, p. 2075–2078, 2020.

LATINFOODS. **Tabla de composición de alimentos de América Latina**. 2002. (<http://www.fao.org/LAmerica/grupo>). Acesso em 17/08/2019.

LAVELLI, V. et al. Circular reuse of bio-resources: The role of: *Pleurotus* spp. in the development of functional foods. **Food and Function**, v. 9, n. 3, p. 1353–1372, 2018.

LACAZ, C. S. et al. Tratado de micologia médica Lacaz. **Sarvier**. v. 1, p. 304, 2002.

LEONHARDT, R. H. et al. Heterologous production of the stain solving peptidase PPP1 from *Pleurotus pulmonarius*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, n. 5, p. 845–853, 2016.

LECHNER, B. E.; WRIGHT, J. E.; ALBERTÓ, E. The genus *Pleurotus* in Argentina. **Mycologia**, v. 96, n. 4, p. 845–858, 2004.

LEHMANN, U. et al. Nutrient profiling for product reformulation: Public health impact and benefits for the consumer. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 76, n. 3, p. 255–264, 2017.

LIGUORI, R.; FARACO, V. Biological processes for advancing lignocellulosic waste biorefinery by advocating circular economy. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 13–20, 2016.

LIMA, S. **Farinha de trigo enriquecida com pó de Pleurotus sajor-caju**. Brazilian Journal of Food Research, Campo Mourão, v. 8 n. 4, p. 104-127. 2017.

LIU, X.; KOKARE, C. Microbial Enzymes of Use in Industry. **Biotechnology of Microbial Enzymes**, p. 267–298, 2017.

MACHADO, A. R. G. et al. Nutritional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 621–627, 2016.

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

MAFTOUN, P. et al. The Edible Mushroom *Pleurotus* spp.: I. Biodiversity and Nutritional Values. **International Journal of Biotechnology for Wellness Industries**, v. 4, n. 2, p. 67–83, 2015.

MAGALHÃES, A. A. S. et al. Produção e caracterização de enzimas proteolíticas de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693 do bioma amazônico (Polyporaceae). **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Cienc. Nat.**, Belém, v. 14, n. 3, p. 453-461, set.-dez. 2019.

MAGALHAES, B. et al. Consumo de fibras alimentares entre indivíduos adultos em um supermercado de são luís, maranhão. **Rev Pesq Saúde**, 17(3): 137-140, set-dez, 2016.

MANAN, M. A.; WEBB, C. Design aspects of solid state fermentation as applied to microbial bioprocessing. **Appl Biotechnol Bioeng**, 4(1):511–532 ;2017.

MARTIM, S. R. et al. Proteases ácidas de cogumelo comestível da Amazônia para aplicabilidade industrial. **Mus. Para. Emílio Goeldi. Cienc. Nat.**, v. 12, n. 3, p. 353–362, 2017.

MARTINS, O. G. et al. Sobra de alimentos como alternativa para a formulação de novos substratos para o cultivo de food surplus as an alternative for the elaboration of new substrates for the cultivation of *Pleurotus*. **Revista Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 11, p. 505–518, 2018.

MASSAGUER, P.R. Microbiologia dos processos alimentares. São Paulo: **Varela**, p. 258, 2005.

MILLAR, K. A. et al. Dough properties and baking characteristics of white bread, as affected by addition of raw, germinated and toasted pea flour. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 56, n. June, p. 102189, 2019.

MKHIZE, S. Performance of *Pleurotus pulmonarius* mushroom grown on maize stalk residues supplemented with various levels of maize flour and wheat bran. **Food Sci. Technol.** vol.37, n.4 [cited 2018-08-28], pp.570-577. ISSN 0101-2061. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-457x.27216>. 2017.

MOHAMED, M. F. et al. Fruiting bodies yield of oyster mushroom (*Pleurotus columbinus*) as affected by different portions of compost in the substrate. **International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture**, v. 5, n. 4, p. 281–288, 2016.

MOHAN, V. S. et al. Waste biorefinery models towards sustainable circular bioeconomy: Critical review and future perspectives. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 2–12, 2016.

MORSELETTTO, P. Targets for a circular economy. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 153, n. November 2019, p. 104553, 2020.

MYRONICHEVA, O. et al. Assessment of the growth and fruiting of 19 oyster mushroom strains for indoor cultivation on lignocellulosic wastes. **BioResources**, v. 12, n. 3, p. 4606–4626, 2017.

NASCIMENTO, J. F. et al. Avaliação físico-química de polpas de cupuaçu, *Theobroma grandiflorum* Schum, industriais e artesanais. **PUBVET** v.13, n.3, a300, p.1-6, Mar., 2019.

TACO. Tabela de composição de alimentos. NEPA- Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação. UNICAMP. Campinas, São Paulo, Brasil., 105 p. 2006.

TACO. - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. NEPA–UNICAMP. 4 ed. São Paulo: Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação, 2011.

PAUL, T. T.; NGOZIKA, I. P. Growth Performance and Yield of the Edible White Rot Fungus (*Pleurotus ostreatus*) on Different Agro Waste Materials. **International Journal Agricultural and Biosystems Engineering**, v. 11, n. 8, p. 642–645, 2017.

PACKKIA-DOSS, P. P. et al. Effect of supplementation of wheat bran on dough aeration and final bread volume. **Journal of Food Engineering**, v. 252, n. December 2018, p. 28–35, 2019.

PANDA, S. K. et al. Microbial-processing of fruit and vegetable wastes for production of vital enzymes and organic acids: Biotechnology and scopes. **Environmental Research**, v. 146, p. 161–172, 2016.

PEIGHAMBARDOUST, S.H. et al. Aeration of bread dough influenced by different way of processing. **J. Cereal Sci.** **51**, 89e95.<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2009.10.002>. 2010.

PHILIPPINI, R. R. et al. Agroindustrial Byproducts for the Generation of Biobased Products: Alternatives for Sustainable Biorefineries. **Frontiers in Energy Research**, v. 8, n. July, p. 1–23, 2020.

PICORNELL-BUENDÍA, M. R.; PARDO-GIMÉNEZ, A.; DE JUAN-VALERO, J. A. Qualitative parameters of *pleurotus ostreatus* (Jacq.) p. kumm. mushrooms grown on supplemented spent substrate. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 16, n. 1, p. 101–117, 2016.

POSTEMSKY, P. D. et al. Pilot-scale bioconversion of rice and sunflower agro-residues into medicinal mushrooms and laccase enzymes through solid-state fermentation with *Ganoderma lucidum*. **Bioresource Technology**, v. 231, p. 85–93, 2017.

PRADO, F. B. et al. Production of bioactive compounds by *Aspergillus* kept under two preservation conditions. **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Cienc. Nat.**, Belém, v. 12, n. 1, p. 37-47, jan.-abr, 2017.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T. L. Cogumelos no Brasil – Fungos Agaricales s. l. **LupaGraf**, v. 3, n. 1, p. 67-75, 2018.

RABUSKE, E. R. et al. Substratos alternativos para o cultivo do cogumelo comestível ostra salmão: *Pleurotus djamor*. **Caderno de Pesquisa**. Santa Cruz do Sul, v. 31, n. 2, p. 22-24, mai./ago. 2019.

RASHAD, F. M. et al. Recycling of agro-wastes for *Ganoderma lucidum* mushroom production and *Ganoderma* post mushroom substrate as soil amendment. **Waste Management**, v. 88, p. 147–159, 2019.

RATHORE, H.; PRASAD, S.; SHARMA, S. Mushroom nutraceuticals for improved nutrition and better human health: A review. **PharmaNutrition**, v. 5, n. 2, p. 35–46, 2017.

RAHI, D. K.; THAKUR, S.; MALIK, D. Comparative qualitative profile of various extracellular enzymes produced by two indigenous fungus *Lentinus cladopus* and *Pleurotus pulmonarius*. **International Journal of Scientific Research in Biological Sciences**, v. 5, n. 3, p. 85–87, 2018.

RAJORIYA, A. GUPTA, N. GUPTA, N. Useful Extracellular Enzymatic Activity of Mycelial Culture of Some Edible Mushrooms of Odisha. **Agricultural Research & Technology:Open Access Journal**, v. 3, n. 1, 2016.

RAMAN, J. et al. Cultivation and Nutritional Value of Prominent *Pleurotus* Spp.: An Overview. **Mycobiology**, v. 49, n. 1, p. 1–14, 2021.

RAMOS, A.C. et al. Cogumelos - Produção, Transformação e Comercialização. Portugal. **Publinsustria**, 2015.

RAZZAQ, A. et al. Microbial proteases applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, n. JUN, p. 1–20, 2019.

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

REIS, M. F.; ROCHA, C. L. M. S. C. Efeito de extratos aquosos dos cogumelos *Lentinula edodes* E *Pleurotus ostreatoroseus* sobre o desenvolvimento vegetativo de *Aspergillus nidulans*. **SaBios: Rev. Saúde e Biol.** v.11, n.2, p.42-52, 2016.

RITOTA, M.; MANZI, P. *Pleurotus* spp. cultivation on different agri-food by-products: Example of biotechnological application. **Sustainability (Switzerland)**, v. 11, n. 18, 2019.

ROLLAN, M. G. Cultivo de Setas y Trufas. 4ª ed., Espanha: **Artes Gráficas Cuesta S.A.**, p. 239, 2003.

ROYSE, D. J.; BAARS, J.; TAN, Q. Current Overview of Mushroom Production in the World. **Edible and Medicinal Mushrooms**, v. 2010, p. 5–13, 2017.

SAAD, A., et al. Aproveitamento de resíduos agrícolas no cultivo do cogumelo medicinal *Ganoderma lucidum* utilizando a tecnologia chinesa “Jun-Cao”. **Ambiência Guarapuava (PR)** v.13 n.3 p. 271 - 283 Set/Dez 2017 ISSN 1808 – 0251. DOI:10.5935/ambiencia.2017.03.03.2017.

SADH, P. K.; DUHAN, S.; DUHAN, J. S. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 5, n. 1, p. 1–15, 2018.

SALAMI, A. O.; BANKOLE, F. A. Don’ t Waste the ‘Wastes’, they are Ways to Wealth. **Ec Microbiology**, v. 9, n. September, p. 499–514, 2018.

SALMONES, D. *Pleurotus djamor*, un hongo con potencial aplicación biotecnológica para el neotrópico. **Scientia Fungorum**, v. 46, p. 73–85, 2017.

SANTOS, A. F.; ALVES, R. S.; LEITE, N. S.; FERNANDES, R. P. M. Estudos bioquímicos da enzima bromelina do *Ananas comosus* (abacaxi). v. 5, n. August, p. 1–6, 2009.

SARDAR, H. et al. Agro-industrial residues influence mineral elements accumulation and nutritional composition of king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*). **Scientia Horticulturae**, v. 225, n. June, p. 327–334, 2017.

SEKAN, A. S. et al. Green potential of *Pleurotus* spp. in biotechnology. **PeerJ**, v. 7, p. 1–27, 2019.

SHARMA, V. P. et al. Status of mushroom production in India. **Mushroom Research**, v. 26, n. 2, p. 111–120, 2017.

SHELDRAKE, M. Entangled Life: How Fungi Make Our Worlds, Change Our Minds and Shape Our Futures (Hardback). v. 1, p.5 (368 pgs), 2020.

SILVA, G. M. DE M. E et al. Screening, production and biochemical characterization of a new fibrinolytic enzyme produced by *Streptomyces* sp. (Streptomycetaceae) isolated from Amazonian lichens. **Acta Amazonica**, v. 46, n. 3, p. 323–332, 2016.

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

SILVA, M., YONAMINE, G.H, MITSUIKI, L.Desenvolvimento e avaliação do pão francês caseiro sem sal. **Braz. J. Food Technol.**6(2):229-36. 2003.

SILVA, R. M. DA et al. Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated in agroindustrial wastes of palm oil fruits and cocoa almonds. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 87, p. 1–10, 2020.

SILVA, R. R., Bacterial and fungal proteolytic enzymes: production, catalysis and potential applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 183(1): 1-19. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2427-2>. 2017.

SILVERMAN, J.; CAO, H.; COBB, K. Development of Mushroom Mycelium Composites for Footwear Products. **Clothing and Textiles Research Journal**, v. 38, n. 2, p. 119–133, 2020.

SIQUEIRA, F. G., et al. Simpósio Nacional sobre Cogumelos Comestíveis e Encontro de Biotecnologia da UNIFESP, 1. 2017, São José dos Campos, SP. **Anais Brasília**, DF: Embrapa, p.91-102. 2017.

SOUZA, R. A. T. et al. Nutritional composition of bioproducts generated from semi-solid fermentation of pineapple peel by edible mushrooms. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 12, p. 451–457, 2016.

SPERANDIO, G. B.; FERREIRA FILHO, E. X. Fungal co-cultures in the lignocellulosic biorefinery context: A review. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 142, n. December 2018, p. 109–123, 2019.

SUN, L. BIN et al. Advances in umami taste and aroma of edible mushrooms. **Trends in Food Science and Technology**, v. 96, n. October 2019, p. 176–187, 2020.

TAKKELLAPATI, S.; LI, T.; GONZALEZ, M. A. An overview of biorefinery-derived platform chemicals from a cellulose and hemicellulose biorefinery. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 20, n. 7, p. 1615–1630, 2018.

TOLERA, K. D.; ABERA, S. Nutritional quality of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) as affected by osmotic pretreatments and drying methods. **Food Science and Nutrition**, v. 5, n. 5, p. 989–996, 2017.

UBANDO, A. T.; FELIX, C. B.; CHEN, W. H. Biorefineries in circular bioeconomy: A comprehensive review. **Bioresource Technology**, v. 299, n. November 2019, 2020.

VENKATA MOHAN, S. et al. Waste biorefinery models towards sustainable circular bioeconomy: Critical review and future perspectives. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 2–12, 2016

VETTER, J. Biological values of cultivated mushrooms-a review. **Acta Alimentaria**, v. 48, n. 2, p. 229–240, 2019.

VIEIRA, F. R. Substrato de cultivo para os cogumelos *Pleurotus ostreatus* E *Agaricus bisporus*: composição físico-química e metagenômica microbiana. **Habitat**, 2016.

VILAR, D S. et al. Lignin-modifying enzymes: a green and environmental responsive technology for organic compound degradation. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, n. February, 2021.

WALTER, M., MARCHEZAN, E., AVILA, L. Arroz: composição e características nutricionais. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.38, n.4, p.1184-1192, jul, ISSN 0103-8478, 2008.

WALKER, G. M.; WHITE, N. A. Introduction to Fungal Physiology. Fungi: Biology and Applications, Third Edition. Edited by Kevin Kavanagh. **John Wiley & Sons, Inc.** Published 2018.

WANG, Q. et al. Bioactive mushroom polysaccharides: A review on monosaccharide composition, biosynthesis and regulation. **Molecules**, v. 22, n. 6, 2017.

WANZENBÖCK, E. et al. Wheat bran biodegradation by edible *Pleurotus* fungi – A sustainable perspective for food and feed. **LWT - Food Science and Technology**, v. 86, p. 123–131, 2017.

YAMAUCHI, M. et al. Cultivation of oyster mushroom (*Pleurotus ostrreatus*) on fermented moso bamboo sawdust. **Journal of King Saud University - Science**, v. 31, n. 4, p. 490–494, 2018.

YANG, D et al. Tea waste: an effective and economic substrate for oyster mushroom cultivation. **J. Sci. Food Agric.** 1: 1-5. 2015.

ZÁRATE-SALAZAR, J. R. et al. Use of lignocellulosic corn and rice wastes as substrates for oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus* Jacq.) cultivation. **SN Applied Sciences**, v. 2, n. 11, p. 1–10, 2020.