
Cogumelo ostra salmão: características de crescimento e produção de proteases em escala laboratorial

Salmon oyster mushroom: growth characteristics and protease production on a laboratory scale

Elliza Emily Perrone Barbosa^{1*}, Laynah Pimenta¹, Ana Kézia Pimentel de Brito¹, Samara Picanço Batista¹, Salomão Rocha Martim², Maria Francisca Simas Teixeira¹

Received: 2023-01-03 | Accepted: 2023-02-05 | Published: 2023-02-11

RESUMO

Pleurotus se destacam pela facilidade de cultivo e como excelentes fontes de enzimas proteolíticas. Esta pesquisa teve por objetivo avaliar o crescimento micelial e atividade de proteases extracelulares de *Pleurotus ostreatoroseus*. O cogumelo foi cultivado em ágar batata dextrose (BDA) suplementado com extrato de levedura (YE) 0,5% (p/v). A velocidade do crescimento micelial radial (VCR) e densidade micelial ocorreu em diferentes 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), ágar extrato de Cará-de-espinho (CEIN), ágar extrato de Ariá (EA). A atividade proteolítica foi determinada pelo método de bloco de gelose. No crescimento micelial vertical (VCM) foram utilizados: Exocarpo de cupuaçu (CC), açaí (Sac), abacaxi (CsAb) e serragem (SER), suplementados com farelo de arroz (FA) ou farelo de trigo (FT). 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 ± 0,10 mm/dia). No entanto, ágar GYP apresentou forte densidade micelial. A mistura de substrato significativa e com forte densidade micelial ocorreu em Sac+FA (0,61 ± 0,09 cm/dia). Os meios testados foram eficientes na produção de proteases extracelulares por este cogumelo.

Palavras-chave: *Pleurotus*; Açaí; Resíduo; Densidade micelial; Enzimas.

ABSTRACT

Pleurotus have an easy cultivation and are excellent sources of proteolytic enzymes. The aimed was evaluate the mycelial growth and extracellular protease activity of *Pleurotus ostreatoroseus*. The mushroom was grown on potato dextrose agar (BDA) with yeast extract (YE) 0.5% (w/v). The radial mycelial growth velocity (RCV) and mycelial density occurred on different 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), torn yam extract agar (CEIN), aria extract agar (EA). Proteolytic activity was determined by the gelose block method. In mycelial growth (VCM) is used: cupuaçu exocarp (CC), açaí (Sac), pineapple (CsAb) and sawdust (SER), supplemented with rice bran (FA) or wheat bran (FT) were used. Proteases were extracted in sterile distilled water under 180 rpm agitation at 30 °C. Significant RCV was observed in MEA+YE (12.32 ± 0.10 mm/day). However, GYP agar showed strong mycelial density. Significant substrate mixture with strong mycelial density occurred on Sac+FA (0.61 ± 0.09 cm/day). The tested media were efficient in the production of extracellular proteases by this mushroom.

Keywords: *Pleurotus*; Açaí; Waste; Mycelial density; Enzymes.

¹ Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade do Federal do Amazonas (PPGBIOTEC-UFAM)

*E-mail: elliza.perrone01@gmail.com

² Universidade Nilton Lins

INTRODUÇÃO

A exploração de resíduos lignocelulósicos está promovendo o desenvolvimento de produtos inovadores e estimulando novas oportunidades de negócio, especialmente para a agricultura familiar. Com essa finalidade, a busca por substratos alternativos para produção de cogumelos está em ascendência por ser uma solução ecologicamente correta e promover a redução do impacto ambiental negativo (KORHONEN *et al.*, 2018, RESHMY *et al.*, 2022).

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

Nesse contexto, os fungos comestíveis são promissores 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).

Fungos de podridão branca, ocorrem em florestas temperadas, tropicais e subtropicais. Cogumelos comestíveis representados pelo gênero *Pleurotus* são cultivados globalmente e considerados comercialmente importantes. Degradam celulose, hemicelulose, lignina e são fontes de enzimas, como proteases, celulasas e amilases (RAMAN *et al.*, 2021, COELHO *et al.*, 2022). Dentre estes biocatalisadores, as proteases se destacam por representar mais de 70% do mercado mundial e por serem utilizadas em diversos processos industriais, como na indústria alimentícia, de medicamentos, e detergentes (BARBOSA *et al.*, 2020; BRITO *et al.*, 2021; SANTANA *et al.*, 2022)

Pleurotus ostreatoroseus Singer. apresenta coloração rósea, facilidade de crescimento, e como produto alimentício fornece compostos nutricionais como proteínas e fibras. Em função dessas características *P. ostreatoroseus* 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; COELHO *et al.*, 2021, COELHO *et al.*, 2022).

Desse modo, esta pesquisa teve por objetivo avaliar o crescimento de *P. ostreatoroseus* em diferentes meios de cultura, bem como em resíduos lignocelulósicos como substratos alternativos para o cultivo e a respectiva produção de proteases extracelulares.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo e Manutenção de *Pleurotus ostreatoroseus*

Pleurotus ostreatoroseus DPUA 1720, foi 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), em placa de petri. Os cultivos foram mantidos a 28 °C por oito dias, na ausência de luz e umidade a 60 %.

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

Preparação do Inóculo

Para a preparação do inóculo da cultura obtida no item anterior 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 submetida 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).

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

No cultivo de *P. ostreatoroseus* foi utilizado como inóculo um disco micelial de 10 mm de diâmetro retirado da cultura obtida anteriormente. 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 citado no item anterior, 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 avaliada 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 vigor micelial significativo foi utilizado nos experimentos citados a seguir.

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 na avaliação do crescimento micelial e radial (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.

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.

Crescimento micelial de *P. ostreaoroseus* em resíduo lignocelulósico em tubo de ensaio

Para avaliação do crescimento micelial de *P. ostreaoroseus* em resíduo lignocelulósico, da cultura matriz selecionada nos ensaios realizados utilizando meios sintético ou natural 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.

$$\text{Equação II: } VMC = \frac{V_f - V_i}{T_f} \quad [\text{VMC} = \text{Velocidade média do crescimento micelial ao dia; } V_f = \text{medida do crescimento micelial no tempo final (cm); } V_i = \text{medida do crescimento micelial no tempo inicial (cm); } T_f = \text{Tempo final (dias)}].$$

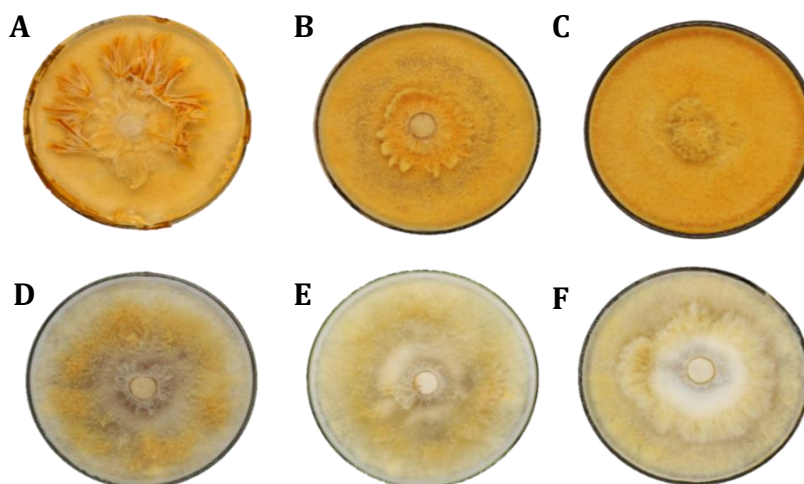
Análise Estatística

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.

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, mediamente adensado em MEA e AE, nos demais meios, fracamente adensado (Figura 1).

Figura 1. Densidade do micélio de *P. ostreatoroseus* nos cultivos em diferentes meios de cultura.



Fonte: Barbosa, 2020.

Meios testados: (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.

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).

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 [VMC (mm/dia)]	Micélio Densidade (Vigor Micelial)
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	Mediamente 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	Mediamente 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: Mediamente adensado; Nota 3: Fortemente adensado. Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo método de Tukey (p<0,05).

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, no estudo de Brito *et al.* (2021) com *P. djamor*, foi observado crescimento inferior 11,91% em relação ao de *P. ostreatoroseus* observado neste estudo. 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).

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

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, COELHO *et al.*, 2021).

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, COELHO *et al.*, 2022). 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.

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 Inhamo 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.

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 Inhamo 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 ($p < 0,05$)

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 com valor 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.

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; BANO *et al.*, 2018; BATISTA *et al.*, 2021).

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.

Batista *et al.* (2021) e Brito *et al.* (2021) verificaram dados similares a este estudo com as espécies de *L. crinitus* e *P. djamor* quando cultivados em serragem suplementada com farelo de arroz ou trigo, respectivamente, apresentando crescimento micelial significativo, no entanto com densidade do micélio classificada como fracamente adensada.

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}	Mediamente adensado
CsAb+FA	0,29 ± 0,03 ^c	Mediamente adensado
CsAb+FT	0,45 ± 0,04 ^{b, c}	Mediamente 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.

Cogumelos crescem em diferentes tipos de resíduos, condição que favorece a colonização de folhas, frutos, sementes, caules, entre outros. Essa capacidade de adaptação em diversos substratos lignocelulósicos favorece o seu cultivo e possibilita diversos ciclos de produções (FONSECA *et al.*, 2015; PANDEY *et al.*, 2020)

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; COELHO *et al.*, 2022).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos evidenciam a influência da qualidade nutricional dos substratos no crescimento de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720. Ágar GYP e ágar malte foram os meios eficientes para crescimento e expressão da densidade micelial, respectivamente. Através do método do bloco de gelose, foi possível verificar que *Pleurotus ostreatoroseus* sintetiza proteases em meios de cultura sintéticos ou naturais, porém com atividade de degradação enzimática significativa em ágar Malte (MEA) suplementado com extrato de levedura 0,5 % (p/v). A mistura de resíduos lignocelulósicos apropriadas para crescimento e produção de *P. ostreatoroseus* foram resíduos de processamento de açaí suplementado com farelo de arroz ou farelo de trigo.

AGRADECIMENTOS

Ao laboratório de Micologia Médica e Industrial da Universidade Federal do Amazonas - UFAM e a Coleção de Culturas-DPUA/UFAM. Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – PPGBIOTEC/UFAM. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazona - FAPEAM. Aos colegas colaboradores Mestres e Doutores.

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.

BARBOSA, E. E. P.; PIMENTA, L.; BRITO, A. K. P.; MARTIM, S. R.; TEIXEIRA, M. F. Cultivo de cogumelo comestível em resíduos lignocelulósicos de floresta tropical para produção de proteases. **Brazilian Journal of Development**. Curitiba, v. 6, n. 11, p.92475-92485, nov. 2020.

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

BATISTA, S. C. P. et al. Biomassa residual do processamento de produtos hortícolas da Amazônia para crescimento micelial e produção de proteases por uma espécie de cogumelo comestível. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 3, e35310313393, 2021.

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 mycelial phase and production of hydrolases by edible mushroom from tropical forest. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 22890–22907, 2021.

COELHO, M. P. S. L. V. et al. Ciclo de produção de cogumelos comestíveis cultivados em resíduos lignocelulósicos da fruticultura Amazônica: Um estudo de caso. **Revista Concilium**, Vol. 22, n. 2, 2022.

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.

GURUMALLES, 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.
- PANDEY, A. K.; RAJAN, S.; SARSAIYA, S.; JAIN, S. K. Mushroom for the National Circular Economy. **International Journal of Scientific Research in Biological Sciences**, v.7, n. 6, p.58-66, dec. 2020.
- 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.
- RESHMY, R. et al. **Updates on high value products from cellulosic biorefinery**. Vol 308, ISSN 0016-2361, 2022.
- 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.

SANTANA, R. S. et al. Produção e caracterização de enzimas proteolíticas do cogumelo Ostra-Rei por fermentação submersa. **Revista Concilium**, vol. 22, nº 2. 2022.

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.; MENDONCA, 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.** 2018.