

PRODUÇÃO DE BIOMASSA, PROTEASES E EXOPOLISSACARÍDEOS POR *Pleurotus ostreatus* EM CULTIVO LÍQUIDO

Clodoaldo Campos¹
Débora Camila Dias²
Juliana Silveira do Valle³
Nelson Barros Colauto⁴
Giani Andrea Linde⁵

CAMPOS¹, C; DIAS², D. C; VALLE³, J. S; COLAUTO⁴, N. B; LINDE⁵, G. A. Produção de biomassa, proteases e exopolissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* em cultivo líquido. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR*, Umuarama, v. 13, n. 1, p. 19-24, jan./jun. 2010.

RESUMO: A renina é um complexo natural de enzimas (endopeptidases aspárticas) utilizada na produção de queijos, extraída principalmente de estômagos de bezerros jovens. A maior demanda por queijos e o alto custo da renina têm incentivado a procura de fontes alternativas de proteases. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi verificar as condições de tempo e temperatura para a produção de biomassa, exopolissacarídeos (EPS) e proteases por *Pleurotus ostreatus* em cultivo líquido. O micélio foi crescido em meio Pontecorvo, enriquecido com proteína isolada a 22, 25 ou 28°C, com amostragens aos 3, 6, 9, 14 e 17 dias de cultivo. A biomassa foi separada por centrifugação; EPS foram determinados por precipitação com etanol e a atividade proteolítica determinada pela ação do extrato enzimático sobre caseína solúvel alcalina 1% (m/v). Verificou-se que tanto o tempo quanto a temperatura afetaram ($p \leq 0,05$) a produção de biomassa, EPS e proteases. Concluiu-se que a maior produção de biomassa de *P. ostreatus* ocorre após nove dias de cultivo a 25°C; a produção de EPS aumenta com a ampliação do tempo de cultivo, com maior produção a 22°C; e a máxima produção de proteases ocorre aos 14 dias de cultivo a 28°C.

PALAVRAS-CHAVE: *Pleurotus ostreatus*. Queijo. Enzima. Temperatura. Exopolissacarídeo.

BIOMASS, EXOPOLYSACCHARIDE AND PROTEASE PRODUCTION BY PLEUROTUS OSTREATUS IN LIQUID CULTIVATION

ABSTRACT: Rennet is a natural complex of enzymes (aspartic endopeptidases) and is often used in the production of cheese. Those enzymes (proteases) are extracted from abomasums of young ruminant animals. The high cheese demand associated with the high curdle cost have been stimulated the searching for alternative protease sources. The objective of this study was to verify the time and temperature conditions for biomass, exopolysaccharide (EPS) and protease production by *Pleurotus ostreatus* in liquid cultivation. The mycelium was grown in Pontecorvo medium added with isolated soy protein (5%) and maintained at 22, 25 or 28°C, with samplings at 3, 6, 9, 14 or 17 days of cultivation.

The biomass was separated by centrifugation, EPS were separated by ethanol precipitation and the proteolytic activity was determined by enzymatic extract action on alkaline soluble casein 1% (m/v). It was verified that time and temperature affect ($p \leq 0.05$) biomass, EPS and protease production. Most of *P. ostreatus* biomass production occurs after nine days of cultivation at 25°C. EPS production rise with increasing of cultivation time, with higher production at 22°C. Higher protease activity occurs at 28°C on 14 days of cultivation.

KEYWORDS: *Pleurotus ostreatus*. Cheese. Enzyme. Temperature. Exopolysaccharide.

PRODUCCIÓN DE BIOMASA, PROTEASAS Y EXOPOLISACÁRIDOS POR *Pleurotus ostreatus* EN CULTIVO LÍQUIDO

RESUMEN: La renina es un complejo natural de enzimas (endopeptidasas aspárticas) utilizada en la producción de quesos, extraída principalmente de estômagos de becerros jóvenes. La mayor demanda por quesos y el alto costo de la renina ha incentivado la búsqueda de fuentes alternativas de proteasas. Así que, el objetivo de esta investigación fue verificar las condiciones de tiempo y temperatura para la producción de biomasa, exopolisacáridos (EPS) y proteasas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo líquido. El micelio creció en medio a Ponte corvo, enriquecido con proteína aislada a 22, 25 o 28°C, con muestras a los 3, 6, 9, 14 y 17 días de cultivo. Se separó la biomasa por centrifugación; EPS fueron determinados por precipitación con etanol y la actividad proteolítica determinada por la acción del estrato enzimático sobre caseína soluble alcalina 1% (m/v). Se verificó que tanto el tiempo como la temperatura afectaron ($p \leq 0,05$) a la producción de biomasa, EPS y proteasas. Se concluye que la mayor producción de biomasa de *P. ostreatus* ocurre tras nueve días de cultivo a 25°C; la producción de EPS aumenta con la ampliación del tiempo de cultivo, con mayor producción a 22°C; y la máxima producción de proteasas

¹Químico Industrial e Mestre em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, UNIPAR – Umuarama – PR.

²Acadêmica de Farmácia e Bolsista de Iniciação Científica (PIBIC) da UNIPAR

³Professora Mestre Adjunta do Curso de Farmácia da UNIPAR

⁴Coordenador e Professor Doutor Titular do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura da UNIPAR

⁵Professora Doutora Titular do Programa de Pós-graduação em biotecnologia Aplicada à Agricultura da UNIPAR - Diretora do Instituto de Ciências Exatas, Agrárias, Tecnológicas e de Geociências da UNIPAR

ocorre a los 14 días de cultivo a 28°C.

PALABRAS CLAVE: *Pleurotus ostreatus*. Queso. Enzima. Temperatura. Exopolisacáridos.

Introdução

A hidrólise enzimática da caseína é realizada por endopeptidases do grupo aspartil-protease (EC 3.4.23), hidrolisando na ligação peptídica entre a Phe (105) e a Met (106) da K-caseína, provoca a desestabilização da micela com consequente precipitação da caseína do leite (ORDOÑÉZ, 2005). A precipitação proteica da caseína é amplamente utilizada na produção de queijos, sendo a principal fonte de proteases o estômago de bovinos jovens. O uso destes animais para a produção enzimática tem encontrado alguns entraves éticos com consequente elevação de preço (BÖNISCH; HEIDEBACH; KULOZIK, 2008). Desta forma, este tema tem despertado a atenção da comunidade científica na procura por fontes alternativas às proteases de origem de animal.

Vários trabalhos relatam o uso de fontes alternativas de proteases obtidas de plantas como *Cynara cardunculus* spp. *flavescens* (BÖNISCH; HEIDEBACH; KULOZIK, 2008), *Cynara scolymus*, *Cynara humilis* (ESTEVES; LUCEY; PIRES, 2002), *Eriosema psoraleoides*, *Eriosema ellipticum*, *Adenolichos anchietae* (LOPES et al., 1998), *Albizia lebbek*, *Helianthus annuus* (EGITO et al., 2007), *Ficus carica*, *Ananas sativa*, *Carica papaya* e *Ricinus communis* (RAPOSO; DOMINGOS, 2008); de microrganismos como os fungos *Mucor miehei*, *Mucor pusillus*, *Endothia parasitica*, *Aspergillus oryzae*, *Irpex lactis* (MOHANTY, 1999), *Rhizopus oryzae* (KUMAR et al., 2005), *Penicillium oxalicum* (HASHIM, 1999); de bactérias como *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp. (OKAMURA-MATSUI et al., 2001), *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* (CAVALCANTI et al., 2004; DUTT et al., 2008), além de genes codificadores de proteases de bezerros clonados em células de *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Aspergillus nidulans*, *Trichoderma reesei* (NEELAKANTAN; MOHANTY; KAUSIIH, 1999), *B. subtilis* e *Proteus mirabilis* (MOHANTY, 1999).

Os basidiomicetos foram pouco investigados quanto à capacidade de produzir proteases para produção de queijos. O gênero *Pleurotus* compreende um grupo de cogumelos comestíveis de interesse comercial devido a seu sabor refinado (SHARMA; MADAN, 1993; COLAUTO; EIRA, 1995), capacidade de produzir biocompostos antitumorais (WASSER; WEIS, 1999), hipocolesterolêmicos (HOSSAIN et al., 2003), antivirais, antibióticos, antiinflamatórios, antioxidantes entre outros (COHEN; PERSKY; HADAR, 2002). O cultivo deste fungo vem crescendo devido principalmente a menor complexidade das técnicas de cultivo, e sua capacidade de adaptar-se a diferentes meios de crescimento (COLAUTO; EIRA; MINHONI, 1998; RINKER et al., 1999; MANTOVANI et al., 2008), graças à sua capacidade em produzir uma grande variedade de enzimas (COHEN; PERSKY; HADAR, 2002), incluindo enzimas necessárias para a hidrólise do leite (VENABLES; WATKINSON, 1989).

O cultivo líquido de fungos possui vantagens como a fácil separação de biocompostos de interesse comercial como biomassa, exopolissacarídeos (EPS) e enzimas. Desta forma, devido à importância nutricional e terapêutica do gênero *Pleurotus*, da sua capacidade de adaptação a diferen-

tes meios de cultivo e da necessidade de desenvolvimento de tecnologias para obtenção de bioprodutos de importância industrial, comercial e funcional; este trabalho teve como objetivo verificar as condições de tempo e temperatura para a produção de biomassa, EPS e proteases por *Pleurotus ostreatus* em cultivo líquido.

Materiais e Métodos

Os experimentos foram realizados na Universidade Paranaense - Campus I de Umuarama, Laboratório de Biologia Molecular. Utilizou-se a linhagem de *P. ostreatus* U10-6, pertencente à micoteca do Laboratório de Biologia Molecular. O fungo foi transferido para placas de Petri contendo ágar-extrato de malte (AEM) previamente esterilizado a 121°C por 20 min. As placas foram dispostas aleatoriamente em estufa a 25°C. Micélio com crescimento homogêneo e sem setoriamento foi selecionado para compor o inóculo. Para o cultivo em meio líquido foi utilizado meio Pontecorvo composto por 10 g/L de glicose, 6 g/L de NaNO₃, 1,5 g/L de KH₂PO₄, 0,5 g/L de KCl, 0,5 g/L de MgSO₄, 0,01 g/L de FeSO₄, 0,01 g/L de ZnSO₄ (PONTECORVO et al., 1953) e enriquecido com 5 g/L de proteína isolada de soja. 25 mL de meio de cultura foram transferidos para Erlenmeyers de 125 mL e autoclavados a 121 °C por 20 min. Três discos de AEM, contendo o micélio do fungo crescido, foram inoculados em cada Erlenmeyer, que por sua vez foram armazenados em estufa estática a 22°C, 25°C ou 28°C. Quatro Erlenmeyers foram retirados aos 3, 6, 9, 14 e 17 dias de cultivo e avaliados quanto à produção de biomassa, EPS totais e atividade proteolítica.

Determinação da biomassa

Para determinação de biomassa o meio de cultivo foi homogeneizado com bastão de vidro e centrifugado a 5000 g por 15 min a 4°C. O sobrenadante (extrato bruto) foi transferido para novo frasco. A massa micelial precipitada foi desidratada a 105°C e após obtenção de massa constante, mensurada em miligramas (NAIAL, 1976).

Determinação de EPS

Para determinação de EPS totais, 15 mL do extrato bruto foram misturados a 45 mL de etanol e mantidos a 5°C por 12 h. Os EPS totais foram então separados com nova centrifugação a 5000 g por 10 min a 4°C. O precipitado foi desidratado a 60°C, até massa constante, e mensurado em miligramas (NAIAL, 1976).

Determinação de atividade proteolítica

Para determinação da atividade proteolítica 0,5 mL do extrato bruto foi misturado a 2,5 mL de caseína solúvel alcalina 1% (m/v), preparada em tampão fosfato de potássio 0,02 M (pH 6,5). A mistura foi mantida a 35°C por 20 min e a reação paralisada pela adição de 2,5 mL de ácido tricloroacético (0,44 M). O precipitado foi removido em nova centri-

fugação a 9000 g por 15 min a 5°C. A quantidade de proteína liberada foi mensurada pela mistura de 1,0 mL do sobrenadante a 2,0 mL de reagente de Biureto. A mistura foi mantida a 35°C por 20 min e a absorvância mensurada a 540 nm. Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorvância em 0,1 unidade em 60 min a 35°C (ARIMA; YU; IWASAKI, 1970).

Resultados e Discussão

Pode-se observar que tanto o tempo quanto a temperatura afetaram significativamente a produção de biomassa (Figura 1). O pico de produção de biomassa ocorreu em nove dias de cultivo em fase estacionária. Após este período ocorreu declínio da biomassa micelial, indicando início da fase de morte celular. Os fungos do gênero *Pleurotus* são excelentes produtores de biomassa, sendo um dos mais cultivados devido a sua rusticidade e alta eficiência biológica (COLAUTO; EIRA; MINHONI, 1998). Wu et al. (2003) mostraram que a curva de crescimento micelial de *Pleurotus tuber-regium* em meio líquido apresentou rendimento máximo de biomassa aos 20 dias de cultivo a 30°C. Os resultados encontrados neste trabalho para *P. ostreatus* demonstram que esta linhagem atinge sua máxima produção de biomassa em menor tempo, demonstrando a maior rusticidade e capacidade metabólica.

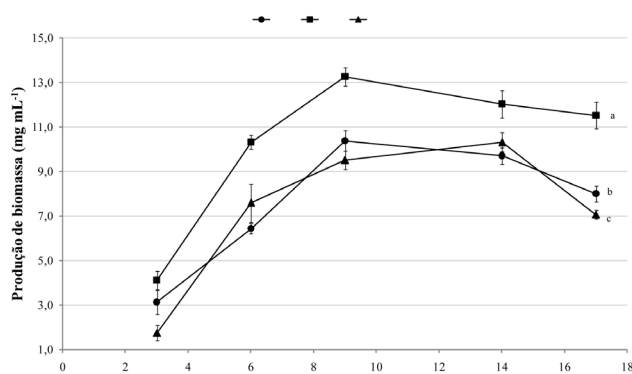


Figura 1. Produção de biomassa de *Pleurotus ostreatus* em função do tempo e da temperatura de cultivo. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

A melhor temperatura de cultivo para produção de biomassa foi de 25°C independente do tempo de cultivo (Figura 1). A temperatura afeta a velocidade das reações enzimáticas, determinando a síntese de energia metabólica e biomassa. Ademais, o crescimento microbiano é um processo exotérmico e a temperatura deve seguir um balanço entre a manutenção de energia para as reações enzimáticas e a remoção do excesso de calor eventualmente gerado (MITCHELL; LONSANE, 1992; GHILDYAL et al., 1994). Os basidiomicetos possuem uma faixa bastante estreita de temperatura ideal de crescimento, conforme descrito para *Agaricus brasiliensis* (COLAUTO et al., 2008). Zadrazil (1978) constatou que a temperatura ótima de crescimento micelial de *Pleurotus eryngii* foi de 25°C. Os resultados encontrados neste trabalho concordam com os relatados na literatura, já que houve diferença ($p \leq 0,05$) na produção de biomassa, mesmo com a diferença de apenas 3°C, demonstrando alta sensibilidade do

fungo quanto a esta variável. Isto evidencia a importância da rigorosa manutenção do cultivo a 25°C para produção de biomassa micelial por *P. ostreatus* em cultivo líquido.

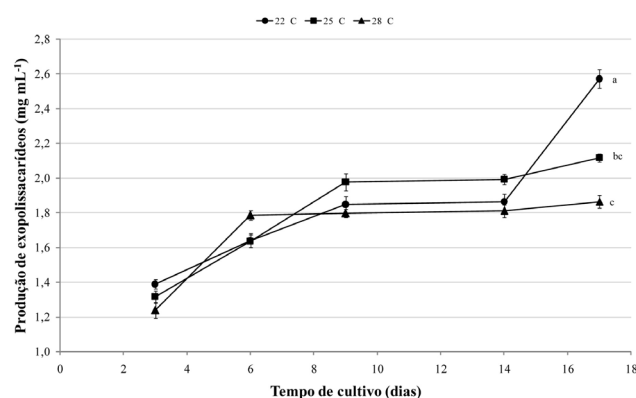


Figura 2. Produção de exopolissacarídeos totais por *Pleurotus ostreatus* em função do tempo e da temperatura de cultivo. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

A síntese de EPS foi diretamente proporcional ao tempo de cultivo independente da temperatura. A maior produção de EPS ocorreu no 17º dia de cultivo a 22°C (Figura 2). Isto demonstra que o aumento na produção de EPS ocorre quando o fungo entra na fase estacionária e de morte celular. A produção de EPS por fungos do gênero *Pleurotus* tem sido descrita em diferentes condições de cultivo líquido (BURNS et al., 1994) e em estado sólido (BURNS et al., 1994; GUTIÉRREZ; PIETRO; MARTINEZ, 1996). Maziero, Cavazzoni e Bononi (1999) selecionaram 56 espécies de basidiomicetos para a produção de EPS em cultivo submerso. Os resultados apontaram que 70% das espécies estudadas produziram EPS em maiores quantidades após 14 dias de cultivo. No presente estudo, observou-se que quando o fungo entra na fase estacionária e de morte celular ocorre um aumento significativo ($p \leq 0,05$) da produção de EPS. Os polissacarídeos constituem um importante percentual da biomassa fúngica, podendo compor até 75% da parede da hifa. Os EPS são produzidos pelos fungos como uma forma de proteção e de aderência, sendo encontrados ligados à superfície das células ou excretados no meio de cultivo (SUTHERLAND, 1998). Alguns polissacarídeos (glicanas) constituem uma capa extracelular que proporciona um suporte para adesão das enzimas excretadas. Outro aspecto importante é a capacidade que estes compostos possuem de manter a estabilidade do pH ótimo para a ação das enzimas, que auxilia a regulação dos substratos e produtos enzimáticos como a concentração de glicose extracelular (SILVA et al., 2006). Desta forma, o aumento de EPS durante o cultivo é coerente com o aumento da biomassa fúngica, não sendo utilizado pelo fungo como reserva de carbono para manutenção, mas provavelmente como suporte físico para manutenção do crescimento e proteção. Outra possibilidade é que o fungo tenha sua produção de EPS induzida durante o cultivo para compensar a velocidade das reações enzimáticas, pela redução da concentração de substratos prontamente disponíveis e com maior facilidade de assimilação, bem como para compensar a redução de água livre após o crescimento fúngico. Ademais, ao final do cultivo a quantidade de EPS foi maior a 22°C, indicando a indução

da produção de EPS. A maior produção de EPS pode estar relacionada à menor velocidade das reações enzimáticas a 22°C, desta forma houve indução de produção de EPS para compensar as dificuldades ambientais e manter a disponibilidade de nutrientes.

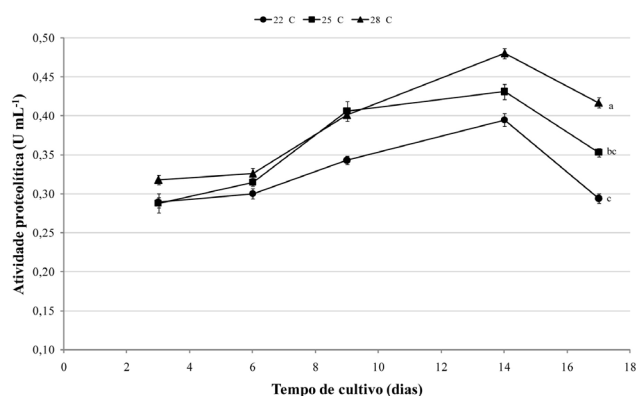


Figura 3. Atividade proteolítica de *Pleurotus ostreatus* em função do tempo e da temperatura de cultivo. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey.

Observou-se maior atividade proteolítica aos 14 dias de cultivo para todas as temperaturas analisadas, com valor máximo a 28°C (Figura 3). A máxima atividade proteolítica foi atingida cinco dias após o pico de produção de biomassa (Figura 1). As proteases extracelulares têm a função de liberar aminoácidos do meio de cultivo tanto para a síntese de proteínas fúngicas como para a produção de energia pelo metabolismo das proteínas. Desta forma, a provável redução de carbono do meio de cultivo, após nove dias, pode ter induzido a síntese de proteases exógenas para a liberação do carbono proteico e produção de energia. Isso explicaria o aumento da atividade proteolítica aos 14 dias de cultivo, quando a biomassa está em fase estacionária. Já após 14 dias de cultivo houve início da morte celular com consequente redução da atividade proteolítica (Figura 1 e 3). A produção de proteases por diferentes microrganismos tem sido relatada na literatura, especialmente em cultivo líquido submerso (ROMERO et al., 2001; SINGH; BATRA; SOBTI, 2001). As proteases de origem microbiana correspondem a cerca de 40% do total mundial de enzimas comercializadas e possuem a maioria das características desejadas para aplicação em biotecnologia com custo de produção menor que enzimas de origem vegetal ou animal (SAID; PIETRO, 2002). Estudos descrevem a produção de proteases por *Penicillium chrysogenum* (BENITO et al., 2002), *Penicillium* sp. (GERMANO et al., 2003), *Aspergillus parasiticus* (TUNGA; SHRIVASTAVA; BANERJEE, 2003) e *Streptomyces clavuligerus* (MOREIRA et al., 2001). Para basidiomicetos a literatura relata atividade proteolítica (SABOTIČ et al., 2007) para *P. eryngii* (WANG; NG, 2001), *Agaricus bisporus* (BURTON et al., 1993), *Armillariella mellea* (KIM; KIM, 1999), *Flammulina velutipes* (SHIN; CHOI, 1998), *Grifola frondosa* (NONAKA et al., 1997), *P. ostreatus* e *Lentinula edodes* (TERASHITA et al., 1985).

Os resultados descritos neste trabalho demonstram que *P. ostreatus* produz quantidades substanciais de proteases e que a temperatura apresentou um efeito positivo na pro-

dução destas enzimas, sendo a máxima produção obtida aos 14 dias de cultivo a 28°C. Associar a produção de proteases à produção de biomassa e EPS é de grande interesse industrial, pois estes compostos podem ser separados e comercializados individualmente ou ainda, produzidos como um conjunto proteolítico para introdução em alimentos como queijos. Isso poderia substituir enzimas animais e introduziria no alimento biomassa e EPS com propriedades nutricionais e medicinais, podendo impulsionar a produção de alimentos funcionais e o aumento do valor agregado do produto.

Conclusões

A maior produção de biomassa de *P. ostreatus* ocorre em nove dias de cultivo a 25°C. A produção de EPS é diretamente proporcional ao tempo com produção máxima em 17 dias de cultivo a 22°C. Já a máxima produção de proteases ocorre aos 14 dias de cultivo a 28°C.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Paranaense pelo financiamento desta pesquisa.

Referências

- ARIMA, K.; YU, J.; IWASAKI, S. Milk-clotting enzyme from *Mucor pusillus* var. *Lindt*. **Methods in Enzymology**, New York, v. 19, p. 446-460, 1970.
- BENITO, M. J. et al. Purification and characterization of an extracellular protease from *Penicillium chrysogenum* Pg222 active against meat proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 7, p. 3532-3536, 2002.
- BÖNISCH, M. P.; HEIDEBACH, T. C.; KULOZIK, U. Influence of transglutaminase protein cross-linking on the rennet coagulation of casein. **Food Hydrocolloids**, Amsterdam, v. 22, n. 2, p. 288-297, 2008.
- BURNS, P. J. et al. Physiological studies of exopolysaccharide production from the basidiomycete *Pleurotus* sp. florida. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 16, n. 7, p. 566-572, 1994.
- BURTON, K. S. et al. Purification and characterization of a serine proteinase from senescent sporophores of the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 139, n. 6, p. 1379-1386, 1993.
- CAVALCANTI, M. T. H. et al. Partial purification of new milk-clotting enzyme produced by *Nocardopsis* sp. **Biore-source Technology**, Barking, v. 93, n. 1, p. 29-35, 2004.
- COHEN, R.; PERSKY, L.; HADAR, Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 58, n. 5, p. 582-594, 2002.
- COLAUTO, N. B. et al. Condições de temperatura e pH para o crescimento de *Agaricus brasiliensis* em cultivo axênico.

- Semina. Ciências Agrárias**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 373-312, 2008.
- COLAUTO, N. B.; EIRA, A. F. Efeito de recipientes de contenção do substrato na distribuição da produção de *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer. **Energia na Agricultura**, Botucatu, v. 10, n. 2, p. 19-28, 1995.
- COLAUTO, N. B.; EIRA, A. F.; MINHONI, M. T. A. Fatores físicos que afetam a produtividade do cogumelo comestível *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer. **Científica**, São Paulo, v. 26, n. 1/2, p. 25-43, 1998.
- DUTT, K. et al. Role of casein on induction and enhancement of production of a bacterial milk clotting protease from an indigenously isolated *Bacillus subtilis*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 46, n. 5, p. 513-518, 2008.
- EGITO, A. S. et al. Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine κ -casein. **International Dairy Journal**, Barking, v. 17, n. 7, p. 816-825, 2007.
- ESTEVEZ, C. L. C.; LUCEY, J. A.; PIRES, E. M. V. Rheological properties of milk gels made with coagulants of plant origin and chymosin. **International Dairy Journal**, Barking, v. 12, n. 5, p. 427-434, 2002.
- GERMANO, S. et al. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, n. 2, p. 246-251, 2003.
- GHILDYAL, N. P. et al. Interaction of transport resistances with biochemical reaction in packed-bed solid-state fermentors: effect of temperature gradients. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 16, n. 3, p. 253-257, 1994.
- GUTIÉRREZ, A.; PIETRO, A.; MARTINEZ, A. T. Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 281, n. 1, p. 143-154, 1996.
- HASHEM, A. M. Optimization of milk-clotting enzyme productivity by *Penicillium oxalicum*. **Bioresource Technology**, Barking, v. 70, n. 2, p. 203-207, 1999.
- HOSSAIN, S. et al. Dietary mushroom (*Pleurotus ostreatus*) ameliorates atherogenic lipid in hypercholesterolaemic rats. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, Oxford, v. 30, n. 7, p. 470-475, 2003.
- KIM, J. H.; KIM, Y. S. A fibrinolytic metalloprotease from the fruiting bodies of an edible mushroom, *Armillariella mellea*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 63, n. 12, p. 2130-2136, 1999.
- KUMAR, S. et al. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. **Process Biochemistry**, Barking, v. 40, n. 5, p. 1701-1705, 2005.
- LOPES, A. et al. New vegetal sources for milk clotting enzymes. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**, Amsterdam, v. 5, n. 1, p. 63-68, 1998.
- MANTOVANI, T. R. D. et al. Criopreservação do gênero *Pleurotus* a -20 °C e a -70 °C. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, Umuarama, v. 11, n. 2, p. 107-112, 2008.
- MAZIERO, R.; CAVAZZONI, V.; BONONI, V. L. R. Screening of basidiomycetes for the production of exopolysaccharide and biomass in submerged culture. **Revista de Microbiologia**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 1, p. 77-84, 1999.
- MITCHELL, D. A.; LONSANE, B. K. Definition, characterization and economic evaluation. In: DOELLE, H. W.; MITCHELL, D. A.; ROLZ, C. E. **Solid substrate cultivation**. London: Elsevier, 1992. p. 1-16.
- MOHANTY, A. K. Bovine chymosin: production by rDNA technology and application in cheese manufacture. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 17, n. 2-3, p. 205-217, 1999.
- MOREIRA, K. A. et al. Partial characterization of proteases from *Streptomyces clavuligerus* using an inexpensive medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 3, p. 215-220, 2001.
- NAIAL - Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1976. 1020 p.
- NEELAKANTAN, S.; MOHANTY, A. K.; KAUSSEHIK, J. K. Production and use of microbial enzymes for dairy processing. **Current Science**, Bangalore, v. 77, n. 1, p. 143-148, 1999.
- NONAKA, T. et al. Amino acid sequences of metalloendopeptidases specific for acyl-lysine bonds from *Grifola frondosa* and *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 272, n. 48, p. 30032-30039, 1997.
- OKAMURA-MATSUI, T. et al. Characteristics of a cheese-like food produced by fermentation of the mushroom *Schizophyllum commune*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 92, n. 1, p. 30-32, 2001.
- ORDOÑÉZ, J. A. **Tecnología de alimentos: componentes dos alimentos e processos**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 294 p.
- PONTECORVO, G. et al. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, San Diego, v. 5, p. 141-238, 1953.
- RAPOSO, S.; DOMINGOS, A. Purification and characterization milk-clotting aspartic proteinases from *Centaurea calcitrapa* cell suspension cultures. **Process Biochemistry**, Barking, v. 43, n. 2, p. 139-144, 2008.

- RINKER, D. et al. Specialty and medicinal mushroom research in South America. **Mushroom World**, v. 10, n. 4, p. 74-76, 1999.
- ROMERO, F. J. et al. Production, purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grow in whey. **Process Biochemistry**, Barking, v. 36, n. 6, p. 507-515, 2001.
- SABOTIČ, J. et al. Basidiomycetes harbour a hidden treasure of proteolytic diversity. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 128, n. 2, p. 297-307, 2007.
- SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas de interesse industrial e biotecnológico**. Rio de Janeiro: Eventos, 2002. 121 p.
- SHARMA, S.; MADAN, M. Microbial protein from leguminous and non-leguminous substrates. **Acta Biotechnologica**, Berlim, v. 13, n. 2, p.131-139, 1993.
- SHIN, H. H.; CHOI, H. S. Purification and partial characterization of a metalloprotease in *Flammulina velutipes*. **Journal of Microbiology**, Seoul, v. 36, n. 1, p. 20-25, 1998.
- SILVA, M. L. C. et al. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 85-92, 2006.
- SINGH, J.; BATRA, N.; SOBTI, R. C. Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. **Process Biochemistry**, Barking, v. 36, n. 8-9, p. 781-785, 2001.
- SUTHERLAND, I. W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 16, n. 1, p. 41-46, 1998.
- TERASHITA, T. et al. Purification and some properties of metal proteinases from *Lentinus edodes*. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokio, v. 49, n. 8, p. 2293-2300, 1985.
- TUNGA, R.; SHRIVASTAVA, B.; BANERJEE, R. Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. **Process Biochemistry**, Barking, v. 38, n. 11, p. 1553-1558, 2003.
- VENABLES, C. E.; WATKINSON, S. C. Production and localization of proteinases in colonies of timber-decaying basidiomycete fungi. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 135, n. 5, p. 1369-1374, 1989.
- WANG, H.; NG, T. B. Pleureryn, a novel protease from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 289, n. 3, p. 750-755, 2001.
- WASSER, S. P.; WEIS, A. L. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives (review). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, Reading, v. 1, n. 1, p. 31-62, 1999.
- WU, J. Z. et al. Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer-Part 1: physical and chemical factors affecting the rate of mycelial growth and bioconversion efficiency. **Food Chemistry**, Barking, v. 81, n. 3, p. 389-393, 2003.
- ZADRAZIL, F. Cultivation of *Pleurotus*. In: CHANG, S. T.; HAYES, W. A. **The biology and cultivation of edible mushrooms**. New York: Academic, 1978. p. 521-557.

Recxebido em: 05/08/2009

Aceito em: 10/10/2010