

SELEÇÃO DE BASIDIOMICETOS PROTEOLÍTICOS

Clodoaldo Campos¹
 Débora Camila Dias²
 Mateus Pasko dos Santos²
 Camila de Medeiros²
 Juliana Silveira do Valle³
 Elisa Serra Negra Vieira⁴
 Nelson Barros Colauto⁴
 Giani Andrea Linde⁴

CAMPOS¹, C.; DIAS², D. C.; SANTOS², M. P. dos.; MEDEIROS², C. de.; VALLE³, J. S. do.; VIEIRA⁴, E. S. N.; COLAUTO⁴, N. B.; LINDE⁴, G. A. Seleção de Basidiomicetos Proteolíticos. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR*, Umuarama, v. 14, n. 1, p. 45-49, jan./jun. 2011.

RESUMO: Basidiomicetos têm sido amplamente utilizados como produtores de enzimas, no entanto são pouco explorados quanto a sua capacidade de produção de proteases. Estes fungos são reconhecidos pelas suas propriedades antitumorais, hipocolesterolêmicas, antimutagênicas, antioxidantes entre outras. Assim, a associação destas propriedades aos derivados do leite pode potencializar estes produtos como alimentos funcionais. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi selecionar basidiomicetos produtores de proteases, com potencial uso no processo de fabricação de derivados do leite. Foram utilizadas 27 linhagens de fungos crescidas em meio mínimo adicionado de 0,2% de caseína. A atividade proteolítica foi verificada pela formação de halo pela adição de uma solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Concluiu-se que a produção de proteases não apresenta relação com o crescimento micelial. O melhor produtor de proteases é a linhagem *Lentinula edodes* U8/1, seguida por *Pleurotus* sp (U2/9, U6/10 e U2/11). Os basidiomicetos *Agaricus blazei* (U4/3), *Agaricus* sp (U5/1), *Flamulina* sp (U5/4), *Lycoperdon* sp (U8/8), *Agaricus blazei* (U2/7), *Agaricus blazei* (U7/2), *Agaricus blazei* (U7/4) e *Agaricus blazei* (U7/5) não produzem proteases suficientes para serem medidas pela metodologia. Desta forma, estes resultados embasam o uso de *Lentinula edodes* e *Pleurotus* sp para o desenvolvimento de potenciais aplicações na hidrólise de proteínas em alimentos.

PALAVRAS-CHAVE: Basidiomicetos. Protease. Caseína. Screening.

SELECTION OF PROTEOLYTIC BASIDIOMYCETES

ABSTRACT: Basidiomycetes have been widely used as enzyme producers, but are poorly explored about their ability to produce protease. These fungi are known as antitumor, cholesterol-lowering, antimutagenic, antioxidant among other biological activities. Thus, the combination of basidiomycete properties to dairy products can improve them as functional foods. Therefore, the objective of this work was to screen basidiomycete protease producers to prospect the use of these fungi on dairy products. 27 basidiomycete strains grown on minimal medium supplemented with 0.2% casein were used. The proteolytic activity was verified by halo formation after a $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturated solution addition on the culture medium. The production of proteases is not associated with mycelial growth. The best producers of proteases is *Lentinula edodes* U8/1 and after *Pleurotus* sp (U2/9, U6/10 e U2/11). The basidiomycetes of *Agaricus blazei* (U4/3), *Agaricus* sp (U5/1), *Flamulina* sp (U5/4), *Lycoperdon* sp (U8/8), *Agaricus blazei* (U2/7), *Agaricus blazei* (U7/2), *Agaricus blazei* (U7/4) and *Agaricus blazei* (U7/5) do not produce enough proteases to be measured by the methodology. Thus, these results support the use of *Lentinula edodes* and *Pleurotus* sp as potential basidiomycetes for protein hydrolysis on food.

KEYWORDS: Basidiomycetes. Protease. Casein. Screening.

SELECCIÓN DE BASIDIOMICETOS PROTEOLÍTICOS

RESUMEN: Basidiomicetos han sido ampliamente utilizados como productores de enzimas, pero poco exploradas en su capacidad de producción de proteasa. Estos hongos son reconocidos por sus propiedades antitumorales, reductor de colesterol, antimutagênicos, antioxidantes entre otras. Así, la asociación de estas propiedades a los derivados de la leche puede potencializar estos productos como alimentos funcionales. En este sentido, el objetivo de este trabajo fue seleccionar basidiomicetos productores de proteasas, con potencial uso en el proceso de fabricación de productos lácteos. Se utilizó 27 cepas de hongos crecidos en medio mínimo adicionado de 0,2% de caseína. La actividad proteolítica fue verificada por formación de halo por la adición de solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Se concluyó que la producción de proteasas no presenta relación con el crecimiento del micelio. El mejor productor de proteasas es la cepa de *Lentinula edodes* U8/1, seguida por *Pleurotus* sp (U2/9, U6/10 y U2/11). Los basidiomicetos *Agaricus blazei* (U4/3), *Agaricus* sp (U5/1), *Flamulina* sp (U5/4), *Lycoperdon* sp (U8/8), *Agaricus blazei* (U2/7), *Agaricus blazei* (U7/2), *Agaricus blazei* (U7/4) y *Agaricus blazei* (U7/5) no producen prote-

¹Mestre em Biotecnologia Aplicada à Agricultura; UNIPAR, Umuarama - PR

²Mestranda do Programa de Biotecnologia Aplicada à Agricultura; UNIPAR, Umuarama - PR

³Docente do Curso de Farmácia; UNIPAR, Umuarama - PR

⁴Docente do Mestrado Biotecnologia Aplicada à Agricultura; UNIPAR, Umuarama - PR

asas suficientes para que sean medidos por la metodología. Por lo tanto, estos resultados apoyan el uso de *Lentinula edodes* y *Pleurotus* sp para el desarrollo de potenciales aplicaciones en hidrólisis de proteínas en alimentos.

PALABRAS CLAVE: Basidiomicetos. Proteasa. Caseína. Screening.

Introdução

As proteases são enzimas capazes de hidrolisar proteínas com conseqüente modificação das propriedades físicas, químicas e biológicas originais, sendo a proteólise essencial para todos os organismos e envolvida em diferentes processos fisiológicos (SABOTIC et al., 2007). A hidrólise proteica pode liberar peptídeos bioativos que atuam no metabolismo, em glândulas excretoras, pressão sanguínea e no desenvolvimento corporal de forma geral (WANG; MEJIA, 2005). Além disso, proteases representam um dos três maiores grupos de enzimas de interesse industrial e tem ampla aplicação biotecnológica, especialmente na indústria de alimentos, couro, detergentes e em processos de biorremediação (RAO et al., 1998).

Diversos fungos são descritos como produtores de proteases como *Mucor circinelloides* (ANDRADE et al., 2002), *Aspergillus* sp (SUMANTHA et al., 2005), *Penicillium* sp (GERMANO et al., 2003) *Fusarium* sp (PEKKARINEN et al., 2000), *Streptomyces clavuligerus* (MOREIRA et al., 2001), *Aspergillus oryzae* (SANDHYA et al., 2005), *Aspergillus tamaritii* (FERREIRA; BOER; PERALTA, 1999) e *Engyodontium album* (CHELLAPPAN et al., 2006), porém somente alguns produzem proteases específicas para hidrólise da caseína como *Mucor miehei* e *Fusarium moniliforme* (ESCOBAR; BARNETT, 1993; KOLACZKOWSKA et al., 1988; LASURE, 1980; THAKUR; KARANTH; NAND, 1990).

O uso de basidiomicetos comestíveis para produção de proteases capazes de hidrolisar caseína é inexplorado e tal característica seria uma forma potencial para produção de derivados de leite funcionais. Isto poderia ser obtido tanto pela hidrólise de peptídeos do leite como pela associação das propriedades terapêuticas dos basidiomicetos comestíveis como propriedade antitumoral (WASSER; WEIS, 1999; MOURÃO et al., 2009; JUMES et al., 2010), hipocolesterolêmica (HOSSAIN et al., 2003), antimicrobiana (ISHIKAWA; KASUYA; VANETTI, 2001), antimutagênica (SOUZA-PACCOLA et al., 2004), antioxidante (MOURÃO et al., 2011b), anti-inflamatória (MOURÃO et al., 2011a) e antiviral (SASAKI et al., 2001). Não foram encontrados na literatura relatos sobre basidiomicetos comestíveis e/ou medicinais com potencial proteolítico para aplicação na cadeia produtiva do leite. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi selecionar basidiomicetos comestíveis produtores de proteases.

Material e Métodos

Foram utilizadas 27 linhagens de basidiomicetos pertencentes à coleção de culturas fúngicas do laboratório de biologia molecular da Universidade Paranaense. Os microrganismos mantidos por transferência periódica em ágar-batata dextrose (BDA) a 25 °C foram transferidos para meio mínimo de Pontecorvo composto por glicose 10 g L⁻¹; NaNO₃ 6 g L⁻¹; KH₂PO₄ 1,5 g L⁻¹; KCl 0,5 g L⁻¹; MgSO₄ 0,5 g L⁻¹; FeSO₄ 0,01 g L⁻¹; ZnSO₄ 0,01 g L⁻¹ (PONTECORVO et al., 1953) e 15 g L⁻¹ de ágar, previamente autoclavado a 121

°C por 20 min. Pouco antes de verter o meio de cultivo em placas de Petri, foram adicionados 25 mL L⁻¹ de solução de caseína 8%, autoclavada da mesma forma. O meio de cultura foi inoculado com um disco de 3 mm de diâmetro contendo o micélio, e incubado a 25 °C. Após o crescimento micelial atingir cerca de 4 cm de diâmetro, uma solução aquosa saturada de sulfato de amônia foi adicionada à superfície do meio. A atividade proteolítica foi evidenciada pela formação de um halo transparente no meio de cultivo. A espessura do halo foi medida com paquímetro entre o limite do diâmetro de crescimento do micélio e o limite da formação do halo. Cada tratamento teve três repetições. Os resultados foram avaliados pela análise de variância e as diferenças entre as médias determinadas pelo teste de Scott-Knott (p≤0,05) segundo Borges e Ferreira (2003).

Resultados e Discussão

A Tabela 1 mostra os resultados da espessura do halo formado pela atividade proteolítica dos basidiomicetos e o diâmetro de crescimento micelial. Pode-se observar que a linhagem *Lentinula edodes* U8/1 produziu o maior halo de atividade proteolítica e de diâmetro de crescimento micelial (Tabela 1). Entretanto, para os outros fungos, não houve uma correlação positiva entre a atividade proteolítica e o crescimento micelial.

L. edodes cresce usualmente em toras de madeira ou em serragem que têm reduzida disponibilidade de nitrogênio (ANDRADE; MINHONI; ZIED, 2008), necessitando, portanto de um sistema proteolítico eficiente em relação a outros basidiomicetos para sua manutenção. Isto indica que substratos com menor disponibilidade de nitrogênio podem induzir uma maior atividade proteolítica deste fungo.

A capacidade de produção de enzimas foi seguida por *Pleurotus* sp (U2/9, U6/10 e U2/11). *Pleurotus ostreatus* apesar de possuir um sistema enzimático versátil, capaz de adaptar-se a diferentes substratos com diferentes concentrações de nitrogênio (SILVEIRA; FURLAN; NINOW, 2008), produziu 36% menos enzimas proteolíticas que *Lentinula edodes* U8/1. Desta forma, a maior capacidade de produção de proteases por *L. edodes* (U8/1) torna-o um fungo de potencial interesse para aplicação na hidrólise de proteínas em alimentos como os da cadeia produtiva do leite.

Tabela 1: Média do diâmetro do micélio e da espessura do halo formado pela atividade proteolítica seguidos pelo desvio padrão de diferentes basidiomicetos em meio mínimo de Pontecorvo com adição de caseína.

Código	Cepa	Diâmetro do micélio (mm)	Espessura do halo de atividade proteolítica (mm)
U8/1	<i>Lentinula edodes</i>	4,27 ± 0,25 a	0,72 ± 0,18 a
U2/9	<i>Pleurotus ostreatus</i>	3,08 ± 0,63 c	0,46 ± 0,16 b
U6/10	<i>Pleurotus florida</i>	3,08 ± 0,27 c	0,45 ± 0,19 b
U2/11	<i>Pleurotus ostreatus</i>	4,51 ± 0,30 a	0,42 ± 0,10 b
U2/10	<i>Pleurotus ostreatus</i>	4,72 ± 0,63 a	0,38 ± 0,07 c
U6/8	<i>Pleurotus ostreatus</i>	4,55 ± 0,70 a	0,37 ± 0,10 c
U8/7	<i>Trametes</i> sp	4,06 ± 0,62 b	0,33 ± 0,10 c
U8/6	<i>Sparassis</i> sp	2,94 ± 0,30 c	0,30 ± 0,12 c
U5/5	<i>Trametes</i> sp	2,73 ± 0,10 d	0,29 ± 0,10 c
U6/7	<i>Schizophyllum commune</i>	3,58 ± 0,53 b	0,27 ± 0,06 c
U5/2	<i>Trametes</i> sp	3,66 ± 0,55 b	0,27 ± 0,11 c
U6/12	<i>Lentinula edodes</i>	2,74 ± 0,32 d	0,26 ± 0,12 c
U6/11	<i>Lentinula edodes</i>	3,92 ± 0,21 b	0,26 ± 0,76 c
U6/9	<i>Pleurotus ostreatus</i>	3,92 ± 0,21 b	0,26 ± 0,76 c
U2/2	<i>Agaricus blazei</i> *	2,25 ± 0,60 d	0,22 ± 0,21 c
U8/9	<i>Agaricus blazei</i> *	2,43 ± 0,20 d	0,17 ± 0,07 d
U6/6	<i>Agaricus blazei</i> *	2,97 ± 0,34 c	0,15 ± 0,24 d
U2/3	<i>Agaricus blazei</i> *	2,51 ± 0,25 d	0,11 ± 0,12 d
U8/5	<i>Agaricus</i> sp	2,48 ± 0,37 d	0,10 ± 0,23 d
U4/5	<i>Agaricus blazei</i> *	2,82 ± 0,40 c	0,09 ± 0,10 d
U2/6	<i>Agaricus blazei</i> *	2,67 ± 0,42 d	0,09 ± 0,12 d
U4/2	<i>Agaricus blazei</i> *	2,40 ± 0,50 d	0,01 ± 0,04 e
U8/8	<i>Lycoperdon</i> sp	3,17 ± 0,20 c	0,01 ± 0,05 e
U4/3	<i>Agaricus blazei</i> *	2,86 ± 0,42 c	0,00 ± 0,00
U5/1	<i>Agaricus</i> sp	3,00 ± 0,08 c	0,00 ± 0,00
U5/4	<i>Flamulina</i> sp	2,92 ± 1,34 c	0,00 ± 0,00
U2/7	<i>Agaricus blazei</i> *	3,14 ± 0,17 c	0,00 ± 0,00
U7/4	<i>Agaricus blazei</i> *	3,43 ± 0,31 c	0,00 ± 0,00
U7/5	<i>Agaricus blazei</i> *	3,32 ± 0,26 c	0,00 ± 0,00
U7/2	<i>Agaricus blazei</i> *	2,32 ± 0,54 d	0,00 ± 0,00

Legenda: Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). **Agaricus blazei* Murrill ss. Heinemann = *A. brasiliensis* Wasser et al. = *A. subrufescens* Peck (COLAUTO et al., 2011). =

Os basidiomicetos *Agaricus blazei* (U4/3), *Agaricus* sp (U5/1), *Flamulina* sp (U5/4), *Lycoperdon* sp (U8/8), *Agaricus blazei* (U2/7), *Agaricus blazei* (U7/2), *Agaricus blazei* (U7/4) e *Agaricus blazei* (U7/5) apresentaram crescimento micelial sem formação de halo, deste modo, estes fungos não produziram proteases suficientes para serem detectadas pela metodologia adotada (Tabela 1). *A. blazei* cresce naturalmente em meios compostados constituídos de material parcialmente decomposto por outros microrganismos. Nesse caso, as fontes de nitrogênio disponíveis foram previamente hidrolisadas estando disponíveis ao micélio que desenvolve estratégias de crescimento que envolve um menor aparato enzimático (MANTOVANI; LINDE; COLAUTO, 2007; ZAGHI JUNIOR; LINDE; COLAUTO, 2010; D'AGOSTINI et al., 2011). Isso pode explicar a reduzida produção de proteases por este basidiomiceto. Assim, apesar do alto valor nutricional

e funcional de *A. blazei* (MOURÃO et al., 2009; MOURÃO et al., 2011a; MOURÃO et al., 2011b), este basidiomiceto não se mostrou promissor para o desenvolvimento de aplicações com o objetivo de gerar alimentos funcionais da cadeia produtiva do leite.

Conclusão

Concluiu-se que a produção de proteases não apresenta relação com o crescimento micelial e que *Lentinula edodes* (U8/1), seguido de *Pleurotus* sp (U2/9, U6/10 e U2/11) são os maiores produtores de proteases. Estes resultados indicam a necessidade de mais pesquisas para o desenvolvimento de aplicações destes fungos na hidrólise de proteínas em alimentos.

Referências

- ANDRADE, M. C. N.; MINHONI, M. T. A.; ZIED, D. C. Caracterização bromatológica de oito linhagens de *Lentinula edodes* (Shiitake) cultivadas em toras de *Eucalyptus grandis*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 793-797, 2008.
- ANDRADE, V. S. et al. Production of extracellular protease by *Mucor circinelloides* using D-glucose as carbon source/ substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 2, p. 106-110, 2002.
- BAILEY, M. J.; SIIKA-AHO, M. Production of microbial rennin. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 10, n. 3, p. 161-166, 1988.
- BORGES, L. C.; FERREIRA, D. F. Poder e taxas de erro tipo I dos testes Scott-Knott, Tukey e Student-Newman-Keuls sob distribuições normal e não normais dos resíduos. **Revista de Matemática e Estatística**, Marília, v. 21, n. 1, p. 67-83, 2003.
- CHELLAPPAN, S. et al. Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation. **Process Biochemistry**, Barking, v. 41, n. 4, p. 956-961, 2006.
- D'AGOSTINI, E. C. et al. Low carbon/nitrogen ratio increases lacase production. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 68, n. 3, p. 295-300, 2011.
- ESCOBAR, J.; BARNETT, S. M. Effect of agitation speed on the synthesis of *Mucor miehei*. **Enzyme Microbiology Technolology**, New York, v. 15, p. 1009-1013, 1993.
- FERREIRA, G.; BOER, C. G.; PERALTA, R. M. Production of xylanolytic enzymes by *Aspergillus tamarii* in solid state fermentation. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 173, n. 2, p. 335-339, 1999.
- GERMANO, S. et al. Characterization and stability of protease from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, n. 2-3, p. 246-251, 2003.
- HOSSAIN, S. et al. Dietary mushroom (*Pleurotus ostreatus*) ameliorates atherogenic lipid in hypercholesterolaemic rats. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, New York, v. 30, p. 470, 2003.
- ISHIKAWA, N. K.; KASUYA, M. C. M.; VANETTI, M. C. D. Antibacterial activity of *Lentinula edodes* grown in liquid medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 32, p. 206-210, 2001.
- JUMES, F. M. D. et al. Effects of *Agaricus brasiliensis* mushroom in walker-256 tumor-bearing rats. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, Ottawa, v. 88, p. 21-27, 2010.
- KOLACZKOWSKA, M. et al. Factors affecting rennin-like proteinase production by *Fusarium moniliforme*. **Milchwissenschaft Milk Science International**, Kempten, v. 43, n. 2, p. 83-86, 1988.
- LASURE, L. L. Regulation of extracellular acid protease in *Mucor miehei*. **Mycologia**, New York, v. 72, p. 483-493, 1980.
- MANTOVANI, T. R. D.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B. Effect of the addition of nitrogen sources to cassava fiber and carbon-to-nitrogen ratios on *Agaricus brasiliensis* growth. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 53, p. 139-143, 2007.
- MODA, E. M. et al. Uso de peróxido de hidrogênio e ácido cítrico na conservação de cogumelos *Pleurotus sajor-caju* in natura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 291-296, 2005.
- 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.
- MOURÃO, F. et al. Antineoplastic activity of *Agaricus brasiliensis* basidiocarps on different maturation phases. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 40, p. 901-905, 2009.
- MOURÃO, F. et al. Anti-inflammatory activity of *Agaricus blazei* in different basidiocarp maturation phases. **Food and Agricultural Immunology**, Hopkinton, v. 22, n. 4, p. 325-333, 2011.
- MOURÃO, F. et al. Antioxidant activity of *Agaricus brasiliensis* basidiocarps on different maturation phases. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 42, p. 197-202, 2010.
- PEKKARINEN, A. et al. Production of proteases by *Fusarium* species grown on barley grains and in media containing cereal proteins. **Journal of Cereal Science**, London, v. 31, n. 3, p. 253-261, 2000.
- PONTECORVO, G. et al. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, San Diego, v. 5, p. 141-238, 1953.
- RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 62, p. 597-635, 1998.
- SABOTIC, J. et al. Basidiomycetes harbour a hidden treasure of proteolytic diversity. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 128, p. 297-307, 2007.
- SANDHYA, C. et al. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2689-2694, 2005.

SASAKI, S. H. et al. Strains of *Lentinula edodes* suppress growth of phytopathogenic fungi and inhibit algal serotype of vesicular stomatitis virus. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 2, p. 52-55, 2001.

SILVEIRA, M. L. L.; FURLAN, S. A.; NINOW, J. L. Development of an alternative technology for the oyster mushroom production using liquid inoculum. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 858-862, 2008.

SOUZA-PACCOLA, E. A. et al. Antimutagenic action of *Lentinula edodes* and *Agaricus blazei* on *Aspergillus nidulans* conidia. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 35, p. 311-315, 2004.

SUMANTHA, A. et al. Production and partial purification of a neutral metalloprotease by fungal mixed substrate fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 43, n. 4, p. 313-319, 2005.

THAKUR, M. S.; KARANTH, N. G.; NAND, K. Production of fungal rennet by *Mucor miehei* using solid state fermentation. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v. 32, p. 409-413, 1990.

WANG, W.; MEJIA, E. G. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 4, p. 63-78, 2005.

WASSER, S. P.; WEIS, A. L. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: current perspectives. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, New York, v. 1, p. 31-62, 1999.

ZAGHI JUNIOR, L. L.; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B. Carbon-to-nitrogen ratios for *Agaricus brasiliensis* on the axenic method. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 32, p. 55-60, 2010.

Recebido em: 10/07/2010

Aceito em: 23/08/2011