

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

Eliza Emily Perrone Barbosa

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 Pimenta

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 Brito

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 Martim

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 Teixeira

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: Proteases, 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: Proteases, 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., 2017; 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 90% do comércio mundial de vendas, têm aplicações no processamento de alimentos, panificação, sucos e produção de queijos, propriedades que promovem a predominância dessas enzimas no mercado mundial, 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 conhecidos 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, OMRANE 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

açai [(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.

3 CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEASES

3.1 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 a 70 °C), por uma hora (MARTIM *et al.*, 2017).

3.2 EFEITO DE INIBIDORES DE PROTEASES E ÍONS METÁLICOS NA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

O efeito de inibidores na atividade enzimática foi investigado utilizando na mistura reacional, fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), ácido etileno-diaminotetracético (EDTA), ácido iodoacético (10 mM) e pepstatina (0,1 mM). Os íons metálicos utilizados foram CaCl_2 , CuSO_4 , FeSO_4 , MgSO_4 , MnSO_4 , ZnSO_4 , NaCl e KCl (10 mM). As amostras foram incubadas nas condições ótimas de pH e de temperatura (MARTIM et al., 2017).

3.3 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.

4 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 ($p < 0,05$).

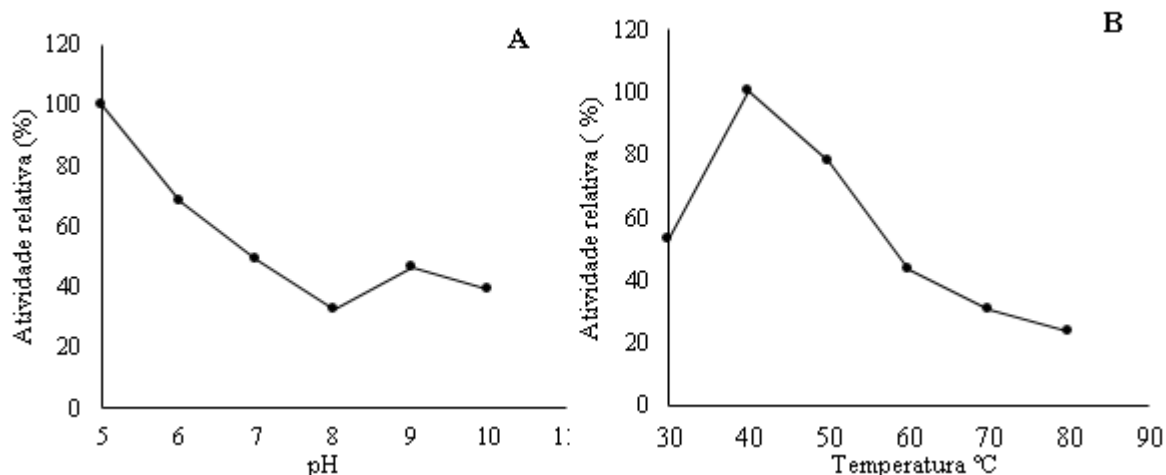
Substratos suporte/Suplemento	Atividade proteolítica (U/mL)
Sac+FA	$26,53^a \pm 0,4$
EC+FA	$22,75^b \pm 0,8$
SER+FA	$18,82^c \pm 0,1$

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

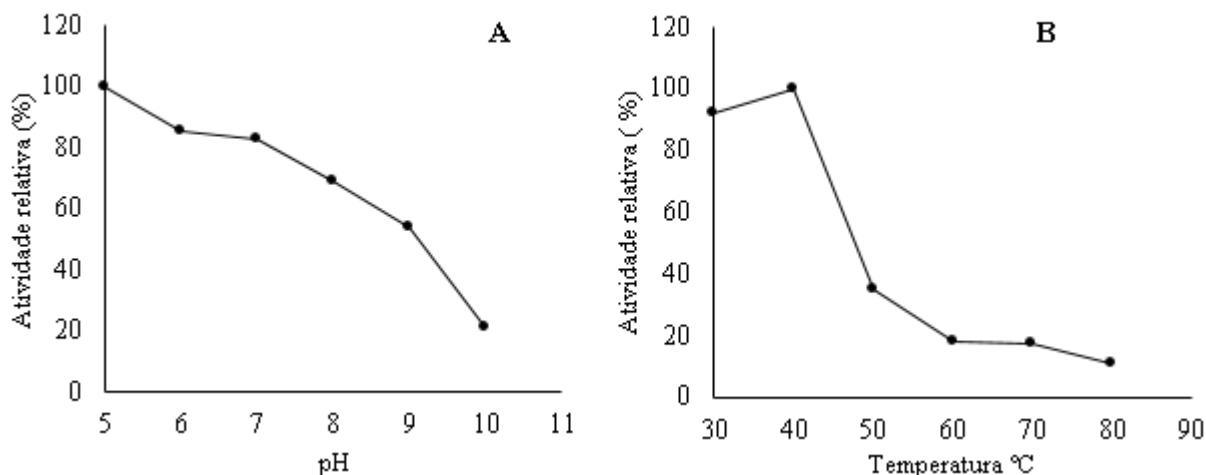
processamento de alimentos, na produção de ração animal, e até mesmo para o tratamento de resíduos agroindustriais e, na panificação (MACHADO et al., 2017).

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., 2019). 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. (2019) 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., 2019)

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. 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.

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

5 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.

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.

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, 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.

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

OMRANE, B. 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.

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.