

Proteases ácidas de cogumelo comestível da Amazônia para aplicabilidade industrial Acid proteases from Amazonian edible mushroom for industrial applications

Salomão Rocha Martim^I, Larissa Svetlana Cavalcanti Silva^I, Mircella Marialva Alecrim^I,
Bianca Cordeiro de Souza^{II}, Ila Maria de Aguiar Oliveira^I, Maria Francisca Simas Teixeira^I

^IUniversidade Federal do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil

^{II}Centro Universitário do Norte. Manaus, Amazonas, Brasil

Resumo: As proteases constituem um grupo de enzimas obtidas de fontes animais, vegetais e microbianas, que apresentam elevada aplicabilidade em diversos setores industriais. Entre os fungos, os cogumelos têm se destacado como fonte de proteases com potencial biotecnológico. O objetivo deste trabalho foi investigar a produção de proteases por cogumelos, utilizando a fermentação em meio líquido. A cultura matriz foi preparada em ágar batata dextrose, acrescida de extrato de levedura 0,5% (p/v), e o bioprocessamento foi conduzido durante cinco dias, a 150 rpm e 25 °C. Azocaseína 1% (p/v) foi utilizada como substrato para avaliar a atividade proteolítica dos cogumelos. Entre as espécies avaliadas, *Pleurotus albidus* (Berk.) Pegler 1983 foi a produtora significativa de proteases (34,00 U/mL), e a síntese dessas enzimas foi estimulada pela idade e pelo volume do inóculo. Essas enzimas mostraram atividade ótima em pH 5, a 60 °C, e estabilidade em pH 5-8, com temperaturas de 30 a 60 °C. As proteases foram classificadas como cisteína e serinoproteases.

Palavras-chave: Proteases. Basidiomicetos. Fermentação submersa.

Abstract: Proteases are a group of enzymes that can be obtained from animal, plant and microbial sources and have high applicability in many industrial areas. Among the source fungi, mushrooms have been noted as proteases producers with biotechnological potential. The aim of this study was to investigate the protease production by mushrooms in liquid fermentation. The main culture was prepared in potato dextrose agar with 0.5% (w/v) yeast extract. The fermentation was carried out for five days, 150 rpm at 25 °C. Azocasein 1% (p/v) was used as substrate to evaluate the proteolytic activity of mushrooms. Among the species evaluated, *Pleurotus albidus* (Berk.) Pegler 1983 was a significant producer of proteases (34.00 U/mL), and the synthesis of these enzymes was stimulated by the age and inoculum volume. The proteases from *P. albidus* showed optimum activity at pH 5.0 and 60 °C with stability at pH 5-8 and from 30 °C to 60 °C. They were classified as cysteine and serine proteases.

Keywords: Protease. Basidiomycetes. Submerged fermentation.

MARTIM, S. R., L. S. C. SILVA, M. M. ALECRIM, B. C. SOUZA, I. M. A. OLIVEIRA & M. F. S. TEIXEIRA, 2017. Proteases ácidas de cogumelo comestível da Amazônia para aplicabilidade industrial. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais** 12(3): 353-362. Autor para correspondência: Salomão Rocha Martim. Universidade Federal do Amazonas. Av. General Rodrigo Octávio, 6200 – Coroado I. Manaus, AM, Brasil. CEP 69080-900 (salomao.martim@gmail.com).

Recebido em 15/02/2017

Aprovado em 14/06/2017

Responsabilidade editorial: Fernando da Silva Carvalho Filho



INTRODUÇÃO

As proteases constituem um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de proteínas em peptídeos (Rajput *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2016). Estes biocatalisadores são classificados de acordo com o mecanismo de ação (exo e endopeptidases), condições ótimas de pH (ácidas, neutras e básicas), aminoácidos e íons metálicos presentes no sítio ativo (serinoprotease, cisteínoprotease, aspartatoprotease, treoninoprotease, glutaminoprotease e metaloprotease) (Li *et al.*, 2013; Inácio *et al.*, 2015).

A evolução orgânica ocorrida no sítio catalítico das proteases contribuiu para que essas enzimas participassem de reações bioquímicas relacionadas com funções metabólicas e reguladoras, essenciais em processos biológicos, por isso, as enzimas proteolíticas são encontradas em todos os organismos vivos (Erjavec *et al.*, 2012; Sabotič & Kos, 2012; Suganthi *et al.*, 2013).

As proteases são importantes grupos de enzimas industriais, representando mais de 70% do mercado global, sendo amplamente utilizadas na produção de queijos, amaciamento de carnes, hidrolisados proteicos, produtos de panificação, detergentes, formulações médicas, bem como são adotadas para o beneficiamento do couro e da seda, no tratamento de águas residuais e na recuperação da prata (Srilakshmi *et al.*, 2014; Bano *et al.*, 2016).

Entre as fontes de protease, os microrganismos são considerados excelentes produtores, devido ao elevado rendimento de enzimas proteolíticas purificadas e à sua ampla gama de propriedades bioquímicas e catalíticas. Além disso, tais enzimas são geralmente extracelulares, o que facilita a sua recuperação no final do bioprocessamento (Ortiz *et al.*, 2016). Muitas espécies de microrganismos são comumente reconhecidas como *Generally Regarded as Safe* (GRAS), as quais não são tóxicas e nem patogênicas, por isso são investigadas para aplicação na indústria de alimentos, inclusive quanto à produção de proteases (Malik & Shinde, 2016).

Os fungos representam fonte potencial de proteases, devido à ampla diversidade bioquímica que possuem, à susceptibilidade à manipulação genética,

à alta produtividade de biocompostos extracelulares, facilmente recuperados quando cultivados em meio líquido ou em matriz sólida. Entre os fungos, cogumelos têm se destacado como fonte de proteases: *Cordyceps sobolifera* (Hill ex Watson) Berk. & Broome 1875 (Wang *et al.*, 2012); *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer 1951 (Ravikumar *et al.*, 2012); *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer 1951 (Iketaani *et al.*, 2013); *Hypsizygus ulmarius* (Bull.) Redhead 1984 (Shivashankar & Premkumari, 2014); *Pleurotus ostreatoroseus* Singer 1961 (Fonseca *et al.*, 2014); *Lentinus citrinus* Walley & Rammeloo 1994 (Machado *et al.*, 2016); *P. eryngii* (DC.) Qué. 1872 (Bano *et al.*, 2016); *Russula brevipes* Peck 1890 (Rajoriya & Gupta, 2016).

A demanda por proteases com especificidade e estabilidade em vastas faixas de pH e de temperatura, com retenção da atividade na presença de íons metálicos, tensoativos, solventes orgânicos e oxidantes estimula a busca por novas fontes enzimáticas, em especial as de origem microbiana (Nair & Geethu, 2015). O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de enzimas proteolíticas por cogumelos e selecionar uma espécie produtora de proteases com potencial biotecnológico.

MATERIAL E MÉTODOS

COGUMELOS

Nesta pesquisa foram avaliados seis cogumelos, *Auricularia mixotricha* Bull. ex Juss. 1787 DPUA 1695, *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst 1881 DPUA 1694, *Lentinus citrinus* DPUA 1535, *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693, *Pleurotus albidus* DPUA 1692 e *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720, provenientes do acervo da coleção de culturas DPUA do Departamento de Parasitologia, da Universidade Federal do Amazonas. De cada cultura preservada sob óleo mineral, foram transferidos fragmentos para Caldo Glicosado, para obtenção de cultura viável (Lacaz *et al.*, 2002). Fragmentos da massa micelial foram transferidos para ágar batata dextrose (BDA), adicionado de extrato de levedura 0,5% (p/v), em placas de Petri. Todos os cultivos

foram mantidos a 25 °C por oito dias para uso nos demais experimentos.

FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Para produção de proteases, cinco fragmentos miceliais de 5 mm de diâmetro foram inoculados em frascos Erlenmeyer (250 mL), contendo 50 ml de meio líquido Glicose-Extrato de levedura-Peptona (GYP) (20 g de glicose, 5 g de extrato de levedura, 5 g de peptona, para cada 1.000 mL de água destilada), suplementado com gelatina a 0,5% (p/v), pH 5,6. A fermentação foi realizada a 30 °C, 150 rpm. Após cinco dias, a biomassa foi separada por filtração sob vácuo em papel de filtro Whatman n. 1, seguindo as filtrações em membrana de éster de celulose de 0,45 µm e em membrana polietersulfônica de 0,22 µm. A partir do extrato bruto, foi determinada a atividade proteolítica, em triplicata.

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA IDADE E DO TAMANHO DO INÓCULO NA SÍNTESE DE PROTEASE

Para avaliar a influência da idade e do tamanho do inóculo na produção de proteases pela espécie de cogumelo selecionada, foram utilizadas culturas com 2, 5, 8, 12 e 15 dias. De cada cultura, foram retirados discos miceliais equivalentes a 2%, 4%, 10%, 20% e 40% (m/v), para frascos de Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de GYP, suplementado com gelatina a 0,5% (p/v), pH 5,6. A fermentação foi realizada a 30 °C, 150 rpm. Após cinco dias, a biomassa foi separada por filtração, conforme descrito no item anterior.

ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

A atividade proteolítica foi determinada segundo Leighton *et al.* (1973), utilizando-se azocaseína a 1% como substrato enzimático. Uma unidade de atividade de protease foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir variação de absorbância igual a 0,01 em 60 minutos.

DETERMINAÇÃO DO EFEITO DO PH E DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE E NA ESTABILIDADE DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

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 0,1M: 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, que variaram de 30 a 80 °C. Para 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), mantidas a 25 °C por 24 horas. Na estabilidade térmica, o extrato foi incubado em diferentes temperaturas, que variaram de 30 a 80 °C por uma hora (Merheb-Dini *et al.*, 2010). Os resultados foram expressos em atividade relativa em todos os experimentos.

EFEITO DE INIBIDORES E DE ÍONS METÁLICOS NA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

O efeito de inibidores na atividade proteolítica foi investigado utilizando-se 10 mM de fluoreto de fenilmetanosulfonila (PMSF), 10 mM de ácido etileno-diaminotetracético (EDTA), 10 mM de ácido iodoacético e 1 mM de Pepstatin A, na mistura reacional. Os íons metálicos utilizados na concentração de 10 mM, na mistura reacional, foram: CaCl₂, CuSO₄, FeSO₄, MgSO₄, MnSO₄, ZnSO₄, NaCl e KCl. As amostras foram incubadas nas condições ótimas de pH e de temperatura. A atividade enzimática residual foi comparada com o controle, incubado sem os inibidores ou íons metálicos e correspondeu a 100% de atividade.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Em todos os experimentos, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (P < 0,05), por meio do programa Minitab, versão 16.0 (Minitab, 2010). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

PRODUÇÃO DE PROTEASES POR ESPÉCIES DE COGUMELOS COMESTÍVEIS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Nas condições de fermentação em meio líquido, todos os cogumelos excretaram proteases. *P. albidus*, *L. crinitus* e *G. lucidum* sintetizaram maiores quantitativos de proteases, em ordem decrescente, 34,00 U/mL, 27,20 U/mL e 23,50 U/mL, respectivamente. *P. ostreatoroseus* demonstrou os menores valores de atividade proteásica (1,90 U/mL) (Tabela 1). Estudos têm demonstrado que espécies de cogumelos pertencentes ao gênero *Pleurotus* são eficientes na produção de proteases em diferentes condições de cultivo. Genier *et al.* (2015) e Campos *et al.* (2010) relataram valores de 70 U/mL e de 0,45 U/mL, respectivamente, de atividade proteolítica por *P. ostreatus* (Jacq.) P. Kumm 1871, utilizando cultivo submerso. Fonseca *et al.* (2014) utilizaram cultivo semissólido para a produção de proteases por *P. ostreatoroseus* e verificaram valores de 7,89 U/mL e 4,50 U/mL de atividade proteásica, na presença e na ausência de luz, respectivamente. Ravikumar *et al.* (2012) relataram valores de atividade de aproximadamente 45 U/mL de atividade proteolítica de *P. sajor-caju*, em cultivo semissólido. As diferenças no quantitativo de proteases produzidas por basidiomicetos ocorrem porque estes organismos utilizam rotas metabólicas distintas, de acordo

com o seu curso de vida. As diferenças desenvolvidas entre as espécies durante a evolução resultaram em variações genotípicas, que influenciam na síntese de enzimas proteolíticas (Kudryatseva *et al.*, 2008).

Neste estudo, *P. albidus* expressou os valores significativos de proteases e foi selecionado para caracterização dos parâmetros que influenciaram na produção e na atividade de proteases.

INFLUÊNCIA DO TAMANHO E DA IDADE DO INÓCULO NA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

A Figura 1 demonstra a influência do tamanho do inóculo na atividade de proteases por *P. albidus*. Com inóculo de 10% de volume, foi verificada a produção máxima de protease por *P. albidus* (54 U/mL). Quando utilizados inóculos de 2% e 40%, foram observadas atividades proteolíticas de 20,5 U/mL e 21 U/mL, respectivamente. Estes dados demonstram que a utilização de inóculo reduzido ou elevado não favoreceu a síntese de proteases por *P. albidus*. Estudos revelaram que o tamanho do inóculo é um parâmetro que influencia na produção de proteases, independente da espécie avaliada e do bioprocessos. Por exemplo, a maior atividade proteolítica de *Rhizopus oligosporus* Saito 1905 M30 e de *R. arrhizus* A. Fisch 1892 M26 foi determinada quando utilizado inóculo de 10% e 5% (v/v), respectivamente (Irfan *et al.*, 2011). *R. oryzae* A. Fisch 1892 produziu maiores quantidades de proteases ao ser empregado inóculo de 2% (v/v) (Mushtaq *et al.*,

Tabela 1. Produção de proteases por cogumelos comestíveis pertencentes à coleção DPUA. Letras iguais na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Cogumelos	Atividade proteolítica (U/mL)
<i>Auricularia mixotricha</i> DPUA 1695	2,70 ± 0,00 ^e
<i>Ganoderma lucidum</i> DPUA 1694	23,50 ± 0,00 ^c
<i>Lentinus citrinus</i> DPUA 1535	19,30 ± 0,01 ^d
<i>Lentinus crinitus</i> DPUA 1693	27,20 ± 0,02 ^b
<i>Pleurotus albidus</i> DPUA 1692	34,00 ± 0,00 ^a
<i>Pleurotus ostreatoroseus</i> DPUA 1720	1,90 ± 0,00 ^f

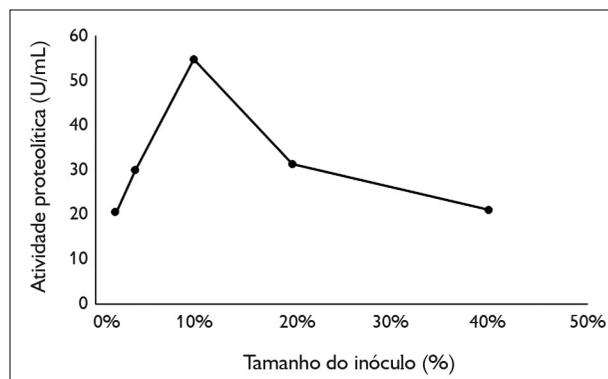


Figura 1. Efeito do tamanho do inóculo na atividade proteolítica de *Pleurotus albidus*.

2015). Inóculo de 3% (v/v) proporcionou maior atividade proteolítica por *P. sajor-caju*, em fermentação semissólida (Ravikumar *et al.*, 2012).

O efeito da idade do inóculo na atividade proteolítica de *P. albidus* está demonstrado na Figura 2. A máxima atividade (80,33 U/mL) foi determinada com inóculo de cinco dias de crescimento. Houve gradual decréscimo de atividade com o aumento da idade do inóculo. Com a utilização de inóculos de 8, 12 e 20 dias, foram verificadas reduções de 28,57%, 47,40% e 77,39% nas atividades proteolíticas, respectivamente. Boukhalfa-Lezzar *et al.* (2014) também verificaram que *Aspergillus oryzae* (Ahlb.) Cohn 1884 NRRL 2220 produziram maior quantitativo de protease ao ser empregado inóculo com cinco dias de idade. Zhou *et al.* (2009), Rani *et al.* (2012) e Prasad & Raju (2013) determinaram maior atividade de proteases por *Laccocephalum mylittae* (Cooke & Massee) Núñez & Ryvarden 1995, *A. flavus* Link 1809 AS2 e *R. oligosporus* NCIM 1215, utilizando inóculo com quatro dias de crescimento dessas espécies.

EFEITO DO pH E DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE E NA ESTABILIDADE DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

A Figura 3 mostra o efeito do pH na atividade proteolítica do extrato bruto de *P. albidus*. A enzima demonstrou maior atividade em pH 5, seguida de decréscimo de atividade nos valores de pH superiores, apresentando somente 23,70% de atividade em pH 10. Geralmente, enzimas de fungos apresentam atividade ótima em pH ácido (Merheb *et al.*, 2007). Em pH 5, as proteases de *P. eryngii*, *Mucor mucedo* L. 1763 DMS 809 e *Termitomyces clypeatus* R. Heim 1951 MTCC 5091 apresentaram maiores atividades catalíticas, conforme descrito por Cha *et al.* (2010), Yegin *et al.* (2012) e Majumder *et al.* (2015), respectivamente. Vannabun *et al.* (2014) relataram que, em condições fora do pH ótimo, ocorre perda de atividade enzimática, devido a alterações da conformação da proteína, causada pela repulsão de cargas. Nessas condições, as distribuições de carga da superfície proteica e

as conformações são alteradas, fazendo com que as enzimas não consigam se associar com o substrato corretamente.

O efeito da temperatura na atividade enzimática está demonstrado na Figura 4. A atividade das proteases foi

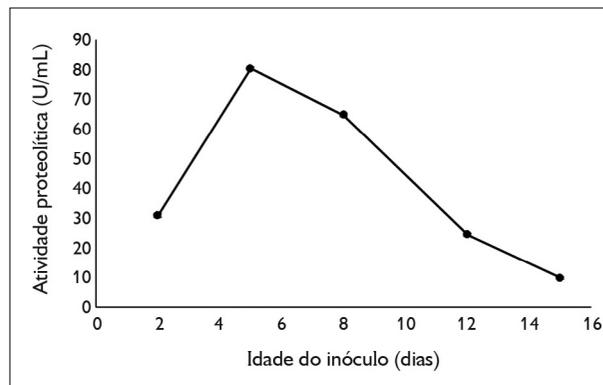


Figura 2. Efeito da idade do inóculo na atividade proteolítica de *Pleurotus albidus*.

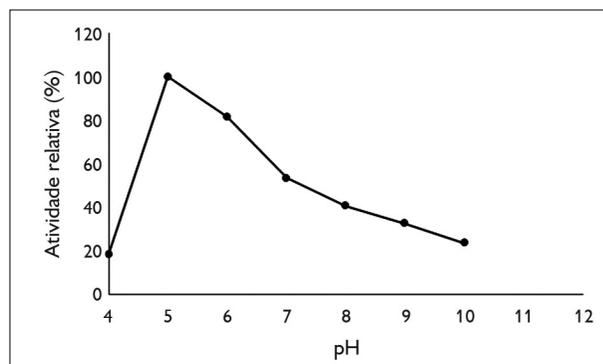


Figura 3. Efeito do pH na atividade proteolítica de *Pleurotus albidus*.

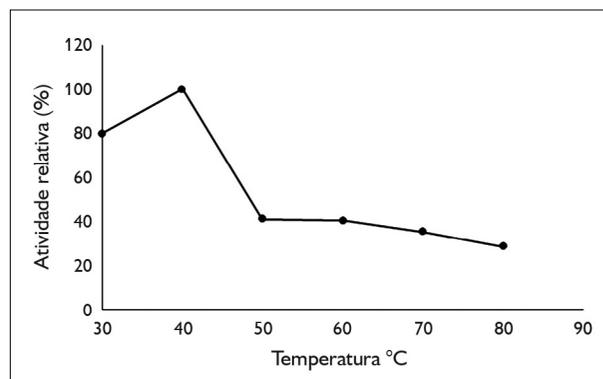


Figura 4. Efeito da temperatura na atividade proteolítica de *Pleurotus albidus*.

determinada em todas as temperaturas avaliadas, porém a máxima atividade catalítica foi verificada em 40 °C, seguida de decréscimo de atividade nas temperaturas mais elevadas. O valor de temperatura ótima encontrado no presente estudo está de acordo com aqueles reportados para outros fungos filamentosos. Guan *et al.* (2011) e Moon *et al.* (2014) relataram que as serinoproteases de *Pholiota nameko* (T. Itô) S. Ito & S. Imai 1933 e as metaloproteases fibrinolíticas de *Lyophyllum shimeji* (Kawam.) Hongo 1971, respectivamente, agiram otimamente na temperatura de 40 °C. As proteases alcalinas de *Myceliophthora sp.* apresentaram atividade ótima nas temperaturas de 40-45 °C, conforme relatado por Zanphorlin *et al.* (2011). As proteases de *Piptoporus soloniensis* (Dubois) Pilát 1937 apresentaram maior atividade catalítica na faixa de temperatura entre 35 a 40 °C (El-Baky *et al.*, 2011). A velocidade de reação aumenta à medida que a temperatura inicialmente aumenta, devido à elevação da energia cinética da reação de moléculas. No entanto, como a temperatura é potencializada, a energia cinética da enzima ultrapassa a barreira de energia, resultando na quebra das ligações de hidrogênio e hidrofóbicas fracas, que mantêm a estrutura da enzima. Nestas condições de temperatura, a enzima é desnaturada, resultando na perda de atividade catalítica (Daniel *et al.*, 2010; Oueslati & Mounirhaouala, 2014).

Os resultados relacionados à estabilidade do extrato bruto em diferentes valores de pH estão demonstrados na

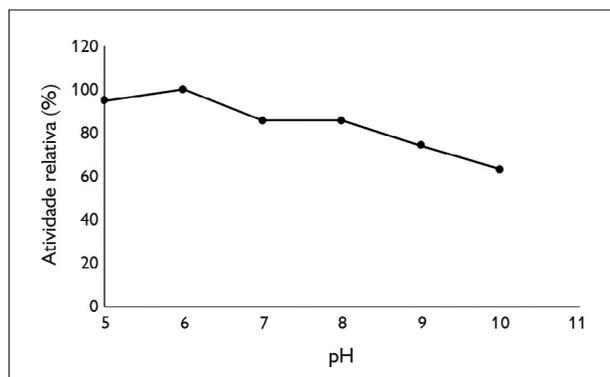


Figura 5. Efeito do pH na estabilidade da atividade proteolítica de *Pleurotus albidus*.

Figura 5. As proteases de *P. albidus* apresentaram elevada estabilidade, retendo, em média, 90,30% de atividade entre pH de 5 a 8. Em pH 9 e 10, foi verificada perda de atividade de 25,80% e 36,80%, respectivamente. As proteases de *Thermomucor indicae-seudaticae* Subrahm., B.S. Mehrotra & Thirum. 1977 N31, reportadas por Merheb-Dini *et al.* (2010), apresentaram estabilidade entre pH 5 e 7, retendo 65-70% de atividade. As proteases fibrinolíticas de *A. oryzae* KSK-3, estudadas por Shirasaka *et al.* (2012), foram mais ativas na faixa de pH entre 4 e 9. As serinoproteases de *A. fumigatus* Fresen, 1863 demonstraram estabilidade entre pH de 7 a 11, com valores de atividades residuais acima de 50%, conforme relatado por Hernández-Martínez *et al.* (2011).

A estabilidade das proteases de *P. albidus* em diferentes temperaturas está demonstrada na Figura 6. As proteases exibiram maior estabilidade nas temperaturas entre 30 a 60 °C, retendo, em média, 86,70% de atividade. Na temperatura de 80 °C, foi verificado decréscimo acentuado na ação catalítica, em que a enzima reteve apenas 25,45% de atividade relativa. Similar estabilidade à temperatura foi descrita por Moon *et al.* (2014) e Shankar *et al.* (2011) para os fungos *Lyophyllum shimeji* e *Beauveria sp.*, respectivamente. Em estudo realizado por Kumaran *et al.* (2011), as proteases de *G. lucidum* Vk12 apresentaram estabilidade térmica até 55 °C. Choi *et al.* (2011) verificaram que as proteases fibrinolíticas de *Cordyceps militaris* (L.) Fr. 1818 apresentaram

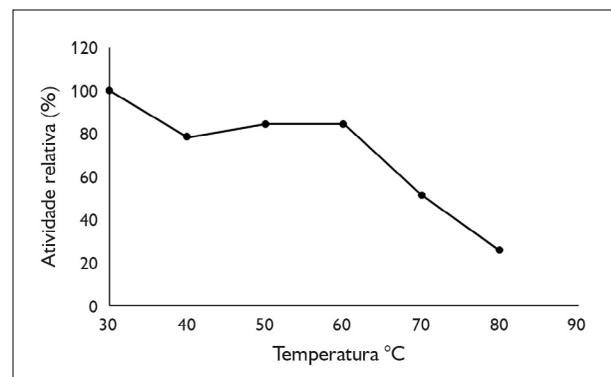


Figura 6. Efeito da temperatura na estabilidade da atividade proteolítica de *Pleurotus albidus*.

estabilidade na faixa de temperatura entre 20 a 40°C, porém foram completamente inativadas a 50 °C.

EFEITO DE INIBIDORES E DE ÍONS METÁLICOS NA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

O efeito de inibidores está demonstrado na Figura 7. As proteases não foram sensíveis aos inibidores de metaloproteases (EDTA) e aspartatoproteases (pepstatin A), retendo 93% e 92% de atividade, respectivamente. Estes resultados indicam a ausência de íons metálicos e de resíduos de ácido aspártico no centro catalítico da enzima. Porém, PMSF e ácido iodoacético foram os inibidores que mais reduziram a atividade proteolítica, ambos causando inibição de 30%. Estes resultados sugerem a presença de serinoproteases e cisteinoproteases no extrato bruto de *P. albidus*. Majumder *et al.* (2014) também relataram que as proteases presentes no extrato bruto do cogumelo *T. clypeatus* foram sensíveis a inibidores de serinoproteases (PMSF) e de cisteinoproteases (E-64 e iodoacetamina). Estes autores sugeriram a presença de proteases com grupos de cisteína-serina cruzados, em função da sua susceptibilidade a inibidores de cisteína e de serina proteases. Na literatura científica, há poucos estudos reportando a presença de cisteinoproteases em extratos de fungos filamentosos. Como exemplo, pode ser citado o estudo realizado por Shin & Choi (1998), que purificaram e caracterizaram uma cisteinoprotease de *P. ostreatus*. Contudo, a produção de serinoproteases por fungos tem sido reportada em vários estudos, como os de Cha *et al.* (2010), Choi *et al.* (2011), Guan *et al.* (2011), Iketani *et al.* (2013) e Zhang *et al.* (2010a).

Os resultados referentes ao efeito de íons metálicos na atividade das proteases estão demonstrados na Figura 8. Os íons Fe^{2+} exerceram forte influência, causando aumento superior em sete vezes na atividade catalítica em relação ao controle. Os íons Mn^{2+} elevaram em 16% a atividade proteolítica. Contudo, Cu^{2+} , Na^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Zn^{2+} , Ca^{2+} promoveram discreta inibição, e a enzima reteve, em ordem decrescente, 91,50%, 90,30%, 88,85%,

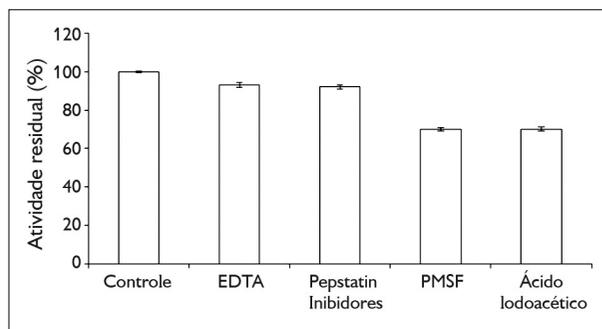


Figura 7. Efeito de inibidores na atividade proteolítica de *Pleurotus albidus*.

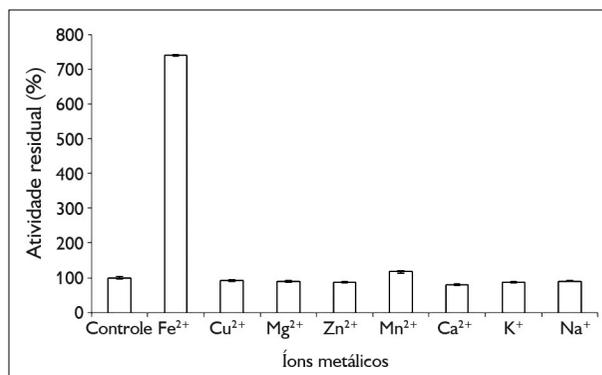


Figura 8. Efeito de íons metálicos na atividade proteolítica de *Pleurotus albidus*.

87,65%, 87,15% e 80,60% de atividade proteolítica, respectivamente. Sun *et al.* (2014) também relataram incremento na atividade catalítica de *R. microsporus* var. *rhizopodiformis* (Cohn) Schipper & Stalpers 1984 F518 na presença de Fe^{2+} e Mn^{2+} . Zhang *et al.* (2010b) verificaram que os íons Fe^{2+} elevaram em 62,5% da protease alcalina sintetizada por *Helvella lacunosa* Afzel, 1783. Os íons Mn^{2+} estimularam em 54,10% as proteases produzidas por *A. oryzae*, conforme reportado por Shirasaka *et al.* (2012). Entre os íons que inibiram discretamente a atividade proteolítica de *P. albidus*, Ca^{2+} foi o que mais se sobressaiu. Resultados semelhantes foram relatados por Zheng *et al.* (2011) e Zhang *et al.* (2010a) para as proteases dos cogumelos *Termitomyces albuminosus* (Berk.) R. Heim 1941 e *Hypsizygus marmoreus* (Peck) H.E. Bigelow 1976, respectivamente.

CONCLUSÃO

Auricularia mixotricha, *Ganoderma lucidum*, *Lentinus citrinus*, *L. crinitus*, *Pleurotus albidus* e *P. ostreatoroseus* são fontes de enzimas proteolíticas. Destes macrofungos, *P. albidus* sintetizou valor significativo de proteases, sendo a produção destes biocompostos influenciada pelo tamanho e pela idade do inóculo. Em meio de cultivo líquido, *P. albidus* produz protease ácida, termoestável, do tipo cisteíno e serinoprotease, características bioquímicas que indicam a sua aplicação na indústria alimentícia, farmacêutica, têxtil e química.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e à Universidade Federal do Amazonas (UFAM), pelo apoio técnico, científico e financeiro.

REFERÊNCIAS

- BANO, S., M. U. DAHOT & S. H. A. NAQVI, 2016. Optimization of culture conditions for the production of protease by *Pleurotus eryngii*. **Pakistan Journal of Biotechnology** 13(3): 193-198.
- BOUKHALFA-LEZZAR, H., H. LEGHLIMI, E. COPINET, F. DUCHIRON & A. MECHAKRA-MAZA, 2014. Utilization of tomato pomace as a substrate for neutral protease production by *Aspergillus oryzae* 2220 on solid-state fermentation. **International Journal of Advanced Research** 2(11): 338-346.
- CAMPOS, C., D. C. DIAS, J. S. VALLE, N. B. COLAUTO & G. A. LINDE, 2010. Produção de biomassa, proteases e exopolissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* em cultivo líquido. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zootecnia da UNIPAR** 13(1): 19-24.
- CHA, W. S., S. S. PARK, S. J. KIM & D. CHOI, 2010. Biochemical and enzymatic properties of a fibrinolytic enzyme from *Pleurotus eryngii* cultivated under solid-state conditions using corn cob. **Bioresource Technology** 101(16): 6475-6481. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.048>.
- CHOI, D., W. S. CHA, N. PARK, H. W. KIM, J. H. LEE, J. S. PARK & S. S. PARK, 2011. Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from fruiting bodies of Korean *Cordyceps militaris*. **Bioresource Technology** 102(3): 3279-3285. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.002>.
- DANIEL, R. M., M. E. PETERSON, M. J. DANSON, N. C. PRICE, S. M. KELLY, C. R. MONK, C. S. WEINBERG, M. L. OUDSHOORN & C. K. LEE, 2010. The molecular basis of the effect of temperature on enzyme activity. **Biochemical Journal** 425(2): 353-360. DOI: <https://doi.org/10.1042/BJ20091254>.
- EL-BAKY, H. A., D. LINKE, M. NIMTZ & R. G. BERGER, 2011. PsoP1, a milk-clotting aspartic peptidase from the basidiomycete fungus *Piptoporus soloniensis*. **Process Biochemistry** 46(11): 2137-2143. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf2021495>.
- ERJAVEC, J., J. KOS, M. RAVNIKAR, T. DREO & J. SABOTIČ, 2012. Proteins of higher fungi – from forest to application. **Trends in Biotechnology** 30(5): 259-273. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.01.004>.
- FONSECA, T. R. B., J. F. BARRONCAS & M. F. S. TEIXEIRA, 2014. Produção em matriz sólida e caracterização parcial das proteases de cogumelo comestível da floresta amazônica. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial** 8(1): 1227-1236. DOI: <https://doi.org/10.3895/S1981-36862014000100008>.
- GENIER, H. L. A., F. E. F. SOARES, J. H. QUEIROZ, A. S. GOUVEIA, J. V. ARAÚJO, F. R. BRAGA, I. R. PINHEIRO & M. C. M. KASUYA, 2015. Activity of the fungus *Pleurotus ostreatus* and of its proteases on *Panagrellus* sp. larvae. **African Journal of Biotechnology** 14(17): 1496-1503. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJB2015.14447>.
- GUAN, G. P., G. Q. ZHANG, Y. Y. WU, H. X. WANG & T. B. NG, 2011. Purification and characterization of a novel serine protease from the mushroom *Pholiota nameko*. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 111(6): 641-645. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.02.009>.
- HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R., G. GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, C. W. BERGMANN, O. LOERA-CORRAL, A. ROJO-DOMÍNGUEZ, S. HUERTA-OCHOA, C. REGALADO-GONZÁLEZ & L. A. PRADO-BARRAGÁN, 2011. Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. **Process Biochemistry** 46(10): 2001-2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.07.013>.
- IKETANI, A., M. NAKAMURA, Y. SUZUKI, K. AWAI & Y. SHIOI, 2013. A novel serine protease with caspase- and legumain-like activities from edible basidiomycete *Flammulina velutipes*. **Fungal Biology** 117(3): 173-181. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2013.01.005>.
- INÁCIO, F. D., R. O. FERREIRA, C. A. V. ARAÚJO, T. BRUGNARI, R. CASTOLDI, R. M. PERALTA & C. G. M. SOUZA, 2015. proteases of wood rot Fungi with emphasis on the genus *Pleurotus*. **BioMed Research International** 2015: 1-10. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/290161>.
- IRFAN, M., A. RAUF, Q. SYED, M. NADEEM & S. BAIG, 2011. Exploitation of different agro-residues for acid protease production by *Rhizopus* sp. in Koji Fermentation. **International Journal for Agro Veterinary and Medical Sciences** 5(1): 43-52. DOI: <http://dx.doi.org/10.5455/ijavms.20110215080443>.
- KUDRYATSEVA, O. A., Y. E. DUNAEVSKY, O. V. KAMZOLKINA & M. A. BELOZERSKY, 2008. Fungal proteolytic enzymes: features of the extracellular proteases of xylotrophic basidiomycetes. **Microbiology** 77(6): 643-653. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0026261708060015>.

- KUMARAN, S., P. PALANI, R. NISHANTHI, S. SRIMATHI & V. KAVIYARASAN, 2011. Purification of an intracellular fibrinolytic protease from *Ganoderma Lucidum* Vk12 and its susceptibility to different enzyme inhibitors. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research** 10(4): 413-420. DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v10i4.6>.
- LACAZ, C. S., E. PORTO, J. E. C. MARTINS, E. M. HEINS-VACCARI & N. TAKAHASHI DE MELO, 2002. **Tratado de micologia médica**: 9. ed.: 1-1104. Savier, São Paulo.
- LEIGHTON, T. J., R. H. DOI, R. A. J. WARREN & R. A. KELLN, 1973. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Molecular Biology** 76(1): 103-122. DOI: <https://doi.org/10.1016/0022-2836(73)90083-1>.
- LI, Q., L. YI, P. MAREK & B. L. IVERSON, 2013. Commercial proteases: present and future. **FEBS Letters** 587(8): 1155-1163. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2012.12.019>.
- MACHADO, A. R. G., M. F. S. TEIXEIRA, L. S. KIRSCH, M. C. L. CAMPELO & I. M. A. OLIVEIRA, 2016. Nutritional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region. **Saudi Journal of Biological Sciences** 23(5): 621-627. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.07.002>.
- MAJUMDER, R., S. P. BANIK, L. RAMRAKHIANI & S. KHOWALA, 2014. Bioremediation by alkaline protease (AkP) from edible mushroom *Termitomyces clypeatus*: optimization approach based on statistical design and characterization for diverse application. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** 90(10): 1886-1896. DOI: <https://doi.org/10.1002/jctb.4500>.
- MAJUMDER, R., S. P. BANIK & S. KHOWALA, 2015. Purification and characterisation of κ -casein specific milk-clotting metalloprotease from *Termitomyces clypeatus* MTCC 5091. **Food Chemistry** 173: 441-448. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.027>.
- MALIK, N. & V. SHINDE, 2016. Comparative analysis of alkaline protease production by solid state and submerged fermentation. **International Journal of Development Research** 6(2): 6972-6976.
- MERHEB, C. W., H. CABRAL, E. GOMES & R. SILVA, 2007. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. **Food Chemistry** 104(1): 127-131. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.11.010>.
- MERHEB-DINI, C., E. GOMES, M. BOSCOLO & R. SILVA, 2010. Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31: (Milk-clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31). **Food Chemistry** 120(1): 87-93. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.075>.
- MINITAB, 2010. **Minitab statistical software**. LEAD Technologies, Inc. Version 16.0.
- MOON, S. M., J. S. KIM, H. J. KIM, M. S. CHOI, B. R. PARK, S. G. KIM, H. AHN, H. S. CHUN, Y. K. SHIN, J. J. KIM, D. K. KIM, S. Y. LEE, Y. W. SEO, Y. H. KIM & C. S. KIM, 2014. Purification and characterization of a novel fibrinolytic α chymotrypsin like serine metalloprotease from the edible mushroom, *Lyophyllum shimeji*. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 117(5): 544-550. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.10.019>.
- MUSHTAQ, Z., M. IRFAN, M. NADEEM, M. NAZ & Q. SYED, 2015. Kinetics study of extracellular detergent stable alkaline protease from *Rhizopus oryzae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 58(2): 175-184. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-8913201400071>.
- NAIR, R. A. & C. GEETHU, 2015. Purification and characterization of secretory serine protease from necrotrophic oomycete, *Pythium myriotylum* Dreschler. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 31(1): 85-94. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-014-1767-0>.
- ORTIZ, G. E., D. G. NOSEDA, M. C. P. MORA, M. N. RECUPERO, M. BLASCO & E. ALBERTÓ, 2016. A comparative study of new *Aspergillus* Strains for proteolytic enzymes production by solid state fermentation. **Enzyme Research** 2016: 1-11. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/3016149>.
- OUESLATI, A. & MOUNIRHAOUALA, 2014. Operating conditions effects on enzyme activity: case enzyme protease. **Journal of Engineering Research and Applications** 4(9): 33-37.
- PRASAD, D. S. R. & K. J. RAJU, 2013. Studies on the production of neutral protease by *Rhizopus oligosporus* NCIM 1215 using *Lablab purpureus* seed powder under solid state fermentation. **Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences** 3(4): 2772-2783.
- RAJORIYA, A. & N. GUPTA, 2016. Useful extracellular enzymatic activity of mycelial culture of some edible mushrooms of Odisha. **Agricultural Research & Technology** 3(1): 1-4.
- RAJPUT, K., S. CHANYAL & P. K. AGRAWAL, 2016. Optimization of protease production by endophytic fungus, *Alternaria alternata* isolated from gymnosperm tree - *Cupressus torulosa* D.DON. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences** 5(7): 1034-1054. DOI: <http://dx.doi.org/10.20959/wjpps20167-7137>.
- RANI, M. R., N. N. PRASAD & K. R. S. SAMBASIVARAO, 2012. Optimization of cultural conditions for the production of alkaline protease from a mutant *Aspergillus flavus* AS2. **Asian Journal of Experimental Biological Sciences** 3(3): 565-576.
- RAVIKUMAR, G., D. GOMATHI, M. KALAISELVI & C. UMA, 2012. A protease from the medicinal mushroom *Pleurotus sajor-caju*: production, purification and partial characterization. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine** 2(1): 411-417. DOI: <https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60198-1>.

- SABOTIČ, J. & J. KOS, 2012. Microbial and fungal protease inhibitors-current and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology** 93(4): 1351-1375. DOI: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-011-3834-x>>.
- SHANKAR, S., M. RAO & R. S. LAXMAN, 2011. Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveria* sp. **Process Biochemistry** 46(2): 579-585. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.10.013>>.
- SHIN, H. H. & H. S. CHOI, 1998. Purification and characterization of cysteine protease from *Pleurotus ostreatus*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry** 62(7): 1416-1418. DOI: <<https://doi.org/10.1271/bbb.62.1416>>.
- SHIRASAKA, N., M. NAITOU, K. OKAMURA, M. KUSUDA, Y. FUKUTA & T. TERASHITA, 2012. Purification and characterization of a fibrinolytic protease from *Aspergillus oryzae* KSK-3. **Mycoscience** 53(5): 354-364. DOI: <<https://doi.org/10.1007/s10267-011-0179-3>>.
- SHIVASHANKAR, M. & B. PREMKUMARI, 2014. Enzyme kinetics of protease from *Hypsizygus ulmarius*. **International Journal of Pharma and Bio Sciences** 5(2): 746-754.
- SILVA, O. S., R. L. OLIVEIRA, C. M. SOUZA-MOTTA, A. L. F. PORTO & T. S. PORTO, 2016. Novel Protease from *Aspergillus tamarii* URM4634: production and characterization using inexpensive agroindustrial substrates by solid-state fermentation. **Advances in Enzyme Research** 4(4): 125-143. DOI: <<http://dx.doi.org/10.4236/aer.2016.44012>>.
- SRILAKSHMI, J., J. MADHAVI, S. LAVANYA & K. AMMANI, 2014. Commercial potential of fungal protease: past, present and future prospects. **Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences** 2(4): 218-234.
- SUGANTHI, C., A. MAGESWARI, S. KARTHIKEYAN, M. ANBALAGAN, A. SIVAKUMAR & K. M. GOTHANDAM, 2013. Screening and optimization of protease production from a halotolerant *Bacillus licheniformis* isolated from saltern sediments. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology** 11(1): 47-52. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2013.02.002>>.
- SUN, Q., X. P. WANG, Q. J. YAN, W. CHEN & Z. Q. JIANG, 2014. Purification and characterization of a chymosin from *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 174(1): 174-185. DOI: <<https://doi.org/10.1007/s12010-014-1044-6>>.
- VANNABUN, A., S. KETNAWA, S. PHONGTHAI, S. BENJAKUL & S. RAWDKUEN, 2014. Characterization of acid and alkaline proteases from viscera of farmed giant catfish. **Food Bioscience** 6: 9-16. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2014.01.001>>.
- WANG, S. X., Y. LIU, G. Q. ZHANG, S. ZHAO, F. XU, X. L. GENG & H. X. WANG, 2012. Cordysobin, a novel alkaline serine protease with HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from the medicinal mushroom *Cordyceps sobolifera*. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 113(1): 42-47. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.09.005>>.
- YEGIN, S., Y. GOKSUNGUR & M. FERNANDEZ-LAHOIRE, 2012. Purification, structural characterization, and technological properties of an aspartyl proteinase from submerged cultures of *Mucor mucedo* DSM 809. **Food Chemistry** 133(4): 1312-1319. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.01.075>>.
- ZANPHORLIN, L. M., H. CABRAL, E. ARANTES, D. ASSIS, L. JULIANO, M. A. JULIANO, R. DA-SILVA, E. GOMES & G. O. BONILLA-RODRIGUEZ, 2011. Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. **Process Biochemistry** 46(11): 2137-2143. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.08.014>>.
- ZHANG, X., Q. LIU, G. ZHANG, H. WANG & T. NG, 2010a. Purification and molecular cloning of a serine protease from the mushroom *Hypsizygus marmoreus*. **Process Biochemistry** 45(5): 724-730. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.01.009>>.
- ZHANG, G., H. WANG, X. ZHANG & T. NG, 2010b. Helvellisin, a novel alkaline protease from the wild ascomycete mushroom *Helvella lacunosa*. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 109(1): 20-24. DOI: <<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.06.022>>.
- ZHENG, S., H. WANG & G. ZHANG, 2011. A novel alkaline protease from wild edible mushroom *Termitomyces albuminosus*. **Acta Biochimica Polonica** 58(2): 269-273.
- ZHOU, L. H., Y. Q. ZHANG, R. J. WANG, X. L. SHEN, Y. Q. LI & W. J. GUAN, 2009. Optimization of mycelial biomass and protease production by *Laccocephalum mylittae* in submerged fermentation. **African Journal of Biotechnology** 8(8): 1591-1601.