

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

THAYANE FELICIA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL E PRODUÇÃO DE PROTEASES
POR *Pleurotus djamor* EM SERRAGEM DE ANGELIM**

MANAUS-AM

2021

THAYANE FELICIA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL E PRODUÇÃO DE PROTEASES
POR *Pleurotus djamor* EM SERRAGEM DE ANGELIM**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à coordenação do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade do Estado do Amazonas – UEA, para obtenção do título de Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas.

Orientadora: Larissa Kirsch Barbosa

MANAUS, AM

2021

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

S586a da Silva, Thayane Felicia
AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL E
PRODUÇÃO DE PROTEASES POR *Pleurotus djamor* EM
SERRAGEM DE ANGELIM / Thayane Felicia da Silva.
Manaus : [s.n], 2021.
29 f.: color.; 30 cm.

TCC - Graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura
- Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2021.

Inclui bibliografia

Orientador: Larissa de Souza Kirsch Barbosa

1. *Pleurotus djamor*. 2. Resíduos agroindustriais. 3.
Serragem. 4. Proteases. I. Larissa de Souza Kirsch
Barbosa (Orient.). II. Universidade do Estado do
Amazonas. III. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO
MICELIAL E PRODUÇÃO DE PROTEASES POR
Pleurotus djamor EM SERRAGEM DE ANGELIM

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

FOLHA DE APROVAÇÃO

THAYANE FELICIA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL E PRODUÇÃO DE PROTEASES
POR *Pleurotus djamor* EM SERRAGEM DE ANGELIM**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à coordenação do curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade do Estado do Amazonas – UEA, para obtenção do título de Graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas.

Aprovado em: ___ de ____ 2021

Banca Examinadora

Orientador (a)

Prof^a Dr^a Larissa Kirsch Barbosa, UEA

Membro Titular I

Prof^a Dr^a Ieda Hortêncio Batista, UEA

Membro Titular II

MSc. Cleudiane Pereira de Andrade, UEA

Suplente I

MSc. Josy Caldas da Silva, ILMD/FIOCRUZ

Suplente II

Prof^o Dr. Raimundo Lima Jr, UEA

A minha mãe, com todo meu amor,

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre ser tão bondoso e misericordioso até mesmo em momentos em que achei que estava caminhando sozinha, Ele se permaneceu fiel com seu infinito amor em todos os momentos sendo a minha luz no fim do túnel.

A minha querida orientadora Dra. Larissa Kirsch por todos seus ensinamentos, apoio e compreensão.

Ao laboratório de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Universidade do Estado do Amazonas, por disponibilizar o espaço para que os experimentos pudessem ser realizados.

Aos colegas do laboratório, em especial Beatriz Gomes, Bruna Frazão e Cleudiane Andrade pela ajuda com os experimentos.

Ao Grupo de Pesquisa Química Aplicada à Tecnologia, Dr. Rafael Oliveira e demais colegas, por me acolherem tão bem em outros projetos, pelos ensinamentos, todo apoio e momentos compartilhados.

Aos meus amigos de graduação, Débora Raposo e Kelly Soares por todo apoio, amizade e cada momento que aproveitamos juntos, gratidão por cada ajuda com os experimentos.

Aos meus amigos Beatriz Souza, D'ryane Pinheiro, Elizabeth Silva, Gabriela Mendes, Izabela Zanin, Jeycianne Bastos, Leticia Oka, Maria Luisa, Pollyana Fonseca, Rafaela Teixeira, Virgínia Dantas e Vitória Reis por todo apoio e por estarem nos momentos mais difíceis e nebulosos, obrigada por estenderem a mão quando estava no poço.

A minha mãe, por fazer o possível e o impossível por mim, por estar a meu lado e torcer pelo meu futuro e sonhos.

A Paulo Freire, que já se foi, por ter dado apoio em vários momentos, fazer parte da minha história e ter torcido pelo meu futuro.

E a todos que, mesmo indiretamente, passaram por minha vida e deixou positivities e ensinamentos, muito obrigada!

*“Deixe os meus próprios pés me guiarem
Eu irei mergulhar em mim mesmo
No meu mais profundo interior
Eu me encontrei”*

(BTS. Black Swan)

RESUMO

O interesse pela produção de cogumelos comestíveis em larga escala tem aumentado, dessa forma aumentando o interesse de cultivos com melhor custo e benefício usando meios de culturas alternativos. Devido a capacidade de colonizar uma grande variedade de substratos, espécies do gênero *Pleurotus* podem ser cultivadas artificialmente em substratos formulados a partir de resíduos agroindustriais para diversos fins biotecnológicos. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a viabilidade da serragem de angelim para o crescimento micelial e a produção de proteases da espécie *Pleurotus djamor*. Para o cultivo foi utilizada a serragem de angelim que foi pesada e misturada com o farelo de trigo ou milho (suplemento nutricional) nas concentrações de 0, 20 e 30%. Os cultivos permaneceram a 25°C por 18 dias. A mensuração do crescimento foi realizada a cada 24 horas após 72 horas de inoculação. Após o término da avaliação do crescimento e vigor micelial foi realizada a avaliação da atividade quantitativa de proteases. O maior crescimento e vigor micelial ocorreu em 18 dias de crescimento no tratamento suplementado com 20% de farelo de trigo que teve velocidade média de crescimento de 0,05 cm/dia, sendo mais rápido que os demais tratamentos testados que obtiveram: 10,5 cm (suplementado com 30% farelo de trigo), 8,7 cm (20 e 30% de suplementação de farelo de milho) e 6,2 cm (apenas serragem). Os maiores valores obtidos ocorreram em substratos com adição do farelo de trigo, que influenciou de forma positiva o crescimento, o vigor micelial e a atividade de proteases, pois expressaram maiores atividades média de 4,55 U/mL (30%) e 3,68 U/mL (20%), quando comparado aos outros tratamentos, onde os tratamentos com adição de farelo de milho obtiveram 1,78 U/mL (20%) e 0,67 U/mL (30%). O tratamento sem adição de farelo obteve média de 3,20 U/mL na atividade enzimática. Dessa forma, a adição do farelo de trigo foi viável para um maior crescimento e vigor micelial, como também para a atividade enzimática para a espécie *P. djamor*. Os experimentos com a espécie *P. eryngii* ainda estão em andamento.

Palavras-chave: *Pleurotus djamor*, Resíduos agroindustriais, serragem, proteases.

ABSTRACT

Interest in large-scale production of edible mushrooms has increased, thus increasing the interest in cost-effective cultivation using alternative culture media. Due to the ability to colonize a wide variety of materials, species of the genus *Pleurotus* can be artificially cultivated in substrates formulated from agro-industrial residues for different biotechnological purposes. Thus, this work aims to evaluate the viability of angelim sawdust for mycelial growth and the production of proteases of the species *Pleurotus djamor* and *Pleurotus eryngii*. For cultivation, angelim sawdust was weighed and mixed with wheat or corn bran (nutritional supplement) at concentrations of 0, 20 and 30%. The cultures remained at 25°C for 18 days. Growth measurement was performed every 24 hours after 72 hours of inoculation. After the end of the evaluation of mycelial growth and vigor, the evaluation of the quantitative activity of proteases was carried out. The greatest growth and mycelial vigor for the *P. djamor* species occurred in 18 days of growth in the treatment supplemented with 20% wheat bran, which had an average growth speed of 0.05 cm/day, being faster than the other treatments tested than obtained: 10.5 cm (supplemented with 30% wheat bran), 8.7 cm (20 and 30% corn bran supplementation) and 6.2 cm (sawdust only). The highest values obtained occurred in substrates with the addition of wheat bran, which positively influenced growth, mycelial vigor and protease activity, as they expressed higher average activities of 4.55 U/mL (30%) and 3, 68 U/mL (20%), when compared to other treatments, where treatments with addition of corn bran obtained 1.78 U/mL (20%) and 0.67 U/mL (30%). The treatment without the addition of bran obtained an average of 3.20 U/mL in the enzymatic activity. Thus, the addition of wheat bran was viable for greater growth and mycelial vigor, as well as for the enzymatic activity for the species *P. djamor*. Experiments with the species *P. eryngii* are still ongoing.

Keywords: *Pleurotus djamor*, Agroindustrial waste, sawdust, proteases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas do basidioma	13
Figura 2 - Espécies de <i>Pleurotus</i> (a) <i>P. pulmonarius</i> (b) <i>P. citrinopileatus</i> (c) <i>P. eryngii</i> (d) <i>P. ostreatus</i>	15
Figura 3 - Preparação do substrato para o inóculo	18
Figura 4 - Média de crescimento micelial vertical da espécie <i>P. djamor</i> nos diferentes tratamentos durante 18 dias	20
Figura 5 - Vigor micelial (a) SA0F (b) SAFM20 (c) SAFM30 (d) SAFT20 (e) SAFT30	21

LISTA DE ABREVIATURAS

BDA	Ágar batata dextrose
FM	Farelo de milho
FT	Farelo de trigo
SA	Serragem de angelim
SAF0	Serragem de angelim sem adição de farelo
SAFM20	Serragem de angelim com 20% de farelo de milho
SAFM30	Serragem de angelim com 30% de farelo de milho
SAFT20	Serragem de angelim com 20% de farelo de trigo
SAFT30	Serragem de angelim com 30% de farelo de trigo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Gênero <i>Pleurotus</i>	15
1.2. Resíduos agroindustriais	16
1.3. Proteases.....	17
1.4 Cultivo semi-sólido	17
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Organismos e reativação	18
3.2. Resíduos agroindustriais para o crescimento micelial vertical	19
3.2.1. Avaliação do crescimento micelial vertical	19
3.3. Atividade quantitativa de proteases	20
3.4 Análises estatísticas	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1 Crescimento micelial vertical	20
4.2 Vigor micelial	22
4.3 Atividade proteolítica	23
5. CONCLUSÃO	24
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1. INTRODUÇÃO

Os fungos são organismos muito diversos com uma grande quantidade de espécies. Estima-se que existam entre 2,2 a 3,8 milhões de espécies de fungos no mundo e apenas 120.000 espécies foram descritas, o que representa apenas cerca de 3 a 8% dessa estimativa. São muito comuns na natureza e podem ser encontrados no solo, na água, como decompositores, parasitas ou de forma simbiote com outros organismos, com diferentes estruturas morfológicas, podendo ser microscópicos, como leveduras (unicelulares) e fungos filamentosos (multicelulares) ou macroscópicos, que apresentam corpo de frutificação. (RAMÍREZ, 2012; ABREU et al, 2015; ROCA, 2015; AZEVEDO & BARATA, 2018).

Na natureza esses organismos são importantes na ciclagem de nutrientes, decompondo a matéria orgânica e disponibilizando os nutrientes no solo, contribuindo assim na manutenção de carbono, nitrogênio, fósforo e potássio (LOGUERCIO-LEITE et al, 2006; BRAGA-NETO et al, 2008; SALVI, 2011; TRIERVEILER-PEREIRA et al, 2018).

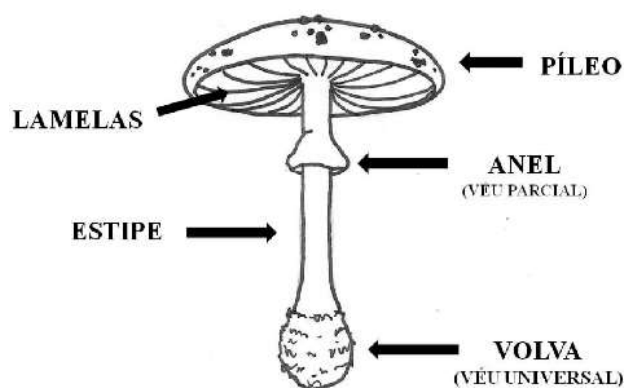
Por muito tempo os fungos foram incluídos no Reino Plantae e conforme estudados, percebeu-se que possuíam características que os diferenciavam desse reino e dos demais, sendo dessa forma, criado o Reino Fungi, onde os fungos estão agrupados atualmente (KUHAR et al, 2013; SILVA, 2016). De acordo com a classificação de Hibbett et al. (2007), os fungos estão classificados nos filos Chytridiomycota, Blastocladiomycota, Neocallimastigomycota, Microsporidia, Glomeromycota, Ascomycota e Basidiomycota. No entanto, outros autores propuseram outras classificações, como Tedersoo et al. (2017), que sugere uma nova classificação composta por 18 filos, além dos sete descritos por Hibbett et al. (2007) incluíram Entorrhizomycota, Calcarisporiellomycota, Mortierellomycota, Mucoromycota, Zoopagomycota, Entomophthoromycota, Kickxellomycota, Monoblepharomycota, Aphelidiomycota, Basidiobolomycota, Olpidiomycota e Rozellomycota.

Um dos principais representantes do Reino Fungi é o filo Basidiomycota, que abriga várias espécies de fungos macroscópicos, os basidiomicetos, que são conhecidos popularmente como “cogumelos”. Tais organismos possuem micélio septado, com doliporo e grampo de conexão. O cogumelo, como mostra a figura 1, é formado por filamentos chamados de hifas, que se unem formando o micélio vegetativo, responsável pela absorção dos nutrientes e o reprodutivo, composto por estipe, píleo e lamela, porém, nem todas as espécies apresentam anel e volva (COIMBRA, 2013; KUHAR et al, 2013; ANDRADE, 2017).

Já foram descritas cerca de 29.914 espécies do filo Basidiomycota, sendo que, aproximadamente 2000 são consideradas comestíveis, mas apenas 25 são cultivadas

comercialmente. A comestibilidade dos fungos pode ser definida por critérios que incluem a ausência de efeitos tóxicos nos seres humanos, aroma e sabor agradável (FURLANI & GODOY, 2007; NASCIMENTO et al, 2011).

Figura 1. Estruturas do basidioma.



Fonte: COIMBRA, 2013.

Por possuírem propriedades medicinais, como efeitos antivirais, antibacterianos, anti-hipertensivos, entre outras finalidades, os cogumelos já eram utilizados desde os tempos mais remotos pelas civilizações antigas. Altamente ricos em proteínas, sais minerais e vitaminas, os fungos comestíveis são muito apreciados na gastronomia (TEIXEIRA et al., 2011; MUZZI et al., 2013).

No Brasil, a população não tem o costume de consumir cogumelos comestíveis na alimentação quando comparado a outros países, como por exemplo a China. Porém, com os constantes estudos a respeito das propriedades nutricionais e medicinais desses cogumelos, houve um maior crescimento no consumo de cogumelos comestíveis, aumentando assim a produção e a comercialização no país (KOMURA, 2006; DAVID et al, 2016).

O país não possui estatísticas oficiais sobre a produção de cogumelos, mas sabe-se que São Paulo é um dos estados com maior produção de cogumelos comestíveis no Brasil. Das espécies de cogumelos comestíveis mais cultivadas e comercializadas no Brasil são: *Agaricus bisporus* (champignon), *Lentinula edodes* (Shiitake) e algumas espécies do gênero *Pleurotus* (Shimeji ou cogumelo ostra) um dos gêneros mais produzidos no Brasil porque tem a capacidade de

adaptação a diversos resíduos agroindustriais, tornando o cultivo de baixo custo e alta qualidade (FURLANI & GODOY, 2007; SILVA & MALTA, 2016; CARDOSO et al., 2013). Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento micelial e a produção de proteases da espécie *Pleurotus djamor* em serragem de angelim em tratamentos com e sem adição suplementação de farelos em diferentes concentrações.

1.1 Gênero *Pleurotus*

O gênero *Pleurotus* pertence à ordem Agaricales e à família Agaricaceae. As espécies desse gênero apresentam uma grande variedade de cores, geralmente claras, rosadas ou cinzas, além de outras cores, que variam de acordo com a espécie, incidência de luz durante a fase de frutificação, disponibilidade de nutrientes no substrato, tempo de incubação e temperatura (REIS, 2010; RIVAS, 2010; RAMÍREZ, 2012; CARDOSO, 2013; SALMONES & MATA, 2015; SILVA et al, 2018).

Figura 2. Espécies de *Pleurotus*: (a) *P. pulmonarius* (b) *P. citrinopileatus* (c) *P. eryngii* (d) *P. ostreatus*



Fonte: (a) <https://mycelia.be/shop/m2204-pleurotus-pulmonarius/>

(b) *Pleurotus citrinopileatus*: <https://marylandbiodiversity.com/view/20105>

(c) <https://portuguese.alibaba.com/product-detail/pleurotus-eryngii-mushroom-60725586054.html>

(d) <https://www.fieldforest.net/product/Oyster-PoHu-Pleurotus-ostreatus-Grain-Spawn/oyster-grain-spawn>

São organismos saprófitos, porém, predominantes em climas tropicais e subtropicais. Podem ser cultivados artificialmente, por serem capazes de colonizar materiais diversos, pois liberam enzimas digestivas que degradam lignina, celulose e hemicelulose. Seu crescimento

pode ser afetado por vários fatores como temperatura, pH ou nutrientes disponíveis no substrato ao qual se encontra. Sendo que se desenvolve em temperatura de 15 a 28° C e pH entre 5 e 7. Dessa forma, pode ser cultivado em substratos formulados a partir de resíduos agroindustriais como matéria-prima (casca e polpa de frutas, gramíneas e resíduos madeireiros), que podem ser suplementados com farelos de cereais (farelos de aveia, trigo, arroz e milho) tornando assim o cultivo de baixo custo (DONINI, 2006; BERNARDI, 2009; ALBUQUERQUE, 2012; RAMÍREZ, 2012; VIEIRA, 2012; CARDOSO, 2013).

1.2 Resíduos Agroindustriais

Com o aumento da população mundial, a demanda e consumo de alimentos tem causado o acúmulo de resíduos agroindustriais. Com a crescente preocupação com o meio ambiente, busca-se medidas preventivas, para a redução da quantidade de resíduos gerados, sendo usados para formulação de rações, adubo e para cultivo de cogumelos comestíveis, dessa forma, contribuindo também para a diminuição dos impactos causados pelo acúmulo desses resíduos. Com base na literatura, no Brasil, os resíduos mais utilizados para o cultivo de cogumelos comestíveis têm sido utilizados são o bagaço de cana-de-açúcar e o *Eucalyptus* sp., porém, devido à baixa disponibilidade na região amazônica, busca-se outros resíduos regionais que sejam viáveis para a produção de cogumelos comestíveis, como palha de milho, folha de bananeira, cascas e semente de tucumã, sendo também utilizado resíduos madeireiros. (MOTATO, 2006; RAMPINELLI, 2009; BENTO, 2012; ANDRADE, 2013).

O aproveitamento de resíduos madeireiros vem sendo cada vez mais utilizado e mostra-se viável para o cultivo de espécies de *Pleurotus*. Segundo um levantamento das condições de uso e processamento de madeiras nas indústrias madeireiras de Manaus, é constatada a perda de até 60% de matéria prima, gerando acúmulo desse material e posteriores problemas ambientais e para a população. E uma alternativa é o uso desse material para a formulação de substratos para a produção de basidiomas e biocompostos, como já reportado por Sales-Campos (2011) que usou serragens de *Simarouba amara* Aubl. (marupá), *Ochroma pyramidale* Cav. ex. Lam. (pau de balsa) e *Anacardium giganteum* Hanc. ex Engl. (cajuí) para cultivo de espécies de cogumelos comestíveis. Sendo também cada vez mais utilizados também para produção de enzimas proveniente de cogumelos (SALES-CAMPOS, 2011; FONSECA, 2013; LIMA, 2014).

1.3 Proteases

As proteases, também encontradas na literatura como peptidases ou proteinases, são enzimas capazes de clivar ligações peptídicas das proteínas. São classificadas em exo ou endopeptidases, pelas condições ótimas de pH ou pelo componente presente no sítio ativo. São enzimas usadas em grande escala em indústrias de detergentes, laticínios, carnes, panificação e couro e representam cerca de 75% do total de enzimas comercializadas em todo o mundo (FREITAS, 2009; MARTIM, 2017).

Esses biocatalisadores podem ser de diversas fontes, de organismos micro ou macroscópicos, vegetais, animais, fungos ou bactérias, no entanto as fontes com mais crescente interesse e estudos são as de origem fúngicas. Tal fato é decorrente de uma grande diversidade bioquímica e de maior controle sobre as condições necessárias para produção, sendo que a composição do meio, temperatura, pH, entre outros fatores, influenciam na produção dessas enzimas. A alta produtividade desses biocompostos extracelulares nos fungos também é um fator importante, visto que são recuperados de forma mais fácil através do cultivo em meio submerso ou semi-sólido (FONSECA, 2013; NEVES, 2014; MARTIM, 2017; PIMENTA, 2018).

1.4 Cultivo semi-sólido

O cultivo semi-sólido é caracterizado pelo crescimento de micro-organismos em superfícies sólidas, apresentando capacidade de absorver ou de conter água, sendo destacado para esse tipo de cultivo o uso de resíduos agroindustriais e florestais. Apesar do cultivo semi-sólido apresentar colonização mais lenta em comparação à cultivos em meio líquido, é um dos cultivos que mais se aproxima aos substratos encontrados na natureza (FONSECA, 2013; SILVA et al 2018).

No cultivo de espécies de *Pleurotus*, quanto maior for a velocidade do crescimento e do vigor micelial, menores são as chances desse substrato ser contaminado por outros organismos. Estudos têm demonstrado que o desenvolvimento micelial vertical proporciona o conhecimento adequado para o crescimento desses cogumelos. Dessa forma, é necessário fazer a escolha do substrato ideal, ou seja, que seja mais adequado para a linhagem que será cultivada, para que se tenha maior eficiência na formação de basidioma, como também em produção de compostos bioativos (ANDRADE, 2007; ALBUQUERQUE, 2012).

Além da produção desses cogumelos para fins de consumo alimentício, o interesse para produção de enzimas e outros biocompostos também tem grande procura devido a facilidade de controle das condições dos organismos, sendo usado para produção de celulases, usada na indústria têxtil, de alimentos como amilases e indústria de couros como lipases e proteases, assim como outras enzimas. Dessa forma, aumentando o interesse no conhecimento de produção de enzimas por cogumelos de forma mais eficiente utilizando meios de cultivo alternativos formulados a partir de resíduos agroindustriais (SOUZA, 2008, BONOMINI, 2017). Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo utilizar resíduos madeireiros, proveniente da região amazônica, para avaliar o crescimento micelial e produção de proteases pela espécie *P. djamor*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento micelial e a produção de proteases da espécie *Pleurotus djamor* em serragem de angelim em tratamentos com e sem adição suplementação de farelos em diferentes concentrações.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o crescimento e a velocidade micelial da espécie *P. djamor* em substratos à base de serragem de angelim em diferentes farelos e concentrações;
- Avaliar a eficácia da formulação do substrato mais promissor para a produção de proteases pela espécie *P. djamor*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Organismo e reativação

Nesta pesquisa foi utilizada a linhagem comercial de *P. djamor*, reativada em ágar batata dextrose (BDA) com extrato de levedura (0,5% p/v), em placas de Petri (90x15mm). Os cultivos foram incubados a 25 °C na ausência de luz por sete dias (KIRSCH et al, 2011). Os cultivos viáveis foram utilizados como inóculo no cultivo semi-sólido para avaliação do crescimento micelial vertical.

3.2 Resíduos agroindustriais para o crescimento micelial vertical

O resíduo agroindustrial utilizado na avaliação do crescimento micelial foi a serragem de angelim (SA), com adição de farelos de trigo (FT) e milho (FM) em diferentes concentrações. Os farelos foram obtidos em estabelecimento comercial na cidade de Manaus, enquanto a serragem de angelim proveniente de serralherias de Manaus. Inicialmente, os resíduos foram tratados, separadamente, com solução de hipoclorito de sódio 2,5% (para cada L de água) e pH ajustado para 6,0 (ROLLAN, 2003).

A serragem foi pesada em balança analítica e misturada com os farelos nas concentrações de 0, 20 e 30% nos seguintes tratamentos: SAF0 = apenas serragem; SAFM20 = serragem + farelo de milho em 20%; SAFM30 = serragem + farelo de milho em 30%; SAFT20 = serragem + farelo de trigo em 20%; e SAFT30 = serragem + farelo de trigo em 30%), umedecidos com água destilada até obtenção de 60% de umidade. Em seguida, tubos de ensaio (2,5 x 20 cm) foram preparados colocando-se na base destes uma porção de algodão umedecido com água destilada e acima do algodão foi adicionada uma coluna de 11 cm de substrato. Em seguida, os tubos foram tamponados com algodão e esterilizados 3 vezes a 121 °C, com duração de 30 minutos.

Em condições assépticas foram transferidos para os tubos de ensaio dois fragmentos de micélio ($\varnothing = 0,8\text{mm}$) das culturas puras (item 4.1.) e os tubos foram incubados a 25 °C.

Figura 3. Preparação do substrato para o inóculo.



Fonte: SILVA, 2020

3.2.1 Avaliação do crescimento micelial vertical

Após 72 horas da inoculação dos substratos foram realizadas medições do crescimento micelial ao longo do tubo, em quatro pontos, utilizando-se uma régua (DONINI et al, 2006), até a completa colonização do substrato em um dos tratamentos testados. Ao término das

medições foi determinada a velocidade de colonização de cada substrato pelo micélio dos fungos. Para avaliar o vigor micelial das espécies foi utilizada a classificação proposta por Marino et al. (2008), conforme as seguintes notas: ① micélio fracamente adensado; ② micélio mediamente adensado e ③ micélio fortemente adensado.

3.3 Atividade quantitativa de proteases

Quando finalizada a etapa de avaliação micelial, o substrato totalmente miceliado foi removido dos tubos e transferidos 20 g do substrato para frascos Erlenmeyers, onde foram adicionados 150 mL de água destilada estéril e em seguida mantidos durante 15 minutos, sob agitação de 150 rpm em agitador orbital. Após esse tempo de incubação as amostras foram filtradas com gaze estéril, para posteriormente ser realizada a leitura de atividade proteolítica.

A atividade quantitativa de proteases foi realizada segundo o método descrito por Leighton et al, 1973 (modificado), com a utilização de 0,25 mL do substrato com azocaseína 1% em solução tampão Tris-HCl 0,2 M com pH 7,2 e 0,15 mL de extrato enzimático. Esta mistura foi incubada durante 1 hora a 25 °C em câmara escura. Após esse tempo de incubação, foram adicionados 1,2 mL de ácido tricloroacético a 10% para interromper a reação. Em seguida essa mistura foi centrifugada a 10.000 rpm durante 10 minutos. Foram retirados 0,8 mL do sobrenadante e transferidos para tubos de ensaio contendo 1,4 mL de hidróxido de sódio 1M. Para o tampão sendo usada água destilada. Logo em seguida, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 440 nm.

3.4. Análises estatísticas

Os resultados experimentais foram expressos como média \pm erro padrão da média e submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey para determinar a significância das diferenças observadas nas amostras, ao nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Crescimento micelial vertical

Neste trabalho, foram propostos cinco tratamentos (SAF0, SAFM20, SAFM30, SAFT20 e SAFT30) para a espécie *P. djamor*, onde houve um maior crescimento em substratos

com adição do farelo de trigo quando comparado aos outros tratamentos. O tratamento que mais se destacou em relação à velocidade de crescimento micelial vertical da espécie *P. djamor*, foi o substrato SAFT20, onde o fungo colonizou todo o substrato (11 cm) em 18 dias com média de 0,05 cm por dia, seguido do tratamento SAFT30 que obteve resultados semelhantes, diferindo a velocidade apenas nos últimos dias de cultivo, onde o tratamento SAFT30 obteve crescimento micelial de 10,5 cm em 18 dias (Figuras 4).

Nos resultados de crescimento micelial dos tratamentos com adição de farelo de milho, quando comparado aos tratamentos com o uso de farelo de trigo, estes obtiveram crescimento bem menor, com velocidade média de 0,04 cm por dia, chegando a 8,7 cm de crescimento em 18 dias para ambas as concentrações (SAFM20 e SAFM30).

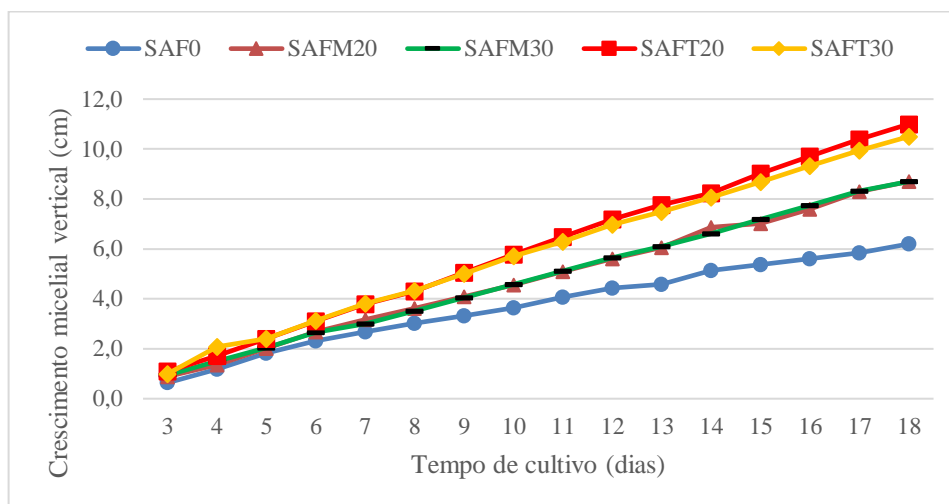
Entretanto, o tratamento sem a adição de nenhum farelo, apenas com o uso da serragem pura (SA), obteve o menor crescimento micelial vertical, com o crescimento médio de 0,03 cm por dia e atingindo 6,2 cm em 18 dias, o que sugere uma menor disponibilidade de nutrientes (Tabela 1). Tendo uma velocidade inferior quando comparado com a literatura, como por exemplo, Brito et al (2021) obtiveram velocidade de crescimento micelial vertical em cultivos a base de serragem + farelo de trigo de 0,37 cm/dia, onde apresentou crescimento rápido, porém com vigor fracamente adensado com a espécie *P. djamor*. O que mostra assim, resultados superiores aos obtidos nesse trabalho quanto ao crescimento da espécie *P. djamor*.

Tabela 1. Velocidade média do crescimento micelial vertical cm/dia

Tratamento	Velocidade de crescimento micelial (cm/dia)
SA0F	0,03
SAFT20	0,05
SAFT30	0,05
SAFM20	0,04
SAFM30	0,04

SA0F = serragem de angelim sem suplementação; SAFT20 = serragem de angelim + farelo de trigo a 20%; SAFT30 = serragem de angelim + farelo de trigo a 30%; SAFM20 = serragem de angelim + farelo de milho a 20%; SAFM30 = serragem de angelim + farelo de milho a 30%.

Figura 4. Média de crescimento micelial vertical da espécie *P. djamor* nos diferentes tratamentos durante 18 dias.

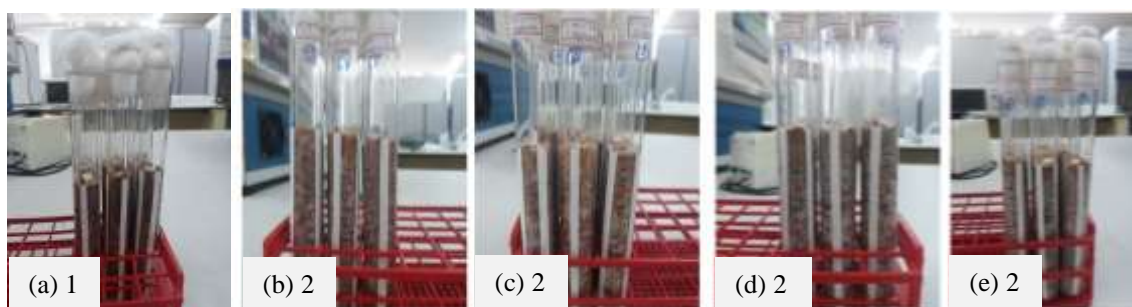


SAOF = serragem de angelim sem suplementação; SAFT20 = serragem de angelim + farelo de trigo a 20%; SAFT30 = serragem de angelim + farelo de trigo a 30%; SAFM20 = serragem de angelim + farelo de milho a 20%; SAFM30 = serragem de angelim + farelo de milho a 30%.

4.2 Vigor micelial

Quanto aos resultados do vigor micelial, que é a densidade do micélio, ou seja, o quão visível e robusto é o micélio, o único tratamento em que o fungo apresentou vigor micelial fracamente adensado foi o tratamento SA. Já nos outros tratamentos obteve-se o vigor mediamente adensado. Nenhum dos tratamentos obteve vigor fortemente adensado (tabela 2 e figura 5).

Figura 5. Vigor micelial (a) SAOF - serragem de angelim; (b) SAFM20 - serragem de angelim + farelo de milho a 20%; (c) SAFM30 - serragem de angelim + farelo de milho a 30%; (d) SAFT20 - serragem de angelim + farelo de trigo a 20%; (e) SAFT30 - serragem de angelim + farelo de milho a 30%. NOTAS: 1 – fracamente adensado; 2 – mediamente adensado; 3 – fortemente adensado.



Fonte: Silva, 2020

Os resultados quanto ao crescimento e vigor micelial obtidos nesse trabalho foram semelhantes aos obtidos por Silva et al (2018), para utilização de suplementação, que usaram substratos a base de palha de milho, casca de tucumã, engaço e casca banana, com a espécie espécie *P. ostreatus* e obtiveram maior crescimento e vigor micelial em tratamentos suplementados com farelo de trigo na concentração de 20%.

De modo geral, a velocidade de crescimento e vigor micelial são fatores importantes para o sucesso de cultivo de espécies de cogumelos comestíveis. Donini et al (2006) apontam a importância desses fatores, pois quanto maior for a velocidade de crescimento do cogumelo no substrato, menores são as chances de o substrato ser contaminado, como também um micélio mais vigoroso proporciona basidiomas de maior qualidade, como justificado por Palheta et al (2011), o vigor do micélio influencia diretamente na produção de basidiomas e biocompostos.

4.3 Atividade proteolítica

Como resultados da avaliação quantitativa de proteases, em todos os tratamentos foi possível verificar a produção de proteases, obtendo no substrato SAFT20 o maior quantitativo médio de 4,55 U/mL, seguido do SAFT20 que obteve 3,68 U/mL. Já os tratamentos SAFM30 e SAFM20 obtiveram valores menores, sendo 1,78 U/mL e 0,67 U/mL respectivamente, enquanto o tratamento SA0F obteve 3,22 U/mL. Dessa forma, nota-se que os tratamentos contendo serragem misturada com farelo de trigo como suplemento foram os que apresentaram maior atividade proteolítica (Tabela 2). O que demonstra que o farelo de trigo estimulou uma maior a produção de proteases em comparação aos outros tratamentos testados neste trabalho.

Tabela 3. Produção de proteases do *P. djamor* em diferentes tratamentos. Médias que não compartilham a mesma letra são estatisticamente diferentes.

Tratamento	Atividade proteolítica (U/mL)
SA0F	3,20±1.02a
SAFT20	3,68±0.34a
SAFT30	4,55±1.35a
SAFM20	1,78±0.51b
SAFM30	0,67±0.33c

SA0F = serragem de angelim sem suplementação; SAFT20 = serragem de angelim + farelo de trigo a 20%; SAFT30 = serragem de angelim + farelo de trigo a 30%; SAFM20 = serragem de angelim + farelo de milho a

20%; SAFM30 = serragem de angelim + farelo de milho a 30%. Médias que não compartilham a mesma letra são estatisticamente diferentes.

Ainda há poucas informações na literatura quanto ao cultivo da espécie *P. djamor* visando produção de enzimas, porém, quando comparado aos valores alcançados na literatura com outras espécies de cogumelos comestíveis, as do presente trabalho apresentaram atividade diferentes de acordo com as espécies e tipo de substrato usado, como por exemplo, Martim et al. (2017), obtiveram atividade de 34,0 U/mL com a espécie *P. albidus* e 1,90 U/mL com a espécie *P. ostreatoroseus*, ambos cultivados em meio líquido Glicose-Extrato de levedura-Peptona suplementado com gelatina a 0,5%. Já Fonseca (2013) obteve atividade proteolítica média de 7,89 U/mL em substrato de casca de cupuaçu suplementado com farelos de arroz na presença de luz e 4,50 U/mL na ausência de luz com *P. ostreatoroseus*.

Os valores obtidos em trabalhos na literatura, como por exemplo os citados anteriormente, utilizando a espécie *P. ostreatoroseus*, obtiveram valores que mais se aproximam aos resultados obtidos neste trabalho, ainda que sendo superiores, aos resultados obtidos neste trabalho com a espécie *P. djamor*. O que explicaria esta diferença de valores em algumas espécies, é a diferença do tipo de substrato cultivado (seja líquido ou semi-sólido), a espécie utilizada, que mesmo espécies pertencentes do mesmo gênero, apresentarem diferenças quanto a atividade proteolítica seria devida as suas rotas metabólicas se distinguirem durante a evolução, resultando assim variações genotípicas, como também com a influência de carbono e nutrientes disponíveis no substrato (MARTIN, 2017; RABUSKE, 2019).

5. CONCLUSÃO

Dessa forma, conclui-se que o uso de serragem é viável para o cultivo da espécie *P. djamor*, desde que haja suplementação de farelo. A adição de suplementação no cultivo da espécie *P. djamor* influenciou de forma satisfatória o crescimento e vigor micelial, como também influenciou na produção de enzimas proteolíticas, mesmo que em uma baixa quantidade comparado a outras espécies na literatura, sendo o farelo de trigo a suplementação que se mostrou mais eficaz em comparação ao farelo de milho, obtendo maiores valores de crescimento micelial e atividade proteolítica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. **Revista Uningá**, v. 21, n. 1, p. 55-59, 2015.

ALBUQUERQUE, M. P.; PEIL, R. M. N.; NASCIMENTO, J. S. Capacidade de colonização micelial de *Pleurotus ostreatoroseus*, *Pleurotus pulmonarius* e *Lentinus sajor-caju* em diferentes substratos. **Caderno de Pesquisa**, v. 24, n. 2, p. 40-53, 2012.

ANDRADE, C. P. **Meios de cultura alternativos para a produção de biomassa de *Pleurotus eryngii*** (Monografia). Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2017.

ANDRADE, M. C. N. **Crescimento micelial, produção e características bromatológicas do Shiitake em função de linhagens e de propriedades físicas e químicas de espécies e clones de Eucalipto** (Tese). Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

ANDRADE, M. C. N et al. Uso de resíduos madeireiros da Amazônia brasileira no cultivo in vitro de *Lentinus strigosus*. **Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 9, n. 1, 2013.

AZEVEDO, E.; BARATA, M. Diversidade no Reino Fungi e aplicações à Indústria. **Rev. Ciência Elem.**, v. 6, n. 4, 2018.

BENTO, C. B. P.; CASARIL, K. B. P. B. Bioconversão de resíduos agroindustriais ligninocelulósicos por fungos causadores da podridão branca: uma alternativa à produção de alimentos. **Revista faz Ciência**, v. 14, n. 19, p. 151-180, 2012.

BERNARDI, E.; PASTORINI DONINI, L.; MINOTTO, E.; SOARES DO NASCIMENTO, J. Cultivo e características nutricionais de *Pleurotus* em substrato pasteurizado. **Bragantia**, v. 68, n. 4, p. 901-907, 2009.

BONOMINI, F. M.; WISBECK E.; MIRANDAGERN, R. M. Produção de enzimas por *Pleurotus Sajor-caju* e *Pleurotus djamor*. **Revista NBC**, v. 7, n. 14, p. 109-126, 2017.

BRAGA-NETO, R et al. **Guia de fungos macroscópicos da Reserva Florestal Adolpho Ducke: Amazônia Central**. Manaus: Attema Design Editorial, 2008.

BRITO, A. K. P et al. Avaliação de substratos de floresta tropical para cultivo e produção de proteases por *Pleurotus djamor*. **Research, Society and Develoment**, v. 10, n. 3, 2021.

- CARDOSO, J. C. P.; DEMENJOUR, P. L. M. M.; PAZ, M. F. Cultivo do cogumelo comestível *Pleurotus ostreatus* em bagaço de baciauva e de cana-de-açúcar pela técnica Jun-Cao. **Evidência, Joaçaba**, v. 13, n. 1, p. 31-40, 2013.
- COIMBRA, V. R. M. **Fungos Agaricóides (Agaricales, Basidiomycota) da Reserva Biológica Saltinho, Pernambuco: Diversidade e aspectos moleculares** (Dissertação). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.
- DAVID, G. Q et al. Desenvolvimento micelial de *Pleurotus florida* em serragem de madeira no município de Alta Floresta-MT. **Agroecol**, Dourados, 2016.
- DONINI, L.P.; BERNARDI, E.; NASCIMENTO, J. S. Desenvolvimento *in vitro* de *Agaricus brasiliensis* em meios suplementados com diferentes farelos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.6, p.995-999, 2006.
- FONSECA, T. R. B. ***Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720: Avaliação do crescimento, produção de basidioma e determinação da atividade proteolítica em resíduos agroindustriais** (Dissertação). Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.
- FREITAS, A. C. **Produção de Proteases por *Aspergillus* em fermentação semi-sólida utilizando torta de canola** (Dissertação). Universidade Federal do Ceará, 2009.
- FURLANI, R. P. Z.; GODOY, H. T. Valor nutricional de cogumelos comestíveis. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 1, n. 27, Campinas, 2007.
- HIBBETT, D. S. et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycological Research**, v. 111, p.509 – 547, 2007.
- KIRSCH, L.S. et al. The influence of different submerged cultivation conditions on mycelial biomass and protease production by *Lentinus citrinus* Walley et Rammeloo DPUA 1535 (Agaricomycetidae). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 13, n. 2, 2011.
- KOMURA, Dirge Leime. ***Pleurotus eryngii*: Isolamento, cultivo e exopolissacarídeos**. Universidade Federal do Paraná, 2006.

KUHAR, F.; CASTIGLIA, V.; PAPINUTTI, L. Reino Fungi: morfologias y estructuras de los hongos. **Revista Boletín Biológica**, v. 7, n. 28, p. 11-18, 2013.

LEIGHTON, T. J. An RNA Polymerase Mutation Causing Temperature-Sensitive Sporulation in *Bacillus subtilis*. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, vol. 70, n. 4, p.1179-1183, 1973.

LIMA, R. M. B.; SOUZA, C. R. Recomendação de Espaçamento para Produção de Madeira de Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. et Bonpl.) para Plantios em Áreas Alteradas no Amazonas. **Embrapa**, Manaus, 2014.

LOGUERCIO-LEITE, C et al. A particularidade de ser um fungo – I. Constituintes celulares. **Revista Biotemas**, v. 2, n. 19, 2006.

MARINO, R. H.; ABREU, L. D.; MESQUITA, J. B.; RIBEIRO, G. T. Crescimento e cultivo de diferentes isolados de *Pleurotus ostreatus* (jacq.: fr.) Kummer em serragem da casca de coco. **Arq. Inst. Biol.** v.75, n.1, p.29-36, 2008.

MARTIM, S. R et al. Proteases ácidas de cogumelo comestível da Amazônia para aplicabilidade industrial. **Cienc. Nat.**, v. 12, n. 3, p.353-362, 2017.

MOTATO, R et al. Evaluación de los residuos agroindustriales de plátano (*Musa paradisiaca*) y aserrín de abarco (*Cariniana piriformes*) como sustratos para el cultivo del hongo *Pleurotus djamor*. **Vitae**, v. 13, n. 1, 24-29, 2006.

MUZZI, Maria Rita Scotti. et al. **Taxonomia de Criptógamas Fungos: Filo basidiomycota**. Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Botânica, p. 2-5, 2013.

NASCIMENTO, A. T. R.; JESUS, M. A.; COSTA, J. S.; CARVALHO, R. S. Macrofungos (basidiomicetos) da região amazônica com potencial alimentar. **XX Jornada de Iniciação Científica PIBIC INPA. CNPq/FAPEAM**, Manaus, 2011.

NEVES, K. C. S. **Produção de Proteases coagulantes por espécies de *Pleurotus* em resíduos vegetais da Amazônia** (Tese). UFRPE-Recife, 2014.

PALHETA, R. A. et al. Crescimento micelial vertical de duas espécies de *Pleurotus ostreatus* em resíduo agroindustrial da Amazônia utilizando planejamento fatorial. **Caderno de Pesquisa, Série Biologia**, v. 23, n. 3, p.52-60, 2011.

PIMENTA, Laynah. **Avaliação da produção de proteases e exopolissacarídeos por *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus eryngii***. Universidade do Estado do Amazonas, 2018.

RABUSKE, E. R et al. Substratos alternativos para o cultivo do cogumelo comestível ostra salmão: *Pleurotus djamor*. **Caderno de Pesquisa**, v. 31, n. 2, p. 22-24, 2019.

RAMÍREZ, Gustavo Flores. **Aprovechamiento del bagazo residual de *Yucca* spp. como sustrato para la producción de *Pleurotus* spp.** Instituto Politécnico Nacional, México, 2012.

RAMPINELLI, J. R. **Produção de *Pleurotus djamor* e avaliação do seu potencial nutricional** (Dissertação). Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.

REIS, M. F et al. Análise de substratos alternativos para o cultivo de *Pleurotus ostreatoroseus* e *Pleurotus florida*. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.3, n.2, p. 79-91, 2010.

RIVAS, P. M. Sá; FILHO, A. A. P.; SANTOS, F. A. S.; ROSA, I. G. Avaliação De Substratos Pectocelulósicos para o Cultivo de Cogumelos Comestíveis do gênero *Pleurotus* sp. (Agaricales). **Cad. Pesq.** v. 17, n. 3, p. 78-83, 2010.

ROCA, Mishari Rolando García. **Contribución al Conocimiento de los macrohongos en la Provincia De Tambopata - Madre De Dios, Peru** (Tese). Universidad Politécnica De Madrid. Madrid, 2015.

ROLLAN, M. G. **Cultivo de Setas y Trufas**. 4ª Ed. España: Artes Gráficas Cuesta, S.A. 239 pp., 2003.

SALES-CAMPOS, C.; ANDRADE, M. C. N. Aproveitamento de resíduos madeireiros para o cultivo do cogumelo comestível *Lentinus strigosus* de ocorrência na Amazônia. **Acta Amazônica**. v. 41, n. 1, 2011.

SALVI, M. B. **Fungos basidiomicetos em biorremediação**. Instituto de Botânica de São Paulo. São Paulo, 2011.

SALMONES, D.; MATA, G. Producción de lacasas en cepas de *Pleurotus djamor* creciendo en medios con agar y during sob cultivo in paja de trigo. **Rev. Mex. Mic.** v. 42, 2015.

SILVA, C. J. A.; MALTA, D. J. N. A importância dos fungos na biotecnologia. **Ciências biológicas e da saúde**. v. 2, n. 3, p. 49-66, 2016.

SILVA, T. F.; MENEZES, K. S.; KIRSCH, L. S. Aproveitamento de resíduos orgânicos amazônicos para o crescimento micelial de *Pleurotus ostreatus*. In: **VII Congresso sobre Diversidade Microbiana na Amazônia**, p. 151. Universidade do Estado do Amazonas, 2018.

SOUZA, H. Q.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 28, p. 116-124, 2008.

TEDERSOO, L.; BAHRAM, M.; PUUSEPP, R.; NILSSON, R. H.; JAMES, T. Y. Novel soil-inhabiting clades fill gaps in the fungal tree of life. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 42, 2017.

TEIXEIRA, Maria Francisca Simas et al. **Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada**. Editora da Universidade Federal do Amazonas, p. 9-14, 2011.

TRIERVEILER-PEREIRA, L.; SULZBACHER, M.A.; BALTAZAR, J.M. Diversidade de fungos brasileiros e alimentação: o que podemos consumir?. **III Fórum Ambiental de Angatuba**, Angatuba-SP. Resumo Expandido nos Anais do III Fórum Ambiental de Angatuba, 2018.

VIEIRA, Fabrício Rocha. **Potencial de uso de gramíneas como substrato pasteurizado no cultivo do cogumelo *Pleurotus ostreatus*** (Jacq.) P. Kumm (Dissertação). Unesp, Botucatu-São Paulo, 2012.