



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Produção de proteases por cogumelo comestível utilizando resíduo de tubérculo não convencional da Amazônia

Ana Rita Gaia Machado¹, Mircella Marialva Alecrim¹; Salomão Rocha Martim¹ e Maria Francisca Simas Teixeira²

¹ Aluno de doutorado da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia da Universidade Federal do Amazonas – UFAM (Av. Rodrigo Octávio, 6200, Coroado I, Cep: 69077-000). E-mail: ritamachado.nutri@hotmail.com

² Professora da Universidade Federal do Amazonas – UFAM (Av. Rodrigo Octávio, 6200, Coroado I, Cep: 69077-000). Instituto de Ciências Biológicas – ICB, Departamento de Parasitologia.

RESUMO

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a influência dos resíduos do processamento de ariá (Calathea allouia) e do tamanho do inóculo (5 ou 10 discos miceliais de 10 mm), na produção de proteases por Lentinus citrinus utilizando a tecnologia da fermentação submersa. As proteases foram extraídas da solução salina adicionados de 0,5% ou 1% (m:v) de ariá (exocarpo ou mesocarpo), em agitador orbital. Em seguida, o extrato bruto foi separado do resíduo por filtração para determinação da atividade enzimática. A maior atividade proteolítica (432,20 U/mL) foi verificada no meio suplementado com exocarpo de ariá 1 % [CA (m:v)], inoculado com 10 discos miceliais. As proteases de L. citrinus exibiram dois picos de atividade ótima, no pH 7,0 e 8,0 e, a 40 °C. Os resultados mostram a viabilidade do tubérculo e do exocarpo de ariá para produção de proteases neutra e alcalina nas condições experimentais.

Palavras-chave: basidiomiceto, substrato, hidrolases

INTRODUÇÃO

As proteases são originadas de diversas fontes vegetal, animal e micro-organismos, Dentre os fungos filamentosos, os cogumelos tem se destacado como produtores de enzimas proteolíticas, além de serem utilizados como alimentos (Fonseca et al., 2014).

Lentinus citrinus, é um cogumelo comestível encontrado em regiões tropicais e subtropicais. Pesquisa recente revelou seu potencial como produtor de proteases, assim como, tem características nutricionais para inclusão na alimentação humana, nos cultivos realizados em exocarpo de cupuaçu suplementado com liteira ou farelo de arroz. Neste estudo as proteases de *Lentinus citrinus* apresentaram atividade ótima em pH neutro e alcalino a 50°C (Machado et al., 2015).

Como alternativa para produção de enzimas proteolíticas em meio líquido são utilizados resíduos da agroindústria, como farelo de arroz, exocarpo de cupuaçu e semente de açaí (Alecrim et al., 2015).

Entre os resíduos poucos investigados tem disponível na Amazônia, o exocarpo de *Calathea allouia* (ariá), um tubérculo pouco conhecido, da família Marantaceae, de importância alimentícia regional e ornamental devido suas folhagens, cultivado por pequenos produtores e comercializado para consumo humano em feiras de produtos orgânicos. O ariá tem 0,3% de gordura, 1,5 % de proteínas, 21,4% de carboidratos e 94,3% de calorias (Varejão



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

et al., 1988). Portanto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a influência dos resíduos do processamento de ariá (*Calathea allouia*) e do tamanho do inóculo na produção de proteases por *Lentinus citrinus*, utilizando fermentação submersa.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismo

Para a produção de enzimas, foi utilizado *Lentinus citrinus* (DPUA 1535) do acervo da Coleção de Culturas DPUA/UFAM. A cultura foi reativada e cultivada em placas de Petri contendo ágar OMYA (aveia + extrato de levedura) durante sete dias a 25°C.

Fermentação Submersa

Na fermentação submersa foram utilizados frascos Erlenmeyer (125 mL) nos quais foram adicionados 50 mL de meio de solução salina [(fosfato de potássio monobásico (0,1 g/L), sulfato de magnésio (0,5g/L), cloreto de sódio (0,5g/L) e sulfato ferroso (0,004 g/L)] adicionados de 0,5% ou 1% de ariá (exocarpo ou mesocarpo) que foram esterilizados por 15 minutos. Em seguida foram adicionados ao meio de cultivo 5 ou 10 discos miceliais de 10 mm de *L. citrinus* e a fermentação submersa foi conduzida durante cinco dias, a 30 °C em agitador orbital a 150 rpm. Posteriormente os extratos foram filtrados em papel de filtro Whatman n°1 e o filtrado foi utilizado nas análises subsequentes.

Determinação da atividade proteolítica quantitativa

Para determinação da atividade enzimática proteolítica foi adicionado 250 µL de solução de azocaseína 1% (p/v) em tampão TRIS-HCl 0,1 M, pH 7,2 em 150 µL de extrato bruto. Os tubos reação foram incubados por 1 hora a 25 °C em câmara escura. Para interrupção da reação foi adicionado 1,2 mL de ácido tricloroacético 10% (p/v) e em seguida procedeu-se a centrifugação por 10 minutos a 10000 rpm, a 4 °C. Em seguida, de cada sobrenadante, foi retirado 0,8 mL e transferido para tubos de ensaio contendo 1,4 mL de hidróxido de sódio 1M. A leitura das amostras foi realizada a 440 nm. Como branco foi utilizado tampão na solução de azocaseína 1% (p/v) em tampão TRIS-HCl 0,1 M, pH 7,2.

Efeito do pH e da temperatura na atividade proteolítica

A partir do extrato bruto onde foi determinada a maior atividade proteolítica analisou-se o efeito do pH na atividade proteolítica, incubando-se o extrato enzimático em diferentes faixas de pH (5,0 – 10,0), a 25 °C por 60 minutos. Os tampões utilizados foram Citrato Fosfato 0,2 M (pH 5,0-6,0), Tris-HCl 0,2M (pH 7,0-8,0), Glicina-NaOH (pH 9,0-10,0). O efeito da temperatura foi determinado em 25 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C e 70 °C, em 60 minutos. A atividade das proteases foi determinada conforme descrito anteriormente.

Análise estatística



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Os resultados foram submetidos à análise estatística descritiva média, desvio padrão, gráfico e tabelas para os cálculos de atividade enzimática ($R^2 \geq 95\%$) por meio de análise de variância (Anova) e teste Tukey ($p < 0,05$), utilizando o software Minitab® versão 17.0.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

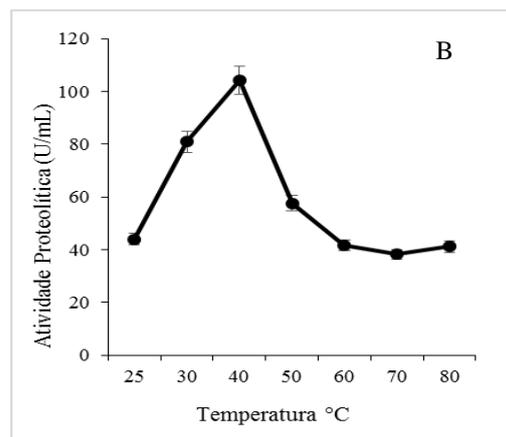
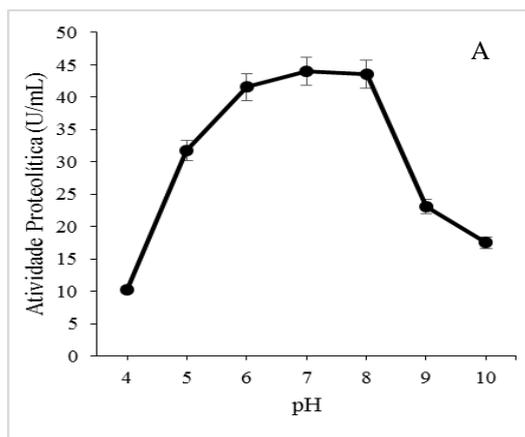
Neste estudo *L. citrinus* excretou proteases em todas as condições avaliadas. O maior quantitativo de proteases (432,20 U/mL) foi verificado em exocarpo 1 % (p/v) e 10 discos miceliais. Os menores valores de atividade de protease (184,00 U/mL) foram verificados na polpa 0,5 % (p/v) e 5 discos miceliais, sendo este valor 57,42 % inferior ao de atividade máxima encontrado neste estudo.

Tabela 1. Atividade proteolítica de *L. citrinus* fermentados em ariá

Substrato	Concentração do substrato (%)	Tamanho do inoculo	Atividade proteolítica (U/ml)
AA	0,5	5	184,00±2,41 ^s
AA	0,5	10	302,20±1,92 ^c
AA	1,0	5	292,30±1,73 ^d
AA	1,0	10	286,20±03 ^e
CA	0,5	5	231,10±1,924 ^f
CA	0,5	10	346,11±0,90 ^b
CA	1,0	5	285,55±1,93 ^e
CA	1,0	10	432,20±1,92 ^a

AA – polpa (mesocarpo) de Ariá, CA – casca (exocarpo) de Ariá.

Com base nos resultados obtidos o extrato bruto com maior atividade proteolítica foi submetido à caracterização parcial de proteases. O efeito do pH na atividade proteolítica está mostrado na figura 1 (A). As proteases de *L. citrinus* apresentaram atividade máxima em pH 7 e 8, com valores de 44,0 U/mL e 43,56 U/mL, respectivamente. Esses dados sugerem a presença de proteases neutras e levemente alcalinas no extrato enzimático avaliado. Nos trabalhos realizados por Fonseca, et al (2014), os autores verificaram que as proteases extraídas dos basidiomas de *Pleurotus ostreatoroseus* demonstraram máxima atividade em pH 6,0. Nos extratos dos basidiomas de *Lentinus citrinus* produzidos em substratos amazônicos as atividades máximas das proteases foram verificadas em pH 7,0 e pH 9,0 (Machado et al, 2015).





XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Figura 1- Efeito do pH (A) e da temperatura (B) na atividade proteolítica do micélio de *Lentinus citrinus* fermentado em Ariá (*Calathea allouia*)

Conforme indicado na Figura 1 (B) a temperatura ótima de atividade proteolítica foi determinada em 40°C, com decréscimo de atividade nas temperaturas subsequentes. Em 70°C e 80 °C foram verificadas perdas de 63,3% e 60,5%, respectivamente. Dados semelhantes foram obtidos por Fonseca et al (2014) e Kirsch et al, (2013) nos trabalhos realizados com extratos dos basidiomas de *P. ostreatoroseus* e *Lentinus citrinus*, respectivamente.

CONCLUSÕES

Polpa e exocarpo de ariá proporcionaram a produção de enzimas proteolíticas por *L. citrinus* e entre estes o mais significativo foi o exocarpo de ariá. Neste estudo utilizando o exocarpo de ariá 1% e 10 discos miceliais, as proteases expressaram atividade ótima em pH neutro e levemente alcalino, temperatura de 40 °C.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- de Porto Macedo, A. J., de Souza Kirsch, L., Palheta, R. A., Putzke, J., & Teixeira, M. F. S. (2014). Crescimento micelial DE *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. em resíduos lignocelulósicos disponíveis na AMAZÔNIA. Caderno de Pesquisa, 23(2), 16-25.
- de Souza Kirsch, L., Ebinuma, V. D. C. S., & Teixeira, M. F. S. 2013. Mycelial biomass and biochemical properties of proteases produced by *Lentinus citrinus* DPUA 1535 (Higher Basidiomycetes) in submerged cultivation. International journal of medicinal mushrooms, 15(5).
- Fonseca, T.R.B; Barroncas, J.F; Teixeira, M. F. S. 2014. Produção em matriz sólida e caracterização parcial das proteases de cogumelo comestível da Floresta Amazônica. Revista Brasileira de Tecnologia, 8(01), 1227-1236.
- Machado, A. R. G., Teixeira, M. F. S., de Souza Kirsch, L., Campelo, M. D. C. L., & de Aguiar Oliveira, I. M. 2015. Nutritional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region. Saudi Journal of Biological Sciences, 30 (3).
- Varejão, M. D. J. C., Ribeiro, M. N. D. S., & Bueno, C. R. 1988. Composição mineral do ariá (*Calathea allouia* (Aubl.) Lindl. Acta Amazonica, 18, 477-480.
- Alecrim, M. M., Palheta, R. A., Teixeira, M. F. S., & Oliveira, I. M. D. A. 2015. Milk-clotting enzymes produced by *Aspergillus flavo furcatis* strains on Amazonic fruit waste. International Journal of Food Science & Technology, 50(1), 151-157.