

## Comparação entre processos de fermentação na produção de enzimas por cogumelos comestíveis

Silva LSC<sup>1</sup>, Machado ARG<sup>1</sup>, Martim S<sup>1</sup>, Teixeira RA<sup>1</sup>, Cruz Filho RF<sup>1</sup>, Teixeira MFS<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> UFAM/ Universidade Federal do Amazonas. E-mail. larissasvetlanas@gmail.com

### Resumo

Dentre os fungos que produzem enzimas de interesse comercial, os cogumelos tem despertado interesse devido a sua facilidade de cultivo e alta produção de enzimas extracelulares por processos biotecnológicos. Neste estudo foi avaliada a produção de amilase, celulase, lipase e protease por *A. mixotricha* e *P. albidus*, em fermentação submersa (FSm) e fermentação semi-sólida (FSS). Os macrofungos foram cultivados em BDA+YE, por 12 dias. A FSm foi realizada em GYP (extrato de peptona-glicose-extrato de levedura) e conduzida a 25 °C, 150 rpm. A FSS foi feita em casca de cupuaçu+semente de açaí (1:1, p/p). A atividade enzimática qualitativa foi determinada pelo método de *cup plate* nos meios ágar amido, ágar celulose, ágar gelatina leite e ágar lipase, medindo-se o diâmetro do halo formado, em milímetros. A determinação quantitativa de proteases foi feita segundo Leighton (1973). Os cogumelos testados apresentaram atividade enzimática nos dois tipos de fermentação, com exceção de lipase, sendo *P. albidus* o mais promissor. Os resultados demonstram o potencial desses fungos na produção de enzimas utilizando os dois tipos de fermentação, porém a FSS foi considerada mais eficaz.

**Palavras-chave:** basidiomicetos, enzimas, fermentação submersa.

### Introdução

Cogumelos comestíveis são macrofungos que possuem propriedade nutricional e medicinal, além de serem importantes fontes de compostos bioativos como, antimicrobiano, antioxidantes e enzimas, tais como proteases, celulasas, amilases, lipases, xilanases, pectinases, entre outras (Orsine et al., 2012). Durante o crescimento do micélio as enzimas são liberadas no meio para degradar os materiais insolúveis

presentes no substrato em moléculas simples e solúveis, que são posteriormente utilizadas por enzimas intracelulares pelo cogumelo (Iketani et al., 2013). A produção de enzimas vem ganhando espaço no mercado por serem relativamente fáceis de produzir em larga escala, eficientes e exigirem investimentos de baixo custo. Ocupam um importante papel em diversos segmentos industriais, como fábricas têxteis, farmacêuticas, de detergentes, de alimentos e bebidas, processos de recuperação de prata, entre outros (Abhijit, 2012). Dentre os bioprocessos empregados na produção de enzimas, a fermentação submersa e a fermentação semi-sólida têm sido amplamente utilizadas (Sankaralingam et al., 2012). A fermentação submersa, por ser realizada em meio nutriente líquido, tem a facilidade de crescimento dos micro-organismos em condições controladas de pH e temperatura (Anbu, 2008). Já a fermentação semi-sólida, o meio de cultura é composto por substratos sólidos e apresenta pouca disponibilidade de água, o que faz com que essa condição de crescimento tente se aproximar do habitat natural do cogumelo (Fonseca et al., 2014). Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de enzimas (amilase, celulase, lipase e protease) pelos cogumelos comestíveis *Auricularia mixotricha* e *Pleurotus albidus* por fermentação submersa e fermentação semi-sólida.

## **Material e métodos**

As espécies *A. mixotricha* (DPUA 1695) e *P. albidus* (DPUA 1692) foram cultivadas em ágar batata dextrose (BDA) com extrato de levedura 0,5% (p/v), a 25 °C, sem luz, durante doze dias. Dos cultivos obtidos foram retirados 10 discos miceliais (10 mm) para serem inoculados em 50 mL de GYP [(glicose 2% (p/v) + peptona 1% (p/v) + extrato de levedura 0,5% (p/v), pH 7,0]. A FSm foi conduzida a 25° C, 150 rpm, por cinco dias. O extrato bruto foi separado da massa micelial em membrana de acetato de celulose (0,45 µm). Na FSS, 10 discos miceliais de 10 mm de diâmetro foram inoculados em casca de cupuaçu + semente de açaí (1:1, p/p), pH 7,0, umidade 65%. Após miceliação do substrato, as enzimas foram extraídas em água destilada esterilizada [resíduo miceliado/mL de água destilada (2:20, p/v)] em frascos de Erlenmeyer de 125mL, mantidos a 30 °C, 180 rpm. Após 30 minutos os extratos foram recuperados por filtração em membrana de acetato de celulose (0,45 µm). Para avaliação da atividade enzimática em meio sólido, 100 µL do extrato bruto foram inoculados em *cup plate* de 5 mm de diâmetro em ágar amido (amilase), ágar celulose (celulase), ágar gelatina leite

(protease) e ágar lipase. Todos os testes foram realizados em triplicata. As placas foram mantidas a 25 °C durante 18 horas. Para evidenciar a atividade de amilase, foi utilizado vapor de iodo sublimado como revelador. Para evidenciar o halo de celulase, foi utilizada solução de vermelho Congo a 0,1% e NaCl 1M. A atividade das enzimas foi determinada medindo-se o diâmetro do halo formado, em milímetros. Para a determinação quantitativa da atividade de proteases, utilizou-se 150 µL do extrato e 250 µL de azocaseína 1% em tampão Tris-HCl, pH 7,2, realizando-se a leitura a 440nm. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzimas capaz de produzir um aumento na absorvância de 0,01 em 1 hora. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

### **Resultados**

Independentemente do bioprocesso empregado *A. mixotricha* e *P. albidus* produziram pelo menos duas das enzimas estudadas. Nos ensaios qualitativos realizados com os extratos de *A. mixotricha* obtidos por fermentação submersa foram observados halos de degradação para celulase (16,5 mm) e protease (18 mm). Na determinação quantitativa de protease a atividade média enzimática foi de 21,56 U/mL. Porém, este macrofungo não apresentou atividade enzimática para amilase e lipase. Os extratos de *P. albidus* apresentaram atividade para amilase (24 mm), celulase (19 mm) e protease (21,5 mm), sendo estes resultados superiores aos encontrados para *A. mixotricha*. Na determinação proteolítica quantitativa a atividade média enzimática foi de 42,44 U/mL. Conforme observado para a *A. mixotricha* também não foi encontrada atividade de lipase para *P. albidus*. Nos ensaios qualitativos realizados com os extratos de *A. mixotricha* obtidos por fermentação semi-sólida, foram observados halos de degradação para amilase (16 mm) e celulase (22 mm). Porém, não foram encontradas atividades enzimáticas para protease e lipase. Na determinação quantitativa de protease a atividade média enzimática foi de 35,48 U/mL. Os extratos de *P. albidus* apresentaram halo de degradação para atividade de amilase (26 mm), celulase (24-25 mm) e protease (15-26 mm). Na determinação proteolítica quantitativa a atividade média enzimática foi de 78,29 U/mL. Na fermentação semi-sólida não foi observada produção de lipase por *P. albidus*.

## Discussão

Enzimas são produzidas por diferentes micro-organismos, incluindo fungos filamentosos, leveduras e bactérias, tanto em fermentação submersa quanto em fermentação semi-sólida (Rao et al., 1998). Nesta pesquisa foi observada a atividade de amilase por *A. mixotricha* apenas quando cultivada na matriz sólida enquanto que *P. albidus* expressou essas enzimas quando submetido aos dois bioprocessos. Amilases são muito utilizadas na indústria de alimentos, constituindo aproximadamente 25% do mercado de enzimas (Sindhu et al., 1997). Em relação às celulases, as produzidas por fungos têm sido bastante estudadas devido o seu potencial em biotecnologia, são utilizadas nas indústrias têxteis e de papel (Souza et al., 2010). De acordo com os resultados obtidos os dois macrofungos foram eficientes na síntese de celulase, o que os torna uma potencial fonte dessas enzimas. Estudo realizado por Fonseca et al. (2014) avaliaram a produção de proteases por *P. ostreatoroseus* no mesmo substrato utilizado nesta pesquisa encontraram resultados semelhantes aos obtidos neste estudo com *A. mixotricha* e *P. albidus*. Enzimas proteolíticas somam 60% do total de vendas e são utilizadas em diversos setores industriais, tais como de alimentos e bebidas, formulação de detergentes (Aftab et al., 2006; Santos e Sato, 2009). Há uma diferença muito grande nos dois tipos de fermentação em relação a produção de enzimas e metabólitos secundários. Os resultados desta pesquisa se assemelham com os de pesquisas atuais que sugerem que a fermentação semi-sólida apresenta vantagens quando comparada a fermentação submersa (Santos et al., 2008). Aspectos físico-químicos, como baixa quantidade de água, são fatores que contribuem para o melhor rendimento deste processo. É um método barato, com baixos níveis de água residual e fácil recuperação das enzimas de interesse (Viniestra-Gonzales, 1997).

## Conclusão

Em todos os experimentos realizados, *P. albidus* foi o mais eficiente, expressando maior atividade enzimática quando comparado a *A. mixotricha*, dado que evidencia a capacidade dessa espécie em produzir enzimas de interesse comercial por processos biotecnológicos e utilizando substrato de baixo custo.

## Referências

- Abhijit R (2012). Protease Enzyme- Potential Industrial Scope. *IJTech* 2:01-04.
- Aftab S, Ahmed S, Saeed S, Rasool SA (2006) Screening, Isolation and Characterization of Alkaline Protease Producing Bacteria from Soil. *Pak J Biol Sci* 9:2122-2126.
- Anbu P, Annaduray G, Lee J-F, Hur B-K (2009). Optimization of alkaline protease production from *Shewanella oneidensis*. *J. Chem. Technol. Biotechnol* 84:54-62.
- El-Zalaki ME, Hamza MA (1979). Edible mushrooms as producers of amylases. *Food Chem* 4:203-211.
- Fonseca TRB, Barroncas JF, Teixeira MFS (2014) Produção em matriz sólida e caracterização parcial das proteases de cogumelo comestível da floresta amazônica. *RBTA* 8:1227-1236.
- Iketani A, Nakamura M, Suzuki Y, Awai K, Shioi Y (2013). A novel serine protease with caspase- and legumain-like activities from edible basidiomycete *Flammulina velutipes*. *Fungal Biol* 117: 173-181.
- Leighton TJ, Doi RH, Warren RAJ, Kelln RA (1973) The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* 76:103-122.
- Souza HQ, Oliveira LO, Andrade JS (2008). Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. *SBCTA* 28.
- Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Desh-Pande VV (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *MMBR* 62:597-635.
- Sankaralingam S, Shankar T, Ramasubburayan R, Prakash S, Kumar C (2012). Optimization of Culture Conditions for the Production of Amylase from *Bacillus licheniformis* on Submerged Fermentation. *AEJAES* 12: 1507-1513.
- Santos D, Sarrouh B, Santos J, Pérez V, Silva S (2008) Potencialidades e aplicações da fermentação semi-sólida em Biotecnologia. *Janus* 3:4-11.
- Santos LF, Sato HH (2009). Production of alkaline protease from *Cellulosi microbium cellulans*. *Braz J Microbiol* 40:54-60.
- Sindhu GS, Sharma P, Chakrabarti T, Gupta, JK (1997). Strain improvement for the production of a thermostable  $\alpha$ -amylase. *Enzyme Microb Technol* 21:525-530.
- Orsine, JVC, Brito LMB, Novaes MRCG (2012). Cogumelos comestíveis: uso, conservação, características nutricionais e Farmacológicas. *Revista HCPA* 4: 452-460.

**Agradecimentos:** CAPES, CNPq