

## **Atividade proteolítica dos extratos aquosos de biocompósitos formulados com cogumelos comestíveis utilizando como matriz casca de abacaxi**

Souza<sup>1</sup>, R.A.T.; Fonseca<sup>2</sup>, T.R.B.; Silva<sup>3</sup>, L.S.C.; Teixeira<sup>2</sup>, M.F.S.

<sup>1</sup> Programa de Pós Graduação em Biotecnologia – UFAM, Manaus – AM. <sup>2</sup> Coleção de Culturas DPUA – UFAM, Manaus - AM. <sup>3</sup> Programa de Pós Graduação em Diversidade Biológica – UFAM, Manaus – AM. Emails: raiane.aila@hotmail.com, tamis\_f@hotmail.com, larissasvetlanas@gmail.com, mteixeira@ufam.edu.br

### **Resumo**

Os cogumelos comestíveis são importantes veículos de nutrientes e além de suas características nutritivas excretam diversos biocompostos de interesse industrial. Podem ser produzidos nos mais diversos substratos, inclusive em resíduos agroindustriais. O objetivo do trabalho foi avaliar a produção de proteases por três diferentes biocompósitos originados da miceliação de cogumelos comestíveis na casca de abacaxi, um resíduo abundante na cidade de Manaus. O biocompósito foi obtido através de fermentação submersa, conduzida a 25 °C até completa miceliação do substrato. Do biocompósito, foram retirados 2g e adicionados a 20mL de água destilada esterilizada para obtenção do extrato aquoso. A atividade proteolítica foi determinada utilizando-se azocaseína como substrato. Os extratos exibiram excelente atividade proteolítica, com média variando de 277 a 294 U/ml. Esses resultados mostram que os resíduos agroindustriais são substratos em potenciais para o cultivo de cogumelos e possibilitam a secreção de importantes metabólitos secundários por esses fungos.

**Palavras-chave:** Fermentação semi-sólida, basidiomicetes, resíduos agroindustriais.

### **Introdução**

Cogumelos comestíveis são macrofungos extensamente cultivados ao redor do mundo desde a antiguidade. Estes basidiomicetes são muito apreciados pelas suas características gastronômicas e propriedades medicinais, pois possuem alto teor de

proteínas e fibras, baixo teor de lipídeos e ainda produzem vários metabólitos como antimicrobianos, antioxidantes, imunoestimuladores, entre outros (FINIMUNDY et al.,2013).

Além das características nutricionais, os cogumelos possuem um elevado potencial produtivo, tempo de geração curto, são mais fáceis de serem trabalhados de modo independente e crescem nos mais diversos substratos. Desta forma, a produção de cogumelos surge como uma alternativa promissora para a reciclagem de resíduos, diminuindo o impacto ambiental causado pelo descarte de resíduos da agricultura A produção destes macrofungos agrega valor a partir de produtos de baixo ou nenhum custo e permite, ainda, a utilização dos resíduos secundários gerados no processo (Campos-Sales *et al.*, 2011).

Estes basidiomicetes também são fontes de enzimas proteolíticas. As proteases constituem uma classe de enzimas participantes em diversas funções fisiológicas e importantes ferramentas tecnológicas em diversos processos, principalmente nas indústrias de alimentos, detergentes e farmacêutica. Deste modo, as enzimas proteolíticas representam as enzimas mais produzidas comercialmente na atualidade e ocupam cerca de 65% das vendas mundiais de enzimas (Kumar e Takagi, 1999).

Assim sendo, o objetivo do presente estudo foi investigar proteases em extrato aquoso de biocompósito produzido a partir da miceliação de casca de abacaxi pelos cogumelos comestíveis *Pleurotus florida*, *Pleurotus albidus* e *Lentinus citrinus*.

### **Material e métodos**

Os biocompósitos utilizados nesse estudo foram elaborados a partir de fermentação semi sólida, utilizando-se casca de abacaxi como substrato e como inóculo discos miceliais retirados de culturas matriz dos cogumelos comestíveis *Pleurotus albidus*, *Pleurotus florida* e *Lentinus citrinus*, cultivados em ágar Saboraud. De cada cultura matriz foram retirados 20 discos miceliais e inoculados no substrato, com 70% de umidade. A fermentação semi-sólida foi conduzida a 25 °C até completa miceliação do substrato. O produto final foi desintegrado e desidratado a 60°C, em estufa de secagem com circulação de ar forçado.

Para recuperação dos extratos, os biocompósitos foram triturados em triturador doméstico e depois de triturados, 2g do resíduo miceliado foi adicionado em 20 mL de água destilada esterilizada, em frascos Erlenmeyer de 125 mL. Os frascos foram então mantidos em shaker, com temperatura de 30 °C e agitação 180 rpm. Após 30 minutos os

extratos brutos foram recuperados por filtração em tecido de algodão e filtrado em membrana de polietersulfônica com porosidade de 0,22µm para a posterior determinação da atividade de proteases. O pH dos extratos foi mensurado com o auxílio de peagâmetro.

A atividade proteolítica foi determinada utilizando-se 150 µL do extrato bruto adicionado a 250 µL de azocaseína 1% (p/v), preparada em tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,2. As amostras e os brancos foram preparados em triplicata e incubados a 25 °C por 1 hora em câmara escura. A reação foi, então, interrompida com 1,2 mL de TCA [ácido tricloroacético 10% (p/v) e em seguida centrifugada por 10 minutos a 4 °C. Do sobrenadante foi retirado 800 µL, adicionando-se 1,4 mL de NaOH 1M. Por fim, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 440 nm. Uma unidade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorbância a 440 nm de 0,1 em 1 hora. Os resultados foram submetidos à análise estatística descritiva (média e desvio padrão).

### **Resultados e Discussão**

As enzimas proteolíticas têm origem de diversas fontes e nos últimos anos, os fungos se caracterizam como uma fonte muito promissora de compostos bioativos. Diversos cogumelos comestíveis vêm sendo relatados como fonte de proteases, como a exemplo *Pleurotus eryngii* (Cha *et al.*, 2010), *Pleurotus ostreatus*, *Grifola frondosa* (Park *et al.*, 2007) e *Pleurotus ostreatoroseus* (Fonseca, 2014).

Atualmente, diversos trabalhos vêm explorando o potencial de resíduos agroindustriais para a produção de proteases. Ravikumar *et al.*, (2012) cultivaram *Pleurotus sajor-caju* em diversos resíduos, selecionando o melhor para a produção de proteases e Liang *et al.*, (2006) observaram a produção destas enzimas no cultivo de *Monascus purpureus* em meio composto por casca de camarão e caranguejo.

Os resultados mostram a produção de proteases em extrato aquoso extraídos dos três diferentes compósitos formulados a partir de resíduo agroindustrial e diferentes espécies de cogumelos comestíveis e podem ser observados na tabela 1. Em todos os extratos recuperados dos compósitos foram determinados a atividade de proteases. Apesar de todos os extratos terem produzido atividade enzimática bastante expressiva, dentre os três extratos avaliados, a maior atividade proteolítica foi determinada no extrato aquoso composto por casca de abacaxi e *Lentinus citrinus* (296,55 U/mL). Nos biocompósitos formulados com *Pleurotus albidus* e *Pleurotus flórida* a atividade

proteolítica foi 270,44 U/mL e 280,55 U/mL, respectivamente, com diferença significativa entre os três valores observados.

Tabela 1. Atividade proteolítica dos extratos aquosos de casca de abacaxi e cogumelos comestíveis.

Amostra	pH do extrato aquoso	Atividade proteolítica (U/mL)
Casca de abacaxi e <i>Pleurotus albidus</i>	4,3	270,44 ± 1,39 <sup>c</sup>
Casca de abacaxi e <i>Pleurotus florida</i>	5,5	280,55 ± 3,87 <sup>b</sup>
Casca de abacaxi e <i>Lentinus citrinus</i>	6,0	296,55 ± 2,41 <sup>a</sup>

\* médias que não dividem uma letra são significativamente diferentes

Os resultados obtidos para os cogumelos do gênero *Pleurotus* foram superiores aos encontrados por Fonseca *et al.* (2014), que avaliaram diversos substratos miceliados por *Pleurotus ostreatoroseus*. Os valores obtidos para o cogumelo comestível *Lentinus citrinus* também foi superior ao encontrado por Kirsch *et al.* (2011) estudando o cogumelo de mesma espécie.

Quanto aos valores de pH nos extratos, foi verificada variação dos valores nos três extratos avaliados. O extrato aquoso do biocompósito obtido a partir da miceliação de casca de abacaxi por *Pleurotus albidus* apresentou o valor mais baixo, com uma média de pH de 4,3, sendo classificado como ácido. O extrato do biocompósito de *Pleurotus florida*, apresentou uma faixa de pH de 5,5, e o extrato obtido de biocompósito de *Lentinus citrinus*, por outro lado, apresentou um valor de pH médio de 6, podendo ser classificados como levemente ácidos. Estes resultados mostraram que os cogumelos estudados produziram enzimas proteolíticas de pH ácido a levemente ácido e apesar de pertencerem a famílias próximas, as características de suas proteases são distintas, podendo ser aplicadas em diversos fins industriais, incluindo indústria farmacêutica, têxtil, alimentícia e química.

O uso de resíduos agroindustriais na fermentação submersa de microrganismos é uma alternativa para a redução da contaminação ambiental oriunda do descarte inadequado destes resíduos, além de ser uma fonte alternativa de produção de metabólitos, auxiliando na redução do custo de produção desses compostos bioativos (Nakamura, 2011).

## Conclusões

A casca de abacaxi é um substrato com grande potencial para o cultivo de cogumelos comestíveis.

O biocompósito gerado ao final deste processo pode ser utilizado como fonte de enzimas proteolíticas derivadas de basidiomicetos.

## Referências

Campos-Sales C, Andrade MCN (2011) Aproveitamento de resíduos madeireiros para o cultivo do cogumelo comestível *Lentinus strigosus* de ocorrência na Amazônia. *Acta Amazonica* 41: 1-8.

Cha WS, Park SS, Kim SJ, Choi DB (2010) Biochemical and enzymatic properties of a fibrinolytic enzyme from *Pleurotus eryngii* cultivated under solid-state conditions using corn cob. *Bioresource Technol* 101: 6475–6481.

Finimundy TC, Gambato G, Fontana R, Camassola M, Salvador M, Moura S, Hess J, Henriques JÁ, Dillon AJ, Roesch-Ely M (2013) Aqueous extracts of *Lentinula edodes* and *Pleurotus sajor-caju* exhibit high antioxidant capability and promising *in vitro* antitumor activity. *Nutr Res* 33:76-84.

Fonseca TRB, Barroncas JF, Teixeira MFS (2014) Produção em matriz sólida e caracterização parcial das proteases de cogumelo comestível da floresta amazônica. *Rev Bras Tecnol Indust.* 8:1227-1236.

Kirsch LS, Pinto AC, Porto TS, Porto AL, Teixeira MFS (2011) The influence of different submerged cultivation conditions on mycelial biomass and protease production by *Lentinus citrinus* Walley et Rammeloo DPUA 1535 (Agaricomycetidae). *Int J Med Mushrooms* 13:185-192.

Kumar CG, Takagi H (1999) Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial view point. *Biotechnol Adv*, Oxford 17:561-594.

Liang TW, Lin JJ, Yen YH, Wang CL, Wang SL (2006) Purification and characterization of a protease extracellularly produced by *Monascus*

*purpureus* CCRC31499 in a shrimp and crab shell powder medium. *Enzyme Microb Tech* 38:74-80.

Nakamura M, Iketani A, Shioi Y (2011) A survey of proteases in edible mushrooms with synthetic peptides as substrates. *Mycoscience* 52:234–241.

Park SE, Li MH, Kim JS, Sapkota K, Kim JE, Choi BS, Yoon YH, Lee JC, Lee HH, Kim CS, Kim SJ (2007) Purification and characterization of a fibrinolytic protease from a culture supernatant of *Flammulina velutipes* mycelia. *Biosci Biotech Biochem* 71:2214-2222.

Ravikumar G, Gomathi D, Kalaiselvi M, Uma C (2012) A protease from the medicinal mushroom *Pleurotus sajor-caju*: production, purification and partial characterization. *Asia Pac J Trop Biomed* 2:411-417.