

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO-REITORIA DE PESQUISA E GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

Produção de proteases por *Pleurotus albidus* DPUA 1692 em cultivo submerso
utilizando resíduos agroindustriais da Região Norte

Bolsista: Ana Júlia Porto de Macedo, CNPq

**MANAUS
2011**

**Produção de proteases por *Pleurotus albidus* DPUA 1692 em cultivo submerso
utilizando resíduos agroindustriais da Região Norte**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO-REITORIA DE PESQUISA E GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

RELATÓRIO FINAL

PIB-B/0043/2010

Produção de proteases por *Pleurotus albidus* DPUA 1692 em cultivo submerso
utilizando resíduos agroindustriais da Região Norte

Bolsista: Ana Júlia Porto de Macedo, CNPq

Orientadora: Maria Francisca Simas Teixeira

**MANAUS
2011**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Proteases	5
2.2 Gênero <i>Pleurotus</i>	7
2.3 Fermentação submersa	9
2.4 Resíduos agroindustriais	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Subcultivo de <i>Pleurotus albidus</i> em meio sólido	12
3.2 Fermentação submersa	12
3.2.1 Preparação do meio de cultivo	12
3.2.2 Efeito do volume do inóculo	13
3.2.3 Determinação da influência da concentração dos resíduos na produção de proteases em meio líquido	13
3.3 Determinação do crescimento de <i>P. albidus</i>	13
3.4 Métodos analíticos	14
3.4.1 Determinação da atividade proteolítica	14
3.4.2 Determinação de proteínas totais	14
3.5 Composição centesimal dos resíduos	15
3.6 Análises estatísticas	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1 Composição centesimal dos resíduos	16
4.2 Fermentação Submersa	17
4.2.1 Efeito do volume de inóculo	17

4.2.2 Atividade específica de proteases	18
4.2.3 Crescimento de <i>P. albidus</i>	20
5. CONCLUSÕES	22
6. REFERÊNCIAS	23

RESUMO

As proteases representam a maior parcela de enzimas comercializadas no mundo e têm ampla utilização em setores industriais, como na produção de alimentos, bebidas, detergentes, no tratamento de couro e como agentes terapêuticos. Uma das formas para a obtenção dessas enzimas por processos de baixo custo é a utilização de resíduos alternativos oriundos da agroindústria. Este trabalho teve como objetivo investigar a influência de resíduos agroindustriais como substrato indutor na produção de proteases e biomassa de *Pleurotus albidus* em cultivo submerso. A cultura de *P. albidus* DPUA 1692, da Coleção de Culturas DPUA, foi reativada em meio BDA e incubada à 25 °C sem luminosidade por oito dias. Os meios de cultivo utilizados na fermentação submersa foram extrato de farelo de arroz (FAR) e de farelo de açaí (FAc) nas concentrações de 20 g/L, 40 g/L, 60 g/L, 80 g/L e 100 g/L. Inicialmente foi realizada a definição do volume do inóculo, utilizando-se diferentes volumes de suspensão celular fermentação em meio líquido. Para tanto, o pré-inóculo foi preparado em frascos Erlenmeyer (50 mL) contendo 6 mL do extrato aquoso dos resíduos, separadamente, adicionado de micronutrientes, seguindo-se a adição de uma alíquota de suspensão de células obtida pela desintegração da biomassa do cultivo em BDA nos frascos. A fermentação foi realizada sob agitação de 150 rpm a 25 °C por 2 dias e após esse período foi transferido para 90 mL de meio líquido idêntico ao utilizado no pré-inóculo e mantido a 150 rpm a 25 °C por 5 dias. Ao término da fermentação as amostras obtidas foram submetidas a filtração à vácuo em papel de filtro de peso conhecido para separação do extrato bruto e quantificação da biomassa. Nos extratos brutos foram determinadas a atividade proteolítica e proteínas totais. Os resíduos utilizados foram analisados quanto a composição físico-química. Em relação à composição físico-química dos resíduos, farelo de arroz apresentou os maiores teores de umidade, cinzas, lipídios, nitrogênio, proteína e energia, enquanto em farelo de açaí houve predominância de carboidratos. No que se refere a influência do tamanho do inóculo, as maiores atividades (40,66 U/mL e 39,33 U/mL) foram determinadas quando se utilizou 2 mL e 4 mL, respectivamente. Com relação a concentração de resíduo, FAR proporcionou as atividades específicas mais expressivas, determinando-se a maior atividade (1496,31 U/mg) quando foram utilizados 20g/L deste resíduo. *P. albidus* apresentou as maiores taxas de crescimento em extrato de FAR, no qual a produção de biomassa foi de 2 a 3 vezes maior que em FAc. O maior valor de biomassa (737,3 mg/100mL) foi obtido em FAR na concentração de 20g/L. Os resultados mostraram que *P. abidus* foi capaz de crescer e produzir proteases por fermentação submersa utilizando como meio de cultura não convencional contendo extrato de farelo de arroz de farelo de açaí, suplementado com micronutrientes, destacando-se o farelo de arroz como um substrato promissor tanto para o crescimento quanto para a produção de proteases.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Espécies de <i>Pleurotus</i> produtoras de biocompostos	8
TABELA 2 - Composição centesimal dos resíduos agroflorestais utilizados nos experimentos	16

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Basidiomas de *P. ostreatus*

7

FIGURA 2 – Basidioma de *P. albidus*

9

LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1** – Atividade proteolítica do extrato bruto de *P. albidus* utilizando-se diferentes volumes de inóculo **17**
- GRÁFICO 2** – Atividade específica de proteases do extrato bruto de *P. albidus* obtido por fermentação submersa sob influência de diferentes concentrações de resíduos **18**
- GRÁFICO 3** – Biomassa de *P. albidus* obtida em fermentação submersa sob influência de diferentes concentrações de resíduos **20**

1 INTRODUÇÃO

O cultivo de cogumelos comestíveis vem tomando maior importância no Brasil devido estudos científicos demonstrarem o valor desses macrofungos para uso como alimento funcional e fonte de compostos bioativos (LINDEQUIST *et al.*, 2005).

Como fonte de biocompostos, os cogumelos em condições adequadas de crescimento produzem compostos bioativos, como enzimas, antimicrobianos, antioxidantes, entre outros compostos de importância para diversos setores industriais.

Mundialmente, o interesse por enzimas tem aumentado, principalmente pelas de origem fúngica, com destaque para pectinases, amilases, lipases e proteases que são produzidas *in vitro* por processos fermentativos, em meio líquido, semi-sólido ou sólido (GHORAI *et al.*, 2009). Entre as enzimas, as proteases representam a maior parcela (60%-65%) entre as comercializadas e têm ampla utilização na produção de alimentos, bebidas, detergentes, no tratamento de couro e como agentes terapêuticos (RAO *et al.*, 1998; SINGH, 2009). As de origem fúngica, em especial, apresentam atividade enzimática em uma larga faixa de pH e especificidade pelo substrato (SABOTIČ *et al.*, 2007; RAO *et al.*, 1998).

Então, como alternativa para reduzir o custo do processo de produção, diversos estudos têm sido desenvolvidos visando o aproveitamento de resíduos da agroindústria como substratos para obtenção de metabólitos, inclusive das enzimas (ALEXANDRINO *et al.* 2007; GRAMINHA *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2009).

O uso de resíduos orgânicos para desenvolvimento de bioprocessos está associado à disponibilidade regional, assim como, aos nutrientes que favorecem o desenvolvimento do organismo de interesse para fins industriais. Por exemplo, na região Norte há a disponibilidade de resíduos provenientes do tratamento do arroz, principalmente no Estado de Roraima, na forma de casca e farelo de arroz, este último de baixo valor no comércio regional que está sendo usado

como ração para animais ou para outros fins. O fruto do açaí é um alimento tradicional na região Norte, cujo consumo se expandiu para o sul do país nas últimas décadas (Menezes, 2005). A oferta brasileira de açaí está concentrada na região Norte, sendo que no ano de 2009 o Estado do Amazonas foi responsável pela produção de 1,576 toneladas de polpa (CONAB, 2011).

Em função da disponibilidade de resíduos orgânicos na Amazônia como fonte alternativa de carbono e nitrogênio, além de outros nutrientes para a produção de metabólitos por fungos, este trabalho teve como objetivo investigar a influência de resíduos agroindustriais como substrato indutor na produção de proteases por *Pleurotus albidus* em cultivo submerso.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Proteases

Os cogumelos são capazes de secretar uma diversidade de compostos bioativos, a exemplo das enzimas que têm um papel importante na fisiologia desses fungos. A nutrição desses organismos deve-se principalmente à excreção de enzimas que transformam as macromoléculas em substâncias assimiláveis e posteriormente metabolizadas por eles (POUCHERET, FONS E RAPIOR, 2006; SABOTIČ *et al.*, 2007). Em função dessa atividade as enzimas passaram a ser utilizadas em processos biotecnológicos, dentre elas, as pectinases, celulases, amilases, xilanases e proteases, já estão sendo utilizadas principalmente na indústria de alimentos (GHORAI *et al.* 2009).

Embora as enzimas sejam produzidas por uma ampla variedade de outros seres vivos como plantas, animais e bactérias, os fungos destacam-se, pois representam excelente fonte desses compostos devido à ampla diversidade bioquímica, a susceptibilidade à manipulação genética e à facilidade de produção em larga escala. Além dessas vantagens, essas enzimas apresentam quase todas as características desejáveis para aplicações biotecnológicas nos diversos ramos industriais. (SERNA *et al.*, 2006; RAO *et al.*, 1998).

Segundo RAO *et al.* (1998) as proteases estão entre os três maiores grupos de enzimas comercializadas, colaborando com cerca de 60% das vendas mundiais. As enzimas proteolíticas catalizam a hidrólise de proteínas. As proteases fúngicas são particularmente interessantes por apresentam atividade em uma larga faixa de pH (4 a 11) e ampla especificidade pelo substrato.

Estas enzimas têm ampla variedade de aplicações na biotecnologia, principalmente na indústria de alimentos, de detergentes e couro, além de processos ecológicos de biorremediação. Também são utilizadas na alimentação animal, por melhorar a digestão de cereais (GHORAI *et al.* 2009).

As proteases fúngicas ácidas com pH ótimo entre 4 e 4,5 têm importância na fabricação do queijo, como alternativa à produção tradicional de queijo a partir de quimosina a qual é cara e a matéria prima é insuficiente para suprir a demanda (VASCONCELOS *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2009; RAO *et al.*, 1998; FOLEGATTI, 1994).

Proteases com alta atividade e estabilidade em pH alcalino são interessantes para a bioengenharia e aplicações biotecnológicas, são utilizadas principalmente na composição de detergentes, em especial aquelas que apresentam alta atividade e estabilidade em pH elevados (HADDAR *et al.* 2009).

SABOTIČ *et al.* (2007) investigaram o potencial proteolítico de 43 basidiomicetos, as espécies avaliadas apresentaram grande diversidade de proteases. As enzimas proteolíticas produzidas pelos basidiomicetos foram aspárticas, cisteíno ou semelhantes a cisteíno-proteases, metaloproteases, serino-proteases, havendo prevalência deste último grupo. Os basidiomicetos representam uma fonte ideal de novas proteases com características potencialmente únicas e podem se firmar como valiosa fonte de proteases com aplicação em processos biotecnológicos, tornando-se importante a caracterização de proteases de espécies selvagens de forma a revelar suas características únicas e prováveis aplicações biotecnológicas.

2.2 Gênero *Pleurotus*

O gênero *Pleurotus* (Jacq.: Fr.) Kumm é um grupo de cogumelos cosmopolitas com alto valor nutricional, propriedades terapêuticas e diversas aplicações ecológicas e biotecnológicas. As espécies deste gênero, a exemplo de *P. ostreatus* (Figura 1) são comestíveis e saborosas, encontradas principalmente em zonas temperadas, caracterizadas por ter esporada branca, lamelas decurrentes, geralmente com estipe excêntrico (LECHNER, WRIGHT E ALBERTO, 2004).



(Fonte: Herbário micológico JairPuzke/UFAM)

Figura 1- Basidiomas de *P. ostreatus*

Na natureza os *Pleurotus* são encontrados geralmente em madeira morta, mas também sobre árvores e galhos caídos. Vários substratos ricos em lignina e celulose podem ser utilizados no cultivo desses cogumelos, como lascas de madeira, milho, trigo, palha de arroz, talos de algodão, cascas e outros resíduos agrícolas, muitos dos quais podem ser posteriormente utilizados na alimentação de animais ou no preparo de outros produtos. A principal vantagem de utilizar espécies de *Pleurotus* no tratamento de resíduos lignocelulósicos é a degradação seletiva de

lignina e hemiceluloses, como resultado, a celulose é exposta e pode ser utilizada por ruminantes (COHEN, PERSKY E HADAR, 2002).

Na tabela 1 apresentam alguns representantes do gênero *Pleurotus* citados na literatura como alimento e fontes de compostos de importância industrial:

Espécie	Biocomposto	Fonte
<i>P. ostreatus</i>	Antioxidante	YANG <i>et al.</i> (2002)
<i>P. florida</i>	Antiinflamatório	JOSE <i>et al.</i> (2004)
<i>P. eryngii</i>	Lacase	MUNOZ <i>et al.</i> (1997)
<i>P. ostreatus</i>	Lacase	TLECUITL-BERISTAIN <i>et al.</i> (2008)
<i>P. eryngii</i>	Manganês peroxidase	MARTÍNEZ <i>et al.</i> (2004)
<i>P. sajor-caju</i>	Manganês peroxidase e lacase	FU, YU, BUSWELL (2006)
<i>P. ostreatus</i>	Polissacarídeo (antitumoral)	WASSER E WEIS (1999)
<i>P. citrinopileatus</i>	Polissacarídeo (antitumoral)	WASSER E WEIS (1999)
<i>P. pulmonarius</i>	Polissacarídeo (antitumoral)	WASSER E WEIS (1999)
<i>P. ostreatus</i>	Proteases	SABOTIC <i>et al.</i> (2007)

Tabela 1- Espécies de *Pleurotus* produtoras de biocompostos

Recentemente LECHNER E ALBERTÓ (2011) avaliaram o crescimento de 5 espécies de *Pleurotus* linhagens de ocorrência na Argentina em substratos à base de serragem e palha de trigo. Nesse estudo foram considerados a eficiência biológica e outros parâmetros morfológicos importantes na produção de cogumelos comestíveis, como tamanho do píleo e do estipe. *P. albidus* apresentou uma das maiores eficiências biológicas já observadas em espécies de *Pleurotus* cultivados em outros substratos. Devido ao alto rendimento e boa qualidade dos cogumelos produzidos os autores sugerem *P. albidus* como uma nova espécie para cultivo industrial em larga escala.

P. albidus, espécie que ainda está pouco estudada, tem como característica macromorfológica píleo circular, com diâmetro de 30 a 170 mm, infundibuliforme, glabro, cor branca a creme, às vezes apresenta cor marrom próximo ao encontro do estipe, margem inteira à crenada, fina, geralmente encurvada. As lamelas são decurrentes e brancas, estipe branco, geralmente curvado ascendentemente, ocasionalmente com pêlos na base. Esporada branca à creme. Encontrado em troncos caídos, raramente em árvores vivas (LECHNER, WRIGHT E ALBERTÓ, 2004). A espécie já foi relatada para o México (MORENO-FUENTES E BAUTISTA-NAVA, 2006), Argentina (LECHNER, WRIGHT E ALBERTO, 2004) e Brasil (PUTZKE, 2002).



(Fonte: Herbario micológico Jair Putzke)

Figura 2- Basidioma de *P. albidus*

2.3 Fermentação Submersa

Este bioprocesso tem como característica a utilização de um meio fermentativo líquido formulado com nutrientes solúveis adequados para o desenvolvimento de micro ou macro organismos (PINHEIRO, 2006).

A técnica de fermentação submersa possui relativa facilidade de cultivo em grande escala, já que garante homogeneidade do meio e facilidade no controle dos parâmetros físico-químicos do processo (pH, temperatura, oxigenação e fornecimento de nutrientes), além da facilidade de recuperação dos biocompostos (COUTO E SANROMÁN, 2006).

No entanto, a viabilidade econômica da utilização fermentação submersa frente a fermentação semi-sólida é questionada, uma vez que os meios de fermentação normalmente apresentam um alto custo (PINHEIRO, 2006).

A fermentação submersa vem sendo utilizada no cultivo micelial de macrofungos em diversos estudos, como forma de obter metabólitos bioativos, biomassa, aminoácidos, enzimas e exopolissacarídeos (FANG E ZHONG, 2002; KURBANOGLU, ALGUR E ZULKADIR, 2004; WU *et al.* 2004; KIM *et al.*, 2005; ZANOTELLI, KIM *et al.*, 2005; TLECUITL-BERISTAIN, 2008; LI, LI E LIU, 2008; ELISASHVILI *et al.* 2008).

2.4 Resíduos agroindustriais x cogumelos

A investigação da fisiologia e propriedades bioquímicas é um pré-requisito para a criação de tecnologias para gestão de resíduos. Estas tecnológicas são orientadas tanto para a produção de enzimas, biomassa de cogumelos rica em proteínas, assim como para utilização de resíduos lignocelulósicos, visto que os basidiomicetos são colonizadores de madeira e resíduo vegetal, especialmente os agentes da podridão branca os quais são capazes de hidrolisar celulose, as substâncias pécnicas e também oxidar a lignina (BIS'KO *et al.*, 2001).

A utilização de resíduos agroindustriais ou agrofloretais nos processos de fermentação tem sido freqüente como forma de utilização da biomassa orgânica para obtenção de produtos com alto valor agregado, como álcool e enzimas pela ação microbiana, no desenvolvimento de um alimento enriquecido para animais, produção de cogumelos comestíveis,

entre outras aplicações (SILVA, MACHUCA E MILAGRES, 2005; COUTO E SANROMÁN, 2006; ALEXANDRINO *et al.* 2007; GRAMINHA *et al.*,2008; SILVA *et al.*, 2009).

Diversos resíduos, principalmente aqueles provenientes da indústria de alimentos, responsável pela geração de grande volume de biomassa vegetal, podem ser utilizados em bioprocessos, com a vantagem de terem valor reduzido ou nulo. Desta forma há minimização dos impactos ambientais, obtendo-se produtos de alto valor comercial com matéria-prima de baixo custo (PANDEY *et al.*, 2000; PELIZER, PONTIERI E MORAES, 2007).

Vários autores têm investigados tais resíduos quanto seu aproveitamento como substratos em processos fermentativos para obtenção de enzimas fúngicas; WANG E YEH (2006) selecionaram a casca de camarão como resíduo promissor para a produção de protease, quitosanase e biofertilizantes; PARANTHAMAN, ALAGUSUNDARAM E INDHUMATHI utilizaram fragmentos de arroz, resíduos da produção de arroz, como substrato para produção de proteases por *Aspergillus niger* em fermentação semi-sólida. SONGULASHVILI *et al.* 2006 avaliaram a atividade das enzimas lacase e manganês peroxidase de oito linhagens de basidiomicetos em fermentação submersa a utilizando os substratos lignocelulósicos casca de tangerina e resíduos da produção de etanol, selecionando as espécies *Ganoderma lucidum* e *Phellinus robustus* como produtores promissores de enzimas lignocelulolíticas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Subcultivo de *Pleurotus albidus* em meio sólido

Para obtenção de culturas viáveis e puras, *P. albidus* DPUA 1692, da Coleção de Culturas DPUA (Departamento de Parasitologia da Universidade do Amazonas) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) foi reativado em ágar batata dextrose (BDA) com extrato de levedura 0,5% (p/v) em placas de Petri medindo 90 x 15 mm. Os cultivos foram mantidos a 25° C na ausência de luminosidade, observando-se o crescimento a cada 24 horas.

A cultura utilizada como pré-inóculo foi cultivada em placas de Petri (55 x 15 mm) contendo BDA e mantidas a 25 °C na ausência de luminosidade. Após completa colonização do meio de cultura sólido, a massa micelial do macrofungo foi utilizada nos experimentos fermentativos.

3.2 Fermentação submersa

3.2.1 Preparação do meio de cultivo

Os resíduos agroindustriais utilizados foram farelo de arroz (FAr) e semente de açaí (FAc), obtidos na empresa Arroz Acostumado/RR e no comércio local do município de Manaus/AM respectivamente. O farelo de arroz e a semente de açaí foram submetidos à desidratação a 60 °C em estufa de ar forçada por aproximadamente 10 horas. Após esse processo a semente de açaí foi triturada em processador automático para obtenção do farelo e os substratos foram armazenados em embalagens plásticas devidamente higienizadas.

De cada resíduo foram utilizados 20g, 40g, 60g, 80g e 100g, separadamente, submetidos ao cozimento em 1L de água de torneira por 10 minutos. Após este tratamento as amostras foram filtradas em tecido de algodão esterilizado e os extratos obtidos utilizados na fermentação submersa.

3.2.2. Efeito do volume do inóculo

Com a finalidade de verificar o volume do inóculo ideal para a produção de proteases *P. albidus* foi cultivado em frascos Erlenmeyer (50 mL) com o seguinte meio de cultura: extrato aquoso de farelo de arroz [20 g/L (item 3.2.1)], acrescido de extrato de levedura (5g/L), FeSO₄ (0,01g/L), MgSO₄.7H₂O (0,5g/L) e KH₂PO₄ (0,05g/L). O pH do meio foi aferido para 5,6, com solução de HCl 1M e em seguida submetido a esterilização a 121 °C por 12 minutos.

A biomassa de *P. albidus* obtida em duas placas de Petri (item 3.1) foi adicionada em 100 mL de água destilada esterilizada para desintegração em um triturador modelo LAR.2 e diferentes volumes dessa suspensão celular (0,5 - 1,0 - 2,0 - 4,0 - 8,0 e 12 mL) foram transferidos para os frascos contendo 10 mL do meio de cultivo. O cultivo em meio líquido foi conduzido a 25 °C, a 150 rpm, em agitador orbital (Certomat MO). Após 48 horas todo o volume foi adicionado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 90 mL de meio líquido. A fermentação foi realizada a 25 °C, a 150 rpm por 5 dias.

3.2.3 Determinação da influência da concentração dos resíduos na produção de proteases em meio líquido

Para determinação da concentração promissora de um substrato orgânico para a produção de proteases por *P. albidus*, a fermentação foi realizada utilizando-se os extratos aquosos (item 3.2.1), adicionados de: extrato de levedura (5g/L), FeSO₄ (0,01g/L), MgSO₄.7H₂O (0,5g/L) e KH₂PO₄ (0,05g/L). O pH dos meios foi aferido para 5,6, com solução de HCl 1M e esterilizados a 121 °C por 12 minutos. Após resfriamento, cada frasco Erlenmeyer de 50 mL contendo 6 mL de meio líquido foi inoculado com 4 mL da suspensão celular (item 3.2.2), a fermentação foi conduzida nas mesmas condições citadas no item 3.2.2. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Após término do processo fermentativo o extrato bruto foi recuperado por filtração à vácuo em papel de filtro com peso conhecido e a biomassa lavada três vezes em água destilada, seguindo-se a desidratação a 50 °C até peso constante para determinação do crescimento do cogumelo (Dong e Yao, 2005).

3.4. Métodos analíticos

3.4.1 Determinação da atividade proteolítica

A partir dos extratos obtidos da fermentação submersa a atividade proteolítica foi determinada segundo Leighton et al. (1973). Alíquotas de 0,25 mL de azocaseína 1,0% (p/v) (Sigma, St. Luis, MO USA), em tampão Tris-HCL, pH 7,2 0,2 M foram adicionados a 0,15 mL do extrato enzimático e a mistura reacional incubada a 25 °C por uma hora em câmara escura. Em seguida, foram adicionados 1,2 mL de ácido tricloroacético 10% (p/v) e as amostras centrifugadas a 4 °C, 10.000 rpm por 15 minutos. Do sobrenadante foram retirados 0,8 mL e homogeneizados com 1,4 mL de NaOH 1M. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorvância de 0,01 em 1 hora a 440 nm e expressa em U/mL.

3.4.2 Determinação de proteínas totais

A determinação de proteínas totais foi realizada segundo a metodologia descrita por Bradford (1976).

3.5 Composição centesimal dos resíduos

A determinação dos conteúdos de proteína bruta, lipídios, minerais, da fração de cinzas, carboidratos totais e umidade dos resíduos utilizados foi realizada segundo os métodos descritos pela A.O.A.C. (2005).

3.6. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados conforme estatística descritiva utilizando-se o programa Microsoft/Excell 2000, segundo Callegari-Jaques (2003).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Composição centesimal dos resíduos

Os conteúdos de umidade, cinzas, lipídios, proteína, fibras, carboidratos e energia dos resíduos estão apresentados no quadro 2. Dos substratos analisados, o farelo de arroz contém os maiores teores de umidade (9,24%), cinzas (9,14%), lipídios (19,41%), nitrogênio (2,77%), proteína (17,37%) e energia (423,35 Kcal) quando comparado aos valores do farelo de açaí, substrato no qual houve predominância de carboidratos (91,97%). Como citado por Papagianni (2004) os resíduos possuem potencial como substrato para o desenvolvimento de fungos em processos visando obtenção de metabolitos primários e secundários por constituírem fontes de nutrientes essenciais para estes organismos como carbono, nitrogênio, hidrogênio, oxigênio, além de micronutrientes.

Parâmetro (g/100g de produto)	Resíduos	
	Farelo de Açaí	Farelo de Arroz
Umidade	0,79	9,24
Cinzas	1,68	9,14
Lipídios	1,68	19,41
Nitrogênio	1,25	2,77
Proteína (N x 6,25)	7,85	17,37
Fibra	2,10	2,07
Carboidratos	85,90	44,84
Energia (kcal)	398,53	423,35

TABELA 2 - Composição centesimal dos resíduos agroflorestais utilizados nos experimentos

4.2. Fermentação Submersa

4.2.1 Efeito do volume do inóculo

Os resultados referentes à determinação da influência do volume do inóculo na produção de proteases por fermentação em meio líquido estão apresentados no gráfico 1. Os valores do pH do extrato bruto ficaram entre 5,5 e 5,6. Quanto as proteases, os valores de atividade aumentaram em ordem crescente, registrando-se os máximos valores (40,66 U/mL e 39,33 U/mL) com inóculo de 4 mL e 2 mL de suspensão celular, respectivamente. À medida que se aumentou o volume do inóculo houve decréscimo de 7,31% e 29,51 %, respectivamente com máximos volumes de inóculo (4 mL e 12 mL). Além de outros fatores (luminosidade, oxigenação, temperatura e nutrientes) que comprometem a produção de metabólitos por microrganismos, a densidade do inóculo (ou o tamanho do inóculo) também contribui de forma positiva ou negativa no crescimento e na produção de enzimas (Fang; Tang; Zhong, 2002).

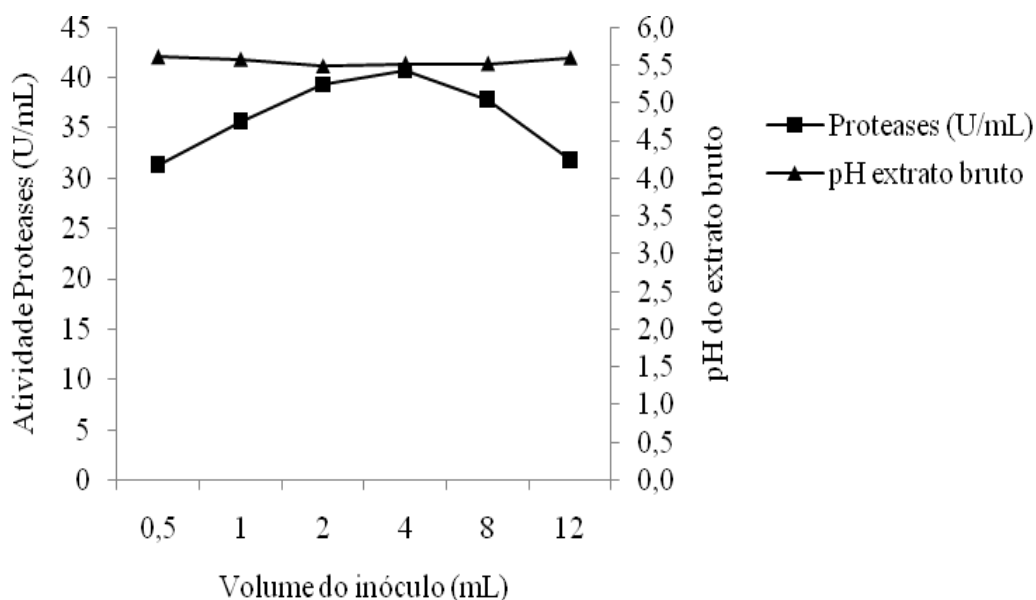


GRÁFICO 1 – Atividade proteolítica do extrato bruto de *P. albidus* utilizando-se diferentes volumes de inóculo

4.2.2 Atividade específica de proteases

No gráfico 2 está representada a atividade específica de proteases de *P. albidus* quando se avaliou diferentes concentrações de FAc e FAr na fermentação submersa. Para ambos os substratos a maior atividade específica [1496,31 U/mg (FAr) e 989,9 U/mg (FAc)] foi determinada em 20 g/L. Todavia, os valores expressivos de atividade específica predominaram em FAr em todas as concentrações, sendo de 0,65% a 33,89% maiores em relação ao FAc. Dessa forma, entre esses substratos a maior eficiência foi encontrada em FAr na concentração de 20 g/L.

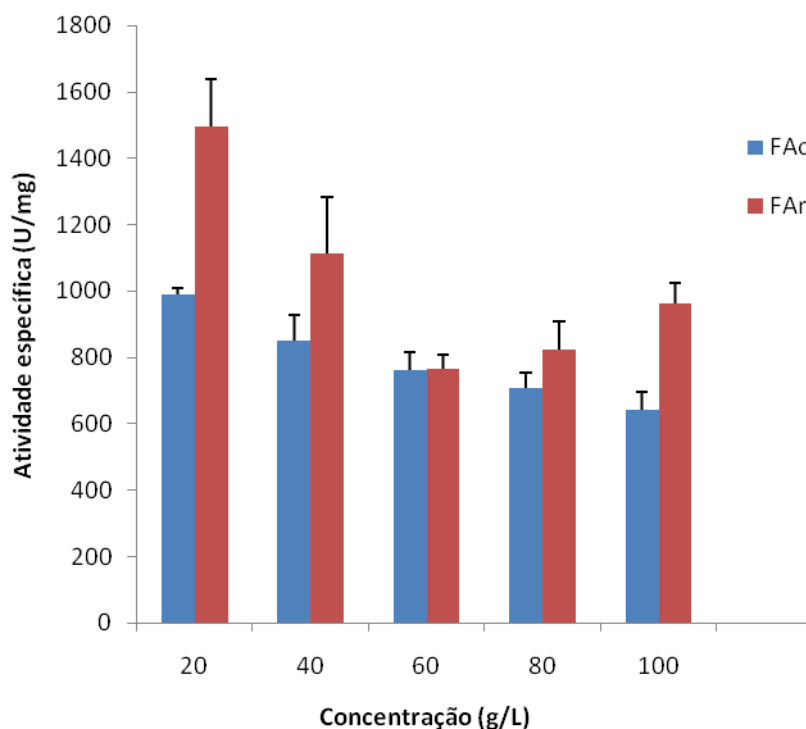


Gráfico 2 – Atividade específica de proteases do extrato bruto de *P. albidus* obtido por fermentação submersa sob influência de diferentes concentrações de resíduos

Buswell e Chang (1994) avaliaram o crescimento e a produção de proteases de seis espécies de cogumelos (*Lycophyllum shimeji* M-46, *Tricholoma lobayense* T-2, *Morcella elata*

M-26, *Pleurotus sajor-caju* Pl-27, *Coriolus versicolor* e *Volvariella volvacea*) em cultivo submerso utilizando resíduo de soja na formulação do meio. A fermentação foi conduzida durante sete dias à temperatura ambiente e a atividade proteolítica foi monitorada diariamente. Os resultados mostraram que todas as espécies excretaram proteases, contudo dentre as espécies analisadas *V. volvaceae* e *T. lobayense* apresentaram os maiores valores de atividade enzimática. Além disso, o tempo de cultivo foi parâmetro importante na produção dessas enzimas, verificando-se aumento exponencial da atividade proteolítica durante o período de fermentação, exibindo máxima atividade no 7º dia de cultivo. Apesar da relevância e importância desse trabalho, considerando o fato dos autores terem utilizado resíduo agroindustrial como meio de cultivo para a produção de proteases fica difícil estabelecer critérios de comparação com o presente trabalho tendo em vista o referido trabalho não expressou a atividade proteolítica em termos de atividade específica.

Chauhan e Gupta (2004) reportam que não há um meio de cultivo definido para a produção de proteases, pois cada organismo apresenta uma exigência nutricional diferente para excretar tais enzimas. Sabe-se também que a habilidade dos fungos em excretar essas enzimas não está apenas relacionada à composição do meio de cultivo, mas também o genótipo da linhagem produtora e das condições de cultivo utilizadas, tais como a duração do tempo de cultivo, pH inicial do meio, frequência de agitação, dentre outros (Dunaevsky et al, 2006).

4.2.3 Crescimento de *P. albidus*

Como observado na figura 3 *P. albidus* apresentou as maiores taxas de crescimento em extrato de FAr e a produção de biomassa foi de 2 a 3 vezes maior nesse meio quando comparado ao extrato de FAc. Em ambos extratos a produtividade de biomassa foi crescente proporcionalmente a concentração do resíduo até a concentração de 80 g/L apresentando uma

sutil redução na biomassa na concentração de 100g/L, evidenciando que altas concentrações podem inibir o crescimento do fungo. Resultado semelhante foi observado por Kurbanoglu *et al.* (2004) ao se avaliar o crescimento micelial de *Agaricus bisporus* em fermentação submersa utilizando hidrolisado de chifre de carneiro, a produção de biomassa decaiu em concentrações maiores desse resíduo concluindo-se que o efeito inibitório pode ser resultante da presença de cátions na parede celular e materiais tóxicos no hidrolisado de chifre de carneiro.

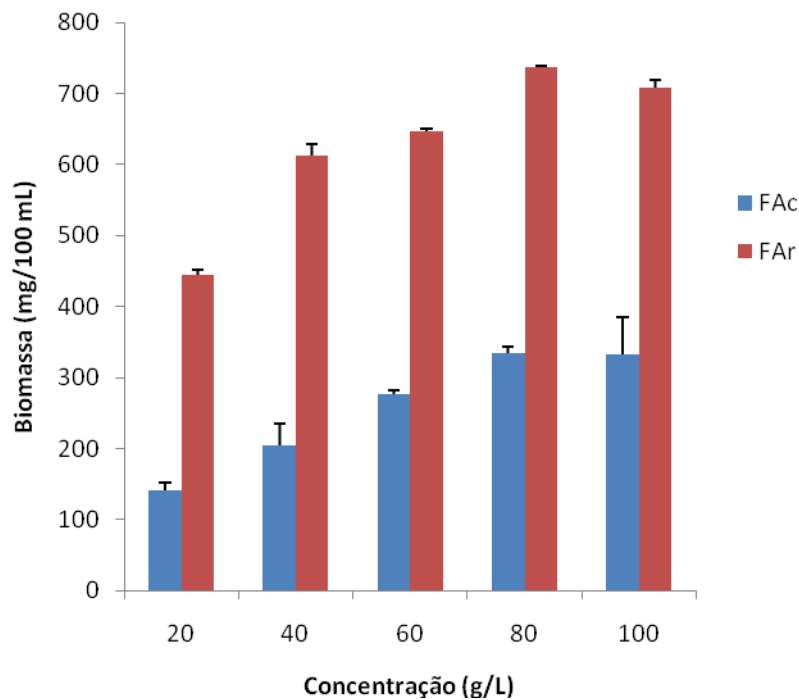


GRÁFICO 3 – Biomassa de *P. albidus* obtida em fermentação submersa sob influência de diferentes concentrações de resíduos

A concentração ideal de farelo de arroz para produção de biomassa foi 80g/L obtendo-se 737,3 mg/100mL de biomassa seca nesta condição, já na concentração de 100g/L houve uma redução de 4,06% na produção de biomassa. Jung *et al* (2003) analisaram o efeito de extratos de

frutas (maçã, pêra e pêssego) no crescimento micelial de *P. ostreatus* em cultivo submerso durante 10 dias de cultivo em temperatura ambiente. Esses autores evidenciaram que dentre as frutas analisadas o extrato de pêssego proporcionou o melhor crescimento micelial de *P. ostreatus*. A concentração de cada uma das frutas na composição do meio de cultivo foi testada e os resultados obtidos mostraram que as concentrações ótimas de extratos de maçã, pêra e pêssego foram de 5,0 %, 3,0% e 5,0%, respectivamente.

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho pode-se concluir que:

- Os farelos de arroz e de açaí oriundos da Amazônia são substratos nutricionais em potencial e podem ser utilizados como fonte alternativa para o cultivo de *P. albidus*;
- O tipo e a concentração do resíduo influenciam tanto no crescimento quanto na produção de proteases de *P. albidus*;
- *P. albidus* é capaz de crescer em meio líquido formulado com farelo de arroz e de açaí, contudo produz maior biomassa em meio contendo farelo de arroz;
- A utilização do farelo de arroz favorece a excreção de enzimas proteolíticas de *P. albidus* em cultivo submerso.

6 REFERÊNCIAS

- ALEXANDRINO, A. M.; FARIA, H. G.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R. M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v.27, n.2, p.364-368, abr.-jun. 2007
- A.O.A.C. (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). Official methods of analysis. 15 ed. Washington: A.O.A.C., 2005
- BUSWELL, J. A.; CHANG, S. Biomass and extracellular hydrolytic enzyme production by six mushroom species grown on soybean waste. *Biotechnology Letters*, v.16, n.12, p. 1317-1322, nov, 1994.
- CHAUHAN, B.; GUPTA, R. 2004. Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease production by *Bacillus* sp. RGR-14. *Process Biochemistry*, 39: 2115-2122.
- CASTRO, R.J.S.; FREITAS, A.C.; PINTO, G.A.S. Influência do tempo de incubação e adição de fontes de nitrogênio e fósforo na produção de proteases por *Aspergillus oryzae* em fermentação semi-sólida utilizando farelo de trigo como substrato. In: IX ENPPPG, IX ENICIT, III SIMPIT, 2009, Fortaleza.
- CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Conjuntura mensal, Janeiro de 2011. Disponível em <www.conab.gov.br/conabweb>. Acesso em: 25/06/11.
- COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry – A review. *Journal of food engineering*, v. 76, p. 291-302, Jul, 2005.
- DUNAEVSKY, Y, E.; ZHANG, D.; MATVEEVA, A. R.; BELYAKOVA, G. A.; BELOZERSKY, M. A. Degradation of proteinaceous substrates by xylophilic basidiomycetes. *Microbiology*, v.75, n.1, p.46-51, 2006.
- ELISASHVILI, V.; PENNINGKX, M.; KACHLISHVILI, E.; TSIKLARI, N.; METREVELI, E.; KHARZIANI, T.; KVESITADZE, G. *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. *Bioresource Technology*, v.99, p.457-462, mar., 2008
- FOLEGATTI, M. I. S. Avaliação do uso de quimosina produzida por *Aspergillus Niger* VAR. awamori na fabricação de queijo tipo prato. 1994. 79f. Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas

COHEN, R.; PERSKY, L.; HADAR, Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v.58, p.582-594, dec. 2002

CHANG, S. T.; MILES, P. G. Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact. 2. ed LonBdon: CRC, 2004. 451p.

ELLOUZ, Y.; BAYOUDH, A.; KAMMOUN, S.; GHARSALLAH, N.; NASRI, M. Production of protease by *Bacillus subtilis* grown on sardinelle heads and viscera flour. *Bioresource Technology*. v.80, p.49-51, mar., 2001

TRIKI-ELLOUZ, Y.; GHORBEL, B.; SOUISSI, N.; KAMMOUN, S.; NASRI, M. Biosynthesis of protease by *Pseudomonas aeruginosa* MN7 grown on fish substrate. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. v.19, p.41-45, 2003

FANG, Q.; ZHONG, J.; Submerged fermentations of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites – ganoderic acid and polysaccharide. *Biochemical Engineering Journal*, v.10, p.61-65, 2002 .

FANG, Q.; TANG, Y.; ZHONG, J. Significance of inoculation density control in production os polysaccharide and ganoderic acid by submerged culture of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry*, v.37, 1375-1379, 2002.

FU, S. Y.; YU, H.; BUSWELL, J. A. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Pleurotus sajor-caju*. *Microbiology Letters*, v.147, n.1, p.133-137, 1997

GBOLAGADE, J. S. The effect of different nutrient sources on biomass production of *Lepiota procera* in submerged liquid cultures. *Journal of Biotechnology*, v.5, n.12, p.1246-1249, jun. 2006.

GHORAI S.; BANIK S. P.; VERMA D.; CHOWDHURY S.; MUKHERJEE S.; KHOWALA S. Fungal biotechnology in food and feed processing. *Food Research International* v. 42, p. 577–587, 2009

GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology*. v.144, p.1-22, sept. 2008

HADDAR, A.; AGREBI R.; BOUGATEF A.; HMIDET N.; SELLAMI-KAMOUN A.; NASRI M. Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavensis* A21: Purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive. *Bioresource Technology* 100 3366–3373, 2009

JESUS, R. S. Inpa participa de evento internacional sobre qualidade e tecnologia do pescado. Inpa, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia:
http://www.inpa.gov.br/noticias/noticia_sgn02.php?codigo=229 (acesso em 28/01/11).

JOSE, N.; AJITH T. A.; JANARDHANAN, K. K. Methanol extract of the oyster mushroom, *Pleurotus florida*, inhibits inflammation and platelet aggregation. *Phytotherapy research*, 18, 1, 43-46, 2004

JUNG, G. T.; JU, I. O.; YU, Y. Z.; RYU, J.; CHOI, J. S.; CHOI, Y. G. Mycelial yield of *Pleurotus ostreatus* using thinned apple, pear, and peach on submerged culture. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v.8, p.286-290, 2003.

KIM, H. O.; LIM, J. M.; JOO, S. W.; KIM S. W.; HWANG, H. J.; CHOI, J. W.; YUN, J. W. Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*. *Bioresource Technology*, v.96, p.1175-1182, 2005

KURBANOGLU, E. B.; ALGUR, O. F.; ZULKADIR, A. Submerged production of edible mushroom *Agaricus bisporus* mycelium in ram horn hydrolysate. *Industrial Crops and Products*, v.19, p.225-230, 2004

LINDEQUIST, U.; NIEDERMEYER, T H. J.; JÜLICH, W. The Pharmacological Potential of Mushrooms. *eCAM*, v. 2, n. 3, p. 285–299, 2005

MANTÍNEZ, M. J.; RUIZ-DUEÑAS, F. J.; GUILLÉN, F.; MARTÍNEZ, A. T. Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*. *Eur. J. Biochem.* v.237, p.424-432, 1996

MUNOZ, C.; GUILLEN, F.; MARTINEZ, A. T.; MARTINEZ, M. J. Laccase isoenzymes of *Pleurotus eryngii*: characterization, catalytic, properties, and participation in activation of molecular oxygen and Mn²⁺ oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.63, n.6, 1997

OLIVEIRA, L. A.; PORTO A. L .F; TAMBOURGI, E. B. Production of xylanase and protease by *Penicillium janthinellum* CRC 87M-115 from different agricultural wastes. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 862–867, 2006

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; BRAND, D.; MOHAN, R.; ROUSSOS, S. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*, v.6, p. 153,162, 2000

PAPAGIANNI, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelia processes. *Biotechnology Advances*, v.22, p. 189 – 259, 2004

PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. O. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. *Journal of Technology Management & Innovation*, v.2, n.1, 2007

- POUCHERET, P.; FONS B. F.; RAPIOR, S. Biological and Pharmacological Activity of Higher Fungi: 20-Year Retrospective Analysis Cryptogamie, *Mycologie*, v. 27 n.4, p. 311-333, 2006
- RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and molecular biology reviews*, v. 62, n. 3 p. 597–635, 1998
- SABOTIČ, J; TRČEC, T; POPOVIČ, T; BRZIN J. Basidiomycetes harbour a hidden treasure of proteolytic diversity. *Journal of Biotechnology* v. 128, p. 297–307, 2007
- SERNA, C. P.; CADAVID, A. S.; VEGA, A. A. S.; ROJANO, B. A. Establecimiento de um médio de cultivo sumergido para uns cepa nativa de um hongo Poliporal. *Ver. Colomb. Biotecnol.* v.8, n.1, jul., 2006.
- SILVA, E. M.; MACHUCA, A.; MILAGRES, A. M. F. Evaluating the growth and enzyme production from *Lentinula edodes* strains. *Process Biochemistry*, v.40, p.161-164, 2005
- SILVA, G. A. B.; ALMEIDA W. E. S.; CORTES M. S.; MARTINS E. S. Produção e caracterização de protease obtida por *Gliocladium verticilloides* através da fermentação em estado sólido de subprodutos agroindustriais. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial* v. 03, n. 01: p. 28-41, 2009
- SINGH, B. K. Exploring microbial diversity for biotechnology: the way forward. *Trends in Biotechnology*, v.28, n.3, 2009
- VASCONCELOS, M.; ARAÚJO, K. G.; VERRUMA-BERNARDI, M. R. Efeito do ph de coagulação do leite e do tipo de coalho sobre o rendimento de massa na produção de queijo. R. bras. *Agrociência*, v.10, n. 4, p. 499-502, out-dez, 2004
- LECHNER, B. E.; WRIGHT, J. E.; ALBERTÓ, E. The genus *Pleurotus* in Argentina. *Mycologia*, v. 96, p. 845-858, jan, 2004.
- LECHNER, B. E.; ALBERTÓ, E. Search for new naturally occurring strains of *Pleurotus* to improve yields. *P. albidus* as a novel proposed species for mushroom production. *Revista Iberoamericana de Micología*, jan, 2011. DOI
- LI, J.; LI, P.; LIU, F. Production of theanine by *Xerocomus badius* (mushroom) using submerged fermentation. *LWT*, v.41, p.883-889, 2008
- MENEZES, M.; PINHEIRO, M. R.; GUAZZELL, A. C.; MARTINS, F. Cadeia produtiva do açaí no estado do Amazonas – Manaus: SDS, 2005. Série Técnica Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável, 1
- MORENO-FUENTES, A; BAUTISTA-NAVA, E. El “hongo blanco patón” *Pleurotus albidus*, em Hidalgo. Su primer registro em México. *Revista Mexicana de Micología*, v.22, p. 41-47, 2006.

PARANTHAMAN, K.; ALAGUSUNDARAM, K.; INDHUMATHI, J. Production of protease from rice mill wastes by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *World Journal of Agricultural Sciences*, v.5, n.3, p.308-312, 2009

PINHEIRO, T. L. F. Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microrganismo. 2006. Dissertação (Programa de mestrado em engenharia de alimentos da URI-Campus de Erechim), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim-RS, 2006

PUTZKE, J. Os generos *Pleurotus* e *Lentinus*(Agaricales, Basidiomycota, Fungos) no Brasil – I: Lista de espécies e chaves de identificação. *Caderno de Pesquisa Sér. Bio.*, Santa Cruz do Sul, v.14, n.1, p. 67-75. Jan-Jun, 2002.

SONGULASHVILI, G.; ELISASHVILI, V.; WASSER, S. P.; NEVO, E.; HADAR Y. Basidiomycetes laccase and maganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 41, p. 57-61, 2006

TLECUITL-BERISTAIN, S.; SÁNCHEZ, C.; LOERA, O. ROBSON, G. D.; DÍAZ-GODÍNEZ, G. Laccases of *Pleurotus ostreatus* observed as different phases of its growth in submerged fermentation: production of a novel laccase isoform. *Mycological Research*, v.112, p.1080-1084, 2008

WANG, S.; YEH, P. Production of a surfactant –and solvent- stable alkaliphilic protease by bioconversion of shrimp shell wastes fermented by *Bacillus subtilis* TKU007. *Process Biochemistry*, v.41, p.1545-1552, 2006

WU, J.; CHEUNG, P. C. K.; WONG, K.; HUANG, N. Studies on submerged fermentation of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Singer. Part 2: effect of carbon-to-nitrogen ratio of the culture medium on the content and composition of the micellial dietary fibre. *Food Chemistry*, v. 85, p.101-105, 2004

YANG, J. H.; LIN, H. C; MAU, J. L. Antioxidant properties of several comercial mushrooms. *Food Chemistry*, 77, 229-235, 2002

ZANOTELLI, C. T.; MEDEIROS, R.; FURLAN, S. A.; WISBECK, E. Avaliação do modelo de Monod na produção de biomassa de *Pleurotus ostreatus* DSM 1833 em cultivo submerso. *Revista Saúde e Ambiente*, v.8, n.2, dez. 2007.