



ARTIGO

Produção de enzimas amilolíticas por *Macrocybe titans* em resíduo do processamento de cerveja

Ana Claudia Wisniewski^{1*}, Maria Ângela Lopes de Almeida²,
Márcia Brandão Palma³ e Lorena Benathar Ballod Tavares⁴

Recebido: 23 de novembro de 2009

Recebido após revisão: 30 de maio de 2010

Aceito: 01 de junho de 2010

Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1441>

RESUMO: (Produção de enzimas amilolíticas por *Macrocybe titans* em resíduo do processamento de cerveja). O perfil enzimático amilolítico de *Macrocybe titans* foi definido em cultivo com substrato não compostado, bem como monitorou-se a produção de massa micelial. A produção das enzimas α -amilase e glicoamilase foi determinada em meio contendo bagaço de malte, resíduo do processo cervejeiro, suplementado com bagaço de mandioca e três tipos de farelos: farelos de soja, trigo e arroz. O crescimento micelial axial do fungo foi avaliado assim como determinados os parâmetros de processo. A determinação das atividades enzimáticas acompanhou a cinética de produção das enzimas e proteínas totais nos tratamentos que apresentaram maior crescimento vegetativo. Verificou-se que nos meios contendo o farelo de soja observou-se maior formação de hifas em relação aos demais farelos, o que indica maior velocidade de crescimento fúngico em substratos com alta concentração em nitrogênio. As variações de pH evidenciaram uma tendência para acidificação em todos os tratamentos, com pequena variação da umidade e da atividade de água. Também foi observada correlação entre as atividades α -amilase e glicoamilase com a biomassa vegetativa, sendo os valores de atividade similares e decrescentes, porém superiores no tratamento com menos concentrações em farelo de soja.

Palavras-chave: bagaço de malte, *Macrocybe titans*, α -amilase e Glicoamilase, farelo de soja.

ABSTRACT: (The production of amylolytic enzymes by *Macrocybe titans* in brewing residue). The amylolytic enzymatic profile of *Macrocybe titans* it was defined in cultivation with a no composted substrate, as well as monitored the production of mycelial mass. The production of the enzymes was determined in a medium containing brewer's spent grain, supplemented with cassava bagasse and three kinds of meals: soybean meal, wheat bran and rice bran. The axial mycelial growth of the fungus it was evaluated as well as in specific process parameters. The determination of the enzymatic activities followed the kinetics of the production of enzymes and total proteins in the treatments that presented the highest vegetative growth. In the media containing soybean meal, there was a greater rate of formation of hyphae in relation to other meals, which points out that the fungus grows faster in substrates with a high concentration of nitrogen, with. The variations in the pH value evidenced a tendency for acidification in all the treatments, with a low variation of moisture level and water activity. In relation to the enzymatic activities of α -amylase and glucoamylase, there was correlation with the vegetative biomass, and the activity values were similar between each other and decreasing, however, greater in the treatment with lower concentrations of soybean meal.

Key words: Bagasse of brewer's spent grain, *Macrocybe titans*, α -amylase and Glucoamylase, soybean meal.

INTRODUÇÃO

Diferentes processos industriais produzem resíduos que necessitam de destino adequado, pois além de criar potenciais problemas ambientais, representam perdas de matérias-primas e energia, exigindo investimentos em tratamentos para controlar a poluição (Pelizer *et al.* 2007). Das diversas tecnologias empregadas para reduzir ou minimizar esses resíduos, a utilização de processos biológicos são uma das alternativas já que estes podem ser empregados como biomassa para cultivo de fungos de interesse econômico, podendo ser para consumo alimentar (Tonini *et al.* 2007), para produção de extratos ativos para uso terapêutico e cosmético (Mohorcic *et al.* 2007), dentre outros.

Produtos da FES (Fermentação em Estado Sólido)

obtidos em sistemas empregando reatores biológicos ainda são limitados ao meio acadêmico, sendo os principais empregados para a produção de enzimas. Outros compostos como antibióticos, esteróides, vitaminas, ácidos orgânicos e aminoácidos também são mencionados (Souza *et al.* 2008). Das várias enzimas produzidas, as amilases são amplamente estudadas devido à importância na hidrólise do amido (Spier *et al.* 2006) para aplicações nas indústrias alimentícias, têxtil e de papel (Gupta *et al.* 2003; Pandey *et al.* 2005). As amilases hidrolisam os amidos e são classificadas em várias formas, dependendo de como atuam sobre as moléculas de amido. Quanto à natureza das ligações hidrolisadas, as amilases podem ser reunidas em cinco classes: α -amilases, β -amilases, isoamilases, glicoamilases, ciclodextrina-glicanotransferase (Cornelis 1987).

1. Bolsista CAPES. Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Regional de Blumenau, FURB. Rua São Paulo, 3250, Itoupava Seca, CEP 89030-000, Blumenau, SC, Brasil.

2. Embrapa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias, EMBRAPA FLORESTAS. Estrada da Ribeira, km 111, Caixa Postal 319, CEP 83411, Colombo, PR, Brasil.

3. Departamento de Engenharia Química, Universidade Regional de Blumenau, FURB. Blumenau, SC, Brasil.

4. Departamento de Engenharia Química, Universidade Regional de Blumenau, FURB. Blumenau, SC, Brasil.

* Autor para contato. E-mail: : anac_wis@hotmail.com

Para o estudo de produção de enzimas em meio sólido, os fungos são os organismos usualmente empregados, sendo que os basidiomicetos estão sendo cada vez mais estudados quanto à capacidade de produção de enzimas (Faria *et al.* 2007). Souza *et al.* (2008), estudaram a formação de halos enzimáticos produzidos pela amilase em basidiomicetos cultivados em várias fontes de carbono, e verificaram que em amido de milho, maltose e farelo de trigo foi detectada a produção de amilases em vários isolados, particularmente em *Daedalea* sp.

Mas a classe dos fungos basidiomicetos mostra uma infinidade de espécies, mais de 25.000 (Putzke e Putzke 2002), e a minoria é estudada. Exemplo disso é o fungo *Macrocybe titans*, gênero encontrado no Brasil, a cerca de sete anos, pelo especialista em taxonomia de macrofungos, André de Meijer, em Antonina (PR) (Sayka 2008), e o qual apresenta poucos registros no país. A potencialidade deste fungo como produtor de enzimas ainda não encontra registros na literatura. Além disso, características fisiológicas, condições de cultivo, potencial biotecnológico, ainda não estão documentados, tendo-se apenas conhecimento de estudos que indicam ausência de produção de toxinas clássicas (Stijve 2004).

Na obtenção de enzimas pelos basidiomicetos, sugere-se que a produção seja regulada pela fonte de carbono ou substrato utilizado. O emprego de biomassa resultante do processo de produção de cerveja é um exemplo de biomassa para cultivo de fungos.

A região de Blumenau destaca-se no cenário catarinense como o local de maior incidência de indústrias de cerveja. Além disso, grandes indústrias estão estabelecidas em Santa Catarina, contribuindo ainda mais para a geração de resíduos agroindustriais. Esse processo industrial gera resíduos que necessitam de destino adequado, pois além de criar potenciais problemas ambientais, representam perdas de matérias-primas e energia, exigindo investimentos em tratamentos para controlar a poluição (Pelizer *et al.* 2007).

O bagaço de malte, resíduo da filtração do mosto (mistura do malte com água) em uma das etapas do processo cervejeiro, é composto principalmente pela casca da cevada que apresenta em sua composição hemicelulose, lignina e celulose, além de proteínas e cinzas. As cinzas são representadas pelos minerais que atuam como cofatores enzimáticos no metabolismo celular. As proteínas

forneem nitrogênio orgânico para a multiplicação celular, enquanto que a hemicelulose e a celulose, fontes de carbono, são convertidas em moléculas de água e CO₂ pelos fungos, que são dotados de um complexo enzimático para tal fim (Buswell *et al.* 1995; Vieira *et al.* 2008).

Em basidiomicetos, os requisitos nutricionais e ambientais no crescimento micelial (fase vegetativa), podem evidenciar a capacidade degradativa e refletir diretamente na produtividade enzimática. Neste trabalho teve-se por objetivo estudar o crescimento micelial e a produção de α -amilase e glicoamilase de *M. titans* utilizando bagaço de malte suplementado com diferentes farelos (trigo, arroz e soja).

MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico

Os experimentos deste trabalho foram desenvolvidos nos Laboratórios de Engenharia Bioquímica e de Processamento de Alimentos do Departamento de Engenharia Química do Centro de Ciências Tecnológicas da Universidade Regional de Blumenau (FURB). O fungo utilizado *M. titans*, linhagem CNPF 131, foi proveniente do Laboratório de Microbiologia da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Centro Nacional de Pesquisa em Florestas - EMBRAPA FLORESTAS, Colombo, PR, conservado em tubos de ensaio contendo meio Batata Dextrose-Ágar (BDA), a 4°C \pm 1°C.

Em condições assépticas, aproximadamente 25 mL de meio BDA foram colocados em placas de Petri e inoculados fragmentos de micélio como discos de 7 mm de diâmetro proveniente de cultura estoque, no centro de cada placa. Estas foram mantidas em estufa a 25°C \pm 1°C até completo preenchimento (Depcke *et al.* 2008). Estas placas, denominadas de matrizes secundárias, foram utilizadas para a obtenção do inóculo.

Substratos para o crescimento micelial axial

O bagaço de malte recém processado e proveniente da produção de cerveja Pilsen foi obtido de uma cervejaria do Vale do Itajaí (SC) na granulometria de 0,3 cm \pm 0,1 em junho de 2008. Como fontes de nitrogênio foram empregados farelo de soja, trigo e de arroz. O farelo de soja foi cedido pela Empresa Búngue Alimentos, unidade

Tabela 1. Quantidades dos resíduos e suplementos (gramas) para formação do substrato dos diferentes tratamentos.

Substratos	Material Lignocelulósico	Fonte de amido		Fonte de Nitrogênio	
	Bagaço de malte	Farelo de mandioca	Farelo de soja	Farelo de arroz	Farelo de trigo
Tratamentos			(gramas)		
01	30	4,0	1,5		
02	30	4,0		1,5	
03	30	4,0			1,5
04	30	4,0	4,0		
05	30	4,0		4,0	
06	30	4,0			4,0
07	30	4,0	7,0		
08	30	4,0		7,0	
09	30	4,0			7,0

localizada em Mato Grosso. Esse resíduo foi triturado em liquidificador industrial e peneirado para obtenção de um farelo, obtendo uma granulometria de 2 mm a 5 mm. O farelo de trigo comercial foi adquirido em agropecuárias no município de Blumenau com uma granulometria aproximada de 1 mm usado de forma original e o farelo de arroz, também com granulometria aproximada de 1 mm, foi fornecido pela indústria Roza Cereais e Beneficiamento de Arroz da cidade de Massaranduba – SC. Como fontes de carbono foi utilizado o bagaço de mandioca, fornecido pela empresa Amafil de Cianorte (PR), já desidratado e com a granulometria de 1 a 2 mm.

A mistura de substratos resultou em nove tratamentos (Tab. 1) com cinco repetições cada, umidificados (70% de umidade) e colocados em frascos cilíndricos de 350 mL fechados com tampas metálicas com abertura de ½ polegada na parte central e coberta com papel filtro. Após esterilização dos frascos, fragmentos de micélio foram colocados por toda a superfície e incubados a 25 °C. Duas fitas de papel milimetrado foram fixadas em posições opostas para facilitar a medida da extensão do substrato ocupado pelas hifas no sentido axial (Tonini *et al.* 2007).

Medida do Crescimento micelial axial

Iniciada a formação das hifas no substrato, foram realizadas medidas diárias do crescimento micelial. A contagem foi interrompida quando o primeiro frasco apresentou completa colonização do substrato. A velocidade média de crescimento micelial axial foi calculada pela equação 01:

$$\bar{m} = \frac{C}{T}$$

Na qual:

Vm = velocidade média de crescimento micelial axial (cm/dia)

Cf = medida do comprimento da dispersão do micélio no tempo final (cm)

Tf = Tempo final (dias)

Para a comparação entre os diferentes tratamentos foram calculadas a média do comprimento da dispersão do micélio pela equação 02.

$$\bar{C} = \frac{C}{10}$$

Na qual:

CT = Média total dos frascos (cm) (5 repetições).

C = Somatória de todos os valores (cm)

10 = Número de leituras realizadas

A comparação dos resultados foi realizada por análise de variância (ANOVA) e teste de média (Tukey) com nível de significância de 5 %, utilizando-se o programa Testes Paramétricos com desenvolvimento em planilha Excel confeccionado pelo Professor Msc. Carlos Efrain do Departamento de Matemática (FURB).

Determinação das Atividades Enzimáticas e Extração das enzimas do meio sólido

A determinação cinética das atividades enzimáticas

foram realizadas nos tratamentos T4 e T7 (4,0 g e 7,0 g de farelo de soja) nos tempos 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38 e 40 dias de cultivo, após a colonização do micélio por todo o substrato.

Para a extração da enzima foi adaptado o método descrito por Maiorano (1990) usando 1g de amostra para 15 mL de água destilada, sem agitação, durante 30 minutos. Após filtração, o extrato resultante foi empregado para determinação da atividade das enzimas α -amilase e glicoamilase.

Atividade de α -amilase

Foi empregado o método proposto por Bernfield (1955) citado por Aiyer (2004). Em um banho termostatizado a 37°C, colocou-se um tubo de ensaio contendo 0,5 mL de amido solúvel 1% (MERCK) juntamente com 0,2 mL da amostra proveniente da extração. O pH da amostra foi ajustado para 5,2 e a reação ocorreu por 30 minutos. Em seguida foi levada a um banho de gelo a fim de parar a atividade da enzima. Em tubos de Duran misturaram-se 15 μ L de amostra da hidrólise com 1,5 mL de reagente enzimático, agitou-se e deixou-se em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente. A glicose liberada na reação de hidrólise descrita foi analisada pelo método da glicose-oxidase, conforme Silva *et al.* (2005), utilizando procedimento descrito no Kit enzimático Glicose Enz – Color, adquirido do Laboratório de Análises Clínicas – Laborclin de Vargem Grande Pinhais - PR. As amostras foram lidas na absorbância de 500 nm em espectrofotômetro UV-1650 PC, UV-Vis Shimadzu.

Uma unidade de atividade de α -amilase foi definida como a quantidade de enzima necessária para a liberação de 1 μ mol de glicose por minuto, nas condições padronizadas, sendo determinada de acordo com a seguinte equação (Dalsenter *et al.* 2005):

$$Aa = \frac{G}{R} \times \frac{V_{Amido}}{M} \times \frac{PMg}{R} \times \frac{E}{M}$$

Na qual Aa = atividade de α -amilase (U.g⁻¹)

G = concentração da glicose pelo método glicose-oxidase (g.L⁻¹)

V_{amido} = (volume do amido) (0,5 mL)

VR = Volume de meio reacional (0,7 mL)

VA = Volume de amostra utilizada (0,2 mL)

PMg = Massa molecular da glicose (5,56 μ mol.L⁻¹)

TR = Tempo de reação (30 minutos)

VE = Volume da extração (15 mL)

ME = Massa seca da amostra utilizada (1 g)

Atividade de Glicoamilase

A atividade de glicoamilase foi determinada pelo método da glicose-oxidase, após reação de hidrólise (Dalsenter *et al.* 2005). Transferiram-se 5 mL de solução de amido 4% (MERCK) para tubos de ensaio, em banho termostático até atingir a temperatura de 60 °C. Adicionou-se 1mL da amostra proveniente da extração, diluída conforme necessidade e a reação ocorreu por 30 minutos. Em seguida os tubos foram para um banho

de gelo. A medida da glicose liberada foi determinada conforme descrito para a enzima α -amilase.

A medida da glicose livre foi feita pelo método da glicose-oxidase usando 15 μ L da amostra do extrato, com posterior leitura em espectrofotômetro UV-1650 PC, UV-Vis Shimadzu na absorvância de 500 nm.

A atividade da enzima glicoamilase (Ag) em que uma unidade de atividade de glicoamilase foi definida como a quantidade de enzima necessária para a liberação de 1 μ mol de glicose por minuto, nas condições padronizadas, foi determinada conforme a equação 03. No entanto, a variável G (glicose) foi a glicose livre e as variáveis V_{amido} (volume de amido), VR (volume de meio reacional) e VA (volume de amostra) foram: 5 mL, 6 mL e 1 mL, respectivamente.

Extração das proteínas do meio sólido

A concentração das proteínas totais dos meios para quantificação da atividade específica das enzimas foi determinada em, 0,1g, de substrato, adicionando de 1mL de uma solução com 0,4g de NaOH em 10 mL de água destilada e de 1 mL de água destilada em tubo Duran. Após agitação, os tubos foram levados a água fervente durante 5 minutos, resfriados em banho de gelo e centrifugados por 15 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi usado para dosagem de proteínas totais pelo método proposto por Bradford (1976).

Cálculo das atividades enzimáticas específicas

A atividade específica (AS) de α -amilase e de glicoamilase expressa em U.mg⁻¹ de proteínas totais produzidas pelo fungo *M. titans* foi quantificada usando a equação abaixo:

$$A = \frac{E}{P}$$

Onde:

AS = Atividade específica (U.mg⁻¹);

AE = Atividade enzimática no tempo t (U.g⁻¹);

PT = Proteínas totais no tempo t (mg.g⁻¹).

Determinações Analíticas

As determinações analíticas foram realizadas no início e no término dos experimentos de análise do crescimento micelial.

O pH foi medido utilizando um potenciômetro digital (DIGIMED, modelo DM 20). As amostras (1 g) foram suspensas em 10 mL de água destilada. Esperaram-se 10 minutos com agitação intermitente e procedeu-se a leitura em potenciômetro digital.

A A.a. (atividade de água), que representa a água disponível no meio, foi medida utilizando o aparelho AQUALAB, que, de acordo com o manual, utiliza a técnica de determinação do ponto de orvalho em espelho encapsulado. Essa técnica é originária da média de umidade relativa aprovada pelo AOAC (Associação de Químicos Analistas).

Para determinação da umidade utilizou-se a adaptação feita por Maiorano (1990) do método nº 14004 da A. O.

A. C. (Association of Official Analytical Chemistry) de determinação de umidade em cereais.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Efeito da concentração dos suplementos no crescimento micelial axial de M. titans

Os fungos constituem um dos grupos de microrganismos mais importantes na atividade de decomposição da matéria orgânica em função de sua capacidade especializada de degradação. Esta atividade ocorre, sobretudo, na sua fase vegetativa ou micelial. Nas Figs. 1A, 1B e 1C, são mostradas imagens do micélio de *M. titans* colonizado nos substratos dos 9 tratamentos. Micélio de cor branca próprio de basidiomicetos foi observado em todos os tratamentos com odor fraco e indeterminado. O crescimento do micélio foi uniforme, simétrico e denso, sendo proporcional ao teor de nitrogênio, já que os tratamentos que continham farelo mais rico em proteínas, farelo de soja, 45% (Tonini *et al.* 2007), indicaram mais intensamente estas características.

A colonização inicial de *M. titans* ("Brown-rot") no substrato foi muito lenta, tendo as hifas se fixado após sete dias da inoculação. A partir daí a total colonização dos substratos foi obtida ao final de dezesseis dias de cultivo nos tratamentos T7, seguido do T4, que continham maior quantidade de farelo de soja. Fungos da podridão branca, conhecidos como "White-rot", degradam todas as estruturas das paredes celulares vegetais, diferindo a velocidade com que cada um destes constituintes é degradado, ao contrário dos fungos da podridão castanha ou "Brown-rot", que degradam seletivamente os carboidratos, com limitada degradação da lignina, que resta em grandes quantidades nos substratos colonizados por estes fungos (Pandey *et al.* 2005).

Quanto ao maior comprimento da dispersão do micélio nos tratamentos T7 e T4, se deve ao fato destes conterem farelo de soja que apresenta alta concentração em nitrogênio, 45%, conforme estudo de Tonini *et al.* (2007). Fernandes *et al.* (2008) também estudaram os efeitos dos farelos de soja, arroz e trigo no crescimento micelial radial, estudo realizado em placas de petri, em *Lentinula boryana*, obtendo a mesma resposta de maior eficiência da soja comparativamente aos demais farelos para o aumento do comprimento da dispersão do micélio do fungo.

O efeito dos tipos e concentrações de suplementos é visualizado no gráfico da Fig. 2 e Fig. 3. A velocidade média de formação das hifas foi superior nos tratamentos T7 e T4 com cerca de 0,3 cm.dia⁻¹, similar ao obtido por Depcke *et al.* (2008) em meio contendo ágar glicose com farelo de soja onde a velocidade média atingiu 0,36 cm.dia⁻¹. Entre o farelo de trigo e o de arroz não houve diferença estatística entre a média do crescimento micelial total do fungo.

A importância do nitrogênio no crescimento micelial foi observada por Kim *et al.* (2002), que utilizaram

fontes inorgânicas e orgânicas e concluíram serem as últimas, melhores pra incrementar a produção de biomassa. Justifica-se a importância da suplementação em nitrogênio no meio de cultura, já que este atua na síntese de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos e de algumas vitaminas pelo fungo. No entanto, altas concentrações inibem a síntese de enzimas lignolíticas (Silva *et al.* 2005). Segundo Maziero (1990), em elevada concentração, o nitrogênio reprime a degradação da lignina, retardando ou até inibindo o desenvolvimento do fungo.

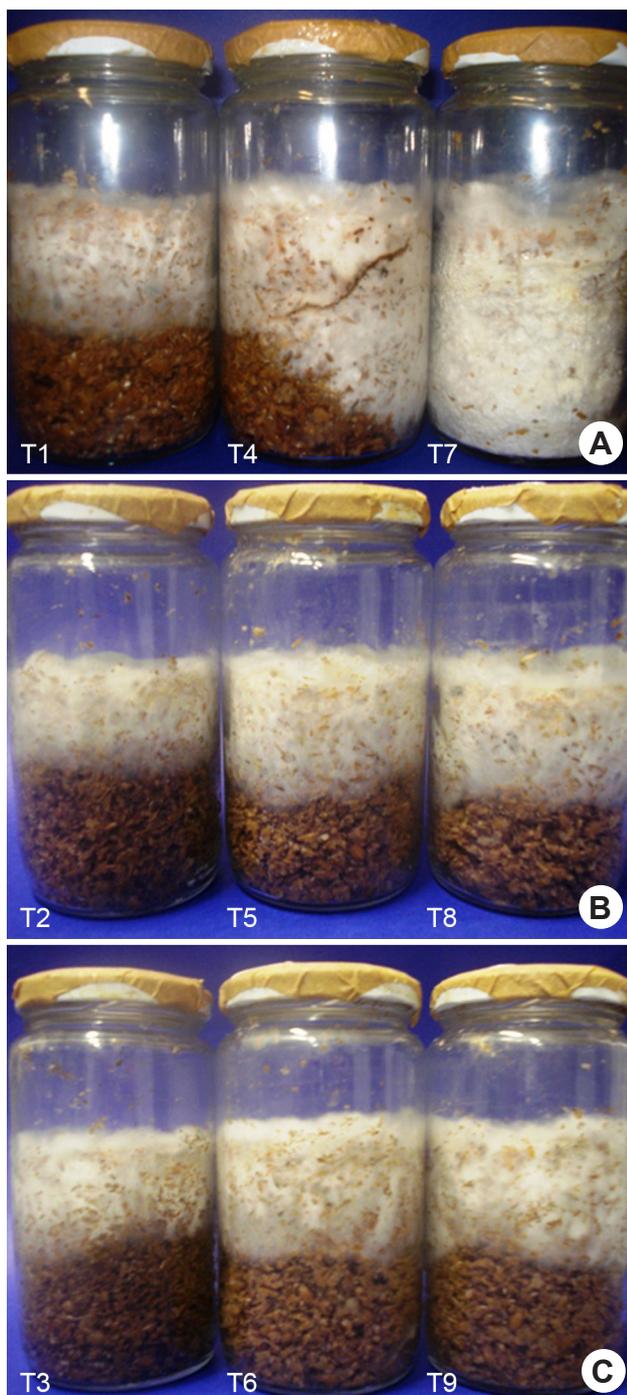


Figura 1. Frascos com micélio de *Macrocybe titans* colonizado nos substratos dos 9 tratamentos com 16 dias de cultivo a 25 °C, descontando os dias de preenchimento da superfície superior do substrato com massa micelial.

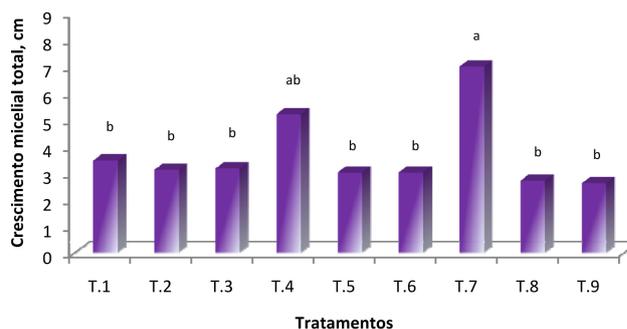


Figura 2. Crescimento micelial de *Macrocybe titans* em diferentes tratamentos com substrato à base de bagaço de malte, bagaço de mandioca e farelos de arroz, soja e trigo. (Letras diferentes representam diferença significativa a 5%).

Variação do pH, umidade e atividade de água dos substratos durante o crescimento micelial axial

Os valores iniciais de pH dos 9 tratamentos entre 5,8 e 6,0 reduziram para 4,8 a 5,6 ao final do crescimento micelial. Segundo Santos, Furlan e Gern (2000), o crescimento micelial implica na secreção de exoenzimas, polissacarídeos, antibióticos e ácidos orgânicos, os quais reduzem o pH. A redução do pH por *L. edodes* é consequência da produção de diversos ácidos orgânicos, como ácido acético e succínico produzidos pelo fungo (Robbers *et al.* 1997). Zadrazil (1997) citado por Santos, Furlan e Gern (2000), relata que algumas espécies de basidiomicetos possuem uma característica auto-reguladora de pH, com tendência a se estabilizar no valor de pH ótimo para seu crescimento, independente do valor de pH inicial. Este fato também foi constatado por Vieira *et al.* (2008) em estudo com *Polyporus tricoloma* para produção de antibiótico, o qual relata que o valor do pH inicial também não parece influenciar no alongamento das hifas de *M. titans*. Depcke *et al.* (2008) avaliaram os efeitos dos valores de pH inicial (5, 6, 7, e 8) no crescimento micelial radial de *M. titans* em meio BDA, e segundo os autores não houve influência no crescimento micelial, tendo uma velocidade média de crescimento radial em

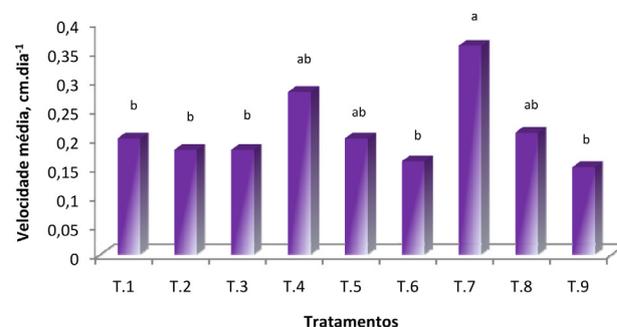


Figura 3. Velocidade média do crescimento micelial axial de *Macrocybe titans* nos diferentes tratamentos após 16 dias de cultivo, com substrato base de bagaço de malte, bagaço de mandioca e farelos de arroz, soja e trigo. Letras diferentes representam diferença significativa a 5%.

Tabela 2. Atividade de água no tempo final nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	Atividade de água (A.a.)
01	0,991
02	0,995
03	0,997
04	0,999
05	0,996
06	0,994
07	0,995
08	0,993
09	0,994

torno de 0,35 cm/dia.

Segundo Schisler (1982), variações mais efetivas nos níveis de pH podem indicar diferença na capacidade degradativa entre espécies e/ou estirpes, já que tais perfis podem ser atribuídos à geração de ácidos orgânicos, resultantes da degradação de açúcares consumidos como fonte de carbono para o crescimento vegetativo, embora não possa ser ignorada a oxidação da lignina que acarreta na formação de derivados ácidos.

Para fungos como *Aspergillus niger*, Spier *et al.* (2006), concluíram que o melhor pH para a produção de α -amilase e glicoamilase foi entre 4,0 e 6,0, valores esses similares ao deste estudo com *M. titans*. Outro estudo sobre o pH ótimo para a produção de α -amilase e glicoamilase foi realizado por Silva e Peralta (2000), que obteve como 5,0 o valor adequado para a produção das enzimas pelo fungo *Aspergillus fumigatus*.

Parâmetros físicos como umidade e atividade de água são importantes para a formação de biomassa e enzimas. A umidade do meio é necessária para a utilização dos açúcares, transformando o ambiente de crescimento. Este crescimento resulta no aumento da temperatura pela atividade dos fungos, que utilizam açúcares e substâncias prontamente assimiláveis no substrato. Os teores de umidade adequados ao crescimento de organismos filamentosos promovem a síntese de uma variedade de enzimas extracelulares (Schisler 1982).

No cultivo de *M. titans*, a umidade manteve-se em torno de 70%, com uma perda de aproximadamente 4%. Bano *et al.* (1987), explicam que teores de umidade acima de 80% podem levar a contaminação bacteriana, acompanhado de contaminação fúngica. Alto teor de

umidade também diminui a porosidade, a difusão de oxigênio e a eliminação de dióxido de carbono. Por outro lado um baixo teor de umidade pode levar a um menor crescimento (Dalsenter *et al.* 2005).

Quanto a atividade de água (A.a) em cultivos em meio sólido, esta deve ser a mínima necessária para os processos metabólicos e para evitar as contaminações. O conhecimento do teor da A.a. de um substrato em FES é essencial para o acompanhamento da sua integridade, preservação e manutenção do tempo de processo. Em substratos com A.a. a partir de 0,65 pode ocorrer proliferação de contaminantes, sendo que até A.a. 0,75, somente alguns tipos microbianos tais como: bactérias halofílicas, leveduras osmofílicas e bolores xerofílicos podem se desenvolver (Ferreira Neto, Figueiredo e Queiroz 2005). Para basidiomicetos, a A.a. deve apresentar valores acima de 0,89 para que ocorra produção de biomassa (Tavares 2008). Em todos os tratamentos a A.a. do substrato esteve entre 0,991 e 0,999 (Tab. 2).

Atividades enzimáticas de α -amilase e glicoamilase

Considerando a cinética de produção de biomassa, observado nas figuras 2 e 3, onde constatou-se que os tratamentos suplementados com farelo de soja, nas concentrações de 4,0 g e 7,0 g, foram mais efetivos no crescimento micelial quando comparado aos demais tratamentos, promovendo o crescimento do micélio de *M. titans* em ambos os substratos, integralmente (até o final do frasco), a análise de atividade enzimática e proteínas foram realizadas nos tratamentos T4 e T7 após 22 dias de cultivo.

A dinâmica de atividade enzimática demonstrou que o fungo utilizou carboidratos disponíveis para formação de biomassa e colonização do substrato (Figs. 4 e 5). Como as determinações enzimáticas, realizadas após 22 dias de incubação, com o passar do tempo deve ter ocorrido redução de carbono de fácil assimilação, permanecendo ainda em altas concentrações as reservas em material lignocelulósico.

No bagaço de malte, por se tratar de substrato que contém material lignocelulósico, o fungo precisaria de níveis mais elevados de enzimas hidrolíticas e oxidativas no meio, pois não houve processo prévio de degradação da

Tabela 3. Produção de α -amilase pelo fungo *Macrocybe titans*.

Dias de cultivo	Tratamento 4		Tratamento 7	
	30,0g bagaço de malte + 4,0g farelo de mandioca + 4,0g farelo de soja		30,0g bagaço de malte + 4,0g farelo de mandioca + 7,0g farelo de soja	
	Atividade Enzimática U.g ⁻¹	Atividade Específica U.mg ⁻¹	Atividade Enzimática U.g ⁻¹	Atividade Específica U.mg ⁻¹
22	9,869	0,05029	2,1545	0,007382
24	12,7185	0,064811	0,4865	0,001667
26	6,672	0,033999	3,058	0,010478
28	4,3785	0,022312	6,1855	0,021194
30	7,2975	0,037187	6,1855	0,021194
32	7,9925	0,040728	3,1275	0,010716
34	3,475	0,017708	1,856	0,009
36	1,946	0,009916	1,668	0,005715
38	6,672	0,033999	1,5985	0,005477
40	3,1275	0,015937	2,502	0,008573

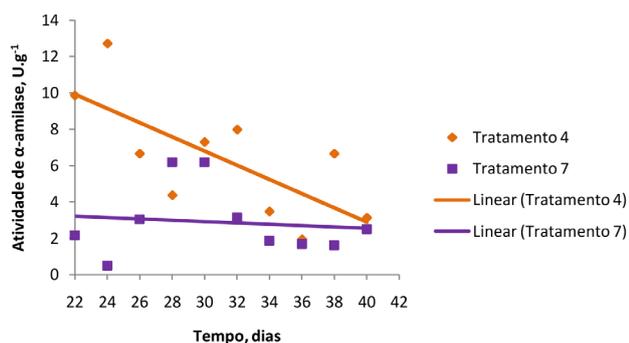


Figura 4. Atividade enzimática de α -amilase, expressa em $U.g^{-1}$, de meio sólido pelo fungo *Macrocybe titans*.

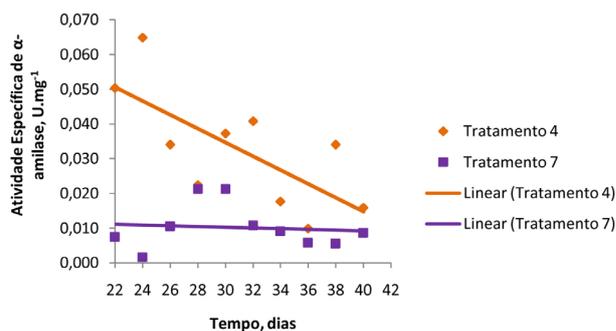


Figura 5. Atividade específica de α -amilase, expressa em $U.mg^{-1}$, de proteínas totais pelo fungo *Macrocybe titans*.

lignina e da celulose do bagaço. Por ser um fungo de podridão marrom (fungo que utiliza a celulose e outros componentes afins da parede da célula e deixa a lignina em condições praticamente idênticas), *M. titans* pode ter encontrado limitação em fonte de carbono assimilável. Isso demonstra que o processo de preparo do substrato, a formulação e o estágio inicial de degradação, podem ser fatores determinantes nos níveis de atividade enzimática.

As enzimas são de fundamental importância para o crescimento micelial, pois são responsáveis pela despolimerização da celulose, hemicelulose e do amido. Os açúcares formadores destes polímeros constituem uma fonte de carbono necessária para a atividade metabólica (Buswell, Cai e Chang 1995). *M. titans* deve utilizar a celulose e outros componentes afins deixando a lignina em condições praticamente idênticas. Também pode ter ocorrido à limitação de acesso às fontes de carbono da celulose e hemicelulose. Portanto, há necessidade do fornecimento de material de mais fácil assimilação para promover a expressão ampliada de atividades amilolíticas. Por outro lado, independente das condições de otimização, *M. titans* pode não apresentar estrutura genética para produção de enzimas amilolíticas.

Quanto à queda da atividade enzimática de α -amilase (Tab. 3), esta pode estar ligada à produção de proteases, uma vez que essa enzima converte proteínas em aminoácidos (Schmidt e Sallas-Mellado 2009).

Analisando os dados de atividade específica de α -amilase, constata-se que em meio com maior concentração de nitrogênio (T7), a atividade é inferior

quando comparada ao meio menos concentrado (T4). Concentrações mais elevadas em nitrogênio inibem a síntese de enzimas (Maziero 1990), portanto, no T7, o fungo pode ter utilizado inicialmente o nitrogênio, que é de fácil assimilação, para multiplicação das hifas em detrimento da síntese de enzimas para degradação dos polímeros do substrato.

Os dados de atividade enzimática e atividade específica de glicoamilase dos tratamentos T4 e T7 estão representados por uma linha de tendência na Fig. 6 e Fig. 7, respectivamente. A atividade de glicoamilase mostrou perfil similar à α -amilase, onde os maiores valores foram obtidos no início do cultivo (Tab. 4). Isto pode ser decorrente do fato da concentração de amido no meio estar em maior concentração no início do cultivo. Com o passar do tempo o amido foi sendo hidrolisado e resultou na sua diminuição que restringiu a indução da síntese das enzimas. A presença de amido no meio pode ter sido o fator determinante da produção de enzimas amilolíticas, pelo menos neste caso.

Este fungo também mostrou atividade enzimática pouco superior no substrato em que a concentração em nitrogênio era menor, sendo a atividade ligeiramente maior para glicoamilase em relação à α -amilase. Mesmo sendo um fungo de podridão marrom, há necessidade do fornecimento de material de mais fácil assimilação para promover melhor crescimento micelial. Tanto que fungos de podridão marrom são cultivados preferentemente em material já compostado.

Outro fator importante sobre a produtividade de amila-

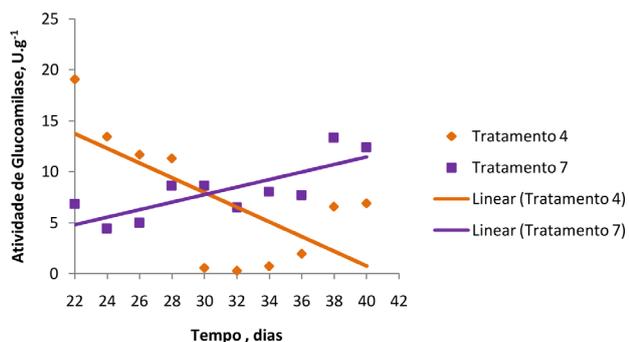


Figura 6. Atividade enzimática de glicoamilase, expressa em $U.g^{-1}$, de meio sólido pelo fungo *Macrocybe titans*.

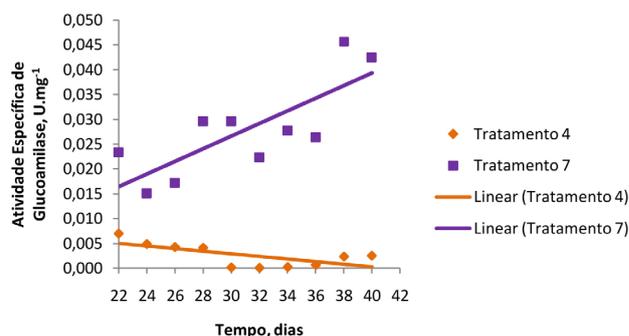


Figura 7. Atividade específica de glicoamilase, expressa em $U.mg^{-1}$, de proteínas totais pelo fungo *Macrocybe titans*.

Tabela 4. Produção de glicoamilase pelo fungo *Macrocybe titans*.

Dias de cultivo	Tratamento 4		Tratamento 7	
	30,0g bagaço de malte + 4,0g farelo de mandioca + 4,0g farelo de soja		30,0g bagaço de malte + 4,0g farelo de mandioca + 7,0g farelo de soja	
	Atividade Enzimática U.g ⁻¹	Atividade Especifica U.mg ⁻¹	Atividade Enzimática U.g ⁻¹	Atividade Especifica U.mg ⁻¹
22	19,07	0,006991	6,81	0,02
24	13,44	0,004928	4,41	0,01
26	11,68	0,00428	5,00	0,01
28	11,34	0,004158	8,63	0,03
30	0,60	0,000219	8,63	0,03
32	0,29	0,000107	6,50	0,02
34	0,74	0,00027	8,07	0,03
36	1,97	0,000724	7,69	0,03
38	6,57	0,00241	13,33	0,04
40	6,89	0,002528	12,38	0,04

ses é sua relação com a baixa concentração de Ca²⁺, uma vez que Pires *et al.* (2002) verificaram que a atividade amilásica é dependente da presença de Ca²⁺, embora a β -amilase aja sem nenhum tipo de metal para a sua ativação. Sobre isso, Alexandrino *et al.* (2007), estudando o basidiomiceto *Pleurotus ostreatus*, relatam que não foram detectadas amilases no meio de cultivo, mas sim lacase e manganês peroxidase. Outro fator citado pelos autores, é que a presença de metais pesados tem mostrado poder de inibição da atividade amilásica, tais como o mercúrio, a prata, o cobre e o chumbo.

Os valores encontrados nesse trabalho para a produção de α -amilase e glicoamilase, são baixos; quando comparados com os obtidos por Spier *et al.* (2006) trabalhando com fungos tais como *Aspergillus niger*: 530,55U.g⁻¹ para α -amilase e 770,66U.g⁻¹ para glicoamilase. No entanto, o conhecimento obtido sobre a síntese destas enzimas em *M. titans* abre um caminho para estudos das necessidades fisiológicas deste fungo.

O perfil enzimático, a dinâmica da atividade enzimática e a correspondente produção de biomassa vegetativa de *M. titans*, forneceram importantes informações sobre a eficiência na utilização dos substratos.

CONCLUSÕES

O bagaço de malte como substrato lignocelulósico foi efetivo no crescimento micelial, proporcionando ao fungo capacidade em produzir enzimas hidrolíticas e oxidativas.

A maior formação de massa micelial em farelo de soja indicou alta capacidade de metabolização de nitrogênio protéico por *M. titans*.

As variações de pH evidenciaram uma tendência para acidificação em todos os tratamentos.

Quanto à produção das enzimas α -amilase e glicoamilase, *M. titans* mostrou atividades mais efetivas no início da colonização do substrato.

O fungo não é um produtor proeminente de amilases.

REFERÊNCIAS

AIYER, P. V. 2004. Effect of C:N ratio on alpha amylase production by *Bacillus licheniformis* SPT 27. *Afr. J. Biotechnol.*, 3(10): 519-522.

ALEXANDRINO, A. M.; FARIA, H. G. de; SOUZA, C. G. M. de; PERALTA, R. M. 2007. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 27(2): 364-368.

BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.

BUSWELL, J. A.; CAI, Y.; CHANG, S. T. 1995. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and lacase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *Fems. Microb Lett.*, 128: 81-88.

CORNELIS, P. 1987. Microbial amylases. *Microbiol. Scienc.*, 4(11): 342-343.

DALSENTER, F. D. H. 2005. VICCINI, G.; BARGA, M. C.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. A Mathematical Model Describing the Effect of Temperature Variations on the Kinetics of Microbial Growth in Solid-State Culture. *Process Biochemistry*, 40: 801-807.

DEPCKE, M.; KOPYTOWKI FILHO, J.; AMAZONAS, M. A.; TAVARES, L. B. B. 2008. Análise da cinética do crescimento micelial radial de *Macrocybe titans* em diferentes condições. In: *IV Simpósio Internacional sobre Cogumelos no Brasil - SICOG, 2008, Caxias do Sul. Anais - Proceedings*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos. p. 133-133.

FARIA, R. O.; MOURE, V. R.; BALMANT, W.; AMAZONAS, M. A. L. A.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A. 2007. The tyrosinase produced by *Lentinula boryana* (Berk. & Mont.) Pegler suffers substrate inhibition by L-DOPA. *Food Technology and Biotechnology*, 45: 334-340.

FERNANDES, L.S.; AMAZONAS, M. A.; TAVARES, L. B. B. 2008. Cinética de crescimento micelial radial de *Lentinula boryana* em resíduo de palmeira-real-da-austrália. In: *IV Simpósio Internacional sobre Cogumelos no Brasil - SICOG, 2008, Caxias do Sul. Anais - Proceedings*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos. p. 153-153

FERREIRA NETO, C. J.; FIGUEIREDO, R. M. F. e QUEIROZ, A. J. de M. 2005. Avaliação sensorial e da atividade de água em farinhas de mandioca temperadas. *Ciênc. Agrotec.*, 29(4): 795-802.

GUPTA, R.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. 2003. Microbial α -Amylases: a Biotechnological Perspective. *Process. Biochem.*, 38:1599-1616.

KIM, S. W.; HWANG, H. J.; XU, C. P.; NA, Y. S.; SONG, S. K.; YUN, J. W. 2002. Influence of nutritional conditions on the mycelial growth and exopolysaccharide production in *Paecilomyces sinclairii*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 34: 389-393.

MAIORANO, A. E. 1990. *Produção de Pectinase por fermentação em estado sólido*. 262f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade de São Paulo, Escola Politécnica, São Paulo, 1990.

MAZIERO, R. 1990. *Substratos alternativos para o cultivo de Pleurotus spp.* 136f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, São Paulo, 1990.

MOHORCIC, M.; FRIEDRICH, J.; RENIMEL, I.; ANDRÉ, P.; MAN-

- DIN, D.; CHAUMONT, J. 2007. Production of melanin bleaching enzyme of fungal origin and its application in cosmetics. *Biotechnol. Bio-process Eng.*, 12: 200-206.
- PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. 2005. *Enzyme Technology*. 1nd ed. New Delhi: Asiatech Publishers. 760 p.
- PELIZER, L. H.; PONTIERI, M. H.; MORAES, I. de O. 2007. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. *J. Technol.Manag. Innov.*, 2: 118-127.
- PIRES, T. da C. R.; E. M. da; FINARDI-FILHO, F. 2002. Enzimas amilolíticas de mandioca-salsa (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 22(3): 278-284.
- PUTZKE, J.; PUTZKE, M.T.L. 2002. *Os reinos dos fungos*. Santa Cruz do Sul: EDUNISC. v. 2, 214 p.
- ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. 1997. *Farmacognosia e Farmacobiotechnologia*. São Paulo: Premier. 372 p.
- SAIKA, R. A. 2008. *Determinação do perfil químico e bioquímico de Macrocybe titans*. 2008. 83f. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.
- SANTOS, V. M. C. S.; FURLAN, S. A.; ARAÚJO, R.P.; GERN, R. M. M. 2000. Influência da suplementação da palha de arroz na produção de *Pleurotus sajor-caju*. *Revista Saúde e Ambiente*, 1(1): 60-63.
- SCHMIDT, C. G.; SALAS-MELLADO, M. 2009. Influência da ação das enzimas alcalase e flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango. *Quím. Nova* [online], 32(5): 1144-1150.
- SCHISLER, L. C. 1982. Biochemical and mycological aspects of mushroom composting. In: *Penn State Handbook for Commercial Mushroom Growers*. Ed. Department of Plant Pathology. University Park: The Pennsylvania State University, p. 3-14.
- SILVA E M.; MACHUCA A; MILAGRES A. M. F. 2005. Effect of cereal brans on *Lentinula edodes* growth and enzyme activities during cultivation on forestry waste. *Lett. Appl. Microbiol.*, 40: 283-8.
- SILVA, W. B. DA.; PERALTA, R. M. 2000. Caracterização bioquímica de uma enzima extra-celular de um fungo termo tolerante. *Revista Publicatio*, 6: 7-19.
- SOUZA, H. Q.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S. 2008. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. *Ciênc. Tecnol. Alim.*, 28: 116-124.
- SPIER, M. R.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L.; SOCCOL, C. R. 2006. Production and Characterization of Amylases by *Aspergillus niger* under solid state fermentation using agro industrial products. *Int. J. Food Eng.*, 2: 6-1-19.
- STIJVE, T. 2004. The tropical giant mushroom *Macrocybe titans* is edible and can be cultivated. *Antwerpse Mycologische Kring. AMK Mededelingen*, 3: 93-94.
- TAVARES, L. B. B. 2008. Cultivo de shiitake em resíduos do processamento de palmito. In: *IV Simpósio Internacional sobre cogumelos no Brasil – SICOG*, 2008. Caxias do Sul. Anais – Proceedings. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos. p. 64-65.
- TONINI, R.C.G.; SANTOS, F.; ISHIKAWA, N.K.; TAVARES, L. B. B. 2007. Utilização de bainha mediana de palmito (*Euterpe edulis*) Mart. Areaceae como substrato de frutificação para o cultivo axênico de *Lentinula edodes* (Beck.) Pegler. *Revist. Brasil. Biociênc.*, 5: 204-206.
- VIEIRA, G.R.T.; LIEBL, M.; TAVARES, L. B. B. ; PAULERT, R ; SMÂNIA JR, A. 2008. Submerged culture conditions for the production of mycelial biomass and antimicrobial metabolites by *Polyporus tricholoma* Mont. *Braz. J. Microbiol.*, 39: 561-568.<<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822008000300029>>