

## **Alternativa de fontes nutricionais para desenvolvimento da fase micelial e produção de hidrolases por cogumelo comestível de floresta tropical**

### **Alternative of nutritional sources for the development of the mycellial phase and production of hydrolases by edible mushroom from tropical forest**

DOI:10.34117/bjdv7n3-145

Recebimento dos originais: 08/02/2021

Aceitação para publicação: 01/03/2021

#### **Maria do Perpétuo Socorro de Lima Verde Coelho**

Mestre em Engenharia de Produção

Doutoranda da Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (REDE BIONORTE)

Instituição: Universidade Estadual do Amazonas-UEA,

Endereço: Av. Carvalho Leal, 1777, Bairro Cachoeirinha - 69065001, Manaus-AM

E-mail: lvcoelho1@gmail.com

#### **Elliza Emily Perrone Barbosa**

Graduada em Ciências Biológicas

Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC)

Instituição: Universidade Federal do Amazonas-UFAM

Endereço: Av. Gen. Rodrigo Octávio 6200 (Bairro Coroado I) 69080-900, Manaus-AM

E-mail: elliza.perrone01@gmail.com

#### **Laynah Pimenta**

Graduada em Ciências Biológicas

Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC)

Instituição: Universidade Federal do Amazonas-UFAM

Endereço: Av. Gen. Rodrigo Octávio 6200 (Bairro Coroado I) 69080-900, Manaus-AM

E-mail: laynahpimenta7@gmail.com

#### **Samara Claudia Picanço Batista**

Graduada em Engenharia de Alimentos

Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC)

Instituição: Universidade Federal do Amazonas-UFAM

Endereço: Av. Gen. Rodrigo Octávio 6200 (Bairro Coroado I) 69080-900, Manaus-AM

E-mail: samara.claudia18@gmail.com

#### **Fabiano Brito Prado**

Mestre em Biotecnologia

Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBIOTEC)

Instituição: Universidade Federal do Amazonas-UFAM

Endereço: Av. Gen. Rodrigo Octávio 6200 (Bairro Coroado I) 69080-900, Manaus-AM

E-mail: fabiano.prado7@gmail.com

**Salomão Rocha Martim**

Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia

Instituição: Universidade Nilton Lins

Endereço: Av. Prof. Nilton Lins, 3259 (Bairro Flores) 69058-030, Manaus-AM

E-mail: salomao.martim@gmail.com

**Raimundo Felipe da Cruz Filho, *in memoriam***

Doutor em Biotecnologia

Instituição: Universidade Federal do Amazonas-UFAM

Endereço: Av. Gen. Rodrigo Octávio 6200 (Bairro Coroado I) 69080-900, Manaus-AM

E-mail: rfilho@ufam.edu.br

**Maria Francisca Simas Teixeira**

Doutora em Ciências Biológicas

Instituição: Universidade Federal do Amazonas-UFAM

Endereço: Av. Gen. Rodrigo Octávio 6200 (Bairro Coroado I) 69080-900, Manaus-AM

E-mail: mteixeira@ufam.edu.br

**RESUMO**

Cogumelos do gênero *Pleurotus* são reconhecidos como alimentos de alto valor nutricional e por sintetizarem enzimas hidrolíticas com ampla aplicação industrial. Estas características incentivam a busca por meios que estimulem a produção de biomassa e hidrolases. Este estudo teve como objetivo avaliar meios de cultivo para crescimento, assim como, a síntese de hidrolases e a caracterização de proteases produzidas por *P. ostreatoroseus* DPUA 1720. A cultura estoque foi mantida em BDAYE (Ágar Batata Dextrose+Extrato de Levedura), a 25 °C por oito dias. O crescimento radial e vigor micelial foram avaliados em seis meios suplementados com Extrato de Levedura (YE): BDAYE (ágar Batata Dextrose), SABYE (Ágar Sabouraud), GYP (ágar Glicose + Peptona), MGYE (Ágar Extrato de Malte-Glicose-Peptona), ágar CEINYE ou CEDYE (*Dioscorea altissima in natura* ou desidratado). A avaliação da síntese de amilase, celulase e protease foi realizada em meio sólido pelo método do bloco de gelose. A influência do meio e do tempo de cultivo na produção de proteases foram realizadas por fermentação submersa. A atividade proteolítica foi determinada em solução de azocaseína 1% (p/v). As proteases produzidas por fermentação com atividade significativa foram caracterizadas quanto ao efeito do pH e da temperatura na atividade. *P. ostreatoroseus* apresentou crescimento rápido e micélio cotonoso em BDAYE (17,80 mm/dia) aos cinco dias de cultivo. Entretanto, SABYE e CEINYE são meios promissores para crescimento desse cogumelo. *Pleurotus ostreatoroseus* sintetizou quantitativo superior de amilase (17,53 mm), seguido de protease (14,33 mm) e celulase (13,61 mm) em CEINYE, BDAYE, GYP, respectivamente. Os valores significativos de atividade das proteases produzidas por fermentação submersa foram determinados em CEINYE (25,87 U/mL) e BDAYE (22,00 U/mL), aos quatro dias de cultivo. As proteases dos cultivos em CEINYE apresentaram atividade ótima em pH 5,0 e 50 °C. *Pleurotus ostreatoroseus* cresce, sintetiza enzimas tanto em meios de cultura tradicionais como em meios naturais e suas proteases tem potencial para aplicação na biotecnologia de alimentos.

**Palavras-Chave:** cogumelo comestível, *Pleurotus ostreatoroseus*, proteases.

## ABSTRACT

Mushrooms of the genus *Pleurotus* are recognized as food of high nutritional value and for synthesizing hydrolytic enzymes with wide industrial application. These characteristics encourage the search for ways to stimulate the production of biomass and hydrolases. This study aimed to evaluate growth media, as well as the synthesis of hydrolases and the characterization of proteases produced by *P. ostreatoroseus* DPUA 1720. The stock culture was maintained on BDAYE (Potato Dextrose agar+Yeast Extract) at 25 °C for eight days. The radial growth and mycelial vigor were evaluated on six media supplemented with Yeast Extract (YE): BDAYE (Potato Dextrose agar), SABYE (Sabouraud agar), GYP (Glucose-Peptone agar), MGYE (Malt-Glucose-Peptone agar), CEINYE or CEDYE agar (*Dioscorea altissima in natura* or dehydrated). The evaluation of the amylase synthesis, cellulase and protease was carried out in a solid medium using the gelose block method. The influence of the medium and the cultivation time on the production of proteases was carried out by submerged fermentation. Proteolytic activity was determined in a 1% (w/v) azocasein solution. Proteases produced in the liquid medium with significant activity were characterized for the effect of pH and temperature on activity. *P. ostreatoroseus* showed rapid growth and cottony mycelium in BDAYE (17.80 mm/day) at five days of cultivation. However SABYE and CEINYE medium are more promising to grow this mushroom. The data of the enzymatic activity by agar diffusion showed higher activity of amylases (17.53 mm), followed by protease (14.33 mm) and cellulase (13.61 mm) in CEINYE, BDAYE, GYP, respectively. The significant values of activity of proteases produced by submerged fermentation were determined in CEINYE (25.87 U/mL) and BDAYE (22.00 U/mL) at four days of cultivation. The proteases from CEINYE cultures showed optimal activity at pH 5.0 and 50 °C. *Pleurotus ostreatoroseus* grows, synthesizes enzymes in both traditional and natural culture media, and its proteases have potential for application in food biotechnology.

**Keywords:** edible mushroom, *Pleurotus ostreatoroseus*, proteases.

## 1 INTRODUÇÃO

Os fungos do gênero *Pleurotus* pertencem ao Reino Fungi, Filo Basidiomycota, ordem Agaricales e popularmente são conhecidos como cogumelos ostra. Esses macrofungos são os principais decompositores de madeira e resíduos vegetais de regiões de clima tropical e subtropical (FONSECA et al., 2015; GRABARCZYK et al., 2019).

Espécies de *Pleurotus* vêm despertando interesse no cenário econômico, não só devido ao significativo valor nutricional, mas também por sintetizarem compostos bioativos com ação antimicrobiana, antioxidante, anticancerígeno, antiviral, anti-inflamatório, entre outros (BEHERA; GUPTA, 2015; BONONI; GIMENES; ROJAS, 2015). Como resultado da valorização econômica, a produção comercial mundial de *Pleurotus* sp. movimentou mais de US \$ 60 bilhões no período de 2013 a 2018 (GRIMM; WÖSTEN, 2018; LAVELLI et al., 2018).

Pesquisas também vêm demonstrando o potencial de *Pleurotus* sp. como fonte de hidrolases de alto valor econômico, como amilases, celulases e proteases (ERGUN; UREK, 2017; ARAÚJO et al., 2021). Estas enzimas, que atuam na clivagem hidrolítica de ligações químicas, são utilizadas na elaboração de queijos, bebidas, pães, detergentes e no beneficiamento da celulose (SINGH et al., 2016). Em 2019, o mercado global de enzimas, incluindo hidrolases, foi avaliado em US \$ 9,9 bilhões, com perspectiva de crescimento a uma taxa anual de 7,1% de 2020 a 2027 (ENZYMES... 2020).

Para aumentar a produção de biomassa e de enzimas hidrolíticas, além de reduzir os custos do bioprocessamento, meios de cultivo alternativos formulados com resíduos do processamento do algodão, arroz, canola, milho, soja, entre outros, vêm sendo utilizados para o crescimento de espécies de *Pleurotus* (RITOTA; MANZI, 2019). Na Amazônia, exocarpos de cupuaçu e abacaxi, semente de açaí, serragem, farelos de trigo e arroz foram utilizados para a produção de basidiomas e enzimas hidrolíticas por *Pleurotus* sp. (FONSECA et al., 2015; SOUZA et al., 2016).

*Pleurotus ostreatoroseus* Sing., uma espécie que cresce naturalmente na Amazônia, possui basidioma carnoso com destacada coloração rósea e crescimento em temperaturas superiores a 20 °C (MENOLLI JUNIOR, et al., 2010; OMARINI et al., 2010). Apesar do potencial biotecnológico, *P. ostreatoroseus* nativo do bioma amazônico é pouco explorado como fonte de biomassa e enzimas hidrolíticas. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi selecionar meios de cultivo para o desenvolvimento de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720, avaliar a produção de hidrolases e proceder a caracterização bioquímica das proteases sintetizadas por esse cogumelo comestível.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 COGUMELO

Nesta pesquisa foi utilizado *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720 cedido pela Coleção de Culturas DPUA, da Universidade Federal do Amazonas- UFAM. Essa espécie foi isolada na Área de Proteção Ambiental (APA/ UFAM) em Manaus, Amazonas, Brasil.

### 2.2 MANUTENÇÃO DA CULTURA MATRIZ

Para manutenção da cultura de *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720 foi cultivado Ágar Batata Dextrose com Extrato de Levedura 0,5% (p/v) (BDAYE), em placas de Petri. A cultura foi incubada a 25 °C por oito dias para posterior uso nos demais experimentos (FONSECA et al., 2015).

## 2.3 SELEÇÃO DE MEIOS DE CULTURA PARA CRESCIMENTO DE *P. OSTREATOROSEUS*

Neste experimento foram analisados quatro meios de cultura definidos e dois complexos, adicionados de YE 0,5% (p/v): (1) Ágar Batata (BDAYE), (2) Ágar Sabouraud (SABYE), (3) Ágar Glicose-Peptona (GYP) e (4) Ágar Extrato de Malte + Glicose (MGYP). Os meios complexos, Cará-de-espinho *in natura* (CEINYE) e Cará-de-espinho desidratado (CEDYE) foram formulados com a biomassa de Cará-de-Espinho (*Dioscorea altíssima*) e preparados de acordo com a metodologia descrita por Tudses (2016). Nos meios de cultura o pH foi aferido para 6,0 e esterilizados a 121 °C por 15 minutos.

### 2.3.1 Determinação do crescimento micelial radial de *P. ostreatoroseus*

Para avaliar o desenvolvimento micelial das espécies de *P. ostreatoroseus*, em cada meio de cultivo (item 2.3), foi inoculado disco micelial de 8 mm de diâmetro. Os cultivos foram mantidos a 25 °C por oito dias e a taxa de crescimento radial avaliada a cada 24 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos em milímetros por dia. (CASTILLO et al., 2018). A velocidade de crescimento radial (VCR) foi avaliada de acordo com a Equação 1. A densidade da massa micelial foi classificada em: (1+) Muito escassa; (2+) Escassa; (3+) Moderada; (4+) Abundante; (5+) Muito abundante (MUTHU; SHANMUGASUNDARAM, 2015).

$$\text{Equação 1. VCR} = \frac{\text{diâmetro da colônia (mm)}}{\text{tempo de cultivo (dia)}}$$

## 2.4. ENSAIO ENZIMÁTICO

### 2.4.1 Avaliação da atividade de amilase, celulase e protease por *P. ostreatoroseus* em meio sólido

Na avaliação da síntese de enzimas hidrolíticas foi utilizado a técnica do bloco de gelose. Fragmentos miceliais (8 mm de diâmetro) foram retirados das culturas de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720 (item 2.3.1) e semeadas, em triplica, na superfície de ágar carboximetilcelulose, ágar leite e ágar Amido. Após semeadura as placas foram mantidas a 37 °C por 18 horas (CHEN et al., 2003; KASANA et al., 2008). Para evidenciar a atividade de celulases foram utilizadas soluções de vermelho do Congo (0,1%, p/v) e NaCl 1M, respectivamente. Na determinação da atividade amilolítica foi usado vapor de

iodo. Para avaliação da presença de proteases não foi necessário o uso de solução reveladora revelador, foi observado a formação de halo translúcido ao redor da colônia. Os halos de degradação foram medidos e os resultados expressos em milímetros (PALHETA et al., 2011).

## 2.4.2 Fermentação Submersa

### 2.4.2.1 Produção de proteases em meio líquido: influência do meio de cultivo e do tempo de fermentação

A cultura inóculo de *P. ostreatoroseus* foi preparada nos meios de cultura com base no forte vigor micelial e na produção significativa de proteases pelo método do bloco de gelose. De cada cultura foram retirados 10 discos miceliais para inoculação em frascos Erlenmeyer contendo 50 mL de meio líquido formulado com os mesmos constituintes do meio sólido. Para investigar a influência do tempo de fermentação na produção de enzimas proteolíticas, *P. ostreatoroseus* foi cultivado durante dois, quatro, seis e oito dias, em agitador orbital a 150 rpm, a 25 °C. Em seguida, a biomassa foi recuperada por filtração a vácuo em papel de filtro Whatman n° 1, em membranas de éster de celulose (0,45 µm) e polietersulfônica (0,22 µm), respectivamente. No extrato bruto obtido foi determinada a atividade proteolítica quantitativa (MARTIM et al., 2017).

## 2.5 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DA ATIVIDADE DE PROTEASES

A atividade proteolítica foi determinada conforme metodologia descrita por Machado et al. (2017), utilizando solução de azocaseína 1% (p/v) como substrato. Uma unidade de atividade de proteases foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir uma variação de absorvância igual a 0,01 em 60 minutos. O extrato com atividade significativa foi submetido à caracterização bioquímica.

## 2.6 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS PROTEASES

Nos ensaios de caracterização das proteases sintetizadas por *P. ostreatoroseus* foram utilizadas as metodologias descritas por Martim et al. (2017). Para ensaio do pH ótimo, a atividade proteolítica foi determinada a 25 °C utilizando as seguintes soluções-tampão 0,1 M: acetato de sódio (pH 5 e 6), Tris-HCl (pH 7 e 8) e glicina-NaOH (pH 9 e 10). A temperatura ótima foi determinada pela incubação do extrato bruto em temperaturas de 30 °C a 80 °C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

## 2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos nesse ensaio foram analisados em ANOVA com teste de Tukey a 5 % de significância utilizando o programa Minitab 18.0 (MINITAB, 2017).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados referentes ao crescimento micelial radial de *P. ostreatoroseus* estão demonstrados na tabela 1. A velocidade do crescimento significativo foi observada em BDAYE (17,80 mm/dia), SABYE (17,24 mm/dia), CEINYE (17,16 mm/dia), GYP (17,04 mm/dia), MGYP (16,96 mm/dia). Entre os meios de cultura, em BDAYE foi observada colonização total do meio em cinco dias. Nos demais meios, o desenvolvimento do micélio em toda a superfície dos meios de cultura foi registrado em oito dias. Sastre-Ahuatzi et al. (2007) determinaram crescimento de 7,8 mm/dia por *P. ostreatus* ao utilizar amido como substrato.

O desenvolvimento e as características morfológicas da massa micelial obtida em BDAYE podem influenciar de forma positiva nas etapas subsequentes de produção de *P. ostreatoroseus*. Guadarrama-Mendoza et al. (2014) e Hoa e Wang (2015) afirmaram que o desenvolvimento micelial em meios de cultura é uns dos principais parâmetros de escolha para o cultivo de cogumelos. Marino et al. (2008) relataram que a rápida colonização e formação de micélio vigoroso são parâmetros que indicam a eficácia do substrato a ser colonizado, diminui perdas por contaminação, além de reduzir o período de incubação e frutificação do cogumelo. Não existe um critério unificado para citar as características do crescimento de cogumelos em meio de cultura sólido (GUADARRAMA-MENDOZA et al., 2014).

Tabela 1 – Média da velocidade do crescimento micelial radial de *P. ostreatoroseus* cultivado, a 25 °C por oito dias, em meios de cultura suplementados com extrato de levedura (YE) 0,5% (p/v).

Meios de Cultura	Velocidade de crescimento micelial radial (mm/dia)	Micélio		
		Textura	Densidade	Crescimento (dias)
BDAYE	17,80 ± 0,28 <sup>a</sup>	Cotonosa	Alta	5
SABYE	17,24 ± 0,55 <sup>a</sup>	Cotonosa	Alta	5
CEINYE	17,16 ± 0,43 <sup>a</sup>	Cotonosa	Alta	8
GYP	17,04 ± 0,60 <sup>a</sup>	Lanoso	Regular	8
MGYP	16,96 ± 0,57 <sup>a</sup>	Lanoso	Regular	8
CEDYE	15,16 ± 1,85 <sup>b</sup>	Lanoso	Baixa	8

BDAYE (Ágar batata dextrose); SABYE (Ágar Sabouraud); CEINYE (Cará-de-espinho *in natura*); GYP (Glicose+Peptona); MGYP (Ágar Extrato de Malte+Glicose+Peptona); CEDYE (Cará-de-espinho desidratado). Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente pelo método de Tukey ( $p > 0,05$ ).  
Fonte: Autores

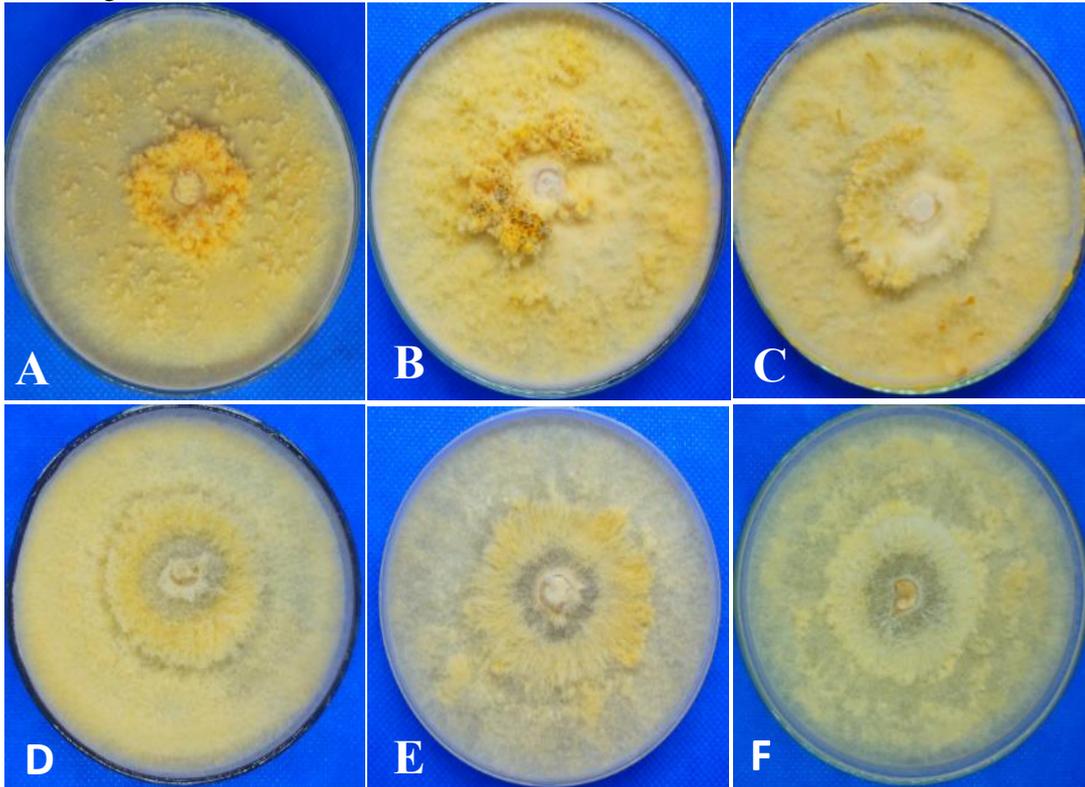
Shim et al. (2005) citaram que a avaliação do diâmetro da colônia em um determinado período constitui um fator de seleção de meios de cultura para fungos filamentosos. O crescimento micelial varia de acordo com a espécie e com as características nutricionais dos meios de cultivo, dados observados na investigação realizada com *Lentinus* sp. e *Pleurotus* sp. (CHANG; MILES, 2004; KLOMKLUNG et al., 2014).

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que BDAYE foi o meio promissor para o desenvolvimento rápido da massa micelial de *P. ostreatoroseus*. Na sua ausência, tanto SABYE quanto CEINYE constituem meios opcionais para o crescimento desse cogumelo (Tabela 1). O uso de *D. altissima* na formulação de CEINYE é uma alternativa inovadora que, além de valorizar esse tubérculo nativo da Amazônia, incentiva o desenvolvimento sustentável da agricultura familiar regional.

A classificação quanto à textura e à densidade micelial de *P. ostreatoroseus* estão demonstrados na tabela 1. Nos meios BDAYE, SABYE, CEINYE foi verificado micélio de textura cotonosa com densidade variando de alta a média. Em GYP, MGYE e CEDYE o cogumelo apresentou textura lanosa e densidade regular e baixa (Figura 1). Souza (2014) e Martins (2016) observaram predomínio de textura cotonosa e lanosa, respectivamente, ao realizar a caracterização macromorfológica de fungos filamentosos. Quanto à densidade micelial, Guadarrama-Mendoza et al. (2014) atribuíram classificação subjetiva variando de alta, média, regular e baixa para *Pleurotus* sp.

A diversidade da densidade micelial demonstrada por *P. ostreatoroseus* nos meios de cultura avaliados está relacionada tanto com a qualidade nutricional e a outros fatores como pH, temperatura, luminosidade, umidade e oxigenação que influenciam no desenvolvimento e no vigor micelial Benlounissi et al. (2012) e Fonseca et al. (2015) também admitiram que fontes nutricionais e fatores ambientais tem ação no crescimento micelial de cogumelos comestíveis.

Figura 1 - Densidade micelial de *P. ostreatoroseus* em diferentes meios de cultivo

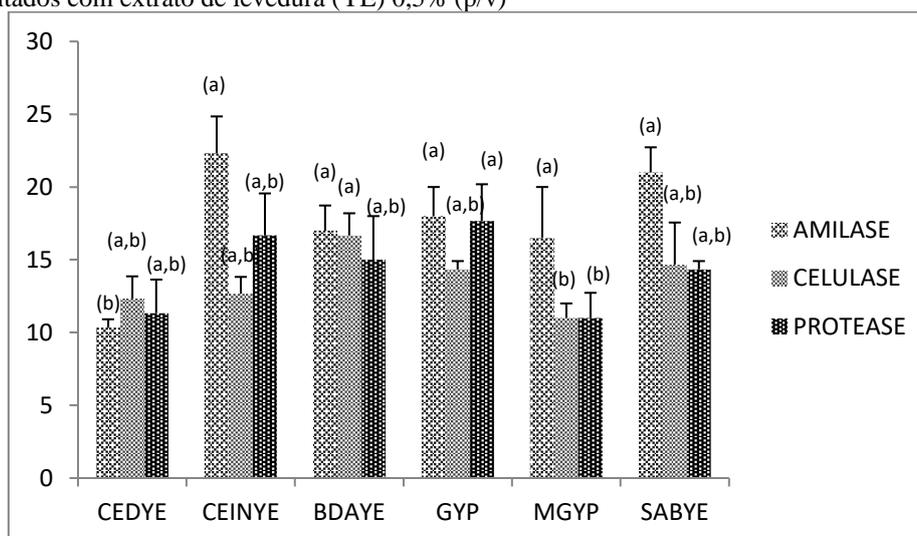


A= BDAYE (ágar batata+extrato de levedura 0,5%, p/v); B= SABYE (Ágar Sabouraud); C= CEINYE (Ágar Cará-de-espinho *in natura*); D= GYP (Ágar Glicose + Peptona); E= MGYP (Ágar Extrato de Malte + Glicose + Peptona); F= CEDYE (Ágar Cará-de-espinho desidratado).

Fonte: (Autores)

A figura 2 demonstra o potencial biotecnológico de *P. ostreatoroseus* como fonte de hidrolases, amilases, células e proteases. Nas condições experimentais avaliadas, *P. ostreatoroseus* sintetizou enzimas hidrolíticas em todos os meios de cultura avaliados. Valores significativos das atividades de amilase, celulase e protease, foram observados em 83,33% dos meios utilizados. Os halos superiores de degradação enzimática para amilase (22,33 mm), celulase (16,67 mm) e protease (17,67 mm) foram observados em CEINYE, BDAYE e GYP, respectivamente. Souza et al. (2008) verificaram halos de hidrólise para amilase (17,5 mm), celulase (21,4 mm), e protease (10,9 mm) quando *Trametes* sp. 11E4 foi cultivado em BDA. As investigações de Hadda et al. (2015) e Rajoriya e Gupta (2016) utilizando *Ganoderma* sp. e *Russula brevipes*, respectivamente, também constataram que essas espécies são fontes de amilase, celulase e protease.

Figura 2 – Atividade de amilase, celulase e protease de *P. ostreatoroseus* em meios de cultivo suplementados com extrato de levedura (YE) 0,5% (p/v)



CEDYE (Cará-de-espinho desidratado); CEINYE (Cará-de-espinho *in natura*); BDAYE (Ágar batata dextrose); GYP (Glicose+Peptona); MGYP (Ágar Extrato de Malte+Glicose +Peptona); SABYE (Ágar Sabouraud).

Fonte: (Autores)

Proteases são enzimas de maior importância comercial, são catalisadores que tem extensa aplicação industrial (RAZZAQ et al., 2019). A tabela 3 apresenta os resultados da produção de proteases por *P. ostreatoroseus* nos meios CEINYE e BDAYE líquido. Nas condições de análise, valores significativos de atividade proteolítica foram determinados em extrato de Cará-de-espinho *in natura* [CEINYE (25,87 U/mL)] e BDAYE (22,00 U/mL). Estes dados mostram a eficácia do meio CEINYE formulado com o extrato da biomassa de *Dioscorea altissima* Lamarck, cujo tubérculo tem produção equivalente a 100 Kg/planta, mas ainda não tem cadeia produtiva estabelecida na Amazônia (TEIXEIRA et al., 2016). A destinação para cultivo de fungos pode estimular a exploração dessa matéria prima e contribuir para geração de novo produto para uso como fonte de carbono e outros nutrientes.

Quando avaliado o tempo de fermentação, a atividade das proteases significativa foi determinada no quarto dia de cultivo. Ainda foi observado que, com aumento do tempo de cultivo houve decréscimo de atividade enzimática, tanto em CEINYE como em BDAYE (Tabela 3). Barbosa et al. (2020) e Fonseca et al. (2014) determinaram atividade proteolítica de 26,53 U/mL e 7,89 U/mL quando *P. ostreatoroseus* foi cultivado em resíduo do processamento de açaí e cupuaçu, respectivamente. Martim et al. (2017) relataram valor de 34 U/mL na caracterização da atividade proteásica de *P. albidus* em GYP.

O uso substrato regionais em bioprocessos, a exemplo de biomassa *in natura* ou desidratada ou na forma de resíduo lignocelulósico resolve problemas ambientais, estimula a cadeia produtiva e em consequência viabiliza o desenvolvimento econômico e contribui para geração de atividades sustentáveis (TEIXEIRA et al., 2016; SIQUEIRA et al., 2017).

Tabela 3 – Atividade de protease por fermentação submersa Influência do tempo de fermentação e do meio de cultivo na atividade proteolítica de *P. ostreatoroseus*.

Tempo de fermentação (dias)	Atividade proteolítica (U/mL)	
	BDAYE	CEINYE
2	8,66 <sup>c</sup> ± 1,1	16,89 <sup>b</sup> ± 1,9
4	22,00 <sup>a</sup> ± 1,7	25,87 <sup>a</sup> ± 1,6
6	14,66 <sup>b</sup> ± 1,1	17,33 <sup>b</sup> ± 1,8
8	11,55 <sup>b,c</sup> ± 1,0	12,66 <sup>b</sup> ± 0,6

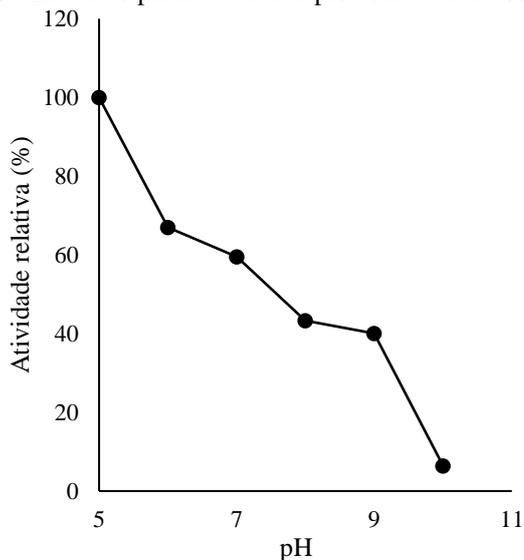
BDAYE = ágar batata dextrose + extrato de levedura (YE) 0,5 % (p/v); CEINYE = ágar cará-de-espinho *in natura* + extrato de levedura (YE) 0,5% (p/v). Letras iguais na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: (Autores)

A atividade proteolítica em CEINYE foi 15% superior quando comparada com BDAYE. Estes resultados demonstram que *D. altíssima* é uma matéria prima promissora para formulação de meios de cultivo naturais, com aplicação na produção de proteases por *P. ostreatoroseus*. Com base nestes resultados, o extrato bruto obtido do cultivo de *P. ostreatoroseus* em CEINYE foi utilizado nos estudos de caracterização bioquímica.

O efeito do pH na atividade de proteases de *P. ostreatoroseus* em extrato de CEINYE está demonstrado na figura 3. Atividade ótima foi observada em pH 5,0, com decréscimo de ação catalítica em pH superiores. Resultado similar foi descrito por Martim et al. (2017) e Barbosa et al. (2020) para as proteases de *P. albidus* e *P. ostreatoroseus*, respectivamente. Entretanto, Machado et al. (2017) verificaram que as proteases de *P. ostreatoroseus* cultivado em *D. alata* apresentaram atividade significativa em pH 7,0.

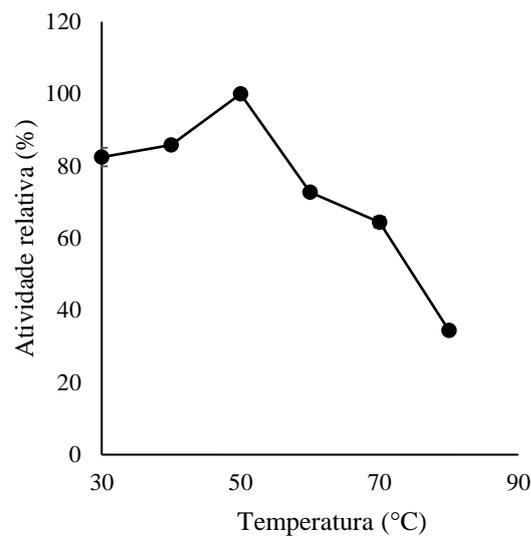
Figura 3 - Efeito do pH na atividade proteolítica de *P. ostreatoroseus*



Fonte: Autores

O efeito da temperatura na atividade de proteases de *P. ostreatoroseus* em CEINYE está demonstrado na figura 4. As proteases demonstraram atividade em todas as condições avaliadas, mas ação catalítica significativa foi determinada em 50 °C. O aumento da temperatura causou a redução da ação proteolítica em 27,26%, 35,36% e 65,56% em 60 °C, 70°C e 80 °C, respectivamente. Machado et al. (2017) e Barbosa et al. (2020) relataram que *P. ostreatoroseus* sintetiza proteases com atividade significativa em 40 °C, quando cultivado em *D. alata* e em semente de açaí, respectivamente. Martim et al. (2017) e Pimenta et al., (2021) verificaram que as enzimas proteolíticas de *P. albidus* demonstraram ação catalítica significativa a 60 °C, em meio líquido constituído por meio líquido glicose, extrato de levedura e peptona e em fermentação em resíduos lignocelulósicos, respectivamente.

Figura 4 – Efeito da temperatura na atividade proteolítica de *P. ostreatoroseus*



Fonte: Autores

Os resultados obtidos no presente estudo indicam o predomínio de proteases ácidas com atividade na faixa de 30°C a 50 °C no extrato bruto de *P. ostreatoroseus*. Estas enzimas proteolíticas são amplamente aplicadas no setor alimentício, na produção de queijo, em clarificação de cerveja e suco de frutas, amaciamento de carne, melhoria da textura de massas, além da elaboração de molho de soja, de temperos e hidrolisados proteicos (RAZZAQ et al., 2019; PIRES et al., 2019).

Biocatalisadores têm vantagens sobre outros métodos, são considerados seguros e eco amigáveis. Assim, as proteases microbianas têm vantagens sobre as de origem vegetal ou animal, considerando que têm custo de produção economicamente de valor reduzido, diversidade bioquímica e, são geneticamente manipuláveis (MAJUMDER et al., 2015).

#### 4 CONCLUSÃO

*Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720 cresce e sintetiza enzimas tanto em meios de cultura tradicionais com em meios naturais formulados com *Dioscorea altissima*, tubérculo nativo da Amazônia. O meio BDAYE promove o desenvolvimento vigoroso da massa micelial de *P. ostreatoroseus* DPUA 1720, assim como, SABYE e CEINYE. Os meios avaliados constituem substratos eficientes para síntese de amilases, celulases e protease, com exceção de CEDYE e MGYE. Em meio líquido CEINYE há produção significativa de proteases ácidas com temperatura ótima a 50 °C. Os resultados evidenciam a expressiva eficiência de BDAYE, SABYE e CEINYE no crescimento e densidade micelial de *P. ostreatoroseus*. Desse modo, o meio formulado com extrato de

biomassa de *Dioscorea* altíssima pode substituir BDA tanto para crescimento micelial quanto para produção de amilases, celulasas e proteases.

### **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal do Amazonas-UFAM e, especialmente ao Laboratório de Microbiologia Industrial e Médica e a Coleção de Culturas DPUA/UFAM, por disponibilizar todos os materiais e equipamentos necessários ao desenvolvimento da pesquisa.

## REFERÊNCIA

ARAÚJO, N. L. et al. Produção de biomassa micelial e enzimas lignocelulolíticas de *Pleurotus* spp. em meio de cultivo líquido. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, 2021.

BANNERJEE, G.; RAY, A. K. Impact of microbial proteases on biotechnological industries, **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 33, n. 2, p. 119-143, 2017.

BARBOSA, E. E. P. et al. Cultivo de cogumelo comestível em resíduos lignocelulósicos de floresta tropical para produção de proteases. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 11, p.92475-92485, nov. 2020.

BEHERA, S.; GUPTA, N. Utilization of vegetable waste for biomass production of some wild edible mushroom cultures. **An International Journal Tropical Plant Research**, v.2, n.1, p. 05–09. 2015.

BENLOUNISSI, A. et al. Milk-clotting fungus enzymes production: A sustainable development approach based on whey recycling. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n.8, p.1997-2005, 2012.

BONONI, V. L. R. et al. Produção de cogumelos e biotecnologia. *In*: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE COGUMELOS NO BRASIL. 8., 2015. Sorocaba/São Paulo. **Anais [...]**. Sorocaba/SP: SICG, 2015. p. 96-109.

CASTILLO, T.A. et al. Mycelial Growth and Antimicrobial Activity of *Pleurotus* Species (Agaricomycetes). **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 20, n. 2, p. 191-200, 2018.

CHANG, S; MILES, G.P. **Cogumelos: cultivo, valor nutricional, efeitos medicinais e impacto ambiental**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2004.

CHEN, L.S. et al. Produção de enzimas proteolíticas neutras por fermentação fúngica em meio semissólido. *In*: SIMPOSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 14., 2003, Florianópolis. **Anais [...]**. 2003.

ENZYMES Market Size, Share & Trends Analysis Report by Application (Industrial Enzymes, Specialty Enzymes), By Product (Carbohydrase, Proteases, Lipases), By Source, By Region, And Segment Forecasts, 2020 – 2027. **GRAND VIEW RESEARCH**, mar 2020. Disponível em: Enzymes Market Size & Share Industry Report, 2020-2027 (grandviewresearch.com)

ERGUN, S.O.; UREK, R.O. Production of ligninolytic enzymes by solid state fermentation using *Pleurotus ostreatus*. **Annals of Agrarian Science**, v.15, p. 273-277, 2017.

FONSECA, T. R.B. et al. Produção em matriz sólida e caracterização parcial das proteases de cogumelo comestível da floresta amazônica. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v.8, n.1, p. 1227-1236, 2014.

FONSECA, T. R. B. et al. Cultivation and nutritional studies of edible mushroom from North Brazil. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 30, p.1814-1822, 2015.

GRABARCZYK, M. et al. Mushrooms of the *Pleurotus* genus – properties and application. **Biotechnology and Food Science**, v. 83, n. 1, p.13-30, 2019.

GRIMM, D.; WÖSTEN, H. A. B. Mushroom cultivation in the circular economy. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 18, p.7795–7803, 2018.

GUADARRAMA-MENDOZA, P.C. et al. Morphology and mycelial growth rate of *Pleurotus* spp. strains from the Mexican mixtec region. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 861-872, set. 2014.

HADDA, M. et al. Screening of extracellular enzyme activities of *Ganoderma* and *Fomes* species collected from north east Algeria. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v.6, n.4, 2015.

HOA, H.T.; WANG, C.L. Effects of temperature and nutritional conditions on mycelium growth of two oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*). **Mycobiology**, v. 43, p.14-23. 2015.

KASANA, R.C. et al. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. **Current microbiology**, v.57, p.503 – 507. 2008.

KLOMKLUNG, N. et al. Optimal conditions of mycelial growth of three wild edible mushrooms from northern Thailand. **Acta Biologica Szegediensis**, v.58, n.1, p.39-43, 2014.

LAVELLI, V. et al. Circular reuse of bio-resources: the role of *Pleurotus* spp. in the development of functional foods. **Food Function**, v.3, 2018.

MACHADO, A. R. G. et al. Produção e caracterização de proteases decogumelos comestíveis cultivados em tubérculos amazônicos. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 46, p. 2160-2166, 15 nov. 2017.

MAJUMDER, R., S.; BANIK, S. P.; KHOWALA, S. Purification and characterization of  $\kappa$ -casein specific milk-clotting metalloprotease from *Termitomyces clypeatus* MTCC 5091. **Food Chemistry**, v. 173, p. 441-448.

MARINO, R. H. et al. Crescimento e cultivo de diferentes isolados de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer em serragem da casca de coco. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 75, n. 1, p. 29-36, 2008.

MARTIM, S. R. et al. Proteases ácidas de cogumelo comestível da Amazônia para aplicabilidade industrial. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais**, Belém, v. 12, n. 3, p. 353-362, set.- dez. 2017.

MARTINS, O. A. **Fungos anemófilos e leveduras isolados em ambientes de laboratórios de microbiologia em Instituição de Ensino Superior**. Dissertação (Mestre em Ciências) Programa de Pós Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da

Universidade Federal de Pelotas: área de concentração: Sanidade Animal. Pelotas, Rio Grande do Sul, 2016.

MENOLLI JUNIOR, N. et al. Morphological and Molecular Identification of four Brazilian Commercial Isolates of *Pleurotus* spp. and Cultivation on Corn cob. **Brazilian Archives of Biology e Technology**, v.53 n.2: pp. 397-408, Mar/Apr 2010

MINITAB (2018). Minitab statistical software. LEAD Technologies, Inc. Version 18.0, 2017

MUTHU, N.; SHANMUGASUNDARAM, K. Effect of five different culture media on mycelial growth of *Agrocybe aegerita*. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 6, n.12, p. 5193-97, 2015.

OMARINI, A. et al. Sensory analysis and fruiting bodies characterisation of the edible mushrooms *Pleurotus ostreatus* and *Polyporus tenuiculus* obtained on leaf waste from the essential oil production industry. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 466–474, 2010.

PALHETA, R.A. et al. Enzimas e aplicações biotecnológicas. In: TEXEIRA, M.F.S.(Org.). **Fungos da Amazônia: uma riqueza inexplorada**. Manaus: EDUA/UFAM, 2011.

PIMENTA, L. et al. Processo eco-amigável para selecionar substrato Lignocelulósico para produção de peptidases ácidas. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.1, p.3469-3479, jan. 2021.

PIRES, C.B.A. et al. Proteases produzidas por microorganismos na região amazônica. **Scientia Amazonia**, v. 8, n.1, B15-B33, 2019. Revista on-line <http://www.scientiaamazonia.org>

RAJORIYA, A.; GUPTA, N. Useful Extracellular Enzymatic Activity of Mycelial Culture of Some Edible Mushrooms of Odisha. **Agricultural Research & Tecnology (Open Access Journal)**, v.3, n.1, 2016.

RAZZAQ, A. et al. **Microbial Proteases Applications**, v.7, jun. 2019.

RITOTA, M.; MANZI, P. *Pleurotus* spp. Cultivation on Different Agri-Food By-Products: Example of Biotechnological Application. **Sustainability**, v. 11, 2019.

SASTRE-AHUATZI, M. et al. Crescimento micelial de cepas de *Pleurotus ostreatus* em ágar e sua correlação com produtividade em cultivo em escala piloto. **Brazilian Journal of Microbiol. [online]**. 2007, v. 38, n. 3, p. 568-572. ISSN 1517-8382.

SHIM, S. M. et al. The Characteristics of Cultural Conditions for the Mycelial Growth of *Macrolepiota procera*, **Mycobiology**, v. 33 n.1, 15-18, 2005.

SINGH, R. et al. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v.6, n. 17, 2016.

SOUZA, H. Q. et al. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, pg. 116-124, Campinas, SP, 2008.

SOUZA, J. R. S. **Diversidade fúngica associada a abelhas sem ferrão (*Melipona spp.*) em meliponários na cidade de Manaus e Iranduba, Amazonas, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Diversidade Biológica) Programa de Pós Graduação em Diversidade Biológica da Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Manaus, UFAM, 2014

SOUZA, R. A. T. et al. Nutritional composition of bioproducts generated from semi-solid fermentation of pineapple peel by edible mushrooms. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 12, p. 451–457, 2016.

SIQUEIRA, F. G.; ROMERO PELAEZ, R. D.; GONÇALVES, C. C.; CONCEIÇÃO, A. A.; MARQUEZ, A. F.; MENDONCA, S. Bioeconomia: resíduos lignocelulósicos agroindustriais pré-tratados por basidiomicetos para nutrição animal. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE COGUMELOS NO BRASIL, 9.; SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE COGUMELOS COMESTÍVEIS, 8.; I ENCONTRO DE BIOTECNOLOGIA DA UNIFESP, 1., 2017, São José dos Campos, SP. **Anais ... Brasília, DF: Embrapa, 2017, p. 91-102.**

TEIXEIRA, L. S.; MARTIM, S. R.; SILVA, L. S. C.; KINUPP, V. F.; TEIXEIRA, M. F. S.; PORTO, A. L. F. Efficiency of Amazonian tubers flours in modulating gut microbiota of male rats. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 38, p. 1-6, 2016.

TUDESSES, N. Isolation and Mycelial Growth of Mushrooms on Different Yam-based Culture Media. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v.4, n.5, p. 033-036, Sep-Oct, 2016.