

Produção e caracterização de enzimas proteolíticas de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693 do bioma amazônico (Polyporaceae)

Production and characterization of proteolytic enzymes of *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693 from the Amazonian biome (Polyporaceae)

Alessandra Alves da Silva Magalhães¹  | Taciana de Amorim Silva¹  |
Maria Francisca Simas Teixeira¹  | Raimundo Felipe Cruz Filho¹  |
Suelen Dias da Silva¹  | Dib Mady Diniz Gomes¹  | José Odair Pereira¹ 

¹Universidade Federal do Amazonas. Manaus, Amazonas, Brasil

Resumo: Proteases são enzimas hidrolíticas capazes de degradar proteínas em pequenos peptídeos e aminoácidos, e podem ser isoladas de plantas, animais e microrganismos. A busca por proteases de origem microbiana vem aumentando no mercado mundial devido à sua estabilidade, à alta taxa de produção e ao menor custo que apresenta. O objetivo deste artigo foi investigar a produção de proteases por *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693, utilizando-se a fermentação submersa. A cultura matriz foi preparada em meio BDA (ágar batata dextrose), adicionando-se extrato de levedura 0,5% (p/v). A fermentação foi conduzida a 30 °C, 150 rpm, por oito dias, utilizando-se meios contendo diferentes fontes de carbono e nitrogênio na síntese de proteases. Na determinação da atividade enzimática, foi adotada azocaseína 1% (p/v) como substrato. Os resultados mostraram que a maior atividade das proteases de *L. crinitus* foi determinada no meio contendo glicose e gelatina. A atividade ótima dessas enzimas foi determinada em pH 5,0, a 50 °C, e a estabilidade, em pH 5,0, à temperatura de 60 °C. As proteases foram classificadas como metalo, serino e cisteíno proteases. Este artigo sugere o uso potencial de protease de *Lentinus crinitus* para aplicação na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética.

Palavras-chave: Cogumelo. Fermentação submersa. Biocatalisador. Protease.

Abstract: Proteases are hydrolytic enzymes capable of degrading proteins in small peptides and amino acids and can be isolated from plants, animals, and microorganisms. The objective of this work was to investigate the production of proteases by *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693, using fermentation in liquid medium. The matrix culture was prepared in BDA (potato dextrose agar) medium, added with 0.5% (w/v) yeast extract. The fermentation was conducted at 30 °C, 150 rpm for eight days, using media containing different carbon and nitrogen sources in protease synthesis. In the determination of the enzymatic activity 1% azocasein (w/v) was used as the substrate. The results showed that the increased activity of *L. crinitus* proteases was in the medium containing glucose and gelatin. The optimal activity of these enzymes was determined at pH 5.0 at 50 °C and stability at pH 5.0 at 60 °C. Proteases were classified as metallo, serine, and cysteine proteases. This study suggests the potential use of *Lentinus crinitus* proteases for application in the food, pharmaceutical, and cosmetics industries.

Keywords: Mushroom. Submerged fermentation. Biocatalyst. Protease.

MAGALHÃES, A. A. S., T. A. SILVA, M. F. S. TEIXEIRA, R. F. CRUZ FILHO, S. D. SILVA, D. M. D. GOMES & J. O. PEREIRA, 2019. Produção e caracterização de enzimas proteolíticas de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693 do bioma amazônico (Polyporaceae). **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais** 14(3): 453-461.

Autora para correspondência: Alessandra Alves da Silva Magalhães. Universidade Federal do Amazonas. Programa de Pós-Graduação da Rede de Biodiversidade da Amazônia Legal (BIONORTE). Av. General Rodrigo Otávio Jordão Ramos, 6200 – Coroado I. Manaus, AM, Brasil. CEP 69080-900 (alealvesmaga@yahoo.com.br).

Recebido em 01/03/2019

Aprovado em 21/06/2019

Responsabilidade editorial: Fernando da Silva Carvalho Filho



INTRODUÇÃO

Enzimas são catalisadores biológicos, em sua maioria de origem proteica, responsáveis por realizar catalisação de reações em organismos vivos (Sayali *et al.*, 2013). Esses catalisadores são muito valorizados nas indústrias, pois são biodegradáveis, sendo derivados de fontes renováveis e apresentando reduzido impacto ambiental, devido à baixa quantidade de resíduos, características que despertam o interesse na busca por novas e mais eficientes fontes enzimáticas (Sheldon & van Pelt, 2013).

As enzimas são biocatalisadores muito empregados em processos industriais e biotecnológicos, com grande relevância econômica no mercado mundial (Chapman *et al.*, 2018). Recentemente, um relatório publicado pela BBC Research (2019) afirmou que a produção mundial de enzimas industriais alcançou um valor de US\$ 5,5 bilhões, em 2018, e a expectativa é de que este mercado atinja 7,0 bilhões de dólares até 2023.

Entre as enzimas, as proteases destacam-se por apresentar grande versatilidade de aplicações, sendo usadas em indústrias como as de produtos farmacêuticos (Kumar *et al.*, 2015), alimentícios (Raveendran *et al.*, 2018), de limpeza (Giri *et al.*, 2011), no processo de amaciamento de couro (Singh & Bajaj, 2017) e de biorremediação (Khan, 2013; Peralta *et al.*, 2017). As proteases representam um dos maiores grupos de enzimas industriais, com perspectiva de aumento em torno de 7% até 2020, e constituem 60% do mercado industrial global devido às suas propriedades biotecnológicas (Chandrasekaran *et al.*, 2015; Bano *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2016).

Proteases são fisiologicamente importantes para a vida dos organismos, estando amplamente distribuídas na natureza, entretanto o seu processo de produção a partir de plantas e animais é mais oneroso e envolve políticas públicas e agrícolas que dificultam sua obtenção em larga escala, condição que promoveu interesse nestas enzimas de origem microbiana (Rao *et al.*, 1998; Félix *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2005).

A obtenção de proteases por microrganismos é possível graças à sua diversidade genética e bioquímica e por apresentarem fácil manipulação, o que viabiliza seu cultivo em grande escala (Rao *et al.*, 1998; Kumar *et al.*, 2005). Além disso, o processo de purificação e recuperação das proteases de origem microbiana é facilitado devido a esses microrganismos lançarem suas enzimas extracelulares diretamente no meio de fermentação (Savitha *et al.*, 2011).

Entre os microrganismos, os fungos destacam-se como fonte potencial de proteases, em razão de apresentarem grande capacidade de adaptação fisiológica, alta produtividade de biocompostos extracelulares, não dependência a condições ambientais e geográficas apropriadas, bem como possuírem gasto reduzido no uso de matérias-primas (Kumar *et al.*, 2005; Zimmer *et al.*, 2009; Peralta *et al.*, 2017).

Os fungos do gênero *Lentinus*, pertencentes à família Lentinaceae (filo Basidiomycota), vêm se destacando devido à disporem de compostos bioativos, principalmente enzimas com aplicação industrial (Kirsch *et al.*, 2013; Machado *et al.*, 2016, 2017). Entretanto, a espécie *Lentinus crinitus* (L.) Fr., 1825, fungo sapróbio, lamelar e decompositor de madeira, ainda não foi estudada quanto ao seu potencial de produção de enzimas proteolíticas em condições de cultivo otimizadas.

Fatores como pH, temperatura e composição do meio são primordiais para obtenção de enzimas de interesse industrial (Abidi *et al.*, 2011). A variação na relação de carbono e nitrogênio no meio de cultivo, a presença de íons de metal, a aeração, entre outros fatores físicos, são responsáveis pela otimização na produção de proteases (Joo & Chang, 2005; Magalhães *et al.*, 2017).

Considerando-se a importância da utilização de novas proteases obtidas a partir de cogumelos do bioma amazônico, o objetivo deste artigo foi avaliar o potencial de *Lentinus crinitus* na produção dessa enzima de interesse bioindustrial, conhecer a influência das fontes de carbono e nitrogênio e caracterizar as enzimas proteolíticas produzidas por este fungo.

MATERIAL E MÉTODOS

CULTIVO DO COGUMELO

A linhagem *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693 foi cedida pela Coleção de Culturas do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas (DPUA). A cultura preservada em óleo mineral foi reativada em caldo glicosado (peptona de carne 1%, extrato de levedura 0,3% e glicose 2%) em cultivo estacionário, por 15 dias. Em seguida, foi realizado subcultivo em meio ágar batata dextrose (BDA), adicionado de extrato de levedura 0,5% (p/v), utilizando-se discos miceliais de 8 mm de diâmetro como inóculo em ponto central. O cultivo foi mantido a 25 °C, na ausência de luz, por oito dias (Kirsch *et al.*, 2011).

DETERMINAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA FONTE DE CARBONO E DE NITROGÊNIO NA SÍNTESE DE PROTEASE EM CULTIVO SUBMERSO

Para determinar a influência das fontes de carbono e de nitrogênio na produção de proteases, foram utilizadas várias formulações dos meios de cultivo conforme Kirsch *et al.* (2016), com modificações (Tabelas 1 e 2). Em todos os meios de cultivo, foi adicionado extrato de levedura 0,5% (p/v) e o pH foi ajustado para 5,6.

Para produção de proteases, dez fragmentos miceliais de 8 mm de diâmetro foram inoculados em 100 mL dos meios de cultivo descritos na Tabela 1, distribuídos em frascos Erlenmeyer (250 mL). A fermentação submersa foi realizada a 30 °C, 150 rpm. Após oito dias, a biomassa foi separada por filtração sob vácuo em papel de filtro Whatman n. 1; em seguida, foram realizadas filtrações em membrana de éster de celulose, de 0,45 μm e 0,22 μm . Na determinação da atividade proteolítica, 150 μL do extrato bruto foi adicionado em 250 μL de azocaseína 1% (p/v), em solução-tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,2. A mistura reacional foi incubada a 25 °C, em câmara escura. Após uma hora, a reação foi interrompida pela adição de 1,2 mL de ácido tricloroacético

Tabela 1. Meios de cultivo utilizados para a determinação da melhor fonte de carbono e nitrogênio para a produção de proteases. Legendas: GGE = glicose, gelatina e extrato de levedura; AGE = amido, gelatina e extrato de levedura; SGE = sacarose, gelatina e extrato de levedura; GPE = glicose, peptona e extrato de levedura; APE = amido, peptona e extrato de levedura; SPE = sacarose, peptona e extrato de levedura; GSE = glicose, sulfato de amônio e extrato de levedura; ASE = amido, sulfato de amônio e extrato de levedura; SSE = sacarose, sulfato de amônio e extrato de levedura.

Meios	Fonte de carbono 2% (p/v)	Fonte de nitrogênio 0,5% (p/v)
GGE	Glicose	Gelatina
AGE	Amido	Gelatina
SGE	Sacarose	Gelatina
GPE	Glicose	Peptona
APE	Amido	Peptona
SPE	Sacarose	Peptona
GSE	Glicose	Sulfato de amônio
ASE	Amido	Sulfato de amônio
SSE	Sacarose	Sulfato de amônio

10% (p/v). Do sobrenadante, foram transferidos 800 μL para 1,4 mL de hidróxido de sódio 1 M. A atividade enzimática foi determinada de acordo com a metodologia recomendada por Porto *et al.* (1996), que definem uma unidade de atividade de protease como a quantidade de enzima necessária para produzir variação de absorbância igual a 0,001 em 60 minutos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

EFEITOS DO PH E DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

O pH ótimo foi determinado a 25 °C em diferentes valores de pH, utilizando-se as seguintes soluções-tampão a 0,1 M: acetato de sódio (para pH 5), fosfato (para 6, 7 e 8) e glicina-NaOH (9 e 10). A temperatura ótima foi determinada pela incubação do extrato bruto em diferentes temperaturas, que variaram de 30 a 80 °C. A determinação da atividade proteolítica foi realizada conforme metodologia descrita anteriormente (Merheb-Dini *et al.*, 2010).

EFEITOS DO PH E DA TEMPERATURA SOBRE A ESTABILIDADE PROTEOLÍTICA

Para conferir estabilidade ao pH, o extrato bruto foi diluído (1:1) nas seguintes soluções-tampão a 0,1 M: acetato de sódio (pH 5), fosfato (pH 6, 7 e 8) e glicina-NaOH (pH 9 e 10), mantidas a 25 °C, por 24 horas, seguindo-se da determinação da atividade proteolítica nas condições ótimas de pH e temperatura encontradas. Para a realização do teste de estabilidade à temperatura, incubou-se cada extrato enzimático durante 1 h em diferentes temperaturas (30, 40, 50, 60, 70, 80 °C), seguindo-se da determinação da atividade proteolítica em condições ótimas de pH e temperatura. A determinação da atividade proteolítica foi realizada conforme metodologia descrita anteriormente, e os resultados foram expressos em atividade relativa em todos os experimentos (Merheb-Dini *et al.*, 2010).

EFEITO DE ÍONS METÁLICOS E INIBIDORES NA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

Para investigar as possíveis aplicações das proteases de *Lentinus crinitus*, foram analisados os efeitos dos seguintes íons metálicos sobre a atividade proteolítica: CaCl₂, CuSO₄, FeSO₄, MgSO₄, MnSO₄, ZnSO₄, NaCl e KCl. Também foram analisados os efeitos dos seguintes inibidores: fluoreto de fenilmetanosulfonila (PMSF), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), ácido iodoacético e pepstatin A. A atividade proteolítica das enzimas do cogumelo foi determinada após incubação do extrato nas condições ótimas de temperatura e pH, com uma solução de cada íon/inibidores na concentração de 10 mM (com exceção da pepstatin A [1mM]). A atividade enzimática residual foi determinada e comparada com o controle que corresponde a 100% de atividade. Todas as amostras foram preparadas em triplicata (Alecrim *et al.*, 2015; Martim *et al.*, 2017).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Em todos os experimentos, os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias foram comparadas

pelo teste de Tukey (P < 0,05), por meio do programa Minitab, versão 18.1 (Minitab, 2017).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

PRODUÇÃO DE PROTEASES POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO E DE NITROGÊNIO

A Tabela 2 demonstra a influência das fontes de carbono e de nitrogênio. Em todos os meios testados, houve produção de proteases, porém a maior atividade (190 U/mL ± 1,33) foi observada no meio GGE [glicose 2% (p/v) + gelatina 0,5% (p/v) + extrato de levedura 0,5% (p/v)], enquanto a menor atividade (77,33 U/mL ± 2,31), no meio ASE [amido 2% (p/v) + sulfato de amônio 0,5% (p/v) + extrato de levedura 0,5% (p/v)].

Martim *et al.* (2017) estudaram a atividade proteolítica de cogumelos amazônicos – *Pleurotus albidus* (Berk.) Pegler 1983 DPUA 1692, *Lentinus crinitus* (L.) Fr. 1825 DPUA 1693 e *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst 1881 DPUA 1694 – e obtiveram a maior atividade enzimática com o

Tabela 2. Produção de proteases de *Lentinus crinitus* em diferentes meios de cultura. Letras iguais na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P < 0,05). Legendas: GGE = glicose, gelatina e extrato de levedura; AGE = amido, gelatina e extrato de levedura; SGE = sacarose, gelatina e extrato de levedura; GPE = glicose, peptona e extrato de levedura; APE = amido, peptona e extrato de levedura; SPE = sacarose, peptona e extrato de levedura; GSE = glicose, sulfato de amônio e extrato de levedura; ASE = amido, sulfato de amônio e extrato de levedura; SSE = sacarose, sulfato de amônio e extrato de levedura.

Meios	Atividade proteolítica (U/mL)
GGE	190,00 ^a ± 1,33
AGE	156,67 ^b ± 2,00
SGE	153,78 ^b ± 1,02
GPE	147,11 ^c ± 1,02
APE	127,78 ^d ± 1,68
SPE	127,33 ^d ± 1,33
GSE	88,00 ^e ± 1,15
ASE	88,00 ^e ± 2,00
SSE	77,33 ^f ± 2,31



fungo *Pleurotus albidus* (34,00 U/mL \pm 0,0). Eles obtiveram atividade proteolítica de *Lentinus crinitus* igual a 27,02 U/mL \pm 0,02, valor bem inferior ao obtido no presente artigo (190 U/mL \pm 1,33), demonstrando a importância do estudo do efeito de diferentes fontes de carbono e de nitrogênio na produção de enzimas de valor industrial.

Neste artigo, observou-se que a gelatina foi a melhor fonte de nitrogênio para produção de protease em *Lentinus crinitus* – meio GGE (190,00 \pm 1,33). A produção de proteases depende da disponibilidade de carbono e de fontes de nitrogênio do meio, sendo que ambos os parâmetros exercem efeitos reguladores sobre a síntese da enzima (Haddar *et al.*, 2010). A definição da fonte de nitrogênio de um bioprocessamento é um dos fatores mais importantes a ser investigado na síntese proteica. Kirsch *et al.* (2011) também relataram, por meio do cogumelo *Lentinus citrinus*, que a gelatina se destacou como a melhor fonte de nitrogênio para a produção das proteases.

Entretanto, os ensaios contendo sulfato de amônio como fonte de nitrogênio (SSE e ASE) foram os que produziram menor quantidade de protease. Fang & Zhong (2002), comparando o efeito de fontes inorgânicas de nitrogênio com fontes orgânicas sobre a produção de biomoléculas do cogumelo *Ganoderma lucidum*, verificaram maior crescimento micelial nos meios contendo nitrogênio orgânico, sugerindo que certos aminoácidos essenciais não seriam sintetizados por células de fungos superiores a partir de fontes de nitrogênio inorgânico, como o sulfato de amônio.

EFEITO DO pH E DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE *LENTINUS CRINITUS*

O efeito do pH na atividade enzimática foi avaliado na faixa de 5 a 10 (Figura 1). Em pH ácido, as proteases de *Lentinus crinitus* apresentaram o melhor desempenho, com 75% de atividade no pH 6,0 e 100% de atividade enzimática no pH 5,0. Nos pH com variação de neutro a alcalino, observou-se redução da atividade proteolítica apresentando percentagem de 36% no pH 10. Esses

dados corroboram os resultados encontrados por Martim *et al.* (2017), que avaliaram o extrato bruto do cogumelo amazônico *Pleurotus albidus*, verificando que a maior atividade proteolítica ocorreu no pH 5,0. Kirsch *et al.* (2013), analisando o cultivo submerso do cogumelo *Lentinus citrinus* ocorrente na Amazônia, verificaram que o pH 7,0 foi o mais promissor para atividade proteolítica.

Estudos enfatizam a importância do controle de fatores externos, como pH e temperatura, para assegurar a manutenção das condições ótimas de cultivo do microrganismo e da atividade biológica da enzima, uma vez que essas enzimas podem vir a sofrer desnaturação quando submetidas a determinadas condições ambientais (Bon *et al.*, 2008).

O efeito da temperatura na atividade enzimática foi avaliado entre 30 a 80 °C, com intervalo de 10 °C (Figura 2). Nestas condições, as enzimas de *L. crinitus* demonstraram atividade ótima a 50° C, seguida de decréscimo nas temperaturas mais elevadas. Em temperaturas elevadas, as enzimas sofrem desnaturação proteica, pois as ligações intramoleculares são afetadas (Ali *et al.*, 2014). Estes resultados estão de acordo com Zhang *et al.* (2010) e Guan *et al.* (2011), em que a temperatura ótima das proteases de *Hypsizygus marmoreus* (Peck) H.E. Bigelow 1976 e *Pholiota nameko* (T. Itô) S. Ito & S. Imai 1933, respectivamente, foi determinada a 50 °C.

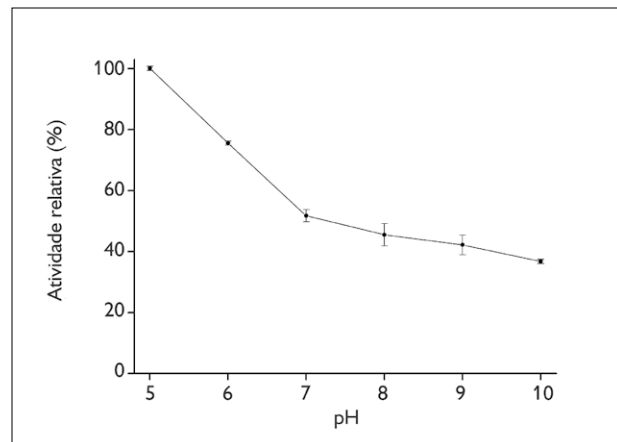


Figura 1. Efeito do pH na atividade proteolítica de *Lentinus crinitus*.

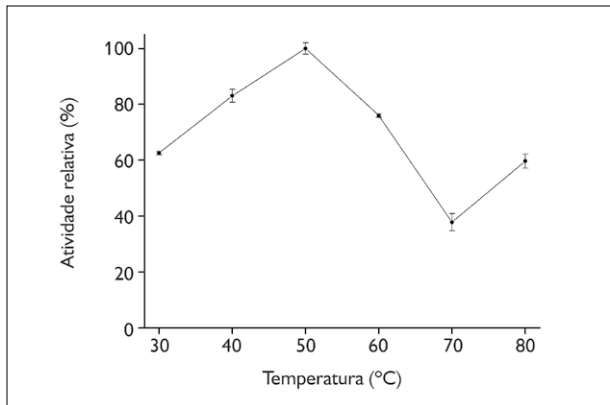


Figura 2. Efeito da temperatura na atividade proteolítica de *Lentinus crinitus*.

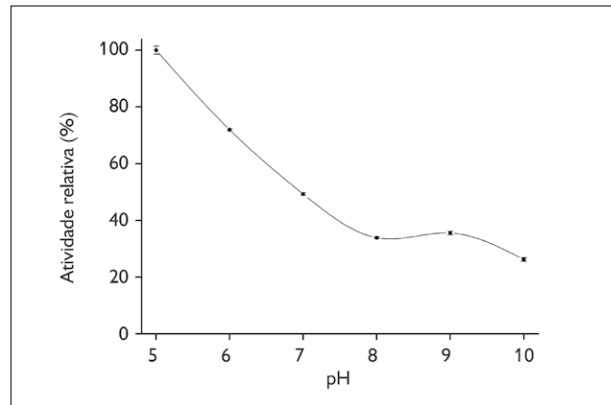


Figura 3. Efeito do pH na estabilidade da atividade proteolítica de *Lentinus crinitus*.

EFEITO DO PH E DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE E NA ESTABILIDADE PROTEOLÍTICA DE *LENTINUS CRINITUS*

As enzimas proteolíticas de *Lentinus crinitus* apresentaram boa estabilidade em pH ácido (pH 5,0 e 6,0), retendo, em média, 90,59% de atividade enzimática, enquanto que a média de retenção da atividade proteolítica foi de 32,25% em pH alcalino (pH 8,0, 9,0 e 10,0), conforme os dados da Figura 3. Martim *et al.* (2017), ao analisarem as proteases do extrato bruto do cogumelo amazônico *Pleurotus albidus*, verificaram elevada estabilidade da enzima entre pH de 5 a 8, com redução da atividade em pH 9 e 10. Entretanto, Kirsch *et al.* (2013), ao investigarem a estabilidade do extrato bruto do cogumelo *Lentinus citrinus* de ocorrência na Amazônia, observaram estabilidade em valores de pH de 5 a 7, e queda na estabilidade no pH 10.

A estabilidade da atividade proteolítica de *Lentinus crinitus* em diferentes temperaturas (30 a 80 °C) pode ser observada na Figura 4. A estabilidade térmica destas enzimas foi mantida entre 50 a 60 °C, exibindo 93,35 a 100% de atividade relativa, respectivamente. Em 80 °C foi observado decréscimo acentuado da atividade da enzima, com retenção de apenas 29,49% de atividade relativa.

Machado *et al.* (2017), avaliando a estabilidade a diferentes temperaturas do extrato bruto de *Pleurotus*

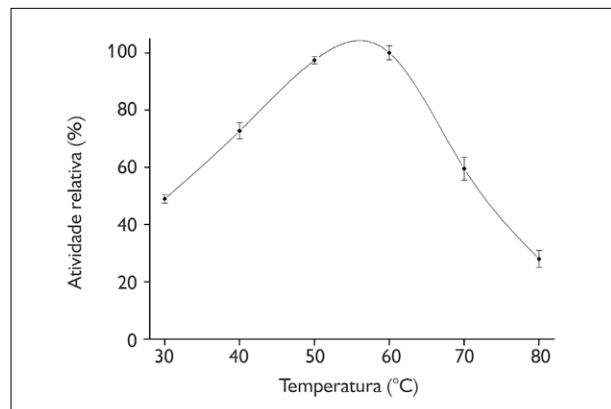


Figura 4. Efeito da temperatura na estabilidade da atividade proteolítica de *Lentinus crinitus*.

ostreatoroseus Singer 1961, verificaram que a estabilidade foi mantida entre 40 e 50 °C, e que a inativação da enzima ocorreu a 70 °C. Estudos mostram que a estabilidade ao pH e à temperatura são parâmetros importantes para aplicação industrial das enzimas, pois determinam a viabilidade econômica do processo (Gupta & Ayyachamy, 2012; Moretti *et al.*, 2012).

EFEITO DE ÍONS METÁLICOS E INIBIDORES NA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE *LENTINUS CRINITUS*

A atividade proteolítica relativa das enzimas de *Lentinus crinitus* foi reduzida significativamente na presença de EDTA

(60,51%), ácido iodo acético (62,61%) e fluoreto de fenilmetanosulfonila (PMSF) (64,86%), conforme dados da Tabela 3. Esse resultado sugere que as enzimas testadas são sensíveis aos três inibidores supracitados, indicando que o extrato bruto do fungo contém metalo proteases, cisteíno proteases e serino proteases, respectivamente. Entretanto, não houve retenção significativa da atividade enzimática na presença de pepstatin A, indicando a ausência de resíduos de ácido aspártico no sítio ativo da enzima.

Resultados semelhantes foram encontrados por Machado *et al.* (2017), os quais relatam a presença de cisteíno proteases, serino protease e metalo proteases em extratos de *Pleurotus ostreatoroseus*. Martim *et al.* (2017), analisando o efeito de inibidores na atividade proteolítica do extrato bruto do cogumelo amazônico *Pleurotus albidus*, também verificaram a presença de serino e cisteíno proteases no extrato bruto do cogumelo.

A maioria dos íons testados interagiu com o sítio ativo das enzimas reduzindo sua atividade catalítica, conforme a Tabela 3 demonstra. A menor atividade relativa da enzima foi verificada na presença de Fe^{2+} (31,08%), e os íons K^+ ,

Tabela 3. Efeito de íons metálicos na atividade proteolítica de *Lentinus crinitus*. Letras iguais na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Íon metálico ou inibidor	Atividade relativa (%)
Mn^{+2}	129,43 ^a ± 3,15
Cu^{+2}	78,60 ^b ± 3,00
Mg^{+2}	42,79 ^c ± 2,40
Zn^{+2}	38,29 ^d ± 3,33
Ca^{+2}	36,04 ^{de} ± 1,33
Na^+	33,93 ^{ef} ± 1,54
K^+	32,28 ^{ef} ± 1,02
Fe^{+2}	31,08 ^f ± 0,67
Pepstatin A	93,54 ^a ± 2,78
EDTA	39,49 ^b ± 2,04
Ácido iodoacético	36,79 ^{bc} ± 1,68
Fluoreto de fenilmetanosulfonila	34,98 ^c ± 2,34

Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} e Zn^{2+} reduziram significativamente a atividade da enzima para valores inferiores a 43% de atividade relativa. Em condições similares, Cu^{2+} exerceu pouca influência na atividade enzimática, retendo 78,60%. Entretanto, na presença de Mn^{2+} , a atividade proteolítica de *L. crinitus* foi potencializada (129,43%).

Harer *et al.* (2018) afirmam que alguns íons metálicos como Ca^{+2} , Mg^{+2} e Mn^{+2} aumentam e estabilizam a atividade enzimática. Os íons podem estar envolvidos nos processos catalíticos, participando das reações de redox ou de transferência de elétrons (Nazmi *et al.*, 2006). Esses íons metálicos protegem a enzima contra a desnaturação térmica e desempenham papel vital na manutenção da conformação ativa da enzima a temperaturas mais elevadas (Gupta *et al.*, 2002).

CONCLUSÃO

Os resultados desta pesquisa indicam que *Lentinus crinitus* produz maior quantidade de protease quando cultivado em meios contendo fontes orgânicas de nitrogênio, e que os melhores nutrientes para induzir a produção de enzimas proteolíticas por fermentação submersa, nas condições testadas, foram glicose e gelatina. As proteases de *L. crinitus* são predominantemente ácidas, termoestáveis, dos tipos metalo, serino e cisteíno proteases, com atividade ótima a 50 °C, em pH 5,0, e maior estabilidade a 60° C. Este estudo sugere o uso potencial de proteases de *L. crinitus* para aplicação em indústrias de alimentos, bebidas e produtos farmacêuticos, representando uma alternativa viável, de fonte segura e sustentável, para o polo industrial da região amazônica.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento da pesquisa; à Universidade Federal do Amazonas (UFAM), ao Programa de Pós-Graduação da Rede de Biodiversidade da Amazônia Legal (BIONORTE) e ao professor Dr. Adolfo J. Mota (UFAM), pelo apoio técnico, científico e financeiro.

REFERÊNCIAS

- ABIDI, F., J. M. CHOBERT, T. HAERTLÉ & M. N. MARZOUKI, 2011. Purification and biochemical characterization of stable alkaline protease Prot-2 from *Botrytis cinerea*. **Process Biochemistry** 46(12): 2301-2310. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.09.010>.
- ALECRIM, M. M., R. A. PALHETA, M. F. S. TEIXEIRA & I. M. D. A. OLIVEIRA, 2015. Milk-clotting enzymes produced by *Aspergillus flavo furcatis* strains on Amazonic fruit waste. **International Journal of Food Science & Technology** 50(1): 151-157. DOI: <https://doi.org/10.1111/ijfs.12677>.
- ALI, S. M., T. C. LING, S. MUNIANDY, Y. S. TAN, J. RAMAN & V. SABARATNAM, 2014. Recovery and partial purification of fibrinolytic enzymes of *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc by an aqueous two-phase system. **Separation and Purification Technology** 122(1): 359-366. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.11.016>.
- BANO, S., M. U. DAHOT & S. H. A. NAQVI, 2016. Optimization of culture conditions for the production of protease by *Pleurotus eryngii*. **Pakistan Journal of Biotechnology** 13(3): 193-198.
- BBC RESEARCH, 2019. **Global markets for enzymes in industrial applications**. Disponível em: <http://bbcresearch.com/>. Acesso em: 14 fevereiro 2019.
- BON, E. P. S., N. PEREIRA JR., L. M. F. GOTTSCHALK, P. SÁ-PEREIRA, J. C. ROSEIRO & M. A. FERRARA, 2008. Bioprocessos para produção de enzimas. In: E. P. S. BOM, M. A. FERRARA & M. L. CORVO (Ed.): **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado**: 95-122. Interciências Ltda., Rio de Janeiro.
- CHANDRASEKARAN, S., S. S. P. KUMARESAN & M. MANAVALAN, 2015. Production and optimization of protease by filamentous fungus isolated from paddy soil in Thiruvavur District Tamilnadu. **Journal of Applied Biology & Biotechnology** 3(6): 66-69. DOI: <https://doi.org/10.7324/JABB.2015.3610>.
- CHAPMAN, J., A. E. ISMAIL & C. Z. DINU, 2018. Industrial applications of enzymes: recent advances, techniques, and outlooks. **Catalysts** 8(6): 238. DOI: <https://doi.org/10.3390/catal8060238>.
- FANG, Q. H. & J. J. ZHONG, 2002. Submerged fermentation of higher fungus *Ganoderma lucidum* for production of valuable bioactive metabolites-ganoderic acid and polysaccharide. **Biochemical Engineering Journal** 10(1): 61-65. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(01\)00158-9](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(01)00158-9).
- FÉLIX, C. R., E. F. NORONHA & L. MARCO, 2004. Proteases: características e aplicações industriais. In: L. SUMMA (Ed.): **Enzimas como agentes biotecnológicos**. 327-347. Editora Legis Summa, São Paulo.
- GIRI, S. S., S. SUKUMARAN, S. S. SEN, M. OVIYA, N. BANU & P. K. JENA, 2011. Purification and partial characterization of a detergent and oxidizing agent stable alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* VSG-4 of tropical soil. **Journal of Microbiology** 49(3): 455-461. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12275-011-0427-4>.
- GUAN, G. P., G. Q. ZHANG, Y. Y. WU, H. X. WANG & T. B. NG, 2011. Purification and characterization of a novel serine protease from the mushroom *Pholiota nameko*. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 11(6): 641-645. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.02.009>.
- GUPTA, R., Q. BEG, S. KHAN & B. CHAUHAN, 2002. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. **Applied Microbiology and Biotechnology** 60(4): 381-395. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1142-1>.
- GUPTA, K. & M. AYYACHAMY, 2012. **Biotechnology of fungal genes**: 1-400. Taylor & Francis Group, CRC Press, Boca Raton.
- HADDAR, A., N. FAKHFAKH-ZOUARI, N. HMIDET, F. FRIKHA, M. NASRI & A. S. KAMOUN, 2010. Low-cost fermentation medium for alkaline protease production by *Bacillus mojavensis* A21 using hulled grain of wheat and sardinella peptone. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 110(3): 288-294. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.03.015>.
- HARER, S. L., M. S. BHATIA & N. M. BHATIA, 2018. Isolation, purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus thuringiensis*-SH-II-1A. **African Journal of Biotechnology** 17(7): 178-188. DOI: <http://dx.doi.org/10.5897/AJB2015.14831>.
- JOO, H. S. & C. S. CHANG, 2005. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. **Process Biochemistry** 40(3-4): 1263-1270. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.05.010>.
- KHAN, F., 2013. New microbial proteases in leather and detergent industries. **Innovation Research of Chemistry** 1(1): 1-6.
- KIRSCH, L. S., A. C. PINTO, T. S. PORTO, A. L. PORTO & M. F. S. TEIXEIRA, 2011. The influence of different submerged cultivation conditions on mycelial biomass and protease production by *Lentinus citrinus* Walley et Rammeloo DPUA 1535 (Agaricomycetidae). **International Journal of Medicinal Mushrooms** 13(2): 185-192. DOI: <http://dx.doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v13.i2>.
- KIRSCH, L. S., V. C. S. EBINUMA & M. F. S. TEIXEIRA, 2013. Mycelial biomass and biochemical properties of proteases produced by *Lentinus citrinus* DPUA 1535 (Higher Basidiomycetes) in submerged cultivation. **International Journal of Medicinal** 15(5): 505-515. DOI: <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushr.v15.i5.80>.
- KIRSCH, L. S., A. J. P. MACEDO & M. F. S. TEIXEIRA, 2016. Production of mycelial biomass by the Amazonian edible mushroom *Pleurotus albidus*. **Brazilian Journal of Microbiology** 47(3): 658-664. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.04.007>.
- KUMAR, S., N. S. SHARMA, M. R. SAHARAN & R. SINGH, 2005. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. **Process Biochemistry** 40(5): 1701-1705. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.06.047>.

- KUMAR, R. S., R. RAJESH, S. GOKULAKRISHNAN & J. SUBRAMANIAN, 2015. Screening and characterization of fibrinolytic protease producing *Bacillus circulans* from mangrove sediments Pitchavaram, South East Coast of India. **International Letters of Natural Sciences** 28: 10-16. DOI: <https://doi.org/10.18052/www.scrippress.com/ILNS.28.10>.
- MACHADO, A. R. G., M. F. S. TEIXEIRA, L. S. KIRSCH, M. C. L. CAMPELO & I. M. A. OLIVEIRA, 2016. Nutritional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region. **Saudi Journal of Biological Sciences** 23(5): 621-627. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.07.002>.
- MACHADO, A. R. G., S. R. MARTIM, M. M. ALECRIM & M. F. S. TEIXEIRA, 2017. Production and characterization of proteases from edible mushrooms cultivated on amazonic tubers. **African Journal of Biotechnology** 16(46): 2160-2166. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJB2017.16154>.
- MAGALHÃES, A. A. S., T. B. CARVALHO, A. Q. L. SOUZA & J. O. PEREIRA, 2017. Efeito da temperatura e do pH no crescimento micelial do fungo amazônico *Lentinus crinitus* (L.) Fr. In: L. A. OLIVEIRA, J. L. S. BENTES, M. A. JESUS, L. C. ROCHA, O. C. FERNANDES, S. L. ANDRADE & A. Q. L. SOUZA (Org.): **Diversidade microbiana da Amazônia**: 2: 200-207. INPA, Manaus.
- MARTIM, S. R., L. S. C. SILVA, M. M. ALECRIM, B. C. SOUZA, I. M. A. OLIVEIRA & M. F. S. TEIXEIRA, 2017. Proteases ácidas de cogumelo comestível da Amazônia para aplicabilidade industrial. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais** 12(3): 353-362.
- MERHEB-DINI, C., E. GOMES, M. BOSCOLO & R. SILVA, 2010. Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31: (milk-clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31). **Food Chemistry** 120(1): 87-93. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.09.075>.
- MINITAB, 2017. **Minitab statistical software**. Version 18.1. LEAD Technologies, Inc., [S.].
- MORETTI, M., D. A. BOCCHINI-MARTINS, R. D. SILVA, A. RODRIGUES, L. D. SETTE & E. GOMES, 2012. Selection of thermophilic and thermotolerant fungi for the production of cellulases and xylanases under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology** 43(3): 1062-1071. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822012000300032>.
- NAZMI, A. R., T. REINISCH & H. J. HINZ, 2006. Ca-binding to *Bacillus licheniformis* α -amylase (BLA). **Archives of Biochemistry and Biophysics** 453(1): 18-25. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2006.04.004>.
- PERALTA, R. M., B. P. SILVA, R. C. G. CÔRREA, C. G. KATO, F. A. V. SEIXAS & A. BRACHT, 2017. Enzymes from Basidiomycetes – peculiar and efficient tools for biotechnology. In: G. BRAHMACHARI (Ed.): **Biotechnology of microbial enzymes**: 119-149. Academic Press, New York. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-803725-6.00005-4>.
- PORTO, A. L. F., G. M. CAMPOS-TAKAKI & J. L. LIMA FILHO, 1996. Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing on soy bean flour medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 60(2): 115-122. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02788066>.
- RAO, M. B., A. M. TANKSALE, M. S. GHATGE & V. V. DESHPANDE, 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 62(3): 597-635.
- RAVEENDRAN, S., B. PARAMESWARAN, S. B. UMMALYMA, A. ABRAHAM, A. K. MATHEW, A. MADHAVAN & A. PANDEY, 2018. Applications of microbial enzymes in food industry. **Food Technology and Biotechnology** 56(1): 16-30. DOI: <http://dx.doi.org/10.17113/ftb.56.01.18.5491>.
- SAVITHA, S., S. SADHASIVAM, K. SWAMINATHAN & F. H. LIN, 2011. Fungal protease: production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers** 42(2): 298-304. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2010.05.012>.
- SAYALI, K., P. SADICHHA & S. SUREKHA, 2013. Microbial esterases: an overview. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences** 2(7): 135-146.
- SHELDON, R. A. & S. VAN PELT, 2013. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews** 42(15): 6223-6235. DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/C3CS60075K>.
- SINGH, R., A. MITTAL, M. KUMAR & P. K. MEHTA, 2016. Microbial protease in commercial applications. **Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological** 4(3): 365-374.
- SINGH, S. & B. K. BAJAJ, 2017. Potential application spectrum of microbial proteases for clean and green industrial production. **Energy, Ecology and Environment** 2(6): 370-386. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40974-017-0076-5>.
- ZHANG, X., Q. LIU, G. ZHANG, H. WANG & T. NG, 2010. Purification and molecular cloning of a serine protease from the mushroom *Hypsizygus marmoreus*. **Process Biochemistry** 45(5): 724-730. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.01.009>.
- ZIMMER, K. R., G. L. BORRÉ, D. S. TRENTIN, C. W. JÚNIOR, A. P. FRASSON, A. A. GRAEFF & A. J. MACEDO, 2009. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. **Revista Liberato** 10(14): 123-137.

