

PRODUÇÃO DE BIOMASSA E METABÓLITOS POR *Volvariella*
volvacea EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA A PARTIR DE REFUGO DE
BATATA E BAGAÇO DE MANDIOCA *

TANIA MARIA TONIAL **
CARLOS RICARDO SOCCOL ***
MARIA DE LURDES TODESCHINI ****
LUIZ PEREIRA RAMOS *****
MARILEUSA D. CHIARELLO *****

Resíduos industriais do processamento de mandioca e batata foram utilizados como substrato na produção de biomassa e metabólitos do fungo *Volvariella volvacea*. Três cepas de *V. volvacea* (LPB 08, 59, 77) foram cultivadas em meio contendo 2,4% (p/v) de refugo de batata e 1,6% (p/v) de bagaço de mandioca (meio RBBM, em placas de Petri). Seu desempenho foi avaliado medindo-se a velocidade de crescimento radial e a produção de biomassa. A cepa LPB 77 apresentou o maior desenvolvimento no meio RBBM (condições de fermentação: temperatura de 32°C, pH 6,5 e suplementação com 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou KNO_3). Estas condições foram transpostas para o estudo cinético da fermentação submersa. Após 12 dias de fermentação, 80 % do açúcar presente no meio foi consumido para produzir biomassa e metabólitos. A concentração de biomassa foi de 5,8 g/L. Em fermentação submersa o *V. volvacea* produz ácido láctico na concentração de 2,8 g/L, como principal metabólito durante seu crescimento.

- * Parte da dissertação de Mestrado em Tecnologia Química, Área de concentração Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná (UFPR).
- ** Mestranda do Curso de Tecnologia de Alimentos da UFPR.
- *** PhD em Biotecnologia, Professor Titular em Biotecnologia Industrial, UFPR.
- **** Bióloga, Bolsista DTI do CNPq.
- ***** PhD em Química de Biomassa, Professor Adjunto, Departamento de Química.
- ***** PhD em Bioquímica dos Alimentos, Pesquisador IIC do CNPq.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o cogumelo ainda é considerado alimento de luxo, devido ao custo elevado, a pouca disponibilidade do produto no mercado e a falta de hábito de consumo (6). Entretanto considerando seu elevado valor nutricional e dietético estudos visando reduzir o custo e aumentar sua produção têm se intensificado nos últimos anos. Em outros países, a produção em grande escala já é um processo econômico com êxito, mas a principal restrição é a resistência dos consumidores em aumentar seu consumo na dieta alimentar (11).

Entre as espécies de cogumelos comestíveis, o *V. volvacea* apresenta como característica seu rápido crescimento, sendo boa fonte de alimento protéico e de carboidratos. Normalmente, contém de 20 a 40% de proteína em base seca (3).

A produção de micélio (inóculo semente) em grande escala e a baixo custo pode ser obtida por fermentação submersa (2). Neste trabalho, utilizou-se resíduos agro-industriais para a obtenção do fungo *V. volvacea* por fermentação submersa, visando a produção de biomassa protéica, inóculo-semente ("spawn") bem como avaliou-se os metabólitos produzidos durante a formação da biomassa.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Matéria-prima

O refugo de batata (tubérculos sem padrão comercial) foi fornecido pela empresa Classificadora de Batatas COMERCIAL AGRÍCOLA COBAGE LTDA., Curitiba-PR. Selecionou-se o material no Laboratório de Processos Biotecnológicos (LPB) manualmente. Os tubérculos foram lavados, fatiados e secos em estufas (50 a 60°C), durante 24 horas. O material seco foi então moído em moedor de café e tamizado. A fração retida entre 0,84 mm e 2 mm foi utilizada.

O bagaço de mandioca desidratado foi fornecido pela Companhia LORENZ de Quatro Pontes (PR). O material foi moído de maneira similar ao refugo de batata e a fração retida entre 0,84 mm e 2 mm foi selecionada.

2.1.2 Microrganismos

Utilizaram-se três cepas do fungo basidiomiceto *V. volvacea* (LPB 08,59, 77) pertencentes ao Laboratório de Processos Biotecnológicos - UFPR.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Seleção das Cepas em Meio Sólido

A capacidade das diferentes cepas de *V. volvacea* em utilizar o refugo de batata e bagaço de mandioca (RBBM) como substrato foi avaliada através de seu crescimento em placa de Petri. Mediu-se a velocidade de crescimento radial e a produção de biomassa. O meio, a base de refugo de batata (2,4% p/v) e de bagaço de mandioca (1,6% p/v) (RBBM), foi cozido em autoclave por 1 hora a 98°C e filtrado em malha de nylon de 200 µm. Corrigiu-se o pH do filtrado para 6 com hidróxido de sódio (NaOH) 3N e o resíduo da filtração foi descartado. Adicionou-se ao filtrado 15 g/L de ágar e esterilizou-se em autoclave a 121°C por 15 minutos. A seguir distribuiu-se o meio de cultura em placas de Petri (20 mL/placa) estéreis, de 85 mm de diâmetro. Para a inoculação utilizou-se o micélio em fase avançada de crescimento. As placas foram a seguir incubadas a 32°C por 6 dias. Avaliou-se o crescimento radial de cada cepa pela medida sucessiva do diâmetro da colônia até a borda da placa (9). Determinou-se a biomassa produzida por gravimetria, de acordo com SOCCOL (9), após fusão do meio gelosado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.2.2 Estudos Fisiológicos

Avaliou-se o efeito de diferentes fatores, ou seja, pH (ajustado na faixa de 3 a 9, com NaOH 3N e/ou HCl 1N), temperatura (5 a 40°C) e ação de diferentes fontes de nitrogênio (suplementação de 1 g/L de KNO₃, (NH₄)₂SO₄, peptona, extrato de levedura e soja).

2.2.3 Fermentação Submersa

Preparou-se o meio de cultura RBBM líquido de maneira similar ao descrito em 2.2.1, mas sem a adição de ágar. O pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 3N. O meio foi inoculado com cinco discos de 5 mm de uma cultura de *V. volvacea* LPB 77 crescida em ágar Dextrose Batata. A fermentação foi

efetuada em Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio por frasco, pelo período de 12 dias, a 32°C e 100 rpm. Os frascos inoculados foram amostrados em intervalos de três dias em duplicata. Determinou-se os teores de proteínas, ácido láctico, açúcares totais e açúcares redutores, bem como a biomassa produzida, pH final e a atividade de α -amilase.

2.2.4 Análises

O teor de proteínas foi determinado por Kjeldahl (5). Estimou-se a produção de biomassa após dessecação. O pH foi verificado de acordo com SOCCOL et al. (8), os açúcares totais pelo método da hidrólise ácida, segundo a AOAC (1) e os açúcares redutores por SOMOGYI (10). Mediu-se a atividade de α -amilase pelo método descrito por (8). O teor de ácido láctico foi determinado por cromatografia em fase líquida, após clarificação das amostras por centrifugação seguida de filtração em filtros de 0,45 μ m. Usou-se coluna BIO-RAD Aminex HPX 87H, detectores de refratometria e ultravioleta a 210 nm; como solvente/eluente: H₂SO₄ 5mM (0,6 mL/min.); pressão de 800-900 PSI e volume injetado de 40 μ l.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 SELEÇÃO DAS CEPAS

A Tabela 1 mostra os resultados obtidos com as três cepas de *V. volvacea* investigadas. A cepa LPB 77 apresentou melhor crescimento em ágar RBBM em relação aos parâmetros avaliados (crescimento radial e biomassa formada). Esta cepa foi selecionada para a continuidade dos ensaios, por apresentar melhor desempenho em assimilar os dois resíduos (RBBM).

3.2 ESTUDO FISIOLÓGICO DO CRESCIMENTO

O efeito dos principais parâmetros do crescimento da *V. volvacea* LPB 77 em ágar RBBM em placas de Petri foi avaliado em termos de crescimento radial (expresso em mm/dia) e de biomassa produzida (expressa em mg/20 mL de meio).

TABELA 1 - SELEÇÃO DE CEPAS DE *Volvariella* CAPAZES DE CRESCER EM MEIO A BASE DE REFUGO DE BATATA E BAGAÇO DE MANDIOCA (RBBM)

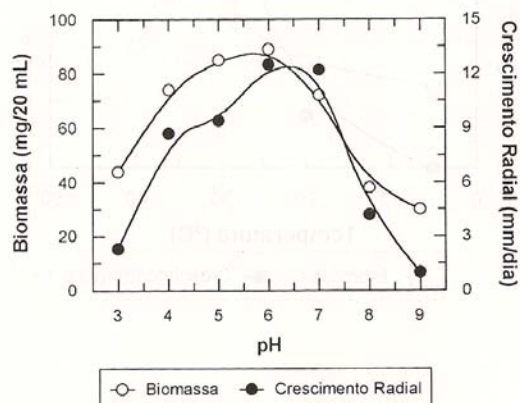
CEPA	CRESCIMENTO RADIAL (mm/DIA)*	BIOMASSA PRODUZIDA (mg/20 mL)*
<i>V. volvacea</i> LPB 08	11,6	45,4
<i>V. volvacea</i> LPB 59	10,8	42,4
<i>V. volvacea</i> LPB 77	12,5	65,1

* média das repetições.

3.2.1 Efeito do pH

O fungo mostrou-se incapaz de crescer satisfatoriamente nos extremos de pH estudados ($\text{pH} \leq 4$ e $\text{pH} > 8$) (Figura 1). Os melhores resultados foram obtidos na faixa entre pH 6,0 e 7,0. Esses resultados confirmam os estudos obtidos por CHANG-HO & YEE (4) usando o meio ágar Batata-Dextrose, enriquecido com peptona, onde o fungo *V. volvacea* obtém elevado crescimento micelial com pH 6,0.

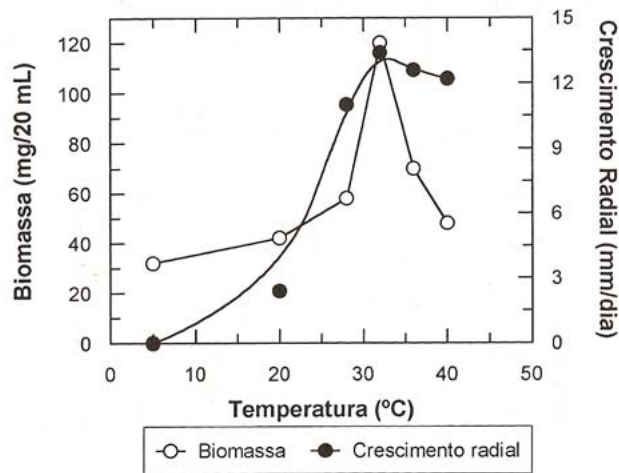
FIGURA 1 - INFLUÊNCIA DO pH NO DESENVOLVIMENTO DO *V. volvacea* LPB 77 EM MEIO RBBM



3.2.2 Efeito da temperatura

A temperatura ideal para o desenvolvimento do *V. volvacea* LPB 77 ficou em torno de 32°C (Figura 2). Temperaturas inferiores a 28°C inibem o crescimento e a produção de biomassa, enquanto que temperaturas superiores a 32°C inibem apenas a produção de biomassa. Enquanto o crescimento radial mantém-se, a espessura do micélio diminui, o que acarreta diminuição na densidade da biomassa produzida. Resultados semelhantes foram observados em estudos fisiológicos envolvendo cepas de fungos do gênero *Rhizopus* (9). Neste caso, aumentos na concentração de CO₂ resultavam em micélios com alta velocidade de crescimento radial, mas menos densos, com conseqüente diminuição da biomassa produzida. De fato, observou-se que em temperaturas superiores a 32°C a densidade micelial apresentou redução significativa.

FIGURA 2 - EFEITO DA TEMPERATURA NO DESENVOLVIMENTO DO *V. volvacea* LPB 77 EM MEIO RBBM



3.3.3 Efeito da suplementação do meio RBBM com diferentes fontes de nitrogênio

A suplementação em nitrogênio em ágar RBBM exerce influência positiva no desenvolvimento do microrganismo (Tabela 2).

TABELA 2 - INFLUÊNCIA DO TIPO DE FONTE DE NITROGÊNIO NO DESENVOLVIMENTO DE *V. volvacea* LPB 77 EM RBBM.

FONTE DE NITROGÊNIO	CRESCIMENTO RADIAL (mm/dia)*	BIOMASSA PRODUZIDA (mg/20 mL)*
<i>Sem suplementação</i>	6,46	30,42
$(NH_4)_2SO_4$	13,1	67,88
<i>Soja</i>	6,5	30,62
<i>Extrato de levedura</i>	9,8	36,38
KNO_3	13,2	69,48
<i>Peptona</i>	7,3	39,2

* média das repetições.

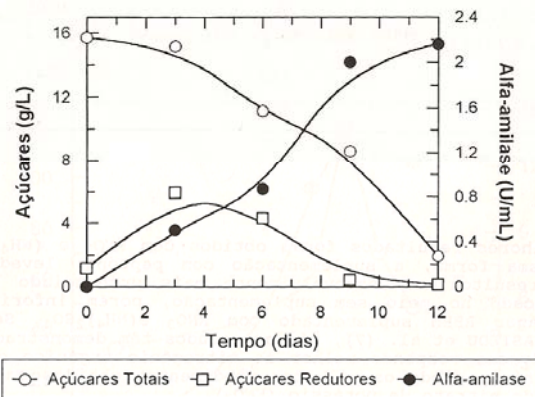
Os melhores resultados foram obtidos com KNO_3 e $(NH_4)_2SO_4$. Da mesma forma, a suplementação com peptona, levedura e soja resultou em desenvolvimento mais pronunciado que o verificado no meio sem suplementação, porém inferior ao meio ágar RBBM suplementado com KNO_3 e $(NH_4)_2SO_4$. Segundo OFOSU-ASIEDU et al. (7), vários estudos têm demonstrado que *V. volvacea* responde melhor ao nitrogênio orgânico que ao inorgânico, sendo os melhores rendimentos obtidos em meios contendo nitrato de potássio (KNO_3).

3.3 CINÉTICAS DE CRESCIMENTO DO *V. volvacea* LPB 77 EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA EM INCUBADOR TIPO "SHAKER"

A evolução de vários parâmetros da fermentação submersa do *V. volvacea* em meio RBBM está apresentada nas Figuras 3, 4 e 5.

Quanto aos açúcares totais (Figura 3), observa-se que no tempo zero o teor é de apenas 16 g/L. De fato, o meio RBBM foi formulado com 4% (p/v) de resíduos amiláceos, contendo em média 75% de amido. Entretanto, verificou-se que, durante a preparação do meio, aproximadamente 50% do amido permaneceu ligado ao resíduo sólido descartado após filtração. Com a evolução da fermentação, aproximadamente 90% do teor real de amido foi consumido após 12 dias. Já o teor de açúcares redutores sofreu aumento significativo entre o tempo zero e 3 dias (de 1,15 g/L para 6 g/L), devido à hidrólise do amido, e depois sofreu redução.

FIGURA 3 - CINÉTICA DO CONSUMO DE AÇÚCARES E DA ATIVIDADE DE α -AMILASE POR *V. volvacea* LPB 77 EM MEIO RBBM LÍQUIDO

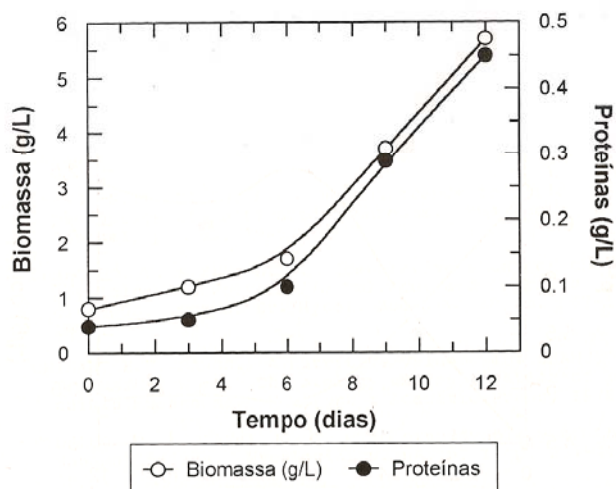


A produção de α -amilase foi lenta nos primeiros 6 dias (Figura 3) e intensificou-se em seguida, (máxima aos 12 dias de fermentação), garantindo o fornecimento de açúcares fermentescíveis às células.

Após 12 dias de fermentação, o desenvolvimento do fungo resultou numa concentração de biomassa de 5,8 g/L (Figura 2). Observa-se que o aumento do teor de proteínas foi proporcional à produção de biomassa.

A produção de ácido láctico atingiu seu máximo no sexto dia de fermentação (Figura 3), sofrendo ligeira queda para estabilizar-se a partir do 9º dia. O pH sofreu redução de 2 pontos após 6 dias de cultura, em função da produção de ácidos orgânicos. Este aspecto pode vir a ser interessante para o desenvolvimento de aplicações industriais, porque a diminuição do pH do meio reduz os riscos de contaminação bacteriana.

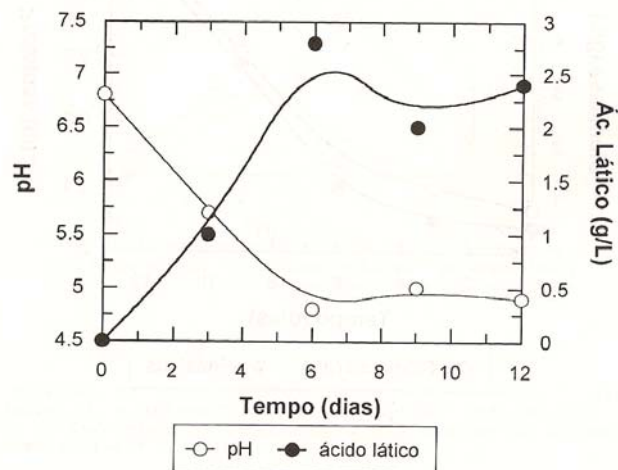
FIGURA 4 - CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA E PROTEÍNAS POR *V. voluacea* LPB 77 EM MEIO RBBM LÍQUIDO



4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram concluir que o meio a base de refugo de batata e bagaço de mandioca pode ser utilizado pelo fungo para o seu crescimento e produção de biomassa. A cepa que apresentou maior crescimento em meio sólido RBBM foi a LBP 77. O pH ótimo para o desenvolvimento situa-se na faixa de 6 a 7 e a temperatura ótima é de 32°C. A adição de KNO_3 ou $(NH_4)_2SO_4$ levou à maior produção de biomassa (superior a 65 mg/placa). Quando transposta para meio RBBM líquido, a fermentação do *V. volvacea* LBP 77 resulta na produção de 5,8 g/L de biomassa após 12 dias. Estes resultados podem contribuir para a produção de inóculo-semente "spawn", reduzindo o custo da produção do *V. volvacea*.

FIGURA 5 - CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁCTICO E DA DIMINUIÇÃO DO pH DURANTE A FERMENTAÇÃO POR *V. volvacea* LBP 77 EM MEIO RBBM LÍQUIDO



Abstract

Industrial solid residues from cassava and potato processing were used as substrate to produce starch production *Volvariella volvacea* edible mushrooms. Three strains of *V. volvacea*(LPB 08, 59, 77) were cultivated in a 2.4% (w/v) declassified potato and 1.6% cassava bagasse mix (RBBM medium), in Petri dishes. Their performance was evaluated by measuring rate of radial growth and biomass producing. LPB 77 showed higher development in RBBM medium (growth conditions: temperature 32°C, pH 6.5 and 1g/L of (NH₄)₂SO₄ or KNO₃). This conditions were employed to submerged fermentation kinetic assays. After 12 days fermentation, 80% of medium carbohydrates were consumed to produce biomass and metabolites. Biomass increase was of 5.8 g/L. Lactic acid was the major metabolite produced in submerged culture (2.8 g/L).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the association of official agricultural chemists.** 15. ed. Washington, 1990. 2200 p.
- 2 BUSWELL, J. A. & CHANG, S. T. Biomass and extracellular hydrolytic enzyme production by six mushroom species grown on soybean waste. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 12, p. 1317-1322, 1994.
- 3 CHANG, S.T & MILES, P G. Recent trends in world production of cultivated mushrooms. **Mushrooms Journal**, p. 503, 1989.
- 4 CHANG-HO, Y. & YEE, N. T. Comparative study of the physiology of *Volvariella volvacea* and *Coprinus cinereus*. **Trans. Br. Mycol. Soc.**, v. 68, p. 167-172, 1977.
- 5 CRISAN, E.V. SANDS. A nutritive value. In: CHANG, S. T., HAYES, W. A. **The biology and cultivation of edible mushrooms.** New York : Academic Press, 1978.
- 6 FIDALGO, O. & PRANCE, G. T. The ethnomycology of the Sanama Indians. **Mycologia**, v. 68, n. 1, p. 201-210, 1976.
- 7 OFOSU-ASIEDU, A , SCHMIDT, O.& LIESE, W. Growth studies of *Volvariella volvacea* for cultivation on wood waste. **Material and Organism.**, v. 19, p. 241-251, 1984.

- 8 SOCCOL, C. R., RAIMBAULT, M., PINHEIRO, L. I. Effect of CO₂ concentration on the micellium growth of *Rhizopus* species. *Arq. Biol. Tecnol.*, v. 37, n. 1, p. 203-210, 1994.
- 9 SOCCOL, C. R. Contribuição ao estudo da fermentação no estado sólido em relação com a produção de ácido fumárico, biotransformação de resíduo sólido de mandioca por *Rhizopus* e basidiomacromicetos do gênero *Pleurotus*. Curitiba, 1994. 228 p. Tese (Professor Titular em Biotecnologia e Tecnologia de Alimentos) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.
- 10 SOMOGYI, M. A. New reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.*, v. 160, p. 61, 1945.
- 11 WOOD, D. Mushroom biotechnology. *International Industrial Biotechnology*, v. 9, n. 1, p. 5-8, 1989.