



Produção de lacase usando como substrato resíduos agroindustriais

Laccase production using agro-industrial waste as a substrate

Lorena de Souza Silveira¹, Virgínia Sanches Coelho de Oliveira Trindade², Ana Letícia Trezolin Bertolucci³, Milena Martins Andrade⁴

RESUMO

Enzimas são catalisadores biológicos que proporcionam uma gama de reações, tendo benefícios de alta seletividade, condições brandas de reação (pressão, temperatura e pH) e promoção de menores problemas ambientais e toxicológicos. As lacases são enzimas promissoras em aplicações biotecnológicas, promovendo a catálise de uma grande variedade de substratos orgânicos, sendo produzidas na natureza principalmente por fungos dos filos *Ascomycota* e *Basidiomycota*. Neste projeto, o fungo *Pleurotus ostreatus* foi utilizado para a produção de lacases, sendo inoculado em diferentes substratos: farinha de amêndoa de tucumã, farinha de casca de marujá e farinha de casca de tucumã. O uso de cada substrato foi analisado a partir de dados de absorvância, obtidos por Espectroscopia UV/UVIS. De acordo com os resultados obtidos, todos os substratos são adequados para a produção, possuindo bons valores de atividade enzimática, porém, a utilização da farinha de casca de tucumã recebe destaque, apresentando valores superiores.

PALAVRAS-CHAVE: fermentação submersa; enzimas; *Pleurotus ostreatus*.

ABSTRACT

Enzymes are biological catalysts that provide a range of reactions, with the benefits of high selectivity, mild reaction conditions (pressure, temperature, and pH), and the promotion of fewer environmental and toxicological problems. Laccases are promising enzymes in biotechnological applications, promoting the catalysis of a wide variety of organic substrates, being produced in nature mainly by fungi from the phyla *Ascomycota* and *Basidiomycota*. In this project, the fungus *Pleurotus ostreatus* was used to produce laccases, being inoculated on different substrates: tucumã almond flour, passion fruit peel flour, and tucumã peel flour. The use of each substrate was analyzed based on absorbance data, obtained by UV/UVIS Spectroscopy. According to the results obtained, all substrates are suitable for production, having good enzyme activity values; however, the use of tucumã peel flour is highlighted, presenting higher values.

KEYWORDS: submerged fermentation; enzymes; *Pleurotus ostreatus*.

INTRODUÇÃO

A tecnologia enzimática é proeminente nos dias de hoje em diversos processos industriais, como na produção de cosméticos, bebidas, alimentos e segmento têxtil. A utilização de enzimas como catalisadores biológicos possui vantagens como alta seletividade, condições brandas de pressão, temperatura e pH, minimizando problemas ambientais e toxicológicos (MONTEIRO; SILVA, 2009; ORLANDELLI *et al.*, 2012).

¹ Voluntária da UTFPR. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil. E-mail: lorenasilveira@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 5122083102190240.

² Bolsista do CNPQ, Universidade Estadual de Maringá, Município, PR, Brasil. E-mail: v.coelho23@hotmail.com. ID Lattes: 6846894218751528.

³ Voluntária da UTFPR. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil. E-mail: anabertolucci@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes: 2418337522918971

⁴ Docente do Magistério Superior e Docente Permanente do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil. E-mail: milenaandrade@utfpr.edu.br. ID Lattes: 0974988053890754.



Dentre as enzimas, as lacases (EC 1.10.3.2) têm se mostrado promissoras em diversas aplicações biotecnológicas, abrangendo as indústrias de bebidas e alimentos, indústrias têxteis, papelarias, indústrias farmacêuticas e processos de biorremediação. Pode-se citar: a biotransformação de xenobióticos e efluentes industriais, a descoloração de corantes, a biorremediação de solos contaminados, a produção de bioetanol, a clarificação de vinhos e chás e a produção de biossensores (PACHECO; SOARES, 2014). As lacases são produzidas na natureza principalmente por fungos dos filos *Ascomycota* e *Basidiomycota* (BAIL, 2020). O fungo gênero *Pleurotus* produz enzimas como celulase, celobiase, hemicelulase, ligninase e lacase (SCHMIDT *et al.*, 2003).

Resíduos industriais, ricos em nutrientes, podem servir para o cultivo de micro-organismos e produção de bioprodutos de interesse industrial, como enzimas, por meio de fermentações em estado sólido ou submerso. Com a redução dos custos de produção das enzimas, adquire-se um alto valor agregado (FARIAS *et al.*, 2014). Este trabalho teve como objetivo produzir lacases pelo fungo *P. ostreatus*, sob condição de fermentação submersa utilizando resíduos da agroindústria como resíduos das frutas de maracujá e tucumã.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS

A farinha de amêndoas e cascas de tucumã foram doados pela Prof^a Dr^a Helvia Lira e a farinha de cascas de maracujá foram doadas pela Prof^a Dr^a Maraisa Menezes. Batata Dextrose Agar – BDA (Acumedia) e ABTS (2,2 azino-bis ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (Sigma-Aldrich) foram utilizados no cultivo do micro-organismo e como substrato na determinação de lacases, respectivamente.

MANUTENÇÃO DO MICRO-ORGANISMO E INÓCULO

O micro-organismo utilizado foi o *Pleurotus ostreatus* que foi mantido em meio de BDA a 4°C e foi repicado para placas contendo meio de BDA que foram incubadas a 28°C por 10 dias (Figura 1). Após o crescimento do micro-organismo, dois discos (~0,7 cm de diâmetro) com hifas foram cortados e utilizados para inocular frascos de Erlenmeyer de 50 mL, contendo 10 mL de meio líquido, composto por farinha de amêndoa de tucumã, cascas de tucumã e cascas de maracujá a 2, 4, 6 % (m/v) em água destilada que permaneceram durante 5 dias em *shaker* a 180 rpm e 28°C. Em seguida, foram interrompidos por centrifugação (6000 rpm/10 min). Os extratos livres de células (ELC) obtidos foram armazenados a 4°C até determinação da atividade enzimática. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada substrato e concentração.



Figura 1 – *Pleurotus ostreatus* após 10 dias de crescimento a 28°C

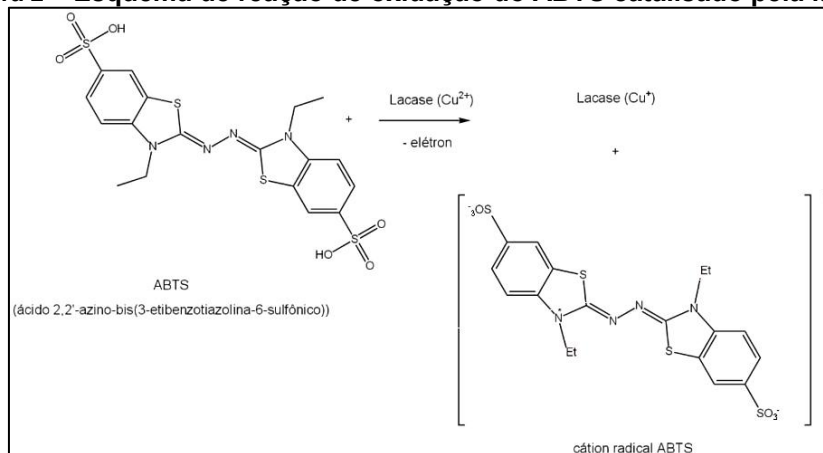


Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para a determinação da atividade da lacase foi utilizado o método de Espectroscopia UV/VIS, baseada na reação da enzima com o ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico)) em meio aquoso, contendo tampão fosfato-citrato pH 3 a 50 °C durante 5 minutos. A lacase faz transferência eletrônica com o ABTS, favorecida pela presença de ligações duplas na molécula, ocorrendo uma reação de oxidação e formação do cátion radical do ABTS (Figura 2), o qual possui coloração esverdeada e é quantificado por sua absorvância, em comprimento de onda de 420 nm. A unidade de lacase foi definida como a liberação do cátion por minuto, por mL da solução de enzima.

Figura 2 – Esquema de reação de oxidação do ABTS catalisado pela lacase



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

A Figura 3 exemplifica de forma resumida toda a metodologia do trabalho.

Figura 3 – Esquemática da metodologia

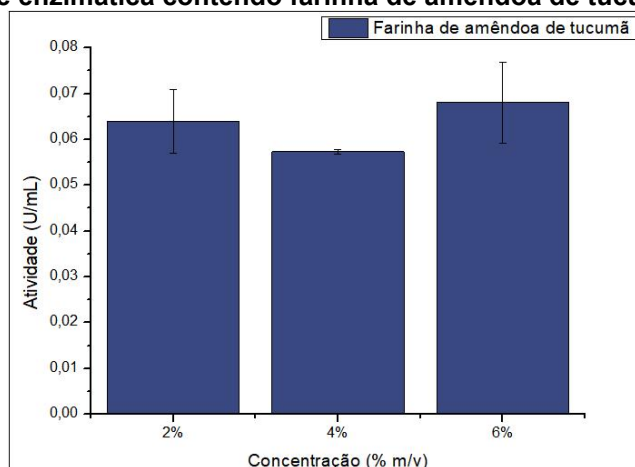


Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nas figuras seguintes (4,5 e 6), pode-se analisar a atividade enzimática em U/mL, de cada meio de cultivo em função da concentração (2, 4, 6 %, m/v). A Figura 4 representa a produção de lacase pelo fungo *P. ostreatus* com a utilização da farinha de amêndoa de tucumã como substrato. Observa-se que a farinha de amêndoa de tucumã proporcionou máxima atividade enzimática a 6 % ($0,068 \pm 0,009$ U/mL), sendo a concentração com maior desvio-padrão para este substrato. Ao se analisar a atividade enzimática juntamente com os valores de desvio-padrão, nota-se que a atividade enzimática foi praticamente constante nas variações de concentração escolhida na prática experimental.

Figura 4 – Atividade enzimática contendo farinha de amêndoa de tucumã como substrato

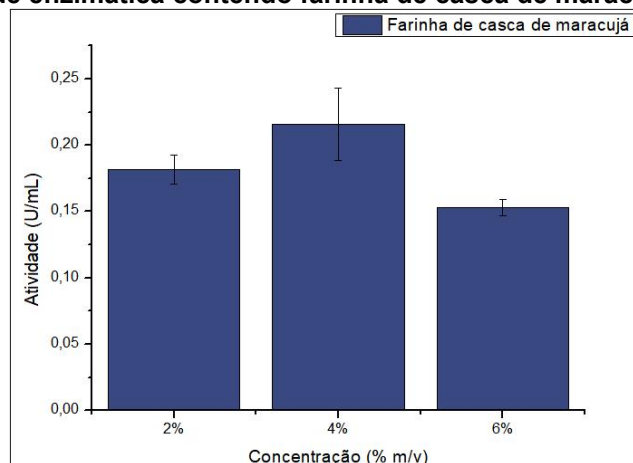


Fonte: Elaborado pelo autor (2023).



A Figura 5 traz os resultados obtidos tendo a farinha de cascas de maracujá como substrato, em que, comparando-se as atividades enzimáticas e os desvios-padrão obtidos, as concentrações de 2% e 6% (m/v) possuem resultados semelhantes. A maior atividade de $0,216 \pm 0,027$ U/mL foi encontrada a 4% (m/v).

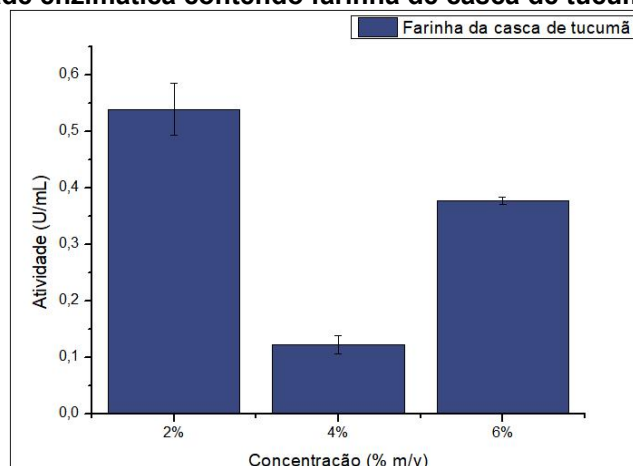
Figura 5 – Atividade enzimática contendo farinha de casca de maracujá como substrato



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

A Figura 6 representa os resultados alcançados tendo como substrato a farinha da casca de tucumã. É possível observar que este substrato apresentou maior diferença de atividade enzimática entre as concentrações avaliadas, sendo que a de 2 % (m/v) expressa a maior atividade ($0,539 \pm 0,047$ U/mL), seguida pela concentração de 6 % (m/v) com $0,377 \pm 0,006$ U/mL.

Figura 6 – Atividade enzimática contendo farinha de casca de tucumã como substrato



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

A casca de tucumã é um substrato cujas aplicações são amplamente estudadas. Santos (2021) analisou a atividade da lacase com a utilização da farinha de tucumã, porém com outros fungos, com o objetivo de avaliar a viabilidade em aplicações industriais. A atividade máxima de lacase obtida em seus experimentos foi de $0,064 \pm 0,006$ U/mL, demonstrando que os resultados obtidos na presente prática foram superiores.



JUNIOR (2018) produziu lacase por meio de outro fungo também pertencente ao gênero *Pleurotus*, usando cana-de-açúcar como substrato e agentes indutivos como sulfato de cobre, etanol e tetrahidrofurano (THF), capazes de causar aumento na atividade. O valor máximo de atividade encontrado foi para indução com 0,4 mM de sulfato de cobre (0,550 U/mL). Observa-se que com o uso de agentes indutivos, o valor máximo de atividade encontrado foi superior ao valor máximo deste trabalho, porém, não apresenta grande disparidade. Isso levanta a questão de como uma futura utilização de indutores poderia resultar em valores de atividade ainda maiores para este estudo.

CONCLUSÃO

A produção de lacase por *Pleurotus ostreatus* apresentou bons resultados na utilização de substratos oriundos do processamento das frutas de maracujá e tucumã, sendo viável a utilização de resíduos da agroindústria na tecnologia enzimática. Para o caso do tucumã, todo o resíduo da fruta pode ser aproveitado, com destaque na utilização de sua casca, apresentando altos valores de produção de lacases (0,539 ± 0,0464 U/mL) a 2 % (m/v).

Agradecimentos

À UTFPR pela vaga cedida, pelo Programa Institucional de Voluntariado na Iniciação Científica (PIVIC) e pelos materiais e equipamentos cedidos. Ao Laboratório Multiusuário de Apoio à Pesquisa da UTFPR Câmpus Apucarana (LAMAP). Às professoras Maraisa Menezes e Helvia Lira pelos substratos cedidos.

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

BAIL, Jaqueline. **Lacase e suas aplicações biotecnológicas: Uma revisão**. Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento, ed.10, v.14, p.21-30, 2020.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Comunicado técnico 424**: Imobilização de lacase em nanofibras de celulose para aplicação em biorrefinaria de lignina. Colombo, 2018. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/190548/1/CT-424-1635-final.pdf>. Acesso em: 28 ago. 2023.

FARIAS, Marcelle A. *et al.* **Lipase Production by *Yarrowia lipolytica* in Solid State Fermentation Using Different Agro Industrial Residues**. **Chemical Engineering Transactions**, vol.38, p.301-306, 2014.

JUNIOR, Joberson alves. **Produção e purificação da lacase de *Pleurotus sajor-caju* usando vinhaça da cana-de-açúcar proveniente da indústria sucroenergética**. Tese (Pós-graduação em engenharia de processos)- Universidade Tiradentes (UNIT), Aracaju-SE, p.35-38, 2018.

MONTEIRO, Valdirene N.; SILVA Roberto Nascimento. Aplicações industriais da biotecnologia enzimática. **Revista Processos Químicos**, p.10-11, 2009).



ORLANDELLI, Ravelly Casarotti *et al.* Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **Sabios: Rev. Saúde e Biol.**, v.7, n.3, p.97-109, 2012.

PACHECO, Sabrina M. V.; SOARES, Carlos Henrique L. imobilização e caracterização de lacase e seu uso na biodegradação de efluentes de indústrias papeleras. **Química nova** (online), Santa Catarina, v.37, n.2, p.209-214, 2014.

QUINTINO, Maria S. M. *et al.* Uso da espectrofotometria para diferenciar as colorações de biodiesel de palma e do corante marcador de óleo diesel. **Química nova** (online), Brasília, v.40, 2017.

SANTOS, Kimberly Luciana Beira-Mar. **Avaliação do potencial de aplicação industrial de subprodutos da cadeia produtiva de palmeiras amazônicas açai (*Euterpe oleracea*), tucumã do Amazonas (*Astrocaryum aculeatum*) e tucumã do Pará (*Astrocaryum vulgare*)**. Tese (Pós-graduação em bioquímica aplicada)- Universidade Federal de Viçosa (UFV), Minas Gerais, p.71, 2021.

SCHMIDT, Patrick *et al.* Tratamento do Feno de Braquiária pelo Fungo *Pleurotus ostreatus*. **R. Bras. Zootec**, v.32, n.6, p.1866-1871, 2003.