

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Caracterização do meio de cultivo e produção de lacase por *Pleurotus sajor-caju* em meio formulado com resíduos da bananicultura

Auriciane Arbighaus¹, Jamile R Rampinelli^{1,2}, Marcia L. L. Silveira¹, Regina M. M. Gern¹, Elisabeth Wisbeck¹, Agenor Furigo Jr², Mariane Bonatti-Chaves¹, Sandra A. Furlan¹

¹Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE

Caixa Postal 246 – 89219-710 Joinville – SC - E-mail: mbonatti@univille.com

²Universidade Federal de Santa Catarina – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química
Caixa Postal 5040 – 88040-970 Florianópolis - SC

RESUMO

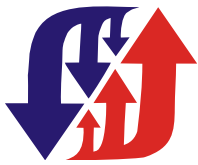
Resíduos da bananicultura são abundantes na região de Santa Catarina sendo utilizados para formulação de meio de cultivo. Este trabalho teve como objetivo caracterizar quimicamente o meio de cultivo utilizado, formulado com resíduos da bananicultura, e avaliar a produção de lacase por *Pleurotus sajor-caju*. Realizaram-se ensaios em biorretor para produção de lacases utilizando meio de cultivo OXI45. A maior atividade de lacase (1.820 U L^{-1}) foi observada em 100 h de cultivo. Observou-se ainda a presença de açúcares, nitrogênio e minerais disponíveis no meio, assim como o pH do meio de cultivo apresentou-se similar ao exigido pela enzima para atuação, bem como o percentual em torno de 10% de celulose, hemicelulose e lignina, considerados indutores de lacase, provenientes do resíduo casca de banana.

Palavras-chave: resíduos bananicultura, lacase, *Pleurotus*.

INTRODUÇÃO

Fungos produzem uma grande variedade de metabólitos de interesse industrial tais como os antibióticos, enzimas, micotoxinas, vitaminas e polissacarídeos com atividade terapêutica. Dentre estes fungos, os fungos do gênero *Pleurotus* são capazes de crescer em uma grande variedade de resíduos agrícolas, degradando esses resíduos, ou seja, convertendo celulose, hemicelulose e lignina em compostos de menor peso molecular, os quais são utilizados para o seu crescimento, devido à produção de uma variedade de moléculas com interessantes atividades biológicas, dentre estas destacam-se as enzimas oxidativas.

Estas enzimas possuem aplicação em diversas áreas que vão desde a destoxificação de efluentes e resíduos das indústrias petroquímica, têxtil, alimentícia e de papel, biorremediação, remoção, precipitação ou transformação de compostos tóxicos e recalcitrantes. Uma das principais limitações para as inúmeras aplicações industriais destas enzimas é o alto custo de sua produção. Portanto, resíduos lignocelulósicos disponíveis na região nordeste de Santa Catarina, podem ser utilizados como substratos nas formulações dos meios de cultivo, além de serem economicamente viáveis, ajudam a resolver os problemas ambientais decorrentes do seu acúmulo na natureza. Uma alternativa ao descarte destes resíduos tem sido a sua utilização como substrato para a produção de cogumelos comestíveis do gênero *Pleurotus*. Contudo, durante o cultivo de cogumelos do gênero *Pleurotus* grande quantidade de um resíduo líquido, denominado água de imersão, é gerado. Este resíduo é



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

proveniente da etapa de umidificação do substrato, que permanece por 12 horas em imersão em água. Durante este período, muitos nutrientes são dissolvidos no meio líquido, o que justifica a proposta de utilização deste resíduo, juntamente com pó de cascas de banana, para a produção de enzimas lignocelulolíticas por fungos do gênero *Pleurotus*.

Assim sendo, os objetivos deste trabalho foram: caracterizar quimicamente o meio de cultivo utilizado, formulado com resíduos da bananicultura, e avaliar a produção de lacase por *Pleurotus sajor-caju* em biorreator utilizando este meio de cultivo.

MATERIAL E MÉTODOS

Micro-organismo e meio de manutenção: foi utilizada a linhagem *Pleurotus sajor-caju* CCB 019. A cepa foi mantida em meio sólido TDA, composto por 1,0 L de extrato de trigo, 20 g de dextrose e 15 g de ágar (FURLAN *et al.* (1997).

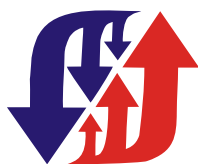
Caracterização dos resíduos agroindustriais: os resíduos foram caracterizados em termos de pH, umidade (AOAC, 1984), carboidrato total (AOAC, 1984), composição monossacarídica (GORIN *et al.*, 1996), proteína bruta (BREENE, 1990), cinzas (AOAC, 1984), fibra bruta (AOAC, 1984), hemicelulose, lignina e celulose (SILVA, 1981).

Produção de lacase por *Pleurotus* em biorreator: os experimentos foram realizados em biorreator de mistura completa B. BRAUN, com volume de trabalho de 4L. A temperatura foi controlada em 30°C, o pH inicial ajustado em 6,0, a vazão de ar em 0,37 L.min⁻¹ e a frequência de agitação em 350 rpm. Amostras foram retiradas a cada dois dias, por aproximadamente 15 dias. Utilizou-se o meio de cultivo denominado OXI45 composto por: água de imersão de folhas secas de bananeira adicionado de 45 g L⁻¹ de pó de cascas de banana, 150 µM de sulfato de cobre, 5,4 mM de tartarato de amônio e 10 g L⁻¹ de glicose. Os inóculos foram preparados em frascos Duran de 2L contendo 400 mL de meio de cultivo. Os frascos foram inoculados com micélio fúngico e incubados a 30°C com agitação recíproca de 110 min⁻¹, por sete dias.

Métodos analíticos: a concentração de glicose foi medida pelo método Glicose-E. A atividade de lacase foi determinada pelo monitoramento do aumento da absorbância (420 nm), produzida pela oxidação do composto ABTS (2,2-azino-bis-[3-ethylthiazoline-6-sulfonate]), utilizado como substrato. Em um volume de 0,8 mL de ABTS, acrescenta-se 0,1 mL de solução tampão acetato de sódio 0,1M (pH 5,0) e 0,1 mL do caldo enzimático (BUSWELL *et al.*, 1996). Uma unidade de atividade de enzima é definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 µmol do substrato ABTS por minuto, utilizando o coeficiente de extinção molar de 36000 M⁻¹.cm⁻¹.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

As Figuras 1 e 2 apresentam as caracterizações dos resíduos água de imersão de folhas secas de bananeira e pó de cascas de banana, utilizados na formulação do meio de cultivo OXI45.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

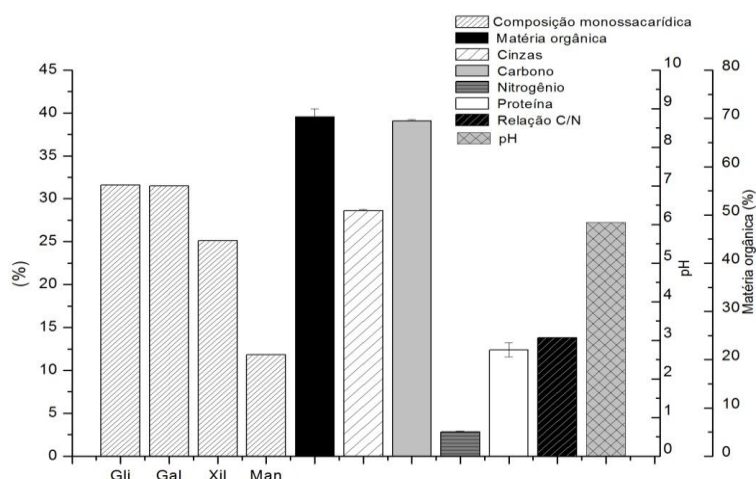


Figura 1 – Composição química da água de imersão de folhas secas de bananeira em termos de teor de matéria orgânica (%), carbono (%), nitrogênio total (%), proteína bruta (%), cinzas (%), relação carbono/nitrogênio e pH.

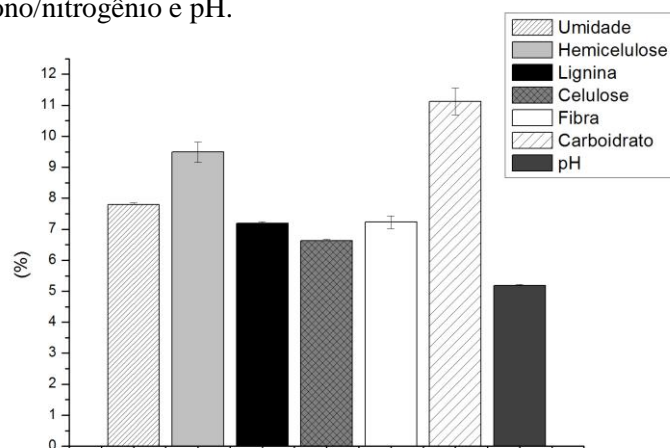
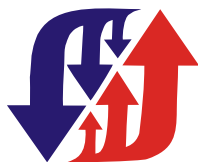


Figura 2 - Composição química de pó de cascas de banana em termos de teor (%) de matéria orgânica, fibra bruta, carboidrato, hemicelulose, lignina, celulose, cinzas, umidade e unidade de pH.

De acordo com os valores observados nas Figuras 1 e 2, observa-se a presença de açúcares (glicose, galactose, xilose e manose) disponíveis no meio, assim como minerais e nitrogênio. O pH do meio de cultivo apresentou valor similar ao exigido pela enzima para atuação. Observa-se ainda percentual em torno de 10% de celulose, hemicelulose e lignina, considerados indutores de lacase, provenientes do resíduo casca de banana.

A Figura 3 mostra as variações da concentração de glicose, atividade de lacase e pH com o tempo, durante o cultivo de *P. sajor-caju*. Observa-se atividade máxima de lacase (em torno de 1.820 U L^{-1}) no tempo de aproximadamente 100 h, sendo ambas as produtividades, global e máxima, iguais a $17,8 \text{ U L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Estes valores são 8,5 e 10,5 vezes superiores aos reportados por Mello (2015), para atividade máxima e produtividade global, respectivamente, utilizando a mesma espécie fúngica, as mesmas condições de cultivo e o mesmo meio de cultivo (OXI), porém com adição de 30 g L^{-1} de pó de cascas de banana ao invés de 45 g L^{-1} . Portanto, observa-se influência positiva deste substrato sobre a produção de lacase por *P. sajor-caju*.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

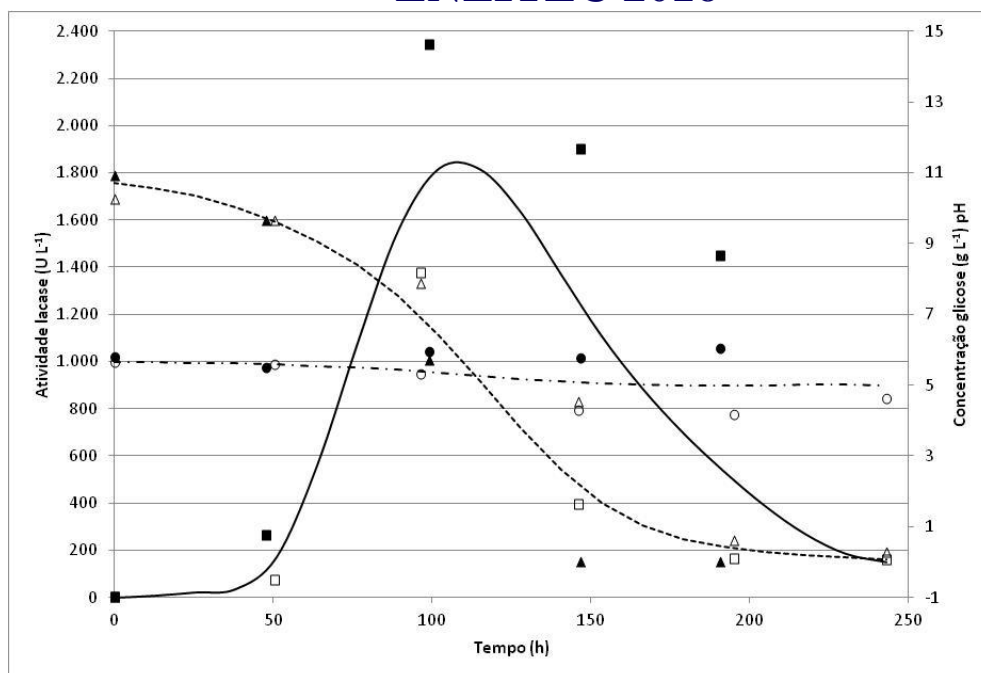


Figura 3 - Variação da concentração de glicose (linha pontilhada), atividade de lacase (linha contínua) e pH (linha tracejada e pontilhada) em função do tempo (horas) de cultivo de *P. sajor-caju*. Os símbolos aberto e fechado representam as duplicatas do experimento (lacase -■-□-, glicose -▲-Δ- e pH -●-○-).

CONCLUSÕES

De acordo com a caracterização química dos resíduos utilizados na composição do meio de cultivo, observou-se, devido à presença destes, a disponibilização para o meio de cultivo de nutrientes e indutores importantes para a produção de lacase. Desta forma, o meio de cultivo OXI45 mostrou-se eficiente na produção de lacase por *Pleurotus sajor-caju*. O aumento da concentração do resíduo pó de cascas de banana de 30 para 45 g L⁻¹ propiciou aumento de 8,5 vezes na atividade de lacase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Association of official analytical chemists (AOAC). 1984. Official methods of analysis. 100 ed. Arlington
- Breene, W.M. 1990. Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. Journal Food Protection, v.53, n.10, p.883-894.
- Buswel, J. A.; Ca, Y.; Chang, S. 1996. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. FEMS Microbiology Letters, v. 128, n. 1, p. 81-87.
- Furlan, S.A., Virmond, L.J., Miers, D. A., Bonatti, M., Gern, R.M.M., Jonas, R. 1997. Mushrooms strains able to grow at high temperatures and low pH values. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 13, n. 6, p. 689-692.
- Gorin, P.A.J.; Teixeira, A.Z.A.; Travassos, L.R.; Labouriau, M.L.S.; Iacomini, M. (1996). Characterization of carbohydrate components of an unusual hydrogel formed by seed coats of *Magonia pubescens* (Tingui). Carbohydrate Research, 282, 325-333.
- Melo, M. P. de. 2015. Uso de resíduos agroindustriais para produção de enzimas oxidativas por rota biotecnológica. Tese (Mestrado) Curso de Programa de Mestrado em Engenharia de Processos da Universidade da Região de Joinville, Universidade da Região de Joinville, Joinville, p. 53.
- Silva, D. J. (1981). Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 166p.