



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Produção de Lacases de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em Biorreator *Airlift* de Circulação Interna utilizando Efluentes Industriais

Fernanda Bettin¹, Nicole Amanda Boff¹, Rochele Santos da Conceição¹,
Simone Zaccaria¹, Mauricio Moura da Silveira¹, Aldo José Pinheiro Dillon¹

¹Universidade de Caxias do Sul – Instituto de Biotecnologia
Caixa Postal 1352 – 95070-560 – Caxias do Sul/RS – E-mail: fbettin@ucs.br

RESUMO

Neste trabalho, avaliou-se a produção de lacases e o crescimento de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em biorreator *airlift* de circulação interna, utilizando efluentes industriais nos meios de cultivo. Elevadas atividades enzimáticas foram obtidas no ensaio contendo 100% de efluente da indústria de papel e celulose (192 U.mL⁻¹ em 90 horas); neste meio, também foi observada maior biomassa micelial (4,3 g.L⁻¹ em 72 horas). No meio contendo 50% de efluente têxtil e 50% de papel e celulose, a produção de lacases foi de 79 U.mL⁻¹ em 60 horas, com biomassa máxima de 3,7 g.L⁻¹ em 90 horas. Maiores proporções de efluente têxtil (100% e 75%) inibiram a síntese enzimática e o crescimento, sugerindo que esse efluente contém componentes tóxicos ao desenvolvimento fúngico. Os dados mostraram que o organismo é capaz de crescer e produzir lacases na presença de efluentes industriais ambientalmente problemáticos, indicando seu potencial de aplicação no biotratamento de águas residuais.

Palavras-chave: *Pleurotus sajor-caju*, efluentes industriais, lacases, biorreator *airlift*.

INTRODUÇÃO

Efluentes que contêm resíduos fenólicos devem ser tratados antes do seu despejo no ambiente e este tratamento pode ser físico, químico ou biológico (Bayramoglu *et al.*, 2009). Entretanto, fatores como alto custo, baixa eficiência e geração de subprodutos tóxicos limitam a utilização de alguns métodos (Hu & Duvnjak, 2004). O emprego de fungos, especialmente basidiomicetos, no tratamento biológico de diversos tipos de efluentes, tem sido alvo de inúmeros estudos nos últimos anos, devido à produção de enzimas extracelulares inespecíficas, capazes de interagir com uma ampla gama de substratos (Durán, 2004).

Lacases são polifenol-oxidases multi-cobre presentes na maioria dos fungos da degradação branca, sendo também produzidas por outros tipos de fungos, plantas, algumas bactérias e insetos (Gianfreda *et al.*, 1999). As mais extensivamente estudadas são as lacases extracelulares de fungos ligninolíticos. Essas enzimas estão envolvidas na degradação da lignina e na remoção de fenóis potencialmente tóxicos produzidos durante sua degradação (Thurston, 1994). Lacases oxidam compostos fenólicos reduzindo o oxigênio a água pela retirada de um elétron do substrato aromático, gerando radicais fenoxilos (Durán, 2004).

O emprego de lacases no tratamento de efluentes pode ser uma alternativa para a remoção de cor e de compostos recalcitrantes. Muitas substâncias são tóxicas aos organismos empregados para degradá-las. Contudo, fungos como *Pleurotus sajor-caju* toleram concentrações elevadas de poluentes e são capazes de produzir enzimas fenol-oxidases, especialmente lacases e peroxidases, demonstrando eficiência na descoloração e na remoção de compostos fenólicos presentes em efluentes industriais (Munari *et al.*, 2007). Diante disto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de *P. sajor-caju* PS-2001 de crescer e produzir lacases em meios de cultivo contendo diferentes proporções de efluentes das indústrias têxtil e de papel e celulose em biorreator *airlift* de circulação interna.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

MATERIAL E MÉTODOS

Linagem – *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 foi mantido em meio contendo: serragem de *Pinus* spp., 20 g; farelo de trigo, 20 g; CaCO₃, 2 g; ágar-ágar, 20 g; H₂O destilada q.s.p. 1 L, com crescimento a 28°C e armazenamento das placas a 4°C (Bettin *et al.*, 2009).

Inóculos – Preparados em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio composto por: glicose, 5 g; caseína pura, 1,5 g; solução mineral de nutrientes e micronutrientes, 100 mL; H₂O destilada q.s.p. 1 L. Após crescimento sob agitação recíproca por seis dias, a 180 rpm e 28±2°C, utilizaram-se 10% (v/v) de inóculo (Bettin *et al.*, 2011).

Efluentes industriais – Foram gentilmente cedidos por uma indústria de produção de polpa de celulose e por uma indústria de tingimento têxtil, sendo denominados, neste trabalho, como efluente da indústria de papel e celulose (EIPC) e efluente da indústria têxtil (EIT). Diferentes proporções desses efluentes foram utilizadas nos ensaios realizados.

Meios de cultivo fúngico em biorreator – Foram baseados em: glicose, 5 g; caseína pura, 1,5 g; ácido benzoico, 122 mg; CuSO₄, 100 mg; solução mineral, 100 mL; efluente industrial q.s.p. 1 L. Os meios foram autoclavados por 20 minutos e antiespumante à base de silicone foi adicionado, quando necessário (Bettin *et al.*, 2009; Bettin *et al.*, 2011).

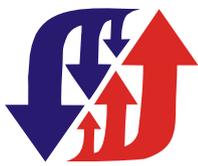
Condições de cultivo em biorreator – O biorreator *airlift* de circulação interna possui 75 cm de altura e 11 cm de diâmetro; o tubo interno (*riser*) possui 34 cm de altura e 7 cm de diâmetro, com volume nominal de 6 L e operacional de 4,5 L. Utilizou-se uma tampa de *nylon* e um aerador de vidro sinterizado. A aeração (1,5 L.min⁻¹ de ar - 0,33 vvm) não foi alterada durante os processos, com percentual de saturação em oxigênio dissolvido (OD) variando livremente. O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La), antes da inoculação, foi de 34 h⁻¹, utilizando-se regime descontínuo, pH 6,5 a 28±1°C, durante 90 horas.

Determinação da atividade de lacases – Lacases foram quantificadas pela oxidação do substrato ABTS em tampão acetato de sódio pH 5,0 por 90 segundos a 25°C, em 420 nm (Wolfenden & Willson, 1982).

Determinação das concentrações de substrato e de biomassa fúngica – O consumo de substrato (glicose) foi quantificado com a utilização do reagente DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico) e curva padrão de glicose, de acordo com Miller (1959). A concentração celular foi mensurada por gravimetria, em cadinhos de porcelana (Bettin *et al.*, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Figura 1, são apresentadas as atividades de lacases e os percentuais de saturação em OD dos ensaios realizados com diferentes proporções de efluentes industriais. Níveis superiores de lacases (Figura 1A) foram obtidos em meio contendo 100% de EIPC, atingindo 192 U.mL⁻¹ em 90 horas de processo. Atividades relevantes também foram observadas na presença de 50% de EIPC + 50% de EIT (79 U.mL⁻¹ em 60 horas). Entretanto, nos meios contendo proporções mais elevadas de EIT (100% e 75%), as atividades enzimáticas foram muito baixas (Figura 1A), sugerindo que esse tipo de efluente seja inibitório para o fungo. A razão para realizar a mistura dos efluentes foi que, diante dos resultados positivos obtidos com 100% de EIPC e dos resultados insatisfatórios obtidos com 100% de EIT, conjecturou-se que, possivelmente, a mistura desses dois tipos de efluentes pudesse favorecer a síntese enzimática, que foi muito baixa na presença de 100 e 75% de EIT, mas esse incremento só foi obtido com o uso de 50% de cada efluente e, ainda assim, inferior a 100% de EIPC. Com relação à saturação em OD (Figura 1B), apenas o ensaio contendo 100% de EIPC não mostrou quedas acentuadas, diferentemente do que foi observado nas demais condições.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

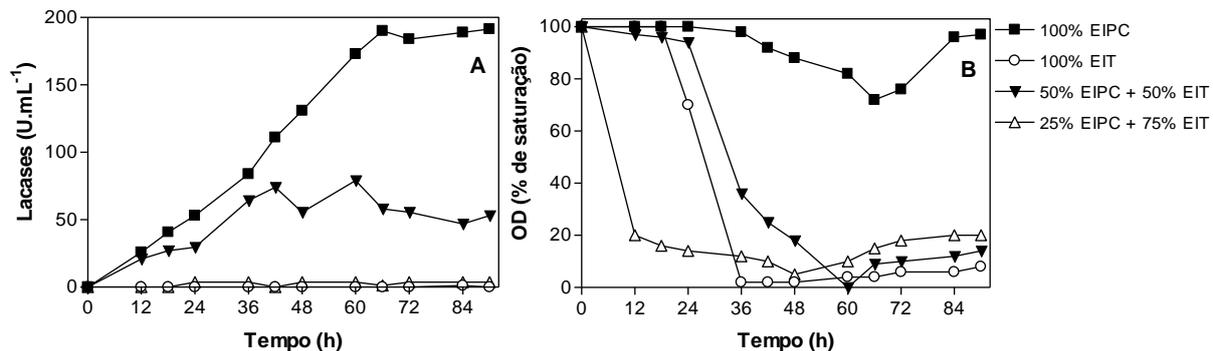


Figura 1. Atividade de lacases (A) e percentual de saturação em oxigênio dissolvido (B) em função do tempo em cultivos de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 realizados em meios de cultivo contendo diferentes proporções de efluentes industriais.

O crescimento micelial e o consumo de substrato são mostrados na Figura 2. Maior biomassa foi observada no ensaio contendo 100% de EIPC (Figura 2A), com pico de 4,3 g.L⁻¹ em 72 horas, seguido do teste contendo 50% de cada efluente (Figura 1C), com 3,7 g.L⁻¹ em 90 horas. Nas demais condições, a biomassa fúngica foi inferior, atingindo somente 2,2 g.L⁻¹ em 90 horas no teste contendo 100% de EIT; esses dados indicam, mais uma vez, que a composição específica desse efluente têxtil seja tóxica ao crescimento do organismo e inibitória à síntese de lacases (Figura 1A). Com relação ao substrato, a glicose foi consumida em todas as condições avaliadas (Figura 2), mostrando apenas níveis residuais no final dos processos; porém, nos testes com 100% (Figura 2B) e com 75% (Figura 2D) de EIT, a glicose residual, em 90 horas, foi superior às demais condições, sugerindo que o fungo teve dificuldades em consumir o substrato na presença de elevadas proporções do efluente têxtil.

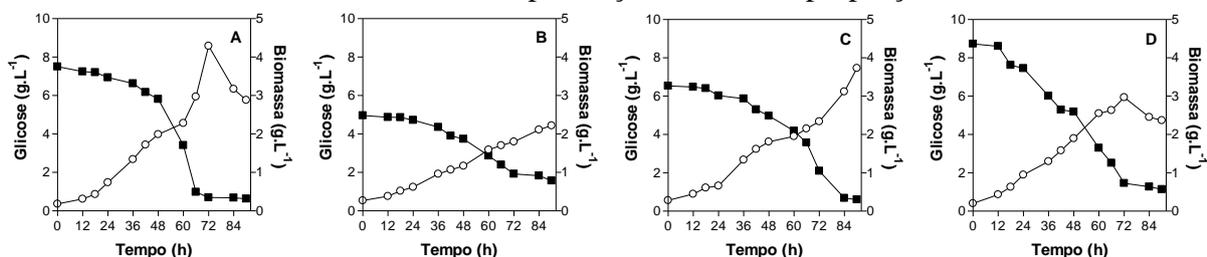


Figura 2. Consumo de substrato (■) e biomassa micelial (○) em função do tempo em cultivos de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 realizados em meios de cultivo contendo diferentes proporções de efluentes industriais. (A) 100% de EIPC. (B) 100% de EIT. (C) 50% de EIPC + 50% de EIT. (D) 25% de EIPC + 75% de EIT.

A possibilidade de utilizar fungos da degradação branca em estratégias de biotratamento provém da característica que estes organismos possuem de produzir um sistema enzimático não específico, capaz de metabolizar uma grande diversidade de poluentes até CO₂ e H₂O (Barr & Aust, 1994). A polimerização de alguns xenobióticos por oxidorreduções coloca estas enzimas em evidência, devido à possibilidade de seu uso na descontaminação de ambientes poluídos (Shuttleworth & Bollag, 1986). A possibilidade de utilização de fenol-oxidases é particularmente adequada para a descontaminação de ambientes aquáticos e de efluentes industriais complexos, como é o caso das indústrias têxtil e de papel e celulose, pois, após a polimerização, as substâncias precipitadas podem ser facilmente removidas (Dec & Bollag, 1990). Lacases oxidam uma ampla variedade de fenóis, transformando radicais fenólicos em outros que se polimerizam espontaneamente e formam complexos insolúveis, que



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

podem ser facilmente removidos por precipitação, filtração ou centrifugação (Davis & Burns, 1990). Ainda, de acordo com estudos realizados por Munari *et al.* (2007), culturas submersas de *P. sajor-caju* PS-2001 mostraram elevada capacidade de redução dos níveis de polifenóis totais e da cor presentes em efluentes da indústria de papel e celulose, atribuindo esses efeitos à presença de lacases e peroxidases produzidas durante o crescimento fúngico e indicando o potencial deste microrganismo para aplicação em novos métodos de tratamento de águas residuais.

CONCLUSÕES

Os dados apresentados neste trabalho mostram que *P. sajor-caju* PS-2001 é capaz de crescer e produzir elevadas atividades de lacases na presença de efluentes industriais, especialmente de EIPC. O EIT utilizado nos testes realizados mostra-se inibitório para o crescimento do organismo, assim como para a síntese enzimática e o consumo de substrato. Quando misturados em proporções iguais, EIPC e EIT também proporcionam níveis relevantes de lacases, porém, inferiores à presença somente de EIPC. Os resultados obtidos indicam que o fungo utilizado possui potencial para o tratamento de efluentes complexos ricos em compostos fenólicos e/ou aromáticos, como é o caso das indústrias têxtil e de papel e celulose, que geram grandes volumes de efluentes diariamente e que apresentam elevado impacto poluidor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barr DP, Aust SD. 1994. Mechanism white rot fungi use to degrade pollutants. *Environ Sci Technol* 28:78-87.
- Bayramoglu G, Gursel I, Tunali Y, Arica MY. 2009. Biosorption of phenol and 2-chlorophenol by *Funalia troglit* pellets. *Bioresour Technol* 100:2685-2691.
- Bettin F, Montanari Q, Calloni R, Gaio TA, Silveira MM, Dillon AJP. 2009. Production of laccases in submerged process by *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 in relation to carbon and organic nitrogen sources, antifoams and Tween 80. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36:1-9.
- Bettin F, Rosa LO, Montanari Q, Calloni R, Gaio TA, Malvessi E, Silveira MM, Dillon AJP. 2011. Growth, kinetics, production, and characterization of extracellular laccases from *Pleurotus sajor-caju* PS-2001. *Process Biochem* 46:758-764.
- Davis S, Burns RG. 1990. Decolorization of phenolic effluents by soluble and immobilized phenol oxidases. *Appl Microbiol Biotechnol* 32:721-726.
- Dec J, Bollag J. 1990. Detoxification of substituted phenols by oxidoreductive enzymes through polymerization reactions. *Arch Environ Contam Toxicol* 19:543-550.
- Durán N. 2004. Enzimas ligninolíticas. In: Esposito E, Azevedo JL. *Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia*. Caxias do Sul: EDUCS. pp.245-260.
- Gianfreda L, Xu F, Bollag JM. 1999. Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. *Biorem J* 3:253-259.
- Hu J, Duvnjak Z. 2004. The production of a laccase and the phenolic content in canola meal during the growth of the fungus *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation processes. *Eng Life Sci* 1:50-55.
- Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31:426-428.
- Munari FM, Gaio TA, Dillon AJP. 2007. Phenol degradation and colour removal in submerged culture of *Pleurotus sajor-caju* with paper mill effluents. *Biocatal Biotransform* 25:24-28.
- Shuttleworth KL, Bollag JM. 1986. Soluble and immobilized laccase as catalysts for the transformation of substituted phenols. *Enzyme Microb Technol* 8:171-177.
- Thurston CF. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiol* 140:19-26.
- Wolfenden BS, Willson RL. 1982. Radical-cations as reference chromogens in the kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *J Chem Soc Perkin Trans II* 02:805-812.

Apoio: CAPES, FAPERGS e UCS.