



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### Produção de enzimas lignolíticas por fungos utilizando resíduos agroindustriais

Bianca Ferraz Teixeira, Claudia Scarpelin, Tânia Regina de Assis e Sandra Helena da Cruz

Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz  
Caixa Postal 09 – 13418-900 Piracicaba - SP - E-mail: bianca.teixeira@usp.br

#### RESUMO

*A cana-de-açúcar é uma das principais culturas do Brasil, tendo a indústria sucroalcooleira uma excelente representação de desenvolvimento do país. As atividades agrícolas açucareiras geram uma grande quantidade de subprodutos, entre eles o bagaço e a vinhaça. O bagaço, biomassa lignocelulósica, pode ser utilizado em diferentes processos, após a hidrólise e liberação de celulose e hemicelulose. A metodologia mais eficiente para obtenção dos açúcares é um pré-tratamento da biomassa e, posterior hidrólise enzimática. Devido à dificuldade de obtenção das enzimas, já que a maioria é importada, este trabalho teve como objetivos avaliar a capacidade de descoloração do corante RBBR pelos fungos *Lentinus edodes* e *Pleurotus ostreatus*, cultivados em meio contendo o corante e a análise da atividade da enzima lacase, durante cultivo dos fungos em sistema de fermentação semissólido (FSS), em meio contendo bagaço de cana-de-açúcar e vinhaça. Os fungos estudados foram capazes de descolorir o meio e apresentaram atividade enzimática.*

Palavras-chave: bagaço de cana-de-açúcar; atividade enzimática; enzimas lignocelulolíticas.

#### INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma matéria-prima para a produção de açúcar e álcool. Durante o processo de produção, são gerados como subprodutos o bagaço e a vinhaça, que possuem várias aplicações, entre elas a geração de energia, fertilizantes e produção de combustíveis (BNDES/CGEE, 2008).

O bagaço de cana é um dos principais materiais lignocelulósicos com potencial para a bioconversão em etanol, uma vez que apresenta alta concentração de carboidratos, baixo conteúdo relativo de lignina, fácil utilização, baixo custo de colheita, de transporte e de armazenagem (PANDEY; SOCCOL, 2000; ROCHA et al., 2015). Os materiais lignocelulósicos são formados por estruturas duras e fibrosas, compostas basicamente de hemicelulose e celulose, envolvidas por uma macromolécula composta por álcoois aromáticos, a lignina, que se encontra unida por ligações covalentes e de hidrogênio (HON, 1996).

Espécies de fungos e bactérias são relatadas como eficientes colonizadores e degradadores de lignoceluloses. Estes fungos realizam a degradação enzimática da porção lignocelulósica dos substratos pela ação das enzimas como as lacases, manganês-peroxidases e lignina peroxidases que estão envolvidas na degradação de lignoceluloses (GOMES et al., 2009; PANDEY; SOCCOL, 2000; PINTO et al., 2005). A atividade dessas enzimas, produzidas por fungos como *Lentinus edodes* e *Pleurotus ostreatus* em meio de cultivo



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

contendo o bagaço de cana, juntamente com as enzimas celulolíticas, hidrolisam o bagaço de cana. Os açúcares obtidos da hidrólise da celulose e hemicelulose podem ser convertidos quimicamente ou por ação microbiana em produtos de interesse comercial como o álcool de segunda geração.

Neste estudo, a atividade da enzima Lacase foi avaliada durante cultivo dos fungos *Lentinus edodes* e *Pleurotus ostreatus*, em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar.

### MATERIAIS E MÉTODOS

O bagaço de cana-de-açúcar e a vinhaça foram provenientes de uma indústria sucroalcooleira do estado de São Paulo. O bagaço foi peneirado em malha 16, abertura 1,00 mm, para melhor uniformidade das fibras. A vinhaça foi mantida sob refrigeração para manter sua composição.

Os fungos *L. edodes* e *P. ostreatus* foram cultivados em meio MEA+RBBR, contendo extrato de malte (1,5%) e ágar (1,5%), acrescido do corante Azul Brilhante de Remazol (RBBR) na concentração de 0,002% (p/v) a fim de avaliar sua habilidade lignolítica (CONCEIÇÃO, 2010). Os meios foram esterilizados a 121°C e 1 atm por 20 min e foram vertidos em placas de Petri. Após a solidificação, as placas foram inoculadas com um disco (0,5 cm Ø) de cultura recente do fungo, e incubadas em BOD à 28°C por 14 dias. Como controle, foram utilizadas placas sem a presença dos fungos. Diariamente foram realizadas avaliações do crescimento do halo de descoloração com auxílio de uma régua.

Para a obtenção dos extratos enzimáticos, os fungos *L. edodes* e *P. ostreatus* foram cultivados em sistema de fermentação semissólido (FSS) em meio contendo bagaço (5g) e vinhaça (25mL), suficiente para umedecer o substrato, a 29±1°C. Após diferentes tempos o extrato enzimático foi obtido após adição de 10mL de tampão citrato-fosfato 0,05M pH 5,0 e filtração do material.

A atividade enzimática da lacase foi analisada no extrato enzimático de acordo com a metodologia de Szklarz et al. (1989), utilizando seringaldazina como substrato. Os cálculos para as atividades enzimáticas foram realizados de acordo com o método proposto por Zeraik et al. (2008).

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

A capacidade de descoloração do corante RBBR por fungos ocorre devido a produção das enzimas lignolíticas, como a lacase e as peroxidases (CONCEIÇÃO, 2010; YAMANAKA; MACHADO, 2007). Após o período de incubação dos fungos no meio MEA + RBBR, verificou-se que os fungos foram capazes de descolorir o corante RBBR (Figura 1). A descoloração do meio confirma a capacidade de atividade lignolítica desses fungos.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

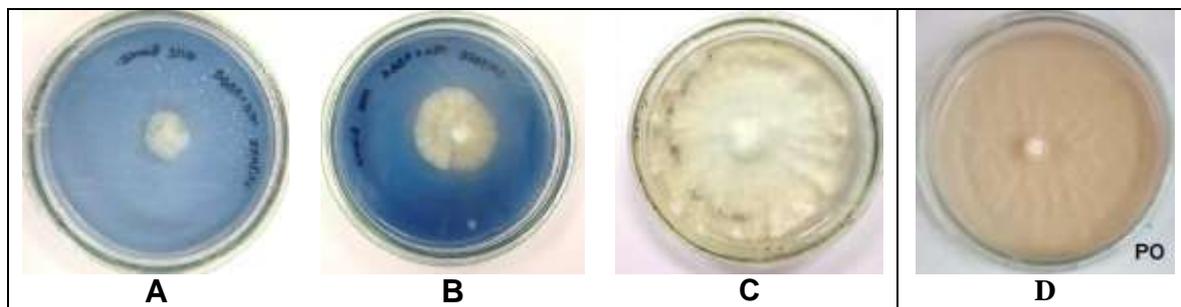


Figura 1 - Descoloração do meio MEA+RBBR pelo fungo *L. edodes* após (A) 4 dias; (B) 8 dias e (C) 14 dias e do fungo *P. ostreatus* após (D) 14 dias de cultivo

O meio de cultivo contendo bagaço de cana e vinhaça propiciou o crescimento dos fungos com produção da enzima lacase.

A atividade da enzima lacase, pelos fungos *L. edodes* e *P. ostreatus*, em fermentação semissólida, meio contendo bagaço e vinhaça, apresentou maior produção no 12º dia, com uma queda a partir do 15º dia (Figura 2).

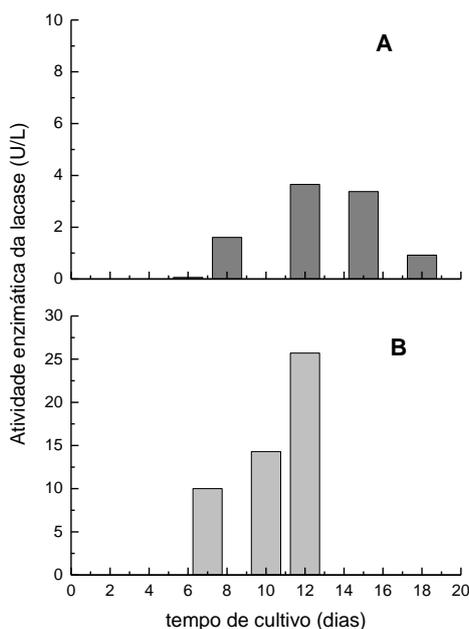


Figura 2 - Atividade de lacase produzida durante cultivo semissólido (FSS) dos fungos (A) *Lentinus edodes* ou (B) *Pleurotus ostreatus*.

### CONCLUSÕES

Os fungos *L. edodes* e *P. ostreatus* foram capazes de descolorir o corante Azul Brillante de Remazol (RBBR) em até 14 dias de cultivo.

A fermentação em sistema semissólido em meio contendo vinhaça e bagaço proporcionou a produção da enzima lacase pelos fungos.



## XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL (BRASIL). CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS. Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável. 1 ed. Rio de Janeiro: Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social, 2008. 314 p.

CONCEIÇÃO, T.A. **Estudo da produção de enzimas ligninolíticas por fungos Agaricomycetes cultivados em resíduos agro-industriais do Estado da Bahia**. 2010. 93 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal de Feira de Santana, Feira de Santana, 2010.

GOMES, E. et al. Ligninases production by basidiomycetes strains on lignocellulosic agricultural residues and their application in the decolorization of synthetic dyes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 31-39, 2009

HON, D.N.S. Chemical modification of lignocellulosic materials. Nova York: New York M. Dekker, 1996. 370p.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Economic Utilization of Crop Residues for Value Addition: A Futuristic Approach. **Journal of Scientific & Industrial Research**, Curitiba, v. 59, n. 1, p. 12-22. jan. 2000.

Pinto, G.A.S. et al. **Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais**. Comunicado técnico on line 102 – Embrapa agosto 2005. 4p.

ROCHA, G.J.M.; NASCIMENTO, V.M.; GONÇALVES, A.R.; SILVA, V.F.N.; MARTÍN, C. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical-chemical composition, **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 52-58. Feb 2015. [dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.003](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.003).

SZKLARZ, G. et al. Production of phenoloxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycologia**, Lancaster, v. 81, p. 234-240, 1989.

ZERAIK, A.E; SOUZA, F.S; FATIBELLO-FILHO, O. Desenvolvimento de um spot test para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 731-734, 2008.

YAMANAKA, R.; MACHADO, K.M.G. Influência do corante Azul Brilhante de Remazol R sobre o sistema enzimático ligninolítico de *Psilocybe castanella* CCB444 em meio de cultivo sintético. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p.1119-1121, jul. 2007.