

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
BACHARELADO EM QUÍMICA**

AMANDA IAPICHINI FERNANDES

**APROVEITAMENTO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA A
PRODUÇÃO DE LACASE POR *Pleurotus ostreatus***

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**CURITIBA
2016**

AMANDA IAPICHINI FERNANDES

**APROVEITAMENTO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA A
PRODUÇÃO DE LACASE POR *Pleurotus ostreatus***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2 do curso superior de Bacharelado em Química Tecnológica do Departamento Acadêmico de Química e Biologia – DAQBi – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná- UTFPR, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Química Tecnológica.

Orientador: Prof^o. Dr. Gustavo Henrique Couto
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Giselle Maria Maciel

CURITIBA

2016

AMANDA IAPICHINI FERNANDES

**APROVEITAMENTO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA A PRODUÇÃO
DE LACASE POR *Pleurotus ostreatus***

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial à obtenção do grau de BACHAREL EM QUÍMICA pelo Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBI) do Câmpus Curitiba da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, pela seguinte banca examinadora:

Avaliador: Profa. Dra. Cristiane Pilissão
Departamento Acadêmico de Química e Biologia, UTFPR

Avaliador: Profa. Dra. Marlene Soares
Departamento Acadêmico de Química e Biologia, UTFPR

Prof. Dr. Gustavo Henrique Couto

Orientador

Dra. Danielle Caroline Schnitzler

Coordenadora de Curso

Curitiba, 11 de novembro de 2016.

RESUMO

FERNANDES, Amanda Iapichini. **APROVEITAMENTO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA A PRODUÇÃO DE LACASE POR *Pleurotus ostreatus***. 2016. 44 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Química) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2016.

Atualmente, é possível verificar um aumento do interesse mundial em relação aos problemas que afetam o meio ambiente como um todo, dentre eles a produção excessiva e o tratamento de resíduos gerados em atividades industriais e agroindustriais. O foco de muitos estudos está na busca de alternativas para diminuir a geração de resíduos, bem como formas de tratamento e aproveitamento em produtos de maior valor agregado. Como opção para essa questão está a utilização das enzimas, catalisadores biológicos capazes de degradar poluentes e resíduos industriais, que podem ser produzidas por microrganismos, como bactérias e fungos. As lacases, enzimas de grande interesse biotecnológico e que podem degradar a lignina, são secretadas por fungos da podridão branca quando estes estão na presença de substratos lignocelulósicos e outros compostos indutores. O objetivo desse trabalho foi a produção de um complexo enzimático rico em lacases a partir de um fungo da podridão branca, *Pleurotus ostreatus*, por fermentação no estado sólido (FES) utilizando o bagaço da cana-de-açúcar como fonte de carbono. A metodologia utilizada para determinação da atividade enzimática foi a oxidação do ABTS (2,2'-azino-bis(3-etiltiazolina-6-sulfonato)). Através do planejamento fatorial completo 2^4 com 4 repetições no ponto central, observou-se que a melhor condição para produção de lacase foi aos 7 dias de fermentação onde todas as variáveis foram adicionadas ao meio (condição 16). O resultado obtido foi de 833,83 U L⁻¹. Através de uma análise estatística também foi possível determinar que o sulfato de amônio foi a variável que mais exerceu influência nos resultados obtidos.

Palavras-chave: Planejamento fatorial. Fermentação. Enzimas lignocelulolíticas.

ABSTRACT

FERNANDES, Amanda Iapichini. **USE OF SUGAR CANE BAGASSE FOR LACCASE PRODUCTION BY *Pleurotus ostreatus***. 2016. 44 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Química) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2016.

Currently, it's possible to perceive a rise in global interest regarding the problems that affect the environment as a whole, including the excessive production and treatment of waste generated by industries, agrobusiness and others. The focus of many studies is the search for alternatives to reduce waste generation, as well as ways of treating these more efficiently. As alternatives, the enzymes arise, biological catalysts capable of degrading organic pollutants and industrial waste, which can be produced by microorganisms such as bacteria and fungi. Laccases, enzymes of great biotechnological interest that can degrade lignin, are secreted by white rot fungi when they are in the presence of lignocellulosic substrates and other inducing compounds. Therefore, the aim of this work was the production of an enzyme complex rich in laccases from a white rot fungus, *Pleurotus ostreatus*, by solid state fermentation (SSF) using bagasse from sugarcane as a carbon source. The methodology used for determining the enzymatic activity was the oxidation of ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethyliazolona-6-sulfonate)). Through the full factorial planning 2^4 with four repetitions at the central point it was observed that the best condition for laccase production is at 7 days of fermentation where all variables were added to the medium (condition 16). The best activity was 833.83 U L^{-1} . Through the statistical analysis was also possible to determine that the ammonium sulfate was the variable that showed more influence on the results.

Key words: Factorial planning. Fermentation. Lignocellulolytic enzymes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Geração de resíduos lignocelulósicos no Brasil de 1990 a 2007.....	10
Figura 2: Crescimento da produção de cana-de-açúcar no Brasil de 2000 a 2014.....	11
Figura 3: Esquema da metodologia utilizada para inoculação de <i>P. ostreatus</i> nos frascos Erlenmeyer do experimento.....	23
Figura 4: Meio de cultivo contendo o substrato, o inóculo e a solução base.....	25
Figura 5: Cinética de produção de lacases por <i>Pleurotus ostreatus</i>	28
Figura 6: Representação gráfica das atividades enzimáticas correspondentes aos dias 5, 7, 10 e 12 de fermentação das 8 melhores condições.....	30
Figura 7: Resultados dos testes ANOVA. Sendo a) 5 dias de fermentação, b) 7 dias de fermentação, c) 10 dias de fermentação e d) 12 dias de fermentação.....	33
Figura 8: Diagrama de Pareto para 5 dias de fermentação.....	34
Figura 9: Diagrama de Pareto para 7 dias de fermentação.....	34
Figura 10: Diagrama de Pareto para 10 dias de fermentação.....	35
Figura 11: Diagrama de Pareto para 12 dias de fermentação.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição da solução basal e respectivas concentrações utilizadas nos experimentos.....	24
Tabela 2: Variáveis utilizadas na otimização.....	25
Tabela 3: Matriz do planejamento fatorial experimental 24 para os ensaios do experimento.....	26
Tabela 4: Variáveis e níveis do planejamento fatorial completo 24 para avaliação da influência da fonte de N e concentração do indutor na produção de lacase.....	26
Tabela 5: Atividades enzimáticas correspondentes aos dias 5, 7, 10 e 12 de fermentação nas condições previamente estabelecidas pelo planejamento fatorial.....	29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 JUSTIFICATIVA	10
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	11
3.1 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS.....	11
3.1.1 Bagaço de cana-de-açúcar	12
3.1.2 Composição dos resíduos lignocelulósicos	13
3.3 FUNGOS DA DECOMPOSIÇÃO BRANCA	14
3.4 PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO	16
3.5 ENZIMAS DO COMPLEXO LIGNOCELULOLÍTICO	17
3.5.1 Peroxidases	18
3.5.2 Lacases	19
3.6 APLICAÇÕES DAS LACASES	20
3.6.1 Indústria de papel e celulose	20
3.6.2. Produção de bioetanol	21
3.6.3. Indústria têxtil.....	22
3.6.4 Indústria de alimentos.....	22
4 OBJETIVOS	23
4.1 OBJETIVO GERAL.....	23
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
5 METODOLOGIA	24
5.1 MANUTENÇÃO DA CEPA E PREPARO DO INÓCULO	24
5.2 PREPARO DO SUBSTRATO	24
5.3 FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO (FES).....	25
5.4 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE	27
5.5 EXTRAÇÃO AQUOSA E MEDIDA DA ATIVIDADE DA LACASE.....	28
5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
6.1 CINÉTICA DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA.....	29
6.3 PRODUÇÃO DE LACASE	30
6.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
7 CONCLUSÃO	38
8 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS	39
REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

A valorização dos resíduos agroindustriais através da utilização de rotas biológicas tem contribuído para o desenvolvimento de processos sustentáveis, gerando produtos com um maior valor agregado. Muitos estudos descrevem bioprocessos que utilizam resíduos como bagaços e cascas para produção de bioetanol, cogumelos, ácidos orgânicos, aminoácidos e enzimas.

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, seguido pela Índia e China, o que resulta em uma produção de aproximadamente 320 kg de bagaço para cada tonelada de cana moída, segundo a Conab. Existe um grande potencial energético no bagaço da cana-de-açúcar e, por isso, a cada tonelada de cana colhida, 90% do bagaço resultante é destinado para produção de energia através da queima, segundo a única (União das Indústrias de Cana-de-Açúcar)⁸. Esse tipo de atividade, mesmo que seja de grande importância para suprir as necessidades energéticas do país, gera muitos compostos poluentes e produtos resultantes da combustão incompleta. Assim, é interessante que novas formas de reaproveitamento desses resíduos lignocelulósicos sejam testadas.

O bagaço da cana pode ser utilizado como substrato na fermentação no estado sólido, agregando valor a esse resíduo e evitando o descarte de toneladas de material de modo indevido. Isso se dá devido à composição do bagaço, que estimula a produção de enzimas por parte de microrganismos e, assim, a produção de enzimas se torna mais sustentável. Dentre esses métodos, as enzimas têm se mostrado alternativas eficientes no tratamento de resíduos.

As enzimas são catalisadores biológicos capazes de degradar uma infinidade de compostos, inclusive os recalcitrantes. Sua utilização vem sendo aplicada em muitas áreas industriais como tratamento de resíduos, produção de biocombustíveis, indústria de vinhos, indústria de alimentos, várias indústrias têxteis e indústrias de materiais de limpeza, entre outros. Microrganismos, como fungos e bactérias, são capazes de produzir enzimas através de seu metabolismo. Os fungos da podridão branca produzem enzimas lignocelulolíticas, amplamente aplicadas em muitos processos de tratamento, descoloração e remoção de compostos fenólicos.

As lacases, enzimas muito eficazes em vários processos industriais, são vastamente aplicadas nos processos de bi branqueamento e biopolpação da

indústria de papel e celulose, na remoção de compostos fenólicos da indústria de vinho, na descoloração e alvejamento de peças na indústria têxtil e na remoção de cor e outros processos na indústria de limpeza. Elas agem quebrando a lignina presente em vários materiais e/ou resíduos, removendo compostos indesejados de alguns produtos e, assim, facilitam processos posteriores com o objetivo de evitar a utilização de produtos químicos.

Nesse contexto, esse trabalho visa reaproveitar o bagaço da cana-de-açúcar, testando seu potencial como substrato na fermentação do estado sólido (FES) com diferentes concentrações de nutrientes, a fim de se obter um extrato enzimático rico em lacases utilizando o fungo *Pleurotus ostreatus*.

2 JUSTIFICATIVA

Atualmente, existem muitos estudos que visam reaproveitar resíduos industriais e agroindustriais em processos biotecnológicos com o objetivo de agregar valor e diminuir a quantidade de material que é descartado sem o esgotamento de seu potencial energético. Muitos resíduos agroindustriais como bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz e de eucalipto podem ser aplicados como suporte e substrato para o crescimento de microrganismos com a finalidade de obtenção de enzimas.

O Brasil, o maior produtor de cana-de-açúcar no mundo, não esgota todos os recursos provenientes dessa planta, obtendo o bagaço em quantidades elevadas como resíduo do processamento da planta. Um de seus usos posteriores é a geração de energia através da queima, atividade útil para as usinas, mas que ao mesmo tempo resulta na emissão de compostos poluentes para o meio ambiente. O bagaço da cana, constituído por uma grande quantidade de celulose, hemicelulose e lignina, tem um alto potencial de servir como fonte de carbono na produção de enzimas lignocelulolíticas. Atualmente, o maior objetivo das pesquisas relacionadas à produção de enzimas é otimizar os bioprocessos a fim de aumentar a produção de enzimas e suas atividades específicas a um custo baixo.

As lacases, enzimas que podem ser produzidas por fungos como o *Pleurotus ostreatus*, ganharam o interesse de indústrias de diferentes ramos. Essa atenção se deve à sua aplicação na substituição de produtos químicos utilizados em catálise de reações. Uma das aplicações mais promissoras dessas enzimas está na possibilidade de degradar compostos recalcitrantes, presentes no ambiente ou em efluentes industriais. Além de apresentarem grande eficiência, também se destacam como uma tecnologia mais limpa frente a outros processos de tratamento químico.

A produção e a secreção de enzimas pode ser influenciada por vários parâmetros como natureza do substrato, disponibilidade de nutrientes, pH do meio e temperatura de cultivo. Para estudar a viabilidade desse processo biotecnológico, faz-se necessário um ajuste dessas variáveis. Dessa forma, somando a necessidade de aproveitamento desse resíduo agroindustrial, este trabalho visa otimizar o processo de obtenção da enzima, utilizando o bagaço como substrato de baixo custo para a fermentação, a fim de estudar a viabilidade da aplicação desta tecnologia pela indústria.

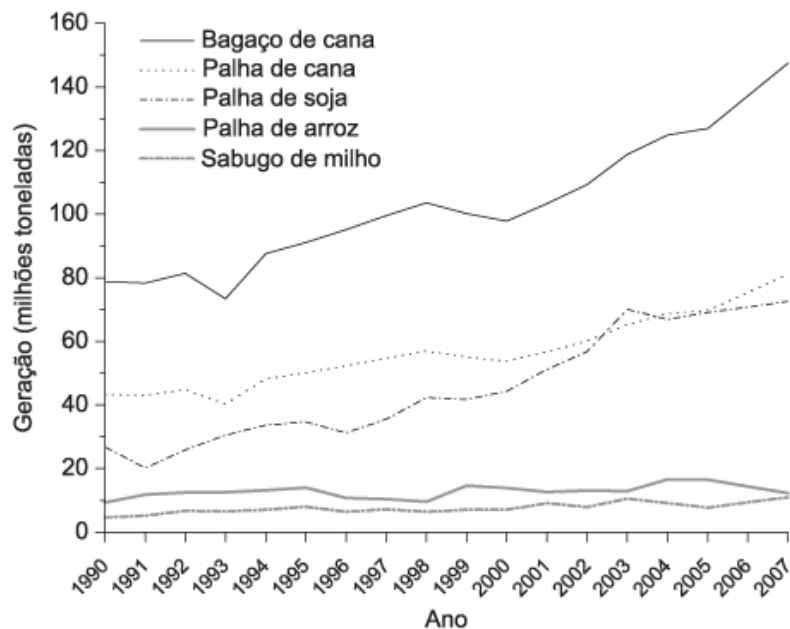
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

A principal atividade comercial brasileira é a agricultura. Isso se deve à grande extensão do país, que possibilita a ocorrência de muitos tipos de solos férteis, além de apresentar climas que propiciam a atividade agrícola. Como principais culturas, destacam-se a soja, milho, arroz, cana-de-açúcar e o feijão.

Essa exploração agrícola gera uma grande quantidade de resíduos agroindustriais. Estima-se que, no ano de 2007, 606 milhões de toneladas desses resíduos foram geradas no Brasil. Na Figura 1 está representada a geração de resíduos em toneladas no Brasil dos anos 1990 a 2007.¹

Figura 1: Geração de resíduos lignocelulósicos no Brasil de 1990 a 2007



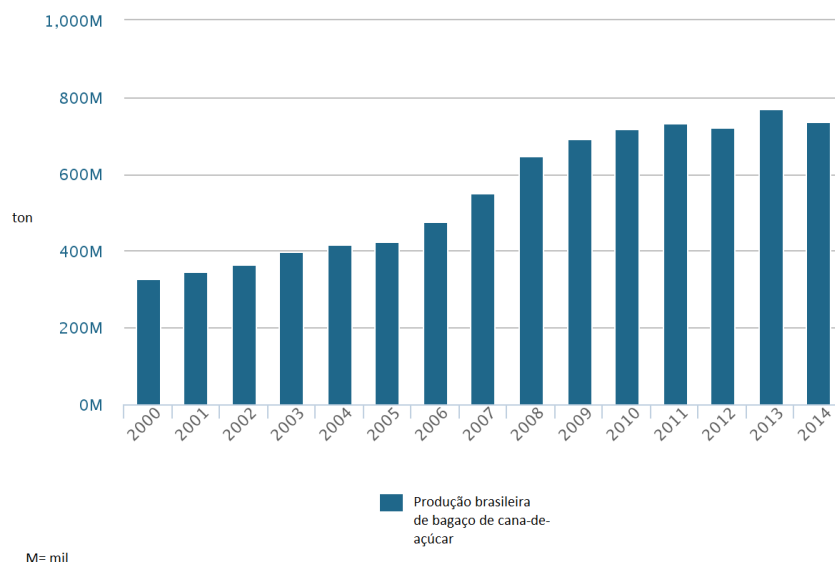
Fonte: Castro (2010)¹

3.1.1 Bagaço de cana-de-açúcar

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar além de responsável por grande parte do açúcar comercializado no mundo, contabilizando 40% das exportações mundiais. Na safra de 2015/2016, o Brasil produziu 665,6 milhões de toneladas, 4,9% a mais do que a safra anterior.^{2,3}

A produção de cana tem aumentado consideravelmente com o decorrer dos anos, conforme apresentado na Figura 2.

Figura 2: Crescimento da produção de cana-de-açúcar no Brasil de 2000 a 2014



Fonte: Adaptado de FAO⁴

Essa intensa exploração resulta em uma grande quantidade de resíduos. Estima-se que a cada tonelada de cana moída, são gerados 320 kg de bagaço. Muitos destes resíduos são descartados em aterros, queimados em caldeiras para geração de energia ou aplicados na fabricação de ração animal. Porém, comparado a quantidade de resíduos que é gerada, essas aplicações não são suficientes para evitar que uma grande quantidade destes ainda necessite de outras formas de disposição, além de nem sempre serem soluções ambientalmente corretas. O foco de muitos estudos está na reutilização desses resíduos com o objetivo de aumentar seu valor agregado.^{5,6,7,8}

O bagaço da cana-de-açúcar é composto por 32-48% de celulose, 19-24% de hemiceluloses, 23-32% de lignina, 3,2-5,5% de cinzas, 0,10-0,15% de enxofre, 0,73-0,97% de potássio, 10,0% de extraíveis e 1,2% de proteínas.⁹

3.1.2 Composição dos resíduos lignocelulósicos

Os resíduos lignocelulósicos são materiais constituídos majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina. Esses componentes são unidos por ligações covalentes, formando uma rede resistente à ataques microbianos. 97-99% da matéria seca é formada por esses 3 compostos.¹

A celulose é o polímero de maior ocorrência natural, por se tratar da base estrutural da parede celular das plantas. É um homopolissacarídeo formado por unidades repetidas de celobiose, onde as moléculas de glicose são ligadas por ligações glicosídicas do tipo β (1,4). A orientação equatorial das hidroxilas anoméricas confere linearidade à estrutura molecular. As hemiceluloses são heteropolissacarídeos altamente ramificados, constituídos por pelo menos dois tipos de monossacarídeos como hexoses (D-glucose, D-manose, D-galactose), pentoses (D-xilose, L-arabinose, L-raminose) e ácidos urônicos. Essas moléculas se associam à parede celular da planta impedindo que as microfibrilas de celulose se toquem. As proporções dos componentes variam de acordo com o tipo e espécie das plantas.¹⁰

A lignina é um material polifenólico presente nas paredes celulares das plantas e, depois da celulose e da hemicelulose, é o composto mais abundante na natureza. Além da sua recalcitrância, até que ocorra sua degradação, esse composto impede que as enzimas responsáveis pela degradação da celulose atinjam as camadas mais internas da parede celular.^{10,11}

Existe um grande interesse econômico no desenvolvimento de processos que possam aplicar esses resíduos para geração de energia, produção de alimentos e produção de microrganismos e enzimas de interesse biotecnológico.⁷

A degradação dos materiais lignocelulósicos, muitas vezes é ineficiente, pois os polímeros de celulose e hemicelulose são insolúveis ou estão fortemente ligados à uma matriz insolúvel. Além disso, os ácidos ferúlicos e p-cumárico se ligam covalentemente aos açúcares presentes no material, alterando as propriedades da

parede celular e sua biodegradabilidade, além de serem tóxicos aos microrganismos.^{12,13}

Para que a biomassa seja reutilizada em outros processos, é necessário que as camadas mais internas estejam acessíveis aos agentes que serão utilizados. Para isso, realizam-se diferentes tratamentos para abrir as cadeias do material para fazer com que a biomassa seja mais facilmente acessada pelos microrganismos e para facilitar a obtenção de açúcares fermentáveis. A vantagem de se utilizar um procedimento biológico é não formar inibidores de reação, além de ser ambientalmente favorável.^{12,14}

Dependendo do tipo de tratamento utilizado, é possível observar diferentes efeitos no substrato, os quais podem contribuir positivamente na hidrólise do material. Alguns desses efeitos são o aumento da porosidade do material devido à remoção total ou parcial da lignina, ruptura da estrutura da lignina e das ligações com o resto do substrato, redistribuição da lignina, remoção da hemicelulose que impede o acesso das celulasas à celulose, ruptura da estrutura da hemicelulose, redução da cristalinidade da celulose, redução do grau de polimerização da celulose, redução do tamanho das partículas.¹⁴

3.3 FUNGOS DA DECOMPOSIÇÃO BRANCA

Ao longo dos anos, muitos microrganismos, incluindo bactérias e fungos, têm sido estudados e caracterizados pela sua capacidade de degradar materiais lignocelulósicos. Devido à capacidade da maioria dos fungos produzir enzimas lignocelulolíticas, esses organismos são preferência quando se trata de degradação de biomassa. A diversidade fúngica no Brasil permite que uma grande variedade de cepas possa ser analisada, a fim de obter informações acerca de sua capacidade para degradar biomassa e produzir enzimas de interesse biotecnológico.¹⁵

Os organismos mais efetivos na biodegradação são fungos filamentosos, pertencentes ao filo Basidiomycota. Entre esses, destacam-se os fungos da decomposição branca (capazes de degradar celulose, hemicelulose e lignina) e os fungos da decomposição marrom (capazes de degradar a porção polissacarídica do material). Devido à elevada massa molar e à insolubilidade dos seus componentes,

o substrato lignocelulósico só é passível de degradação no meio extracelular, o que demanda a produção de enzimas que possam converter esses componentes em compostos suscetíveis ao metabolismo intracelular do fungo. Os fungos, em geral, possuem dois sistemas de enzimas extracelulares: o sistema hidrolítico, responsável por produzir enzimas hidrolases para degradação de polissacarídeos, e o sistema ligninolítico, que degrada a lignina e provoca a abertura dos anéis fenil.¹⁶

Os fungos da decomposição branca, também chamados de fungos da podridão branca são os mais eficientes na deslignificação devido ao seu sistema lignocelulítico único. Esses fungos se mostram capazes de degradar e mineralizar uma grande variedade de compostos recalcitrantes devido a inespecificidade de seu mecanismo enzimático. Muitos desses compostos são poluentes, como pesticidas, organoclorados, bifenilas policloradas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, corantes e polímeros sintéticos.^{17,18,19}

Alguns fungos dessa classe produzem as três enzimas responsáveis pela degradação da lignina (manganês peroxidases, lignina peroxidases e lacases), porém outros produzem apenas algumas dessas enzimas. Esses catalisadores biológicos são essenciais no processo de biodegradação, mas para que ocorra mineralização da lignina, são necessárias algumas enzimas auxiliares. Em paralelo, diversas enzimas, como outras peroxidases, podem ser produzidas.¹⁸

Esse complexo enzimático é produzido pelo fungo através de um metabolismo secundário, já que a degradação da lignina não gera energia ao microrganismo. A síntese intracelular e excreção dessas enzimas aumenta em situações de falta de nutrientes, principalmente carbono e nitrogênio. Outros fatores que podem influenciar na produção enzimática são pH, agitação e temperatura. Portanto, diferentes condições de cultivo geram diferentes quantidades de enzimas produzidas.¹⁷

O mecanismo da degradação ainda não é completamente entendido devido à sua alta complexidade, pois além da variedade de enzimas, outras substâncias e interações fazem parte do processo e podem interferir no grau da biorremediação.¹⁸

O gênero de fungos *Pleurotus sp* tem sido estudada e cultivada intensivamente em várias partes do mundo. O maior interesse vem da capacidade de degradação desses fungos ser maior do que de outras espécies, além da facilidade do cultivo, que pode ser feito em vários substratos lignocelulósicos. A espécie *Pleurotus ostreatus* produz uma extensa variedade de enzimas

lignocelulíticas que contribuem para a degradação da parede celular do substrato. Porém, estudos reportam que a produção de enzimas por essa espécie depende da cepa, da composição do substrato e das condições de cultivo, sendo necessário um estudo a fim de encontrar a melhor condição de produção.^{20,21,22}

3.4 PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

A crescente necessidade de desenvolver métodos de reaproveitamento de resíduos, principalmente os agroindustriais, acompanha a demanda para otimizar a produção de enzimas lignocelulolíticas. A produção de lacases é normalmente realizada por dois métodos: fermentação submersa (FS) e fermentação em estado sólido (FES). Na fermentação submersa o meio de cultivo é líquido e a extração enzimática é realizada por simples filtração. Já na fermentação no estado sólido, a umidade utilizada é apenas a suficiente para que os microrganismos se desenvolvam.^{23,24}

Resíduos agroindustriais vêm sendo aplicados com sucesso como substratos na FES. O tipo e a composição de cada substrato pode influenciar os tipos e quantidades das enzimas produzidas pelos microrganismos.^{5,23}

A FES pode ser utilizada para, basicamente, 3 finalidades: enriquecimento do teor proteico dos resíduos, a fim de aplicá-los na alimentação; tratamento de resíduos, eliminando compostos recalcitrantes; produção de substâncias de alto interesse industrial, agregando valor ao resíduo utilizado.²⁵

Na FES, o substrato é sólido e o cultivo não possui água livre, somente a umidade pré-determinada necessária para o desenvolvimento do microrganismo. O substrato pode tanto ser utilizado como fonte de carbono, quanto suporte para os nutrientes necessários para o desenvolvimento microbiano. Os fungos são mais utilizados na FES, pois esse tipo de cultivo se assemelha ao ambiente natural desses microrganismos, que são capazes de se desenvolver em meios com baixa umidade. Porém, estudos provam que algumas espécies bacterianas podem se desenvolver adequadamente e gerar bons resultados na FES.^{10,24,26,27}

Além da possibilidade de aplicação dos resíduos agroindustriais, esse cultivo produz um extrato enzimático mais concentrado comparado ao extrato obtido na FS.

Também apresenta um baixo consumo de água e energia, além de ser um processo de baixo custo, tornando-o economicamente favorável.^{24,10}

Porém, alguns problemas são enfrentados durante o processo. A distribuição do calor gerado pelo metabolismo fúngico é deficiente, sendo esse o maior gargalo da FES, já que algumas enzimas produzidas por esse processo sofrem desnaturação pelo calor. Além disso, a agitação é ineficiente, gerando heterogeneidade no meio e gradientes de temperatura e nutrientes. Também existe uma grande dificuldade em aumentar a escala de produção devido ao difícil controle do processo e do crescimento microbiano.^{10,27}

Já denominado um processo de “baixa tecnologia”, atualmente tem sido aplicado com sucesso em várias áreas industriais. As biorefinarias têm dado muita importância à FES, já que a biomassa é uma fonte de energia que atende as necessidades energéticas das próximas gerações. Outra área que tem explorado essa técnica é a biorremediação, onde a FES tem mostrado seu valor ao tratar, com grande eficiência, produtos químicos poluentes e corantes sintéticos. Entre suas principais aplicações, destacam-se a biorremediação, produção de enzimas, bioconversão de biomassa, biopolpação, produção de antibióticos, biocombustíveis e biosurfactantes.²⁷

3.5 ENZIMAS DO COMPLEXO LIGNOCELULOLÍTICO

As enzimas modificadoras de lignina são extremamente importantes, não só na degradação da lignina, como também na degradação de outros compostos, poluentes ou não. As principais enzimas desse complexo são as oxidoredutases, LiP (lignina peroxidase) e MnP (manganês peroxidase), e a fenoloxidase, conhecida com lacase.¹⁷

3.5.1 Peroxidases

As peroxidases são as enzimas dependentes de peróxido de hidrogênio para atuar na degradação da lignina. Elas são responsáveis pela catálise da redução do peróxido e, simultaneamente, a oxidação de uma série de compostos.²⁸

A enzima MnP é uma glicoproteína glicosilada com um grupo prostético heme, peso molecular entre 32 e 62,5 kDa e é secretada em várias formas. Essa enzima age de forma singular quando comparada a outras enzimas que utilizam manganês como cofator redox. A MnP liga o Mn^{2+} à superfície de uma proteína, oxida-o e libera o cátion Mn^{3+} complexado com ácidos orgânicos. Além disso, essas enzimas podem gerar o quelato Mn^{3+} facilmente difundido na madeira, sendo uma grande vantagem quando se trata de fungos aplicados na degradação da lignina. Esse complexo age como um mediador para oxidar os terminais fenólicos da lignina. O sítio de ligação onde o Mn se liga é muito flexível, podendo se complexar com vários íons metálicos, como Cd^{2+} e Co^{2+} , além da inibição da oxidação a Mn^{3+} pelos íons Sm^{3+} e Eu^{3+} . Uma característica interessante desse tipo de peroxidase é sua capacidade de iniciar a formação de H_2O_2 através da oxidação do NADPH ou glutathione. Dessa maneira, o ciclo catalítico das peroxidases pode ser iniciado.^{28,29,30}

A LiP, em conjunto com a MnP, é a peroxidase mais conhecida atuando na degradação da lignina. É uma glicoproteína formada por um grupo prostético de ferro por molécula de proteína e seu peso molecular varia de 38 a 46 kDa. Apesar de ser uma típica peroxidase, a LiP apresenta capacidade de oxidar substratos que possuem altos potenciais redox, pois ela mesma apresenta um valor alto para esse parâmetro.³⁰

Essa enzima é capaz de oxidar compostos aromáticos não fenólicos presentes na estrutura dos materiais lignocelulósicos. Atua abstraindo um elétron de moléculas a fim de formar radicais reativos além de transformar fragmentos de lignina provenientes do mecanismo de ação das MnP.¹⁷

3.5.2 Lacases

As lacases são cuproproteínas independentes de peróxido, capazes de oxidar uma infinidade de compostos. Podem ser produzidas por todos os basidiomicetos, mesmo aqueles que não atuam na degradação de lignina. Alguns fungos da decomposição branca não são capazes de secretar MnP e LiP, porém são eficientes na biodegradação somente com a presença de lacases. Essas enzimas são caracterizadas pela baixa especificidade de substrato e sua capacidade catalítica varia de acordo com sua origem.^{30,31}

Assim como as peroxidases, as lacases são glicoproteínas extra ou intracelulares, formadas por quatro átomos de cobre no sítio ativo, que por sua vez são classificados em três tipos de acordo com sua ressonância paramagnética, e estão distribuídos em diferentes sítios de ligação. Eles se diferem em relação à sua acessibilidade para solventes e em seu espectro. O cobre do tipo 1 é acessível à solventes, inclusive água. Então, alguns complexos formados por cobre podem removê-lo da enzima e substituí-lo por mercúrio ou cobalto, o que resulta em uma grande perda de sua atividade. O cobre do tipo 2, além de interagir com íons fluoreto, é facilmente eliminado da molécula quando em determinadas situações. Uma vez eliminados da molécula, os cobres de tipo 1 e 2 são impossíveis de serem embutidos novamente. Já o cobre do tipo 3 pode ser embutido novamente na apoenzima.^{17,32,33}

As lacases atuam em substratos fenólicos catalisando a remoção de um elétron de um grupo hidroxifenólico simultaneamente com a redução do oxigênio à água e formação de radicais fenólicos. O oxigênio que participa como segundo substrato nessa reação é o oxigênio molecular. Elas podem catalisar a oxidação de vários compostos, como o,p-difenóis, aminofenóis, polifenóis, poliaminas, lignina, etc. Diferentemente de outras oxidases, a lacase provoca a redução do oxigênio diretamente à água através de um esquema mediador de quatro elétrons.^{17,32,33}

Devido ao seu baixo potencial redox, a lacase é incapaz de oxidar unidades não-fenólicas da lignina. Portanto, a lacase sozinha, somente consegue oxidar unidades fenólicas, que correspondem a menos de 20% das unidades de lignina na madeira.³⁴

Por esse motivo, as lacases são frequentemente aplicadas na presença de um mediador sintético como o hidroxibenzotriazol (HBT) e 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS). Esses mediadores, compostos de baixo peso molecular, são oxidados pela enzima até a formação de radicais estáveis e atuam como mediadores, permitindo que a enzima oxide outros compostos.³⁰

É provado que os quatro átomos de cobre formadores da enzima participam da catálise e os elétrons podem adentrar a molécula de várias formas. O mecanismo da reação se inicia quando ocorre uma transferência de elétron para um dos átomos de cobre e então se forma um radical livre a partir de um substrato orgânico. A redução do oxigênio forma duas moléculas de água, uma delas é transportada rapidamente para a solução e a outra permanece ligada fortemente ao íon cobre 2.³³

Estudos feitos com a lacase proveniente de *Rhus vernicifera*, mostram que as enzimas podem se apresentar em estados ativos e inativos. Quando em estado ativo, os íons de cobre do tipo 1 e 3 possuem uma relação intramolecular, o que não acontece quando em estado inativo. A interação de uma enzima em seu estado ativo com a molécula de oxigênio só ocorre quando todos os íons de cobre estão em estado monovalente.³³

As lacases podem ser aplicadas em diversas áreas como biorremediação, indústria de papel e celulose, produção de bioetanol, indústria de produtos de limpeza, biossensores, indústria de alimentos, indústria têxtil, entre outros. Na maioria dessas aplicações, elas são utilizadas em conjunto com mediadores redox. Um dos fatores limitantes para que o uso dessas enzimas seja mais difundido é a dificuldade de aumentar sua escala de produção. Isso se deve à falta de um sistema de produção em grande escala que seja eficiente e economicamente viável.³²

3.6 APLICAÇÕES DAS LACASES

3.6.1 Indústria de papel e celulose

A utilização de enzimas nessa indústria se dá nos processos de biopolpação e biobranqueamento. Geralmente, a técnica de biopolpação é feita antes da

polpação, mas também pode ser aplicada entre fases do refino. O processo consiste em utilizar as enzimas produzidas pelos fungos da podridão branca para degradar compostos da parede celular da madeira. O processo acontece, pois as enzimas são capazes de despolimerizar a lignina quebrando ligações éter, deixando celulose e hemicelulose intactas para o posterior processo de polpação.^{34,35}

A vantagem dessa utilização é a menor demanda de energia comparada ao refino mecânico da polpa, além do aumento da resistência do papel e diminuição do impacto ambiental do processo. Embora o sistema de biopolpação possua um alto custo, ele é compensado pela economia final do processo, já que a demanda de reagentes químicos é diminuída.^{34,36}

O biobranqueamento é um método de prétratamento que visa modificar a polpa para facilitar o processo de branqueamento químico. O processo químico utiliza substâncias como sulfito, soda e cloro e é altamente eficiente, porém afeta o meio ambiente pela presença do Cl_2 . A lacase oxida os grupos hidroxifenólicos na polpa, transformando-os em radicais fenóxi. Essa transformação resulta em despolimerização ou polimerização promovendo o biobranqueamento através da deslignificação.³⁴

É importante que as enzimas do complexo lignocelulítico sejam extremamente seletivas à lignina, para evitar perdas de polpa durante o processo que possam acarretar a perda da viscosidade.³⁴

3.6.2. Produção de bioetanol

O desenvolvimento de combustíveis de segunda geração a partir de biomassa lignocelulósica apresenta vantagens do ponto de vista econômico e ambiental. Muito se tem pesquisado acerca de conversões eficientes da biomassa em etanol ou compostos de maior valor agregado. A separação insuficiente da celulose e da lignina e a formação de produtos que inibem a produção de etanol são alguns dos obstáculos encontrados nesse processo.³⁷

As lacases são aplicadas nos substratos lignocelulósicos a fim de degradar a lignina e permitir que a celulose se torne acessível aos outros organismos que vão realizar a fermentação para obtenção do bioetanol. Esse processo, conhecido como

deslignificação, se mostrou eficiente na otimização da produção do etanol celulósico. A enzima diminui a quantidade de compostos fenólicos, possibilitando um maior crescimento das leveduras responsáveis pela conversão da biomassa e, conseqüentemente, um aumento da produção do bioetanol.^{37,38}

3.6.3. Indústria têxtil

Essa indústria é responsável pelo maior consumo de corantes no mercado. Visto que os tratamentos existentes não são completamente eficazes para remoção desses corantes dos efluentes provenientes dessa atividade, as enzimas têm sido amplamente aplicadas.³⁹

As lacases, além de serem utilizadas na remoção de corantes dos efluentes, têm sido utilizadas no clareamento de materiais têxteis e também na sintetização de novos corantes.³⁹

3.6.4 Indústria de alimentos

As lacases podem ser aplicadas em processos que modificam a cor e a aparências dos alimentos. O escurecimento e a turbidez dos alimentos podem ser provocados pela presença de compostos fenólicos nos mesmos, caso onde essa enzima pode ser de grande utilidade.⁴⁰

Além disso, elas são utilizadas em processamento de bebidas, determinação de ácido ascórbico, obtenção de pectina da beterraba e em massas de panificação. Ainda se torna necessário estudar técnicas de menor custo para que sua aplicação seja mais difundida.⁴⁰

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar via planejamento fatorial a produção de lacase por *Pleurotus ostreatus* através do processo de fermentação no estado sólido (FES) utilizando bagaço de cana-de açúcar como principal substrato.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

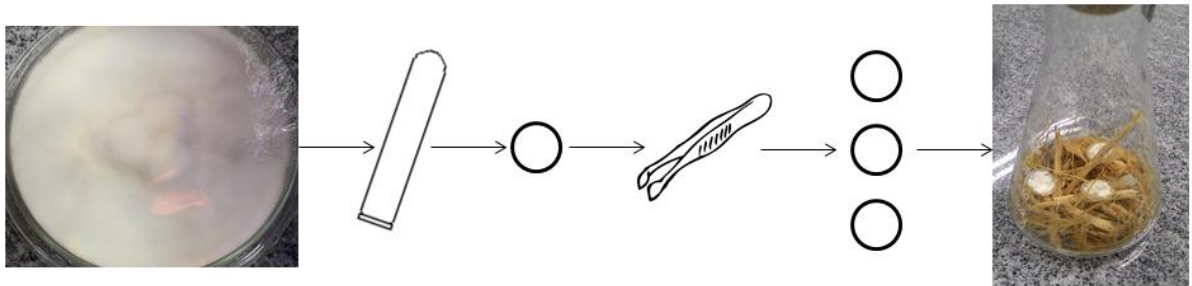
- Determinar a cinética de produção de lacase por *P. ostreatus*
- Selecionar a melhor composição do meio de cultivo baseado em bagaço de cana, utilizando diferentes concentrações de indutores e diferentes fontes de nitrogênio através de um planejamento fatorial e caracterizar a lacase produzida por meio de medida de sua atividade no extrato enzimático.

5 METODOLOGIA

5.1 MANUTENÇÃO DA CEPA E PREPARO DO INÓCULO

A cepa de *Pleurotus ostreatus* foi obtida a partir banco de cepas microbianas do Laboratório de Biotecnologia da UTFPR. A manutenção do fungo para utilização e repique foi feita em placas de Petri com Ágar Batata Dextrose (PDA) com incubação em estufa a 28°C durante 7 dias seguido de armazenamento a 4°C. Para a FES, foram retirados, com auxílio de tubos de ensaio estéreis, plugs circulares de aproximadamente 15 mm, posteriormente depositados sobre o substrato com o micélio voltado para cima. Foram adicionados, com auxílio de uma pinça, 3 plugs contendo o micélio em cada Erlenmeyer. A Figura 3 mostra um esquema do procedimento utilizado para inoculação do fungo no meio de cultivo.

Figura 3: Esquema da metodologia utilizada para inoculação de *P. ostreatus* nos frascos Erlenmeyer do experimento



5.2 PREPARO DO SUBSTRATO

O bagaço da cana-de-açúcar utilizado como substrato de crescimento para o *P. ostreatus* foi coletado em pontos de venda de caldo de cana localizados na cidade de Curitiba, PR. Após a coleta, o bagaço foi lavado em água corrente abundante e seco em estufa a 50°C durante 48 h. Em seguida o bagaço foi triturado

utilizando liquidificador comercial e fracionado através de peneiras do tipo Mesh para seleção de fragmentos entre 2,0 e 10,0 mm que foram armazenados e utilizados para os estudos de FES. O teor de açúcares redutores residuais do bagaço após lavagem foi verificado após fervura de 1 g bagaço em 100 mL de água durante 10 min, seguido de filtração e hidrólise ácida do filtrado para a determinação dos açúcares redutores pelo método do DNS (ácido dinitrosalicílico).⁴¹

5.3 FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO (FES)

Para os estudos de FES foram adicionados 5 g de bagaço de cana-de-açúcar em Erlenmeyers (250 mL) seguido da adição de 15 mL de uma solução basal de sais (Tabela 1) que corresponde a uma umidade 75-80% através da equação (1), onde m_{H_2O} corresponde à massa de solução, m_s à massa de bagaço seco, X_1 a % de umidade inicial do substrato e X_2 a % final de umidade. Antes de completar o volume dessa solução, o pH foi ajustado para 5,5 com HCl 0,5 M ou NaOH 0,5M.

$$m_{H_2O} = m_s \frac{(X_2 - X_1)}{(1 - X_2)} \quad (1)$$

Tabela 1: Composição da solução basal e respectivas concentrações utilizadas nos experimentos. (MENEZES,2009)⁴²

Solução	Concentração no cultivo (g L ⁻¹)
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3
CaCl ₂	0,3
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,5 10 ⁻²
MnSO ₄ .H ₂ O	0,156 10 ⁻²
CoCl ₂	0,2 10 ⁻²
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,14 10 ⁻²

Na Tabela 2 estão dispostas as variáveis do planejamento experimental que foram utilizadas no trabalho com a finalidade de otimizar a produção de lacase.

Tabela 2: Variáveis utilizadas na otimização.

Solução	Variável
Extrato de levedura	Fonte de nitrogênio
Extrato de malte	Fonte de nitrogênio e carbono
Sulfato de amônio	Fonte de nitrogênio
Sulfato de cobre	Fonte de cobre

As diferentes fontes de nitrogênio, carbono e o indutor (CuSO₄) foram adicionados conforme planejamento fatorial (item 5.4). Cada meio de cultivo em Erlenmeyer foi inoculado com 3 plugs circulares obtidos através de cortes de PDA contendo o fungo e o cultivo realizado em estufa a 28°C, exclusivamente em regime estático durante o período de 288 h. A cinética da produção de lacase, utilizando a condição 2 do planejamento fatorial (contendo apenas 2,5 g L⁻¹ de sulfato de amônio), para determinar o pico de atividade foi determinada a cada 48 h de fermentação, sendo a primeira extração realizada após 72 h. A Figura 4 mostra um meio de cultivo pronto para ser submetido ao período de incubação a 28 °C.

Figura 4: Meio de cultivo contendo o substrato, o inóculo e a solução base

5.4 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE

Um planejamento experimental Fatorial 2^4 com quatro repetições no ponto central, conforme disposto na Tabela 3, foi realizado para a avaliação do processo de produção de lacase, totalizando 20 ensaios. Este planejamento foi utilizado para o meio contendo bagaço de cana e as variáveis estudadas foram a concentração de sulfato de cobre (indutor da atividade lacase) e as fontes adicionais de nitrogênio e carbono (sulfato de amônio, extrato de levedura e extrato de malte), cujos níveis estão apresentados na Tabela 4. Os resultados obtidos na produção de lacase foram analisados no programa StatisticaTM (8.0) realizando-se uma estimativa dos efeitos das variáveis sobre a resposta analisada.

Tabela 3: Matriz do planejamento fatorial experimental 2^4 para os ensaios do experimento

Ensaio	Sulfato de amônio	Extrato de levedura	Extrato de malte	Sulfato de cobre
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1
13	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	1
15	-1	1	1	1
16	1	1	1	1
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0

Tabela 4: Variáveis e níveis do planejamento fatorial completo 2^4 para avaliação da influência da fonte de N e concentração do indutor na produção de lacase.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Sulfato de amônio (g L^{-1})	0	1,25	2,5
Extrato de levedura (g L^{-1})	0	1,25	2,5
Extrato de malte (g L^{-1})	0	1,25	2,5
CuSO_4 (μM)	0	75	150

5.5 EXTRAÇÃO AQUOSA E MEDIDA DA ATIVIDADE DA LACASE

Para extração da lacase, 50,0 mL de água deionizada foram adicionadas aos Erlenmeyers contendo o meio de fermentação. Com auxílio de um bastão de vidro, as amostras foram homogeneizadas e alíquotas (4 mL) do extrato aquoso foram colocadas em Eppendorfs para serem armazenadas congeladas a -20 °C antes de serem submetidas à determinação da atividade enzimática logo após descongelamento.

Em tubos de ensaio limpos foram adicionados 0,2 mL da amostra, 0,4 mL da solução de ABTS 10 mM e 3,4 mL da solução de tampão acetato de sódio 50 mM e pH 5,0. Os tubos foram aquecidos em banho-maria a 40 °C por 5 minutos e então submetidos à leitura no aparelho. O espectrofotômetro foi zerado utilizando uma solução contendo o ABTS, a solução tampão e água deionizada em substituição à amostra no meio. A análise da atividade enzimática foi medida em espectrofotômetro com comprimento de onda fixo em 420 nm monitorando-se a oxidação do 2,2'-azino-bis(3-etiltiazolina-6-sulfonato), ABTS.⁴³

5.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para uma melhor interpretação dos resultados, foi realizada uma análise estatística dos dados obtidos experimentalmente. Com auxílio do software STATISTICA 13 foram realizados os testes estatísticos ANOVA e Diagrama de Pareto.

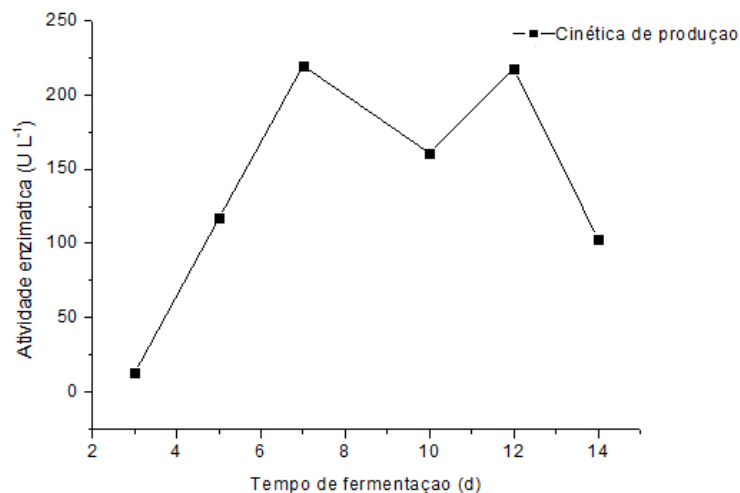
O teste ANOVA foi realizado com um nível de confiança de 95%, comparando a influência de cada variável nos resultados obtidos. Foram feitas análises separadas para os quatro dias de coleta (5, 7, 10 e 12 dias), para que fosse possível entender a influência das variáveis na produção de lacases de acordo com o tempo de fermentação.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 CINÉTICA DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

A cinética de produção enzimática em batelada foi realizada a partir de testes utilizando a condição 2 do planejamento fatorial (solução basal + 2,5 g L⁻¹ de sulfato de amônio). O ensaio foi realizado durante 14 dias para que se pudesse averiguar o pico de produção de lacase. Os resultados das atividades enzimáticas estão dispostos na Figura 5.

Figura 5: Cinética de produção de lacases por *Pleurotus ostreatus*



Assim, foi possível observar que a atividade enzimática se mostrou maior entre os dias 5 e 12, exceto a atividade do dia 10, que pode ter sido resultante do menor desempenho fúngico nessa replicata. Um estudo reporta que *Pleurotus sajor-caju* tem seu pico de produção ao décimo dia de fermentação com posterior decréscimo, assim como o *Pleurotus ostreatus*. Outro estudo encontrou picos de produção de lacase por *Pleurotus pulmonarius* em 10 dias de fermentação.^{21,44}

Por esse motivo, baseado nos resultados da cinética e em dados da literatura, decidiu-se que as alíquotas dos experimentos subsequentes seriam retiradas em 5 dias, 7 dias, 10 dias e 12 dias.

6.3 PRODUÇÃO DE LACASE

Para avaliar a produção de lacase pelo fungo *Pleurotus ostreatus* foram testadas diferentes composições do meio de cultivo utilizando o bagaço de cana como substrato/suporte para o crescimento fúngico. Foi avaliada a influência das variáveis: sulfato de amônio, extrato de malte, extrato de levedura e sulfato de cobre.

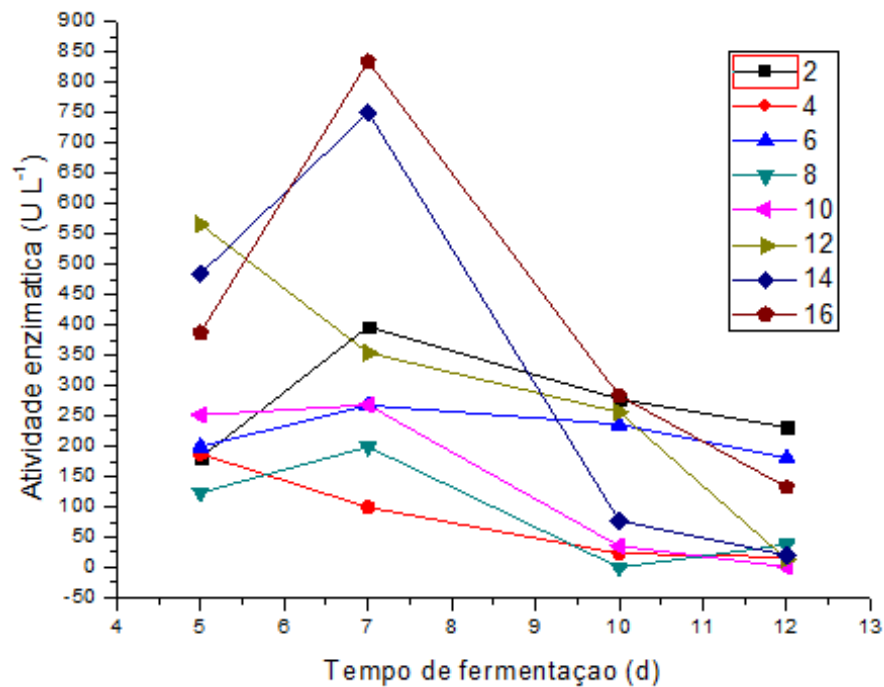
Após cada etapa do cultivo, foi possível caracterizar o extrato bruto obtido através da oxidação do ABTS com a intenção de se medir a atividade enzimática do extrato líquido fúngico.

Os resultados das atividades enzimáticas obtidas estão apresentados na Tabela 5, onde os maiores valores estão realçados, bem como na Figura 6 onde estão representadas as melhores condições para facilitar a comparação entre as condições de cultivo e suas respectivas atividades.

Tabela 5: Atividades enzimáticas correspondentes aos dias 5, 7, 10 e 12 de fermentação nas condições previamente estabelecidas pelo planejamento fatorial.

Tempo de fermentação (d)	1 (U/L)	2 (U/L)	3 (U/L)	4 (U/L)	5 (U/L)	6 (U/L)	7 (U/L)	8 (U/L)	9 (U/L)
5	3,16	181,15	16,98	187,31	1,33	198,97	7,16	123,21	93,24
7	33,30	396,77	20,15	99,07	10,32	267,07	5,99	198,97	46,45
10	12,15	277,39	0	23,14	0	235,76	0	0	45,12
12	5,33	230,77	0	16,82	0	179,82	0	37,46	11,43
Tempo de fermentação (d)	10 (U/L)	11 (U/L)	12 (U/L)	13 (U/L)	14 (U/L)	15 (U/L)	16 (U/L)	Ponto central (U/L)	
5	251,08	8,49	565,27	64,60	483,52	64,10	386,78	231,02 ± 146,31	
7	267,57	66,27	353,81	68,10	749,75	93,07	833,83	372,58 ± 168,51	
10	35,30	31,41	255,74	38,74	76,67	31,41	283,05	30,87 ± 13,84	
12	0,89	3,88	13,15	12,88	20,55	19,65	132,09	19,75 ± 14,22	

Figura 6: Representação gráfica das atividades enzimáticas correspondentes aos dias 5, 7, 10 e 12 de fermentação das 8 melhores condições.



A partir da análise desses dados, pode-se observar que a maioria das condições teve seu pico de atividade enzimática aos 7 dias de fermentação com decaimento da atividade aos 10 dias de fermentação. Na literatura, é possível encontrar dados variados a respeito da produção de lacases por *Pleurotus ostreatus*. Um estudo utilizando *Pleurotus ostreatus* em bagaço de cana-de-açúcar e vinhaça como fonte de nitrogênio, obteve resultados da atividade de lacase com pico no 15º dia de fermentação. Em outros estudos, utilizando cepas diferentes do fungo *P. ostreatus* foi possível observar picos de atividade no décimo e no sétimo dia de fermentação.^{28,44,45}

A maior atividade enzimática encontrada foi de 833,83 U L⁻¹, correspondente à condição 16 do planejamento fatorial em 7 dias de fermentação, onde foram adicionados 2,5 g L⁻¹ de sulfato de amônio, 2,5 g L⁻¹ extrato de malte, 2,5 g L⁻¹ extrato de levedura e 150 µM de sulfato de cobre simultaneamente no cultivo. Na literatura foi possível encontrar atividades máximas de 22,86 U L⁻¹ para *P. sajor-caju* (10º dia) e de 23,58 U L⁻¹ para *P. thailandia* (15º dia).⁴²

Estudos utilizando serragem e vinhaça como substrato obtiveram uma atividade máxima de 2144,6 U L⁻¹ de lacase a partir de *P. ostreatus*. Esse valor alto,

comparado aos obtidos nesse trabalho, pode ser justificado pelo uso da serragem ao invés do bagaço de cana-de-açúcar, pois, segundo estudos prévios, os fungos tem dificuldade de se desenvolver em meios com altos níveis de sacarose, devido a sua incapacidade de metaboliza-la.^{42,44}

Relatos prévios comprovam que a presença de glicose em altas concentrações suprime a produção de lacase, onde foi constatado que as menores atividades de lacase foram encontradas onde os meios foram suplementados com altas concentrações de glicose (5 e 9 g L⁻¹). Para a determinação da glicose residual no bagaço foi utilizado o método do DNS para determinação de açúcares redutores e o valor obtido foi de 0,103 g / g de bagaço. Mesmo após a sequência de lavagem, a glicose residual ainda se encontra presente em níveis consideráveis (10%) no bagaço de cana, o que pode ter suprimido a produção enzimática, gerando valores mais baixos do que os esperados. Uma hipótese é que a presença de glicose inibe os genes de produção enzimática, que são utilizados para metabolizar outras fontes de carbono.^{46,47}

É esperado que os resultados obtidos na fermentação no estado sólido sejam superiores aos obtidos com a fermentação submersa. Isso se deve ao fato do cultivo no estado sólido resultar em um extrato muito mais concentrado. O uso de soluções extratoras, em substituição à água, pode aumentar consideravelmente as atividades resultantes, bem como a purificação do extrato enzimático, metodologia aplicada por Vukojevic et al.^{24,44}

Os valores mais baixos de atividade, considerando o tempo ótimo de fermentação em 7 dias, se encontram em casos onde o meio não foi suplementado com as variáveis (condição 1), em casos onde o meio foi suplementado somente com extrato de levedura ou extrato de malte (condições 3 e 5, respectivamente) ou no caso onde a suplementação foi realizada por uma combinação de extrato de levedura e extrato de malte.

Trabalhos prévios mostram que a suplementação de nitrogênio para produção enzimática a partir de *Pleurotus ostreatus* é positiva, já que aumenta a mineralização da lignina. O extrato de malte e o extrato de levedura, sozinhos, não provocaram um efeito muito positivo no cultivo, contrário ao sulfato de amônio, cuja utilização resultou em valores de atividade consideráveis. Esse fato pode ser explicado pela disponibilidade de nitrogênio dos compostos, que é maior no sulfato de amônio,

onde a amônia corresponde à cerca de 20% do total, do que nos extratos de malte e levedura.^{44,48}

Resultados elevados foram obtidos nas condições onde o sulfato de cobre foi adicionado, combinado ou não com outros componentes. O sulfato de cobre tem sido documentado como um bom indutor da atividade de lacase. Embora alguns fungos, como algumas espécies de *Trametes*, tenham seu crescimento inibido pela presença de cobre, a produção de lacase ainda foi estimulada. Estudos mostram que o crescimento do *Pleurotus ostreatus* não foi afetado pela presença de cobre, tornando seu cultivo passível de suplementação para obtenção de maiores atividades da enzima. Assim, esse fungo se torna um excelente candidato para esse objetivo.⁴⁹

6.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para analisar quais variáveis possuem a maior influência na atividade enzimática, os dados obtidos foram submetidos ao teste ANOVA e Diagrama de Pareto. Com auxílio do software STATISTICA 13, foi realizado um teste ANOVA com nível de confiança de 95%. Abaixo estão apresentados os resultados estatísticos do teste ANOVA (Figura 7) e do Diagrama de Pareto (Figuras 8, 9, 10 e 11).

O ANOVA testa a possibilidade de um resultado ser estatisticamente igual ou diferente dos outros. Para isso, testa a significância de cada variável em relação aos resultados obtidos. Já o diagrama de Pareto analisa a relação entre as causas, nesse caso as variáveis, e as consequências, nesse caso as atividades enzimáticas, apresentando as variáveis que possuem efeitos significantes no resultado.

Figura 7: Resultados dos testes ANOVA. Sendo a) 5 dias de fermentação, b) 7 dias de fermentação, c) 10 dias de fermentação e d) 12 dias de fermentação.

a) ANOVA; Var.: 5 dias; R-sqr=,89741; Adj.,72644 2**(4-0) design; MS Residual=8134,466 DV: 5 dias						b) ANOVA; Var.: 7 dias; R-sqr=,9035; Adj.,74266 2**(4-0) design; MS Residual=16175,06 DV: 7 dias					
Factor	SS	df	MS	F	p	Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Amônio	280431,1	1	280431,1	34,47444	0,001080	(1)Amônio	498115	1	498114,8	30,79524	0,001447
(2)Levedura	422,8	1	422,8	0,05198	0,827227	(2)Levedura	1765	1	1765,5	0,10915	0,752348
(3)Malte	33,0	1	33,0	0,00406	0,951259	(3)Malte	55674	1	55673,6	3,44194	0,112966
(4)Cobre	89671,8	1	89671,8	11,02369	0,016001	(4)Cobre	130883	1	130883,0	8,09165	0,029390
1 by 2	2847,6	1	2847,6	0,35006	0,575677	1 by 2	3099	1	3099,4	0,19162	0,676892
1 by 3	3,7	1	3,7	0,00045	0,983770	1 by 3	53037	1	53036,9	3,27893	0,120145
1 by 4	39423,1	1	39423,1	4,84643	0,069961	1 by 4	67451	1	67450,6	4,17004	0,087195
2 by 3	10846,7	1	10846,7	1,33343	0,292106	2 by 3	3639	1	3639,4	0,22500	0,652026
2 by 4	2073,7	1	2073,7	0,25492	0,631634	2 by 4	22387	1	22386,9	1,38404	0,283971
3 by 4	1205,0	1	1205,0	0,14813	0,713602	3 by 4	72588	1	72588,5	4,48768	0,078455
Error	48806,8	6	8134,5			Error	97050	6	16175,1		
Total SS	475765,2	16				Total SS	1005689	16			

c) ANOVA; Var.: 10 dias; R-sqr=,68258; Adj.,15355 2**(4-0) design; MS Residual=9566,045 DV: 10 dias						d) ANOVA; Var.: 12 dias; R-sqr=,77333; Adj.,39555 2**(4-0) design; MS Residual=2918,109 DV: 12 dias					
Factor	SS	df	MS	F	p	Factor	SS	df	MS	F	p
(1)Amônio	66077,3	1	66077,27	6,907481	0,039153	(1)Amônio	20907,71	1	20907,71	7,164815	0,036696
(2)Levedura	580,6	1	580,57	0,060691	0,813619	(2)Levedura	3558,72	1	3558,72	1,219529	0,311761
(3)Malte	13,4	1	13,36	0,001397	0,971402	(3)Malte	902,70	1	902,70	0,309345	0,598197
(4)Cobre	3875,1	1	3875,06	0,405085	0,547971	(4)Cobre	4085,77	1	4085,77	1,400142	0,281454
1 by 2	56,2	1	56,25	0,005880	0,941369	1 by 2	3203,56	1	3203,56	1,097820	0,335106
1 by 3	31,5	1	31,47	0,003290	0,956122	1 by 3	580,81	1	580,81	0,199036	0,671148
1 by 4	25,2	1	25,15	0,002629	0,960771	1 by 4	7254,78	1	7254,78	2,486124	0,165927
2 by 3	32,9	1	32,95	0,003444	0,955107	2 by 3	2268,62	1	2268,62	0,777427	0,411855
2 by 4	51522,2	1	51522,19	5,385945	0,059387	2 by 4	14680,96	1	14680,96	5,030983	0,066075
3 by 4	1211,4	1	1211,39	0,126634	0,734125	3 by 4	2291,06	1	2291,06	0,785117	0,409685
Error	57396,3	6	9566,05			Error	17508,66	6	2918,11		
Total SS	180821,9	16				Total SS	77243,34	16			

A análise de variância leva em conta o teste de uma hipótese que, de acordo com os resultados, pode ser aceita ou rejeitada. Se o valor de F calculado for maior que o valor tabelado, a hipótese é rejeitada e é possível dizer que há uma diferença significativa entre os resultados. O valor do F apresentado nas tabelas indica se o resultado obtido se deve à variável independente ou não. Quanto maior o valor de F, maior a significância, o que sugere que os resultados são provenientes da variável independente e não do acaso.

Os valores de F para extrato de malte e extrato de levedura não são significantes em nenhum dia de fermentação, sugerindo que essas variáveis não exercem grande influência nos resultados obtidos. Já o sulfato de amônio apresenta a maior significância, indicando que ele exerce maior influência nos resultados. A análise mostra que o sulfato de cobre exerce influência somente no tempo de 5 e 7 dias de fermentação.

Outro fator a ser considerado é o valor de p. Quanto menor esse valor, mais provável que a diferença entre os resultados seja real. Nos casos citados acima, o

valor de p se mostra bem abaixo de 0,05 (valor utilizado para nível de confiança de 95%), sugerindo que a comparação da influência das variáveis é válida.

Figura 8: Diagrama de Pareto para 5 dias de fermentação.

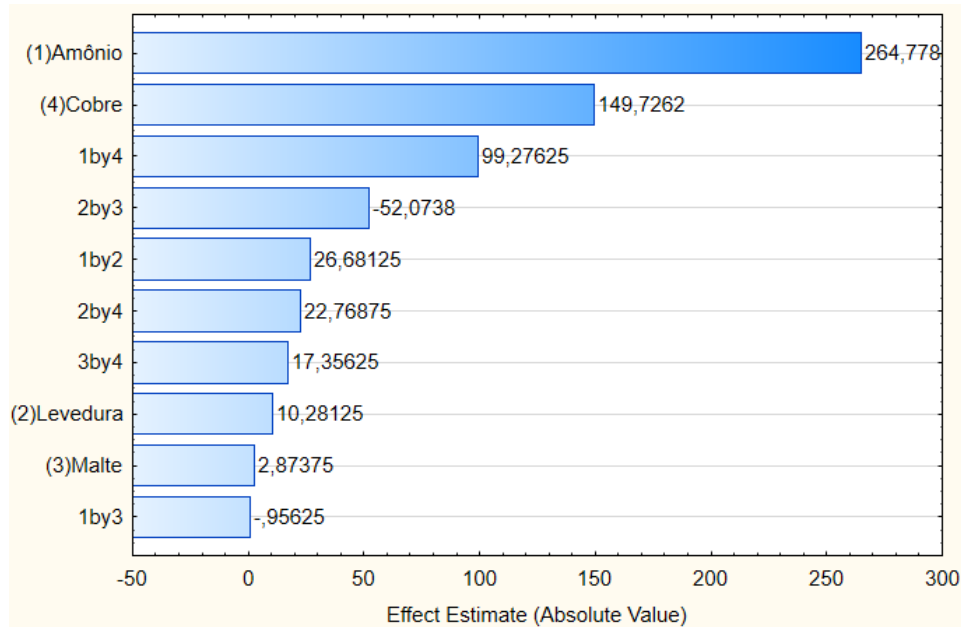


Figura 9: Diagrama de Pareto para 7 dias de fermentação.

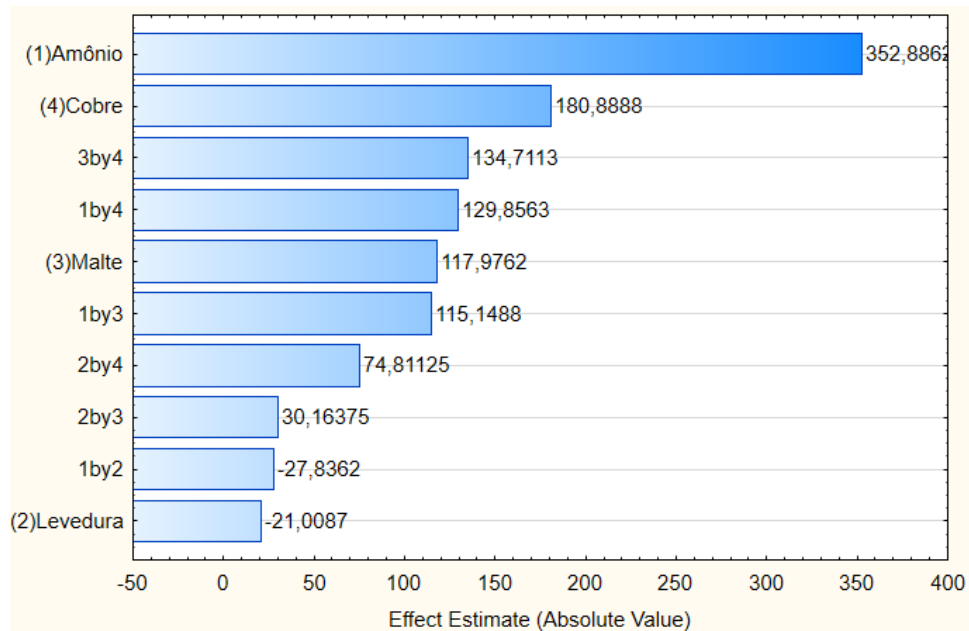


Figura 10: Diagrama de Pareto para 10 dias de fermentação.

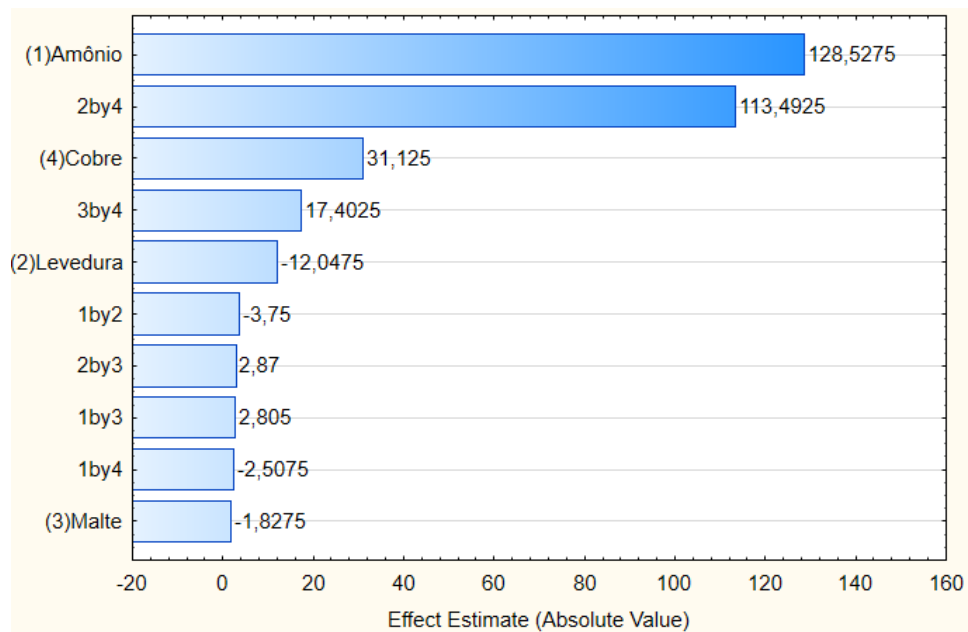
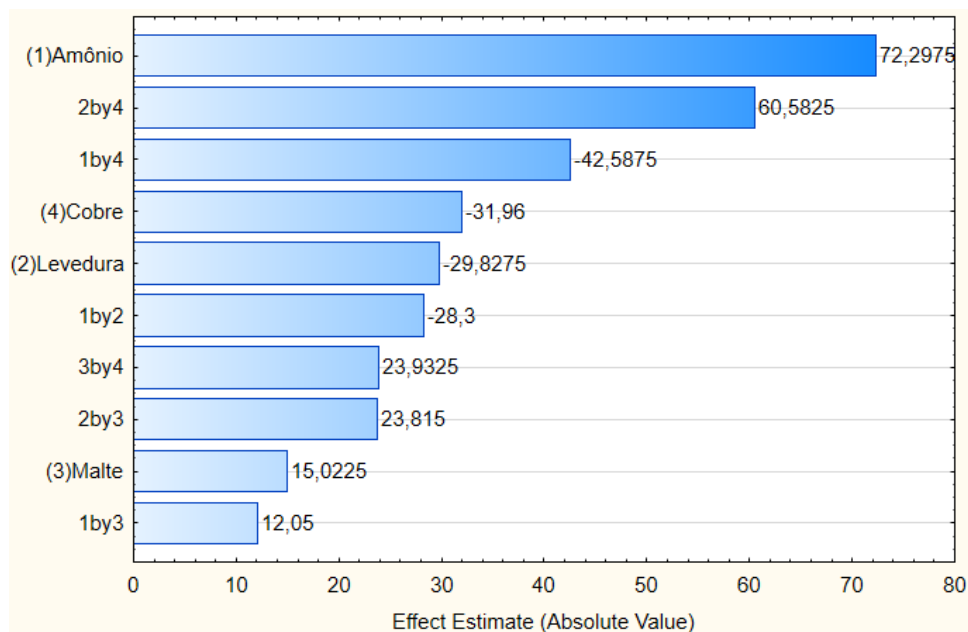


Figura 11: Diagrama de Pareto para 12 dias de fermentação.



A análise dos resultados através do Diagrama de Pareto corrobora com o que mostrou a análise por ANOVA. As barras apresentam a análise de influência de cada variável ou de duas variáveis combinadas, ou seja, o quanto cada valor de atividade foi influenciado por cada variável.

O sulfato de amônio foi a variável que exerceu maior influência nos resultados de todos os tempos de fermentação, se mostrando com uma influência sempre positiva. O sulfato de cobre influenciou positivamente nos 5, 7 e 10 dias de fermentação, porém em 12 dias apresentou um resultado negativo, indicando que as maiores atividades foram obtidas com os menores valores de sulfato de cobre.

O extrato de malte se mostrou pouco positivo em 5 e 7 dias e sua influência foi maior em 7 dias, mas em 10 dias apresentou um valor negativo. O extrato de levedura se mostrou pouco eficiente, pois a maioria dos resultados apresentados para essa variável no diagrama são negativos, mostrando que quanto menor a concentração de extrato de levedura, maior a atividade enzimática.

7 CONCLUSÃO

Conclui-se que o bagaço de cana-de-açúcar é um bom substrato para a fermentação no estado sólido (FES), mais especificamente para a produção de lacases. A FES também se mostrou uma boa alternativa para o objetivo desse trabalho.

Através deste projeto, foi possível concluir que a melhor condição para produção de lacases por *Pleurotus ostreatus* é com a suplementação combinada de extrato de malte, extrato de levedura, sulfato de amônio e sulfato de cobre. Também foi possível concluir que o pico de produção enzimática ocorre aos 7 dias de fermentação.

Através dos resultados e da análise estatística, foi possível determinar que o extrato de malte e o extrato de levedura não exerceram grande influência nas atividades enzimáticas quando comparados ao sulfato de amônio e sulfato de cobre. Já ao comparar os dois últimos, percebe-se que a influência exercida pelo sulfato de amônio é muito maior do que a exercida pelo sulfato de cobre.

8 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Realizar análises a fim de estudar a composição dos extratos enzimáticos produzidos nesse trabalho, além de realizar ensaios para quantificar as proteínas presentes nos extratos.

Utilizar diferentes soluções extratoras, em substituição à água, para comparar a eficiência de recuperação dos extratos enzimáticos.

Aplicar esses extratos em tratamentos de efluentes, corantes e resíduos que contenham compostos lignocelulósicos a fim de analisar a eficiência catalítica dessas enzimas.

Realizar testes de produção em maior escala, como cultivo em bandejas, para analisar a viabilidade tanto econômica quanto ambiental.

Aplicar o bagaço de cana pré-tratado resultante deste trabalho em outros processos de produção

REFERÊNCIAS

- 1 CASTRO, A.M., PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**. v. 33, n. 1, p.181-188, 2010.
- 2 Ministério da Agricultura. **Estatísticas**. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/estatisticas>> Acesso em: 05 out. 2015.
- 3 Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: Cana-de-açúcar**. v.2. Safra 2015/16. n. 4. 2016. Disponível em <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_04_14_09_06_31_boletim_cana_portugues_-_4o_lev_-_15-16.pdf> Acesso em: 27/07/2016.
- 4 Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Statistics Division**. Disponível em <<http://faostat3.fao.org/compare/E>> Acesso em: 27/07/2016
- 5 ORTEGA, G.M. et al. Bioconversion of sugar cane crop residues with white-rot fungi *Pleurotus sp.* **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 8, p. 402-405, 1992.
- 6 KUMAR, R. et al. Composting of sugar-cane waste by-products through treatment with microorganisms and subsequent vermicomposting. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 6707-6711, 2010
- 7 MEMBRILLO, I. et al. Particle geometry affects differentially substrate composition and enzyme profiles by *Pleurotus ostreatus* growing on sugar cane bagasse. **Bioresource Technology**. v. 102, p. 1581-1586, 2011.
- 8 União da Indústria de Cana-de-Açúcar. **Bagaço de cana pode ganhar valor substituindo areia na construção civil**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/noticia/33630022920327850689/bagaco-de-cana-pode-ganhar-valor-substituindo-areia-na-construcao-civil/>> Acesso em: 27/07/2016.
- 9 EWANICK, S., BURR, R. The effect of biomass moisture content on bioethanol yields from steam pretreated switchgrass and sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**. v. 102, p. 2651-2658, 2011.
- 10 AFONSO, Larissa C. **Produção de celulases por cultivo em estado sólido e aplicação na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar**. 2012. 119 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- 11 HIGUCHI, T. **Biosynthesis and biodegradation of wood components**. London: Academic Press Inc, p. 557-577, 1985.
- 12 DINIS, M. J. et al. Modification of wheat straw lignina by solid state fermentation with white-rot fungi. **Bioresource Technology**. v. 100, p. 4829-4835, 2009.

- 13 SANTOS, Ana Paula A. **Desenvolvimento de um método para a determinação da atividade de esterases usando material lignocelulósico como substrato.** 2014. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014
- 14 VAN DYK, J.S.; PLETSCHE, B.I. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes – Factors affecting enzymes, conversion and synergy. **Biotechnology Advances.** v. 30, p. 1458-1480, 2012.
- 15 VALENCIA, E.Y.; CHAMBERGO, F.S. Mini-review: Brazilian fungi diversity for biomass degradation. **Fungal Genetics and Biology.** v. 60, p. 9-18, 2013.
- 16 SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances.** v. 27, p. 185-194, 2009.
- 17 WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S.N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances.** v. 22, p. 161-187, 2003.
- 18 NOVOTNY, C. et al. Ligninolytic fungi in biorremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. **Soil Biology & Biochemistry.** v. 36, p. 1545-1551, 2004.
- 19 WAN, C.; LI, Y. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. **Biotechnology Advances.** v. 30, p. 1447-1457, 2012.
- 20 MEMBRILLO, I. et al. Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. **Bioresource Technology.** v. 99, p. 7842-7847, 2008.
- 21 KURT, S.; BUYUKALACA, S. Yield performances and changes in enzymes activities os *Pleurotus spp.* (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*) cultivated on different agricultural wastes. **Bioresource Technology.** v. 101, p. 3164-3169, 2010.
- 22 SÁNCHEZ, C. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. **Applied Microbiology and Biotechnology.** v. 85, p. 1321-1337, 2010.
- 23 ELISASHVILI, V. et al. Use of *Pleurotus dryinus* for lignocellulolytic enzymes production in submerged fermentation of mandarin peels and tree leaves. **Enzyme and Microbial Technology.** v. 38, p. 998-1004, 2006.
- 24 FERNANDES, Maria L.M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise.** 2007. 120 f. Dissertação (Doutorado em Química) – Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

- 25 PINTO, Gustavo A.S. et al. Fermentação em estado sólido: Uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. **Comunicado Técnico Online**. Embrapa. Fortaleza. V. 102. P. 1-5. Agosto, 2005. Disponível em <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/Fermentacao-alternativa-para-o-aproveitamento-e-valorizacao-de-residuos-agroindustriais-tropicais_000fderll5t02wx5eo0a2ndxyz40jpmp.pdf>
- 26 TÉLLEZ-TÉLLEZ, M. et al. Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 81, p. 675-679, 2008.
- 27 SINGHANIA, R.R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. v. 44, p. 13-18, 2009.
- 28 SOUZA, Gleisson de. **Produção, extração e estabilidade de enzimas lignocelulolíticas para uso em degradação de compostos poluentes**. 2012. 111 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- 29 SUNDARAMOORTHY, M. et al. High-Resolution Crystal structure of manganese peroxidase: substrate and inhibitor complexes. **Biochemistry**. v. 44, p. 6463-6470, 2005.
- 30 KUBICEK, C. P. **Fungi and Lignocellulosic Biomass**. John Wiley & Sons, 2012
- 31 DURÁN, N. et al. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 31, n. 7, p. 907-931, 2002.
- 32 COUTO, S.R.; TOCA-HERRERA, J.L. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. **Biotechnology Advances**. v. 25, p. 558-569, 2007.
- 33 YAROLOPOV, A.I. et al. Laccase: Properties, Catalytic Mechanism, and Applicability. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 49, p. 257-280, 1994.
- 34 WIDSTEN, P.; KANDELBAUER, A. Laccase applications in the forest products industry: A review. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 42, p. 293-307, 2008.
- 35 CUNHA, GINA G.S. **Biopolpação a partir de cultivos mistos de basidiomicetos sobre madeira de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus urograndis* (híbrido *E. grandis* x *E. urophylla*)**. 2012. 110 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.
- 36 SINGH, P. et al. Biopulping of lignocellulosic material using diferente fungal species: a review. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**. v. 9, n. 2, p. 141-151, 2010.
- 37 MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**. v. 38, p. 522-550, 2012.

- 38 KOLB, M. et al. Removal of monomer delignification products by laccase from *Trametes versicolor*. **Bioresource Technology**. v. 104, p. 298-304, 2012.
- 39 COUTO, S.R. HERRERA, J.L.T. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. **Biotechnology Advances**. v. 24, n. 5, p. 500-513, 2006.
- 40 MINUSSI, R.C., PASTORE, G.M., DURÁN, N. Potencial applications of laccase in the food industry. **Trends in Food Science & Technology**. v. 13, n. 6-7, p. 205-216, 2002.
- 41 MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- 42 MENEZES, C.R., SILVA, I.S., DURRANT, L.R., Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas ligninocelulolíticas. **Estudos Tecnológicos** 5(1), 68-78, 2009.
- 43 HOU, H. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. **Process Biochemistry**. v. 39, p. 1415-1419, 2004.
- 44 STAJIC, M. et al. Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 38, p. 65-73, 2006.
- 45 LIU, L. et al. Fermentation optimization and characterization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* strain 10969. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 44, p. 426-433, 2009.
- 46 RONNE, H. Glucose repression in fungi. **Trends in genetics**. v. 11, n. 1, p. 7-12, 1995.
- 47 TAVARES, Ana Paula M. **Produção de lacase para potencial aplicação como oxidante na indústria papeleira**. 2006. 190 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2006.
- 48 SULFATO de Amônio. **Petrobrás**. Disponível em <<http://www.br.com.br/wps/wcm/connect/4622840045856a6d936b9b4a6fd56b56/ft-quim-sulfato-de-amonio.pdf?MOD=AJPERES>> Acesso em 12/09/2016.
- 49 YAMANAKA, R. et al. Lignolytic enzymes produced by *Trametes villosa* ccb176 under different culture conditions. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 39, n. 1, p. 78-84, 2008.