Congresso
Internacional da
Agroindústria
10 e 11 de junho

Inovação,
Gestão e
Sustentabilidade
na Agroindústria

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASES POR *Trametes versicolor* EM
FERMENTAÇÃO DE ESTADO SÓLIDO COM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

**OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LACASAS POR *Trametes versicolor* EN
ESTADO SÓLIDO FERMENTACIÓN CON RESIDUOS AGROINDUSTRIALES**

**OPTIMIZATION OF LACASE PRODUCTION BY *Trametes versicolor* IN SOLID
STATE FERMENTATION WITH AGROINDUSTRIAL WASTES**

Emanuelli Backes¹; Camila Gabriel Kato²; Thaís Marques Uber³, Adelar Bracht⁴, Rosane M. Peralta⁵

DOI: <https://doi.org/10.31692/IICIAGRO.00008>

RESUMO

A valorização de resíduos agroindustriais como substratos para obtenção de enzimas microbianas vem sendo foco de estudo nos últimos anos, uma vez que estes estão disponíveis em grande quantidade e permitirem o crescimento de microrganismos com um mínimo de suplementações. Lacases (EC 1.10.3.2) são cobre-oxidases que catalisam a oxidação de fenólicos e aminas aromáticas com concomitante redução do O₂ à água, apresentando diversas aplicações biotecnológicas. Fungos da podridão branca da madeira são produtores de lacases com elevado potencial redox e apresentam grande potencial tecnológico. O fungo *Trametes versicolor* (L.) Lloyd é um basidiomiceto ligninolítico largamente distribuído em diversos biomas ao redor do mundo. É de fácil cultivo e considerado um excelente produtor de lacases com alto potencial redox. O objetivo deste trabalho foi otimizar a produção de lacase por *Trametes versicolor* em cultivo em estado sólido através da abordagem *one-factor-at-the-time*. Fatores ambientais (tipo de substrato, tempo de cultivo e porcentagem de umidade inicial) e de composição do meio (concentração de sais, carbono e nitrogênio) foram investigados. Diversos resíduos – agrícolas e alimentares – comuns à região do desenvolvimento deste trabalho foram avaliados como potenciais substratos. O substrato capaz de gerar maior produção de lacase foi selecionada para processo de otimização. ABTS (2,2'-azinodi-[3-etil-benzo-tiazolina-sulfonato]) foi utilizado para determinação da atividade da lacase e os resultados foram expressos em U/g de substrato. A produção máxima de lacase foi obtida ao utilizar coroa de abacaxi como substrato. Um aumento de mais de 6 vezes na atividade da lacase foi atingido nas condições otimizadas (7 dias de cultivo, 90% de umidade inicial e meio mineral Vogel diluído 1:50 e suplementado com 5% de glicose e 1,5% de extrato de levedura), que resultou em 32,93 ± 2,59 U/g. Estes resultados evidenciam a valorização promissora de resíduos agroindustriais para obtenção de produtos de alto valor agregado. Ademais, as etapas de otimização levaram à obtenção de lacases com elevada atividade, o que possibilita a segurança e diminuição de custos dos processos biotecnológicos em que são aplicadas.

Palavras-Chave: Lacase, Otimização, Fermentação em estado sólido, Fungos, Resíduos.

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, emanuelibackes@outlook.com

²Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentação e Nutrição, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, camilagkato@hotmail.com

³Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá, thaisuber@gmail.com

⁴Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, abraucht@uem.br

⁵Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Maringá, rmperalta@uem.br

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASES POR *Trametes versicolor* EM FERMENTAÇÃO DE ESTADO SÓLIDO COM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

RESUMEN

La valorización de residuos agroindustriales como sustratos para la obtención de enzimas microbianas ha sido el foco de estudio en los últimos años, ya que se encuentran disponibles en grandes cantidades y permiten el crecimiento de los microorganismos con un mínimo de suplementos. Las lacasas (EC 1.10.3.2) son oxidasas de cobre que catalizan la oxidación de fenólicos y aminas aromáticas con una reducción concomitante de O₂ en agua presentando varias aplicaciones biotecnológicas. El hongo *Trametes versicolor* (L.) Lloyd es un basidiomiceto ligninolítico ampliamente distribuido en varios biomas alrededor del mundo. Es fácil de cultivar y se considera un excelente productor de lacasas con alto potencial redox. En ese contexto, el objetivo de este trabajo fue optimizar la producción de lacasa por *Trametes versicolor* en cultivo en estado sólido a través del enfoque de un factor a la vez. Se investigaron factores ambientales (tipo de sustrato, tiempo de cultivo y porcentaje de humedad inicial) y composición del medio (concentración de sales, carbono y nitrógeno). Se evaluaron como potenciales sustratos varios residuos -agrícolas y alimentarios- comunes a la región del desarrollo de este trabajo. Para el proceso de optimización se seleccionó el sustrato capaz de generar una mayor producción de lacasa. ABTS (2,2'-azinodi- [3-etil-benzo-tiazolina-sulfonato]) se utilizó para determinar la actividad lacasa y los resultados se expresaron en U/g de sustrato. La producción máxima de lacasa se obtuvo utilizando corona de piña como sustrato. Se logró un aumento de más de 6 veces en la actividad de lacasa en condiciones optimizadas (7 días de cultivo, 90% de humedad inicial y medio mineral Vogel diluido 1:50 y suplementado con 5% de glucosa y 1,5% de extracto de levadura), lo que resultó en 32,93 ± 2,59 U/g. Estos resultados muestran la prometedora recuperación de residuos agroindustriales para obtener productos de alto valor agregado. Además, los pasos de optimización han llevado a la obtención de lacasas con alta actividad, lo que permite incrementar la seguridad y reducir los costos de los procesos biotecnológicos en los que se aplican.

Palabras Clave: Lacasa, Optimización, Fermentación en estado sólido, Hongos, Residuos.

ABSTRACT

Valorization of agro-industrial residues as substrates for microorganism enzyme obtainment has been the focus of study in recent years because they are available in large quantities and allow the growth of ligninolytic fungi with a minimum of supplements. Laccases (EC 1.10.3.2) are copper oxidases that catalyze the oxidation of phenolics and aromatic amines with a concomitant reduction of O₂ to water, presenting several biotechnological applications. The fungus *Trametes versicolor* (L.) Lloyd is a ligninolytic basidiomycete widely distributed in several biomes around the world. It is easy to grow and is considered an excellent producer of laccases with high redox potential. Within this context, the objective of this work was to optimize the laccase production by *Trametes versicolor* in solid-state fermentation using the *one-factor-at-the-time* approach. The influence of environmental factors (type of substrate, time of cultivation, and percentage of initial moisture) and medium composition (concentration of salts, carbon, and nitrogen) was investigated. Several residues - agricultural and food - common to the region of the development of this work were evaluated as potential substrates. The substrate capable of generating greater laccase production was selected for the optimization process. ABTS (2,2'-azinodi- [3-ethyl-benzo-thiazoline-sulfonate]) was used to determine laccase activity and the results were expressed in U/g of substrate. The maximal laccase production was obtained by using the pineapple crown as substrate. A more than 6-fold increase in laccase activity was achieved under optimized conditions (7 days of cultivation, 90% initial moisture, and a 1:50-diluted Vogel mineral medium supplemented with 5% glucose and 1.5% yeast extract), with a final absolute yield of 32.93 ± 2.59 U/g. These results represent a promising valorization of an agro-industrial waste for obtaining products with high added value. In addition, the optimization steps led to the obtainment of laccases with high activity, contributing to safe and cost- attractive applications of the enzyme to biotechnological processes.

Keywords: Laccase, Optimization, Solid-state fermentation, Fungi, Residues.

INTRODUÇÃO

Os materiais ligninocelulósicos são os mais abundantes resíduos agrícolas no mundo e o Brasil, com sua economia baseada na agro-indústria, é um grande produtor deste tipo de

resíduo. Diversas aplicações biotecnológicas vêm sendo desenvolvidas para reaproveitar estes resíduos para a obtenção de produtos de alto valor agregado como etanol, cogumelos, proteínas e enzimas, tais como hidrolases (celulases e xilanases) e oxidases (lacases e peroxidases), através do cultivo submerso e em estado sólido de fungos e bactérias (NANDAL et al., 2013; MANSOUR et al., 2016; BHATI et al., 2020). Embora a fermentação submersa seja mais utilizada industrialmente para obtenção de enzimas, algumas vantagens associadas aos cultivos sólidos vem tornando este tipo de cultivo objeto de pesquisas em várias áreas. Fermentações em estado sólido (FES) não requerem sistemas mecânicos e de controle complexos, além de fornecer alto rendimento dos produtos com baixo consumo de energia. A possibilidade do uso de resíduos como substratos é outro fator que diminui os custos do processo (XU et al., 2020).

Lacases são cobre-oxidases que catalisam a oxidação de fenólicos e aminas aromáticas com concomitante redução do O_2 à água (WATTANAKITJANUKUL et al., 2020). Diversos fungos ligninolíticos secretam lacases – entre outras enzimas ligninolíticas – durante seu crescimento. As lacases fúngicas tem a habilidade de degradar a lignina dos resíduos lignocelulósicos, tornando mais acessíveis tanto a celulose quanto as hemiceluloses à ataques pelas celulases e hemicelulases, gerando a produção de açúcares fermentescíveis. Esta característica permite o uso de diversos resíduos agroindustriais como substratos para crescimento fúngico e a geração de importantes enzimas e outros bioativos fúngicos. Dada sua capacidade de produção de lacases, especial atenção tem sido dada aos fungos dos gêneros *Trametes*, *Pleurotus* e *Ganoderma* sp. (MANSOUR et al., 2016). Dessa forma, os objetivos deste estudo foram (1) avaliar a produção da lacase por *Trametes versicolor* em cultivos em estado sólido utilizando diferentes substratos e (2) otimizar a produção da enzima através da abordagem *one-factor-at-the-time*, nos cultivos desenvolvidos no substrato mais promissor.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A FES pode ser definida como qualquer processo de fermentação que permite o crescimento de microrganismos em materiais sólidos úmidos na ausência de água corrente (ZILLY et al., 2012). Este tipo de processo tem sido amplamente utilizado para produzir compostos industrialmente relevantes, incluindo antioxidantes fenólicos, ácidos orgânicos, polímeros, enzimas e antibióticos (MARTINS et al., 2011; MANSOUR et al., 2016).

Estima-se que 60% dos custos da produção de enzimas para uso industrial derivam, principalmente, dos componentes do meio de cultura (WATTANAKITJANUKUL et al., 2020). Dessa forma, a FES se apresenta como uma tecnologia interessante a ser aplicada na produção de enzimas proporcionando menores custos de energia de esterilização, aeração mais fácil e

custos reduzidos ou eliminados para agitação (KARP et al., 2015).

Concomitante, torna-se possível a valorização de resíduos alimentares. Com custo de aquisição praticamente nulos, estas matérias-primas apresentam composição nutricional (fontes de carbono e nitrogênio) ricas para serem utilizadas como substratos no crescimento de microrganismos. Ademais, em larga escala, esta abordagem permitiria mitigar, de forma mais econômica, os problemas associados ao tratamento e depósito de resíduos de indústrias de alimentos (BILAL e IQBAL, 2019).

Os fungos ligninolíticos aparecem como candidatos naturais para serem cultivados em processos de FES (GHORAI et al., 2009). Esses fungos têm a capacidade peculiar de sintetizar uma série de enzimas extracelulares hidrolíticas e oxidativas relevantes, como celulasas, xilanases, lacases e peroxidases (PERALTA et al., 2017). A aplicação potencial dessas enzimas em biotecnologia tem estimulado investigações para selecionar promissores produtores de enzimas e encontrar substratos convenientes para obter grandes quantidades de enzimas a baixo custo (COUTO, 2008).

O farelo de trigo é o substrato mais comumente usado para o cultivo de fungos da podridão-branca. No entanto, a lista de possibilidades é muito grande e inclui vários resíduos lignocelulolíticos, como bagaço de cana, sabugo de milho, palha de trigo, palha de aveia, palha de arroz e resíduos de processamento de alimentos, como casca de banana, casca de kiwi, casca de maracujá e resíduos de laranja (HOLKER et al., 2004; COUTO, 2008). A busca por novos substratos tem sido foco de diversos estudos, principalmente se estiverem disponíveis em grande quantidade, permitirem o crescimento de fungos ligninolíticos com um mínimo de suplementações e possibilitarem a obtenção de elevadas quantidades das enzimas desejadas.

Lacases (EC 1.10.3.2) são oxidases multicobre capazes de oxidar uma ampla gama de compostos aromáticos incluindo monofenóis, *o*- e *p*-difenois, aminofenóis e compostos diaminoaromáticos (PERALTA et al., 2017). Graças à capacidade de oxidar vários substratos, as lacases apresentam aplicações biotecnológicas em distintos setores que incluem transformações em alimentos, polpa e papel, têxtil, farmacêutica e química, além de atuarem no setor ambiental na degradação de diversos xenobióticos (COELHO-MOREIRA et al., 2018; IARK et al., 2019).

As lacases são glicoproteínas, geralmente extracelulares, pertencentes a família de multi-cobre oxidases, assim como manganês oxidase, ascorbato oxidase, entre outras. Porém, as lacases utilizam o oxigênio molecular comoceptor final de elétrons da oxidação de uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos, liberando apenas água como subproduto (Figura 1), ao contrário das peroxidases, que utilizam, por exemplo, o peróxido de hidrogênio

(H₂O₂) (MUÑIZ-MOURO et al., 2017).

Figura 1: Reação geral catalisada pela lacase.

Fonte: Própria (2021).

Uma das características mais importantes das lacases é o seu potencial redox (E^0) (JANUSZ et al., 2020). A capacidade de oxidação da lacase é proporcional à diferença de potencial redox entre o átomo de cobre T1 (um dos quatro átomos de cobre presentes no sítio ativo da enzima) e o substrato. De acordo com o potencial redox, as lacases são classificadas em três grupos: potencial redox baixo (0,4–0,5 V), médio (0,5–0,6 V) e alto (0,7–0,8 V). Lacases bacterianas e vegetais apresentam, frequentemente, redox baixo, enquanto o das lacases fúngicas é, geralmente, médio ou alto. Além disso, valores mais elevados de potencial redox são observados em lacases produzidas por basidiomicetos de podridão-branca o que permite a oxidação de uma gama muito maior de substratos e aumentam suas aplicações industriais em diversos campos (CASTROVILLI et al., 2019; ZERVA et al., 2019).

Neste cenário, as espécies *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, *Pycnoporus cinnabarinus* e *Pycnoporus sanguineus*, por exemplo, têm recebido bastante atenção (MATE e ALCALDE, 2015). Por conta de seu alto potencial redox e elevada capacidade de produção de lacase, diversos estudos são conduzidos com grande eficiência utilizando *Trametes versicolor* (L.) Lloyd, um basidiomiceto largamente distribuído em diversos biomas ao redor do mundo (XIN & GENG 2011; AYDINOGLU & SARGIN, 2013; XU et al., 2020).

As aplicações biotecnológicas das lacases têm sido objetivo de pesquisa há mais de 30 anos e, devido ao espectro de atividade, abrangem um amplo escopo de possibilidades. Indústrias de alimentos, rações, papel e celulose, cosméticos, fármacos, indústria têxtil e processos de biorremediação, por exemplo, são alguns dos segmentos os quais as pesquisas com lacase fazem-se intensas (ZERVA et al., 2019). Na indústria de alimentos, em especial, a utilização de lacases é realizada em produtos de panificação, laticínios, bebidas e ingredientes (síntese de novos compostos antioxidantes e antimicrobianos). Estas enzimas atuam na melhoria dos parâmetros sensoriais de alimentos, controle de odores, realce de sabor e novas

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASES POR *Trametes versicolor* EM FERMENTAÇÃO DE ESTADO SÓLIDO COM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

funcionalidades, bem como para a remoção de compostos indesejáveis em certos produtos alimentícios, entre outras possibilidades (MAYOLO-DELOISA et al., 2020).

É sabido que a síntese de lacases pela maioria dos fungos necessita de indução, que ocorre pela presença de compostos fenólicos e/ou íons de metais pesados. Porém, o uso de indutores tóxicos levanta preocupações quanto ao tratamento dos resíduos, uma vez que são contaminantes do meio ambiente. Assim, estudos de otimização são necessários para se obter uma máxima produção de enzimas, com elevada atividade, em condições que tornem o processo seguro e barato (AYDINOGLU e SARGIN, 2013; XU et al., 2020).

METODOLOGIA

A pesquisa realizada foi de natureza quantitativa experimental. *Trametes versicolor* foi obtido da Coleção de Basidiomicetos do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e de Alimentos do Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Maringá e mantido em laboratório através de repiques sucessivos em ágar-batata-dextrose. Partindo de conhecimentos prévios sobre o comportamento do fungo, o sistema de FES foi otimizado para o máximo da produção de lacase por fatores ambientais (tipo de substrato, tempo de cultivo e porcentagem de umidade inicial) e composição do meio (concentração de sais, carbono e nitrogênio). Todos os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL com 5 g de substrato e a 28 °C no escuro. Durante cada nível de otimização do fator, todos os fatores, exceto o fator particular em consideração, foram mantidos constantes.

Para selecionar o substrato, diferentes resíduos agroindustriais obtidos na região de Maringá, Paraná, foram avaliados, nomeadamente farelo de trigo (FT), bagaço de cana (BC), casca de soja (CS), sabugo de milho (SM), serragem de eucalipto (SE), coroa de abacaxi (CA), casca de abacaxi (CAS), bagaço de laranja (BL) e casca de maracujá (CM). O substrato capaz de gerar maior produção de lacase foi selecionada para processo de otimização. A umidade inicial foi ajustada a 80% através da adição de meio mineral Vogel (VOGEL, 1956). Os cultivos foram mantidos a 28 °C por 7 dias. Para otimizar o tempo de cultivo, foram utilizadas 5 g do substrato selecionado na etapa anterior. Os cultivos, com 80% de umidade inicial foram mantidos a 28 °C e atividade da lacase foi avaliada nos tempos 3, 5, 7 e 9 dias. Para otimizar a umidade inicial níveis de 70, 80 e 90% foram avaliados no tempo de cultivo otimizado a 28 °C.

Determinadas as condições ambientais ótimas, procedeu-se com a otimização da composição do meio de cultura. Para otimizar a concentração de sais, cultivos com distintas concentrações de meio mineral Vogel. O meio mineral foi diluído 1:50, 1:25 e 1:10 e utilizado para obtenção das umidades iniciais selecionadas. Em seguida, avaliou-se o efeito da

suplementação do meio base com duas diferentes concentrações de glicose (5 e 10%) e cinco concentrações distintas de extrato de levedura (0,1; 1,5; 2,5; 3,5 e 5%).

Após preparo, todos os meios foram autoclavados à 121 °C por 15 minutos. Três discos de ágar (7 mm) colonizados com o micélio de *T. versicolor* foram utilizados como inóculo. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Os cultivos foram interrompidos adicionando-se 30 mL de água destilada a cada frasco. Os frascos foram macerados e agitados a 100 rpm por 30 min a 15 °C. As misturas foram filtradas em gaze e, em seguida, centrifugadas (8000 rpm por 10 minutos). Os sobrenadantes foram considerados como sendo os extratos enzimáticos brutos e foram avaliados quanto a atividade da lacase.

Para a determinação da atividade da lacase foi utilizado o substrato ABTS (2,2'-azinodi-[3-etil-benzo-tiazolina-sulfonato]) (BRUGNARI et al., 2018). Os resultados foram expressos em U/g de substrato, onde uma unidade de atividade da lacase (U) é a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 µmol de substrato por minuto.

Todos os resultados foram analisados utilizando-se o teste t-Tukey utilizando-se o programa GraphPad versão 8.0 com 95% de confiança. O mesmo programa gráfico foi utilizado para confecção das figuras. A estrutura química apresentada foi desenhada utilizando o programa ChemDraw 12.0

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferentes fontes de carbono foram inicialmente investigadas como potenciais substratos para a produção de lacase por *T. versicolor*. Nas condições em que os ensaios foram conduzidos, nota-se a alta atividade da lacase obtida nos cultivos onde a coroa de abacaxi foi utilizada como substrato ($5,40 \pm 0,01$ U/g de substrato), seguida do farelo de trigo ($4,22 \pm 0,29$ U/g de substrato) (Figura 2). Ademais, a utilização da coroa de abacaxi favoreceu a produção de lacase comparativamente à casca da mesma fruta – também um resíduo do seu processamento. De forma geral, observa-se que o uso de resíduos frutícolas favoreceu a produção de lacase, comparativamente aos demais substratos. Sabe-se que pequenas mudanças na composição do substrato podem afetar sua capacidade de induzir a produção de lacase. Neste caso, supõe-se que o elevado conteúdo de compostos fenólicos presente nestes tipos de resíduos sejam os responsáveis pela maior produção de lacase, uma vez que estes atuam como indutores da enzima (SOUZA et al., 2004; TEODORO et al., 2018). Dessa forma, a coroa de abacaxi foi selecionada como substrato principal para novos experimentos de otimização dos demais fatores.

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASES POR *Trametes versicolor* EM FERMENTAÇÃO DE ESTADO SÓLIDO COM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Figura 2: Produção de lacases por *Trametes versicolor* em FES utilizando diferentes resíduos como substrato. FT: Farelo de trigo; BC: Bagaço de cana; CS: Casca de soja; SM: sabugo de milho; SE: Serragem de eucalipto; CA: Coroa de abacaxi; CAS: Casca de abacaxi; BL: Bagaço de laranja; CM: Casca de maracujá.

Fonte: Própria (2021).

A cinética de produção de lacase foi utilizada para determinar o tempo ótimo de cultivo para produção da enzima (Figura 3A). Incrementos gradativos na atividade foram observados até o sétimo dia de cultivo (pico de produção, $5,41 \pm 0,02$ U/g), que decaiu significativamente no nono dia ($4,44 \pm 0,03$ U/g). O mesmo comportamento (tempo de cultivo ótimo de 7 dias) tem já sido reportado em cultivos em estado sólido de *Trametes versicolor* utilizando como substratos resíduos de chá e resíduos de horticultura (XIN e GENG, 2011; XU et al., 2020).

Diversos fatores como, por exemplo, biodisponibilidade de nutrientes, fonte de carbono e estirpe fúngica, podem influenciar neste valor. Lacases são reportadas como enzimas de metabolismo primário, isto é, são dependentes do crescimento do fungo e expressas em períodos iniciais do cultivo. Dessa forma, supõe-se que a queda da atividade após o sétimo dia de cultivo deve-se ao rápido consumo do substrato na fase exponencial do crescimento, que acarreta diminuição dos nutrientes para manutenção da síntese de lacase. Para a otimização dos demais fatores, o tempo de cultivo de 7 dias foi estabelecido.

A umidade inicial ótima para produção de lacase foi determinada pela avaliação de três níveis distintos, nomeadamente 70, 80 e 90% (Figura 3B). A produção de lacase aumentou conforme aumento da umidade inicial atingindo valor máximo na condição de 90% ($11,45 \pm 0,45$ U/g). Valores superiores a 90% não foram investigados pois o volume de líquido adicionado descaracterizaria o aspecto sólido do cultivo.

Figura 3: Efeito do tempo de cultivo (A) e da umidade inicial (B) na produção de lacases por *T. versicolor* cultivado em coroa de abacaxi. Em (A) os cultivos foram desenvolvidos a 28 °C e umidade inicial de 80%. Em (B) os cultivos foram desenvolvidos a 28 °C por 7 dias.

Fonte: Própria (2021).

Cultivos em estado sólido combinam as fases sólida, líquida e gasosa, sendo a correlação entre elas crucial para o crescimento fúngico. O teor de umidade inicial é um dos principais fatores que interferem no crescimento do microrganismo e na produção de enzimas por este microrganismo na FES, considerando que a disponibilidade de água em menor ou maior quantidade pode afetar adversamente a atividade microbiana (SINGHANIA et al., 2009). Em cenários de umidades iniciais mais baixas ocorrem possivelmente efeitos adversos que inibem o crescimento do fungo e a consequente produção enzimática, dada a limitação na transferência de nutrientes. Da mesma forma, em umidades iniciais muito elevadas, é comum ocorrer a compactação do substrato, impedindo a transferência de oxigênio (aeração).

Geralmente, quando substratos de granulometria baixa são utilizados, este fenômeno de compactação é observado em porcentagens de umidades iniciais inferiores. Um valor ótimo de 80% de umidade inicial foi encontrado para a produção de lacase por *Xylaria* sp ao se utilizar como substrato cachos de palmeira triturado e peneirado em tela de 3,8 mm (WATTANAKITJANUKUL et al., 2020). De forma semelhante, uma umidade inicial de 70% foi encontrada em cultivos com farelo de trigo para a produção de lacases por *Ganoderma* sp (REVANKAR et al., 2007). Entretanto, as partículas de coroa de abacaxi utilizadas no presente estudo apresentavam tamanho médio de 1 cm². Este tamanho maior permitiu a aeração adequada do cultivo mesmo em condições mais elevadas de umidade, favorecendo também o transporte dos nutrientes.

Considerando-se outros substratos utilizados para o cultivo de *T. versicolor*, maior produção de lacase foi obtida com 85% de umidade inicial utilizando-se resíduos de horticultura como substrato (XIN & GENG, 2011), 80% de umidade inicial quando o substrato foi folhas de oliveira (AYDINOGLU & SARGIN, 2013) e 75% de umidade inicial quando o substrato foi caule de milho pré-tratado por explosão a vapor (ADEKUNLE et al., 2017).

Otimizadas as condições ambientais (tipo de substrato, tempo de cultivo e umidade inicial) para produção da lacase, o estudo focou na otimização de alguns componentes do meio de cultura. Sabe-se que a presença de minerais é importante para suprir as necessidades nutricionais dos fungos, auxiliando no crescimento e manutenção de suas atividades metabólicas. O efeito da concentração de minerais na produção da lacase foi avaliada através do cultivo com diferentes diluições de meio mineral Vogel (1:50, 1:25 e 1:10). Ao se utilizar o meio de Vogel diluído 1:50 e 1:25 a produção de lacase não variou significativamente, obtendo-se atividades de $11,96 \pm 0,20$ e $12,24 \pm 1,24$ U/g de substrato, respectivamente (p -valor $< 0,05$). Entretanto, ao utilizar-se o meio mineral na diluição 1:10, observou-se visualmente uma inibição no crescimento do fungo, provavelmente pelo aumento da força iônica do meio, e redução significativa da lacase produzida ($8,55 \pm 0,61$ U/g de substrato). Dessa forma, estabeleceu-se a utilização do meio mineral Vogel na diluição 1:50 para a otimização dos demais fatores.

A suplementação do meio de cultura com glicose e extrato de levedura também foi avaliada (Figura 4). De forma geral, todos os níveis de suplementação investigados geraram aumento significativo na produção de lacase (p -valor $< 0,05$). Os maiores níveis de lacase foram observados nas condições de 5% G + 1,5% EL ($32,93 \pm 2,59$ U/g de substrato), 5% G + 3,5% EL ($31,79 \pm 2,76$ U/g de substrato), 5% G + 5% EL ($34,36 \pm 3,51$ U/g de substrato) e 10% G + 1,5% EL ($31,00 \pm 1,40$ U/g de substrato), que não diferiram significativamente entre si. Portanto, pode-se operar em condições de desprendimento mínimo dos custos operacionais, neste caso 5% G + 1,5% EL e, ainda, gerar respostas estatisticamente iguais.

As etapas do processo de otimização conduzidas neste estudo permitiram aumentar a produção de lacase mais de 6 vezes, atingindo um valor ótimo de $32,93 \pm 2,59$ U/g de substrato, sem a necessidade de utilização de indutores. Todos os fatores, nomeadamente, tipo de substrato, tempo de cultivo, umidade inicial e composição do meio de cultura, influenciaram diretamente no resultado obtido e possibilitaram que tal valor fosse atingido.

Figura 4: Efeito da suplementação com glicose e extrato de levedura na produção de lacase por *T. versicolor*.

Fonte: Própria (2021).

Pelo que se sabe, este é o primeiro estudo que valoriza a coroa do abacaxi como substrato para produção de lacase por *Trametes versicolor*. Ademais, o resultado obtido foi superior aos encontrados em estudos que utilizaram outros fungos e/ou condições de cultivo. O processo de otimização conduzido por Xu et al. (2020), por exemplo, ao utilizar resíduo de chá como substrato no cultivo de *Trametes*, resultou em uma atividade de 25,7 U/g. Já a produção de lacase por *Xylaria sp.* atingiu valor ótimo de 16,3 U/g, utilizando frutos de palma como substrato (WATTANAKITJANUKUL et al., 2020). Outrossim, para produzir o valor ótimo de 8,6 U/g, álcool veratrílico foi utilizado como indutor da produção de lacase de *Trametes versicolor* cultivado em resíduo agroindustrial (XIN & GENG, 2011). O valor superior encontrado neste estudo demonstra a importância da seleção dos fatores e condições corretas para maximizar a produção de lacases.

CONCLUSÕES

Os dados apresentados aqui sugerem que a coroa de abacaxi possa ser efetivamente utilizada como substrato por *Trametes versicolor* para a produção de lacase em condições de fermentação em estado sólido. A suplementação do meio com nitrogênio orgânico (extrato de levedura) e carboidrato simples (glicose), permitiu obtenção de lacase com atividade máxima de $32,93 \pm 2,59$ U/g nas condições otimizadas, sem adição de indutores. Os resultados promissores obtidos neste estudo abrem o caminho para uma efetiva utilização de um resíduo

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASES POR *Trametes versicolor* EM FERMENTAÇÃO DE ESTADO SÓLIDO COM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

pouco aproveitado na obtenção de um produto de alto valor agregado, a enzima lacase com várias aplicações biotecnológicas.

REFERÊNCIAS

ADEKUNLE, A. E.; ZHANG, C.; GUO, C.; LIU, Z.-Z. Laccase production from *Trametes versicolor* in solid-state fermentation of steam-exploded pretreated corn stalk. **Waste Biomass Valorization**, v. 8, p. 153-159, 2017.

AYDINOGLU, T.; SARGIN, S. Production of laccase from *Trametes versicolor* by solid-state fermentation using olive leaves as a phenolic substrate. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, p. 215-222, 2013.

BHATI, N.; SHREYA; SHARMA, A. K. Cost-effective cellulase production, improvement strategies, and future challenges. **Journal of Food Process Engineering**, v. 44, e13623, 2020.

BILAL, M.; IQBAL, H. M. N. Sustainable bioconversion of food waste into high-value products by immobilized enzymes to meet bio-economy challenges and opportunities – A review. **Food Research International**, v. 123, p. 226-240, 2019.

BRUGNARI, T.; PEREIRA, M. G.; BUBNA, G. A.; FREITAS, E. N.; CONTATO, A. G.; CORRÊA, R. C. G.; CASTOLDI, R.; SOUZA, C. G. M.; POLIZELI, M. L. T. M.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. A highly reusable MANAE-agarose-immobilized *Pleurotus ostreatus* laccase for degradation of bisphenol A. **Science of the Total Environment**, v. 634, p. 1346-1351, 2018.

CASTROVILLI, M. C.; CHIARINELLI, P. B. J.; AVALDI, L.; CARTONI, A.; CALANDRA, P.; TEMPESTA, E.; GIARDI, M. T.; ANTONACCI, A.; ARDUINI, F.; SCOGNAMIGLIO, V. Electrospray deposition as a smart technique for laccase immobilization on carbon black-nanomodified screen-printed electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 163, 112299, 2020.

COELHO-MOREIRA, J. S.; BRUGNARI, T.; SÁ-NAKANISHI, A. B.; CASTOLDI, R.; SOUZA, C. G. M.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Evaluation of diuron tolerance and biotransformation by the white-rot fungus *Ganoderma lucidum*. **Fungal Biology**, v. 122, p. 471-478, 2018.

COUTO, S. R. Exploitation of biological wastes for the production of value-added products under solid-state fermentation conditions. **Biotechnology Journal**, v. 3, p. 859-870, 2008.

GHORAI, S.; BANIK, S. P.; VERMA, D.; CHOWDHURY, S.; MUKHERJEE, S.; KHOWALA, S. Fungal biotechnology in food and feed processing. **Food Research International**, v. 42, p. 577-587, 2009.

HOLKER, U.; HOFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 175-186, 2004.

IARK, D.; BUZZO, A. J. R.; GARCIA, J. A. A.; CORREA, V. G.; HELM, C. V.; CORRÊA, R. C. G.; PERALTA, R. A.; MOREIRA, R. F. P. M.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M.

Enzymatic degradation and detoxification of azo dye Congo red by a new laccase from *Oudemansiella canarii*. **Bioresource Technology**, v. 89, 121655, 2019.

JANUSZ, G.; PAWLIK, A.; SWIDERSKA-BUREK, U.; POLAK, J.; SULEJ, J.; JAROSZ-WILKOŁAZKA, A.; PASZCZYNSKI, A. Laccase properties, physiological functions, and evolution. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, p. 1-25, 2020.

KARP, S. C.; FARACO, V.; AMORE, A.; LETTI, L. A. J.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. Statistical optimization of laccase production and delignification of sugarcane bagasse by *Pleurotus ostreatus* in solid-state fermentation. **BioMed Research International**, v. 2015, 181204, 2015.

MANSOUR, A. A.; ARNAUD, T.; LU-CHAU, T. A.; FDZ-POLANCO, M.; MOREIRA, M. T.; RIVERO, J. A. C. Review of solid state fermentation for lignocellulolytic enzyme production: challenges for environmental applications. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 15, p. 31-46, 2016.

MARTINS, S.; MUSSATO, S. I.; MARTÍNEZ-AVILA, G.; MONTAÑEZ-SAENZ, J.; AGUILAR, C. N.; TEIXEIRA, J. A. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 365-373, 2011.

MATE, D. M.; ALCALDE, M. Laccase engineering: From rational design to directed evolution. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 25-40, 2015.

MAYOLO-DELOISA, K.; GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, M.; RITO-PALOMARES, M. Laccases in food industry: bioprocessing, potential industrial and biotechnological applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 222-230, 2020.

MUÑIZ-MOURO, A.; OLIVEIRA, I. M.; GULLÓN, B.; LÚ-CHAU, T. A.; MOREIRA, M. T.; LEMA, J. M.; EIBES, G. Comprehensive investigation of the enzymatic oligomerization of esculin by laccase in ethanol: water mixtures. **RSC Advances**, v. 7, p. 38424-38433, 2017.

NANDAL, P.; RAVELLA, S. R.; KUHAD, R. C. Laccase production by *Corioloropsis caperata* RCK2011: Optimization under solid state fermentation by Taguchi DOE methodology. **Scientific Reports**, v. 3, 1386, 2013.

PERALTA, R. M.; SILVA, B. P.; CÔRREA, R. C. G.; KATO, C. G.; SEIXAS, F. A. V. S.; BRACHT, A. **Enzymes from Basidiomycetes: peculiar and efficient tools for biotechnology** G. Brahmachari, A.L. Demain, J.L. Adrio (Eds.), Biotechnology of Microbial Enzymes-Production, Biocatalysis and Industrial Applications, Elsevier (2017), pp. 119-150.

REVANKAR, M. S.; DESAI, K. M.; LELE, S. S. Solid-state fermentation for enhanced production of laccase using indigenously isolated *Ganoderma* sp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 143, p. 16-26, 2007.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13-18, 2009.

SOUZA, C. G. M.; TYCHANOWICZ, G. K.; SOUZA, D. F.; PERALTA, R. M. Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic

compounds. **Journal of Basic Microbiology**, v. 44, p.129-136, 2004.

TEODORO, T. S.; OLIVEIRA, F.; CAROLINE POFFO, C.; BRAGA, L. P.; ARBIGAUS, A.; RAMPINELLI, J. R.; WISBECK, E.; BONATTI-CHAVES, M.; FURLAN, S. A. The influence of Tween 80 on laccase production by *Pleurotus sajor-caju* and the efficiency of crude enzyme broth in the removal of bisphenol-A. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, e1022017, 2018.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). **Microbial Genetic Bulletin**, v. 13, p. 42-43, 1956.

XIN, F.; GENG, A. Utilization of horticultural waste for laccase production by *Trametes versicolor* under solid-state fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, p. 235-246, 2011.

XU, L.; SUN, K.; WANG, F.; ZHAO, L.; HU, J.; MA, H.; DING, Z. Laccase production by *Trametes versicolor* in solid-state fermentation using tea residues as substrate and its application in dye decolorization. **Journal of Environmental Management**, v. 270, 110904, 2020.

WATTANAKITJANUKUL, N.; SUKKASEM, C.; CHIERSILP, B.; BOONSAWANG, P. Use of palm empty fruit bunches for the production of ligninolytic enzymes by *Xylaria* sp. in solid state fermentation. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, p. 3953-3964, 2020.

ZERVA, A.; SIMIC, S.; TOPAKAS, E.; NIKODINOVIC-RUNIC, J. Applications of microbial laccases: patent review of the past decade (2009–2019). **Catalysts**, v. 9, p. 1023-1049, 2019.

ZILLY, A.; BAZANELLA, G. C. S.; HELM, C. V.; ARAÚJO, C. A. V.; SOUZA, C. G. M.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Solid-state bioconversion of passion fruit waste by white-rot fungi for production of oxidative and hydrolytic Enzymes. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 1573-1580, 2012.