

PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS POR FUNGOS BASIDIOMICETOS UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Islândia Ramos dos Anjos¹; Hélio Mitoshi Kamida²; Aline Simões da Rocha Bispo³; Fernando Rocha Santana⁴

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: islandia.r@hotmail.com
2. Orientador, Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: hmkamida@terra.com.br
3. Participante do projeto, Doutoranda em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: alinesimoesbispo@gmail.com.br
4. Participante do projeto, Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: frsantana.uefs@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: basidiomicetos, enzimas lignocelulolíticas, resíduos agroindustriais.

INTRODUÇÃO

A utilização de resíduos agroindustriais representa uma via alternativa para o cultivo de fungos capazes de produzir enzimas lignocelulolíticas. O uso de resíduos agrícolas como substratos em bioprocessos, além de poder ser economicamente viável, ajuda a resolver os problemas ambientais decorrentes do seu acúmulo na natureza (Alexandrino et al., 2007). Enzimas como lacase e celulasas produzidas por fungos utilizando tais resíduos podem ser empregadas em diversos processos fermentativos industriais. As lacases podem degradar uma grande variedade de corantes sintéticos tornando-se adequada para o tratamento do efluente de indústria têxtil (Rosales et al., 2002). As celulasas são utilizadas principalmente no descoramento e amaciamento de tecidos, nas indústrias de polpa de papel e celulose, alimentícia, de detergente, entre outras. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo a quantificação das enzimas lacase e celulasas produzidas por basidiomicetos utilizando resíduos agroindustriais.

MATERIAIS E MÉTODOS

As espécies de basidiomicetos utilizadas neste trabalho foram doadas pela Coleção de Cultura de Microrganismos da Bahia (CCMB), situada na Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), sendo elas: *Ganoderma australe* (262, 283, 299, 325), *Phylloporia fruticam* (267), *Trametes sp.* (295), *Formitopsis rósea* (313, 318, 322), *Microporus ostreatus* (331, 369), *Phellinus gilvus* (349), *Rodidoporus sp* (351), *Hexagonia hydnoides* (365), *Microporus sp* (368), *Laetiporus sulphreus* (369), *Ganoderma ordiformum* (373), *Ganoderma multiplicatum* (374, 398), *Corioloropsis caperata* (383), *Lentinus critunus* (401, 417), *Auricularia polytricha* (405) e *Fomitella supina* (420). A reativação das espécies foi feita em Extrato de Malte-Levedura mantido em placa de Petri e incubado em B.O.D a 28°C durante 07 dias. As espécies foram testadas quanto a produção de enzima ligninolítica em meio Ágar-Extrato de malte suplementado com o corante Remazol Brilhante Blue R (RBBR) em concentração 0,02% (p/v), o inóculo foi incubado a 28°C e a verificação da descoloração do meio foi realizada com medidas perpendiculares a cada 24 horas durante 10 dias. O teste para

verificação de produção de enzimas celulolíticas foi realizado em meio de sais modificado (Breccia, 1995), suplementado com carboximetilcelulose (CMC) sal sódico 1%. A verificação da zona de hidrólise ao redor da colônia foi revelada com adição do corante Vermelho congo 0,1% por 15 minutos e posterior, lavagem com NaCl 1M. Ambos os testes foram realizados em triplicata.

Para cultivo dos fungos previamente selecionados nos testes qualitativos, foram utilizados casca de coco, oriunda de um fábrica no município de Feira de Santana e bagaço de sisal, proveniente do município de Riachão do Jacuípe, ambos foram triturados em triturador de forragem e em seguida, em moinho de facas. No Laboratório de Alimentos (UEFS), foram feitas as análises quanto à umidade, teor de cinzas e protídios para definição da relação C/N. A condição C/N adotada para o cultivo do fungo foi 30/1 conseguida através da adição de farelo de trigo, que foi utilizado como fonte de nitrogênio e acrescentado ao meio contendo 5,0g dos resíduos de casca de coco ou sisal. A umidade determinada em 70% foi obtida por meio do acréscimo de água destilada.

Após seleção dos fungos produtores das enzimas, a atividade das lacases foi determinada utilizando o ácido 2,2'-azino-bis-3- etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS), como substrato (Bourbonnais et al. 1998). A mistura reacional foi conduzida em 700 µL de água destilada, 450 µL de tampão acetato de sódio a 0.1M (pH 5.0), 150µL de uma solução de ABTS a 1mM.L⁻¹ e 200µL do extrato enzimático e após incubação a 30°C em banho-maria por 10 minutos, foram feitas as leituras da absorbância a 420 nm ($\epsilon_{420nm} = 36.000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) (D'Agostini; Mantovani et.al., 2011), onde uma unidade de atividade enzimática foi definida como 1,0 µmol de produto formado por minuto sob as condições do ensaio.

A atividade das celulases foi determinada através da quantificação de açúcares redutores pelo método do DNS (ácido dinitrosalicílico), utilizando carboximetilcelulose (CMC) 2% (p/v) sal sódico em tampão citrato de sódio 50 mM (pH 4,8) a 50°C por 20 minutos (Miller, 1959). Uma unidade de atividade enzimática corresponde à liberação de 1µmol de produto por minuto, nas condições dos ensaios.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Após reativação e purificação, as espécies *Fomitella supina* (420) e *Ganoderma australe* (325) foram testadas quanto ao potencial de atividade para as enzimas lacase e celulase. O fungo *F.supina* (420) se destacou, por apresentar 100% de descoloração do meio com RBBR da placa de 9 cm de diâmetro em 08 dias de incubação, com início de descoloração a partir do 4° dia. Eichlerová e colaboradores (2007) testaram o fungo da podridão branca *Dichomitus squalens* utilizando a mesma metodologia com o RBBR e este apresentou descoloração total do meio após um período de 14 dias de incubação. A espécie *G. australe* (325) também apresentou um bom potencial para descoloração do meio com RBBR, obtendo 91,11% de descoloração da placa de 9 cm de diâmetro, com início de descoloração a partir do 3° dia. Ambos tiveram menor tempo de descoloração do RBBR em relação a dados encontrados na literatura, o que mostra seu elevado potencial para serem utilizados em setores industriais. A espécie *F. supina* (420) também se revelou como produtora de enzimas celulolíticas degradando a carboximetilcelulose (CMC), apresentando 4,0 cm de diâmetro halo/colônia após 5 dias de incubação. Os fungos selecionados foram cultivados em resíduos lignocelulósicos (casca de coco ou bagaço de sisal), suplementado com farelo de trigo para estabilidade da relação C/N 30/1, ajuste da umidade em 70%, nas seguintes quatro diferentes condições: casca do coco (CC), casca de coco e farelo de trigo (CC+FT), sisal (SS) e sisal e

farelo de trigo (SS+FT). Após 21 dias de fermentação os extratos enzimáticos brutos foram coletados para determinação das atividades enzimáticas.

O fungo *F. supina* (420) apresentou maior atividade enzimática de lacase (21,042 U/L) na condição CC+FT, enquanto que o fungo *G.australe* (325) apresentou atividade enzimática igual a 14,63 U/L quando se utilizou apenas a casca do coco (CC) como fonte indutora (Figura 1). Silva e colaboradores (2012) verificaram que a casca do café também é um bom substrato para produção de lacase por basidiomicetos, sendo que a espécie *Pleurotus ostreatus* tem atividade final para a lacase de 22,5 U.mL⁻¹ quando adicionado extrato de levedura na concentração de 9 g.L⁻¹ (20 U.mL⁻¹) como fonte de nitrogênio.

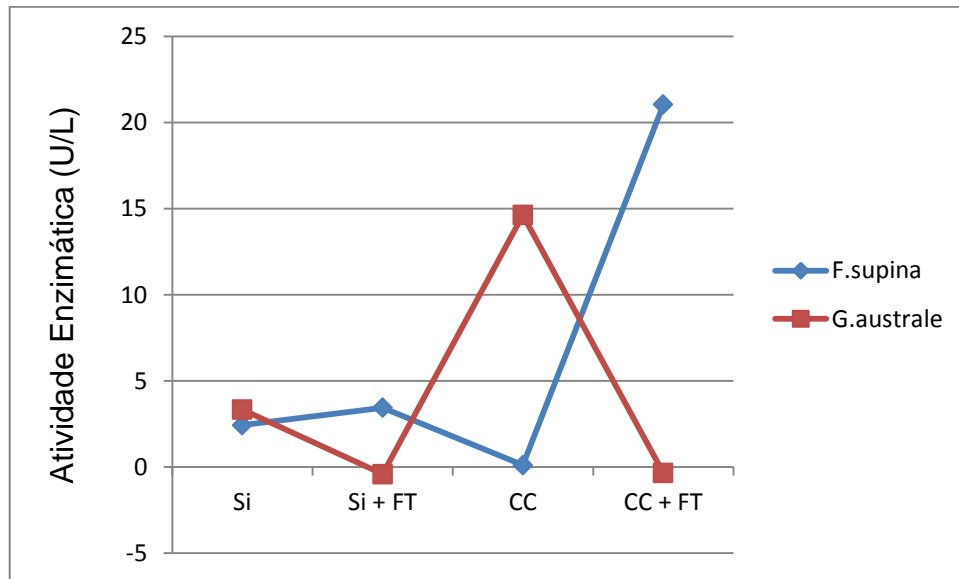


Figura 01: Atividade da lacase do fungo *F. supina* (420) e *G. australe* (325), após 21 dias de fermentação em estado sólido, utilizando resíduos lignocelulósicos.

A espécie *F. supina* (420) também apresentou máxima atividade celulolítica (1,18 IU/mL) na condição CC+FT. Ao contrário do *G. australe* (325) que não apresentou atividade celulolítica nas condições submetidas, mesmo apresentando-se como bom produtor no teste qualitativo, revelando halo de hidrólise promissor após adição do corante vermelho congo 0,1%. Entretanto, o mesmo poderá apresentar atividade celulásica quando submetido em diferentes condições fermentativas. Espécies pertencentes ao gênero *Ganoderma* apresenta atividade para celulase quando cultivados em resíduos de *Eucalyptus benthamii* (Helm 2009).

CONCLUSÃO

As espécies *F. supina* e *G. australe* (325) podem ser consideradas promissoras para produção de enzimas lignocelulolíticas. O fungo *Fomitella supina* (420) apresentou máxima atividade enzimática quando se utilizou casca de coco como fonte de carbono. Apesar do *Ganoderma australe* (325), ter apresentado atividade significativa para lacase quando cultivado apenas na casca do coco, o mesmo não apresentou atividade celulolítica em nenhum dos tratamentos utilizados, entretanto ele pode ser produtor de celulase quando submetido a cultivo com outros resíduos agroindustriais.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRINO, A.M. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 27(2): 364-368, abr.-jun. 2007;
- BOURBONNAIS, R.; LEECH, D.; PAICE, M.G.,1998. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. **Biochemistry and Biophysics**. Acta-General Subjects, 1379, 381-390
- BRECCIA, J. D.; CASTRO, G. R.; BAIGARI, M. D. & SIÑERIZ, F. Screening of xylanolytic bacteria using a colour plate method. J. Appl. Bacteriol. v. 78, pp. 469-472, 1995;
- D'AGOSTINI, E.C.; MANTOVANI, T.R.D.; VALLE, J.S.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; COLAUTO, N.B.; LINDE, G.A. Low carbon/nitrogen ratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation. Scientia Agricola, Piracicaba, v. 68, n. 3, p. 295-300, 2011;
- EICHLEROVA, I. et al. Decolorization of Orange G and Remazol Brilliant Blue R by the white rot fungus *Dichomitus squalens*: Toxicological evaluation and morphological study. Chemosphere, Czech Republic, v. 69, p.795-802, 2007;
- HELM, C. V. Avaliação de basidiomicetos do gênero *Ganoderma* quanto ao potencial de síntese de enzimas lignocelulolíticas. Embrapa Florestas - Artigo em anais de congresso,Paraná,2009;
- MANTOVANI, T.R.D.; PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; VALLE, J.S.; LINDE, G.A.; COLAUTO, N.B. Formulação de substratos na produção de biomassa micelial e de lacase de *Pleurotus ostreatus*. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 33, n. 5, p. 1681-1692, 2012;
- MILLER, L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. v. 31, pp. 426-428, 1959;
- ROSALES, E.; COUTO, R.; SANROMAN, A. **New uses of food waste: application to laccase production by *Trametes hirsuta***. **Biotechnological Letters, Hull**, v. 24, p.701-4,2002;
- SILVA, J. J. da; SANTANA, T. T.; OLIVEIRA, A. C. C.; ALMEIDA, P. H. de; SOUZA, S. G. H. de; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B.; VALLE, J. S. do. Produção de lacase de fungos basidiomicetos por fermentação submersa com casca de café. Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR, Umuarama, v. 15, n. 2, supl. 1, p. 191-196, jul./dez. 2012.