

OBTENÇÃO DE LACASE FÚNGICA POR FERMENTAÇÃO SÓLIDA EM REATOR DE LEITO FIXO UTILIZANDO RESÍDUO DA CASTANHA-DO-BRASIL

A. C. BARROS¹, N. G. ODUARDO¹ e P. M. ALBUQUERQUE¹

¹ Universidade do Estado do Amazonas, Escola Superior de Tecnologia, Engenharia Química
E-mail para contato: andrea.am.campos@gmail.com

RESUMO – O crescente interesse na produção de lacase está especialmente relacionado ao grande potencial biotecnológico que esta enzima apresenta. Este trabalho visou a obtenção de um extrato enzimático pré-purificado, a partir do cultivo de um fungo degradador de madeira isolado da região amazônica no resíduo do beneficiamento da castanha-do-Brasil por meio da fermentação sólida. O cultivo foi realizado em um biorreator de leito fixo com 31,8 L de capacidade a 28°C com aeração forçada. Foi obtido um extrato enzimático com atividade de 3.142 U.mL⁻¹. Na dosagem de carboidratos totais observou-se que o resíduo possui 131,76 g.L⁻¹, uma excelente fonte de carbono para produção de enzimas. O extrato enzimático foi pré-purificado por precipitação com sulfato de amônio seguida de diálise. O rendimento do processo de purificação foi de 28,9%, com 9,60 U.mg⁻¹ de atividade específica e 3,07 de fator de purificação.

1. INTRODUÇÃO

Os processos fermentativos podem ser classificados de acordo com a quantidade de água no meio de cultivo. Desta forma, aquele caracterizado pela ausência de água livre no meio classifica-se como fermentação sólida ou fermentação em estado sólido (FES), e aquele em que há presença de água livre como fermentação submersa (FS) (Borzani, 2001).

A FS é o bioprocesso com o maior número de aplicações industriais no que diz respeito à produção de enzimas. A FES apresenta uma série de vantagens sobre a FS para o cultivo fúngico, pois as condições de cultura são mais semelhantes ao habitat natural destes microrganismos, os quais são capazes de crescer e excretar grandes quantidades de enzimas. As concentrações do produto após a extração são geralmente maiores na FES do que na FS e a quantidade de resíduos líquidos gerados é menor (Castilho et al., 2000). Outro aspecto importante da FES é a recuperação adequada dos metabólitos dos fermentados sólidos (Castilho et al., 1999), sendo a eficiência da extração um elemento crítico que determina a viabilidade econômica da FES para produção de enzimas.

Ramadas et al. (1995) relatam a necessidade de estudos a fim de tornar a FES aplicável para a produção de enzimas, sendo necessário desenvolver técnicas de extração eficazes que viabilizem sua aplicação em alguma atividade industrial. Além disso, estes processos são de interesse econômico especial para os países com abundância de resíduos de biomassa e agroindustrial, como o Brasil.

Nos últimos anos, tem havido um empenho crescente para utilização mais eficiente dos resíduos agroindustriais como substratos em bioprocessos, devido à incessante demanda das atividades agrícolas. O acúmulo destes resíduos gera a deterioração do meio ambiente e perda de recursos, com contribuição significativa para o problema da reciclagem e conservação da biomassa (Pandey et al., 2000a). Diversos processos são desenvolvidos para utilização desses materiais, transformando-os em compostos de alto valor agregado, como álcool, ácidos orgânicos e as enzimas Pandey et al., 2000b).

A importância tecnológica das lacases é resultante da sua capacidade de catalisar a transformação de um grande número de compostos aromáticos (Durán et al., 2002). A produção de lacase é afetada por muitos fatores durante o desenvolvimento fúngico, como a composição do meio de cultura (relação carbono e nitrogênio), pH, temperatura, taxa de aeração, adição de surfactante, presença de reguladores, como o álcool veratrílico (Giese et al., 2004) e adição de fontes indutoras como nitrogênio e cobre, que aumentam a produção desta enzima (Kahraman e Gurdal, 2002).

Considerando os fatores que determinam a produção de lacase, neste trabalho obteve-se lacase pré-purificada, a partir do cultivo por FES de um fungo degradador de madeira isolado da região amazônica no resíduo do beneficiamento da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Microrganismo

O fungo degradador de madeira UEA_105, isolado da região amazônica, pertencente à micoteca do PPG em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da UEA foi o microrganismo utilizado neste trabalho. O fungo foi mantido em meio BDA (ágar batata dextrose) a 5°C. Para o preparo do inóculo, o isolado foi cultivado em meio BDA, sendo incubado em estufa tipo BOD durante sete dias a 28°C. Após este período, discos contendo o micélio fúngico foram retirados das placas com meio BDA e inoculados no meio de cultivo sólido para produção de lacase.

2.2. Substrato Sólido

O resíduo da castanha-do-Brasil foi obtido em feiras da cidade de Manaus-AM, sendo utilizada a casca e amêndoa, obtidas da quebra do fruto. A caracterização físico-química foi realizada a partir das seguintes análises: umidade e cinzas, conforme os métodos do Instituto Adolfo Lutz (1985); densidade e porosidade do leito, segundo Lima (2009); tamanho da partícula, de acordo com Zanotto e Bellaver (1996); e carboidratos totais, segundo método de Dubois et al. (1956).

2.3. Condições de Cultivo

O cultivo sólido do fungo UEA_105 foi realizado em um biorreator de leito fixo em escala laboratorial utilizando o resíduo da castanha-do-Brasil como substrato. A aeração foi realizada com o uso de um compressor de ar, com vazão volumétrica de 65 L.min⁻¹. A temperatura de cultivo foi mantida em aproximadamente 28°C com o uso de uma camisa com circulação de água. O equipamento está representado na Figura 1.

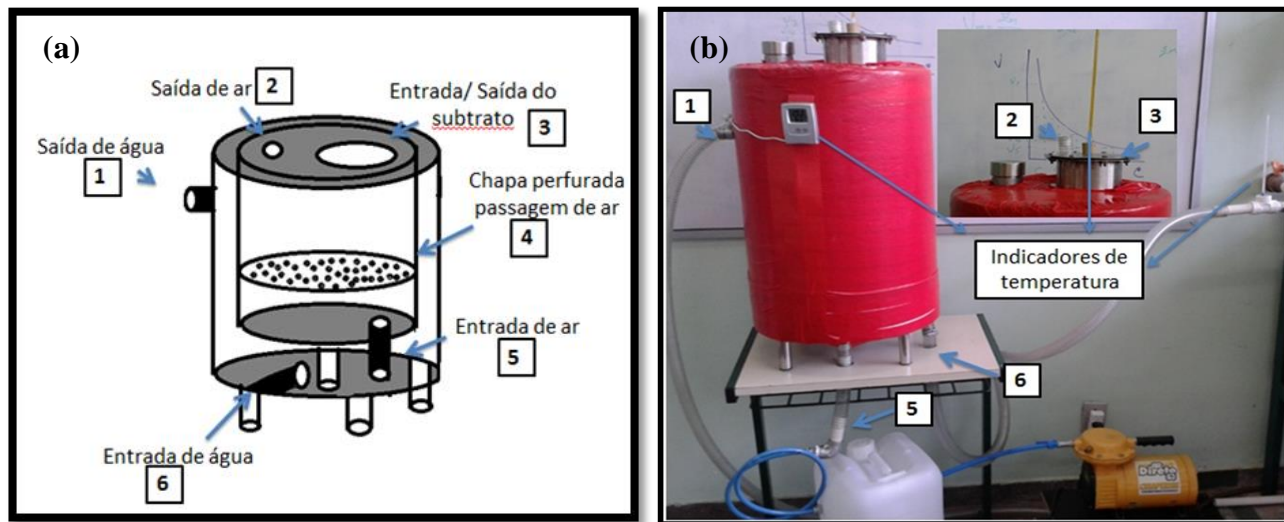


Figura 1 – Representação esquemática do biorreator de leito fixo (a) e biorreator de leito fixo utilizado no experimento de FES (b).

Para o inóculo, discos de 1 mm de diâmetro do fungo cultivado em meio BDA foram inoculados em frascos de 125 mL contendo 3,0 g do substrato úmido (resíduo da castanha-do-Brasil previamente autoclavado). Em seguida, os frascos foram acondicionados em estufa incubadora tipo BOD a 28°C durante 7 dias. Após autoclavagem do resíduo sólido, este foi inserido no biorreator e inoculado com o fungo previamente crescido no resíduo, na relação de 10 g de inóculo/ 100 g de substrato. Adicionou-se também ao substrato uma solução indutora contendo CuSO₄, L-asparagina, álcool veratrílico e Tween 80 nas mesmas concentrações descritas por Barros et al. (2011).

A FES foi realizada durante 7 dias. Após o tempo de cultivo foi obtido o extrato enzimático a partir da adição de água destilada na razão de 1:4 (g de substrato: mL de água destilada). O meio foi incubado em banho-maria por 1 hora a uma temperatura de 40°C, sendo em seguida submetidos à filtração a vácuo. O extrato enzimático (filtrado) foi armazenado em freezer a -18°C.

2.4. Purificação Parcial da Enzima

A purificação parcial da enzima foi realizada conforme descrito por Forootanfar et al. (2011), com modificações. O rendimento de purificação foi obtido considerando a atividade de lacase na cultura filtrada (100% de rendimento) e a atividade enzimática após cada etapa de purificação. O fator de purificação foi calculado considerando a atividade específica (atividade enzimática por mg de proteína) da cultura filtrada (fator igual a 1,00) e a atividade específica de cada etapa de purificação.

2.5. Métodos Analíticos

No extrato enzimático foram dosados: açúcares redutores (Miller, 1959), proteínas solúveis (Bradford, 1976) e atividade enzimática de lacase (Ride, 1980). Uma unidade de atividade enzimática

foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de seringaldazina por minuto por mililitro de extrato enzimático.

2.6. Determinação do pH Reacional Ótimo

O extrato enzimático bruto foi submetido ao ensaio de atividade enzimática, substituindo o tampão reacional (tampão acetato 0,05 M) em pH corrigido para 3,5; 4,0; 4,7; 4,8; 4,9; 5,0 e 6,0. O ensaio foi realizado segundo a metodologia descrita por Côrtes et al. (2010), em triplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização do Substrato Sólido

As características físico-químicas do resíduo (cascas e amêndoas) da castanha-do-Brasil estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Caracterização físico-química do resíduo da Castanha-do-Brasil.

Componente	Valor ^a
Densidade (kg/m^3)	833,70
Porosidade do leito	0,55
Diâmetro geométrico médio (μm)	648,96
Cinzas (%)	2,4
Umidade (%)	11,2

^amédia das replicatas.

O resíduo da castanha-do-Brasil apresenta densidade de $833,70 \text{ kg.m}^{-3}$. Segundo Moura (2012), que realizou análises comparativas da densidade do resíduo da castanha-do-Brasil com outras espécies madeireiras, verifica-se que este resíduo comporta-se como madeira pesada.

Dentre os fatores que favorecem o maior rendimento de conversão do substrato, e maior acessibilidade do microrganismo ao meio, destacam-se a porosidade e o tamanho da partícula. Quanto menor o tamanho da partícula, maior a área superficial e maior o grau de transformação. Por outro lado, o processo precisa de uma granulometria uniforme, de forma que garanta a circulação de ar e a dissipação de gases produzidos (Bianchi et al., 2001). Neste trabalho, o tamanho de partícula obtido foi de $649 \mu\text{m}$, considerado adequado, pois no estudo de Pandey *et al.* (1991) para produção de amiloglicosidade foi possível proporcionar uma boa aeração do meio, utilizando farinha de milho com tamanho de partícula entre $500\text{-}600 \mu\text{m}$.

O valor obtido para a porosidade do resíduo da castanha-do-Brasil foi de 0,55. Lima (2009) obteve uma porosidade de 0,3 para o resíduo da soja e cita o trabalho desenvolvido por Barga em 2007, que obteve uma porosidade de 0,2 para o farelo de trigo. Portanto, o valor encontrado está de acordo com o reportado na literatura para outros cultivos de FES.

A umidade do substrato é um dos principais parâmetros que influencia o sucesso de uma FES. O teor de umidade obtido para o resíduo da castanha-do-Brasil foi de 11,2%. Segundo Schmidell *et al.* (2001), para níveis de umidade menores que o necessitado, haverá maior dificuldade na difusão de nutrientes, resultando em um crescimento menor do microrganismo e com menor produção do produto desejado. Desta forma, o valor obtido no experimento, sendo maior do que os reportados na literatura, aparece como uma vantagem para a FES.

Os valores de pH, açúcares redutores, carboidratos totais e proteína solúvel obtidos para o meio sólido, antes e após o cultivo do fungo UEA_105 por FES estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Características do meio sólido antes e após o cultivo do fungo UEA_105.

Componente	0 dias	14 dias ^a
pH	4,4	5,4
Açúcares redutores (g.L ⁻¹)	37,23	0,2
Carboidratos totais (g.L ⁻¹)	131,76	49,8
Proteína solúvel (mg.mL ⁻¹)	13,31	1.053,9

^adosado no filtrado (extrato enzimático).

O pH do resíduo da castanha-do-Brasil foi de 4,4, considerado relativamente ácido. Segundo Locatelli *et al.* (2003) o pH ácido observado para o resíduo da castanha-do-Brasil pode ser devido ao tipo de solo em que foi cultivada a castanheira. Observando a Tabela 2 verifica-se uma variação de pH na FES. Esta variação deve-se, segundo Schmidell *et al.* (2001) à heterogeneidade do meio, pouca estabilidade e consistência do substrato.

A redução de açúcares redutores foi de 99,9% e de 99,4% para os carboidratos totais. Este resultado indica que o fungo obteve facilidade de degradar as fontes de carbono no meio sólido do que no meio líquido. Dessa forma, o resíduo da castanha-do-Brasil proporciona excelente quantidade de fonte de carbono para os microrganismos, garantido o seu crescimento e produção de metabólitos de interesse.

A concentração de proteína solúvel obtida para o resíduo da castanha foi de 13,31 mg.mL⁻¹. Este valor aumentou consideravelmente após o cultivo fúngico, o que indica o crescimento do microrganismo, bem como a produção enzimática. Souza e Menezes (2004) observaram uma concentração de proteína bruta na amêndoa da castanha-do-Brasil de 14,29% (p/p). Desta forma, verifica-se que o resíduo da castanha possui elevados teores de carboidratos e proteínas, mostrando-se como um excelente substrato para a FES.

3.2. Atividade Enzimática e Pré-Purificação da Enzima

Na Tabela 3 observa-se que o rendimento total da purificação foi de 29,0%. O volume utilizado para a purificação da lacase foi de 200 mL. Alguns estudos utilizaram a FES para obter extratos enzimáticos pré-purificados, onde foram obtidos rendimentos de 36,8% (Côrtes *et al.*, 2010),

28,3% (Rivero, 2003), comparáveis aos valores encontrados neste estudo. Côrtes et al. (2010) obtiveram um fator de purificação de 1,7, abaixo do valor obtido neste trabalho, de 3,09.

Tabela 3 - Pré-purificação da lacase extracelular a partir do filtrado de cultura do fungo UEA_105 em fermentação no estado sólido.

Etapas da Pré-purificação	Volume (mL)	Atividade de lacase (U/mL)	Rendimento (%)	Proteína (mg/mL)	Atividade Específica (U/mg)	Fator de purificação
Cultura filtrada	200	3.142	100	1.054	2,98	1,00
Precipitação com sulfato de amônio	35	1.517	48,3	496,7	3,05	1,02
Díálise	5,0	910	28,9	99,3	9,16	3,07

3.3. Avaliação do pH Reacional Ótimo

Para se maximizar os processos faz-se necessário selecionar as melhores condições reacionais para produção de lacase. Este estudo foi realizado, tendo em vista que o pH é um fator importante para aplicação ótima da enzima (Lehninger et al., 2002). Os resultados estão expostos na Figura 3.

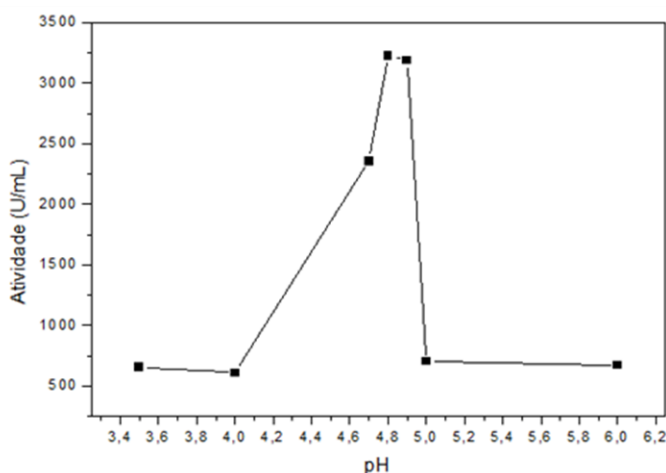


Figura 3 - Determinação do pH ótimo de atividade enzimática da enzima lacase obtida por FES.

Na Figura 3 observam-se os picos de atividade enzimática no pH entre 4,7 e 4,85. No entanto, o aumento da atividade enzimática começa desde o pH 4,0 até o pH 5,0. Côrtes et al. (2010) verificaram o pH ótimo para a lacase obtida por FES utilizando serragem de eucalipto em torno de 4,7. Este resultado indica que o valor obtido no ensaio utilizando o resíduo da castanha-do-Brasil foi similar ao obtido por estes autores.

4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, verifica-se que foi possível utilizar a FES para produzir lacase semi purificada utilizando como substrato o resíduo do beneficiamento da castanha-do-Brasil. O fungo UEA_105 apresentou um bom desempenho na produção da enzima, permitindo a obtenção de bons valores de atividade enzimática. O resíduo, rico em fonte de carbono, mostrou-se adequado para o crescimento do fungo.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPEAM e à EST/UEA pela realização deste trabalho.

6. REFERÊNCIAS

- BARROS, A. C.; ALBUQUERQUE, P. M.; DUVOISIN JR., S.; SERUDO, R. L. *Estudo da produção de lacase fúngica em meio sólido utilizando resíduo da semente do cupuaçu*, Anais do XVIII Simpósio Nacional de Bioprocesso. Caxias do Sul. Rio Grande do Sul. 2011.
- BIANCHI, V. L. D.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Fermentação em Estado Sólido. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUAROB, E.; BORZANI, W. (Eds.). *Biotechnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*, v. 2. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. p. 260-265.
- BORZANI, W. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUAROB, E.; BORZANI, W. (Eds.). *Biotechnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*, v. 2. São Paulo: Edgard Blucher, 2001.
- BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A.; TITO, L. M. A. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresource Technol.*, v. 71, p. 45-50, 2000.
- CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A.; TITO, L. M. A. Recovery of pectolytic enzymes produced by solid state culture of *Aspergillus niger*. *Process Biochem.*, v. 34, p.181-186, 1999.
- CÔRTEZ, M. V. C. B.; MENEZES, R. R.; PAIVA, L. M. C.; ANTUNES, O. A. C. Purificação e caracterização parcial de uma enzima lacase (EC 1.10.3.2) extracelular obtida através de fermentação em fase sólida. *Rev. Anhanguera*, v. 11, n. 1, p. 9-22, 2010.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, v. 28, p. 350-356, 1956.
- DURÁN, N., ROSA, M.A., D'ANNIBALE, A.; GIANFREDA L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme Microb. Tech.*, v. 31, n. 7, p. 907-931, 2002.
- FOROOTANFAR, H.; FARAMARZI, M. A.; SHAHVERDI, A. R.; YAZDI, M. T. Purification and biochemical characterization of extracellular laccase from the ascomycetes *Paraconiothyrium variable*. *Bioresource Technol.*, v. 102, p. 1808-1814, 2011.

GIESE, E. C.; COVIZZI, L. G.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Influência do Tween na produção de lacase constitutivas e indutivas pelo *Botryosphaeria sp.* *Acta Sci. Biological Sciences*, v. 26, n. 4, p. 463-470, 2004.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. São Paulo: O Instituto, 1985.

KAHRAMAN, S. S.; GURDAL, I. H. Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi. *Bioresource Technol.*, v. 82, p. 215-217, 2002.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M.; *Princípios de Bioquímica*. São Paulo: RR Donnelly, 2002.

LIMA, T. *Modelo de interferência para estimação da umidade do leito de um biorreator de fermentação no estado sólido*. Dissertação (Mestrado em Processos Químicos). Centro de Concentração de Desenvolvimento em Processos Químicos. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2009.

LOCATELLI, M.; PERREIRA, S. F.; VIEIRA, A. H.; MARTINS, P. E.; PEQUENO, P. L. L. *Castanha-do-Brasil-opção para solos de baixa fertilidade na Amazônia*. 2003. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/.../1/locatelli2003.pdf>>.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, v. 31, p. 426-428, 1959.

MOURA, R. G. *Fruto da Castanha do Brasil: Potencialidade de Uso como Fonte de Matéria-prima para a Rede Energética do Estado do Amazonas*. 2007. Disponível em: <http://portalamazonia.globo.com/newstructure/view/scripts/noticias/noticia.php?id=47801>>.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technol.*, v. 74, p. 69-80, 2000a.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. *Bioresource Technol.*, v. 74, p. 81-87, 2000b.

RAMADAS, M.; HOLST, O.; MATTIASSON, B. Extraction and purification of amylo glucosidase produced by solid state fermentation with *A. niger*. *Biotechnol. Tech.*, v. 9, p. 901-906, 1995.

RIDE, J. P. The effect of induced lignification on the resistance of wheat cell walls to fungal degradation. *Physiol. Plant Pathol.*, v. 16, p. 187-196, 1980.

RIVERO, E. M. *Caracterización de lacasas producidas por un hongo termofílico silvestre aislado a partir de desechos lignocelulósicos*. Tese (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Autónoma Metropolitana. México: Cidade do México, 2003.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. Biorreatores de Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUAROBÉ, E.; BORZANI, W. (Eds.). *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*, v. 2. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. p. 186-188.

ZANOTTO, D. L.; BELLAVER, C. *Método de Determinação da granulometria de ingredientes para uso em rações de suínos e aves*, EMBRAPA-CNPSA, ct. 215, p. 1-5, 1996.