

## OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACASE A PARTIR DO BAGAÇO DE MANDIOCA EMPREGANDO *RHIZOPUS ORYZAE*

Érika Confortin Miotto (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Ana Elisa Gama, Fernanda Pellegrinello, Larine Kupski (Orientador), Juliana Bueno Ruiz Rebecca (Coorientador), e-mail: erikaconfortin06@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Tecnologia/Umuarama, PR.

### Ciência de Alimentos, Ciência e Tecnologia de Alimentos

**Palavras-chave:** Lacase, bagaço de mandioca, *Rhizopus oryzae*.

**Resumo:** O Brasil por ser um dos maiores produtores de mandioca, acaba gerando muitos resíduos pelas indústrias, um desses resíduos é o bagaço de mandioca, um resíduo sólido gerado no processamento da fécula, que apresenta baixo valor comercial além de ser fonte de fibras. Sendo assim, utilizar processos biotecnológicos, como a fermentação em estado sólido, é uma alternativa promissora para valorização desse resíduo. Para esse processo foi empregado o fungo *Rhizopus oryzae*, pois ele é capaz de colonizar matrizes sólidas porosas, devido a sua capacidade de crescimento na forma de hifas. Com base nesse contexto este trabalho teve por objetivo realizar um planejamento experimental para obter as melhores variáveis para a fermentação em estado sólido para a produção de lacase. Em um primeiro experimento foi observado uma melhor atividade de 0,075 U/g a uma umidade de 60% com 30% de solução nutriente. Através desse melhor ensaio foi realizado um segundo experimento de 0h a 120h de fermentação, onde determinou-se que o melhor tempo de fermentação foi de 48h, tendo uma atividade de 0,037U/g.

### Introdução

O Brasil é o terceiro maior produtor de mandioca, produzindo cerca de 25,4 milhões de toneladas ao ano (FIORDA *et al.*, 2013). Com isso, as indústrias que processam as raízes de mandioca para a obtenção da fécula geram grandes quantidades de descartes considerados agressivos ao meio ambiente. Um desses resíduos gerados é o bagaço de mandioca. (GONÇALVES, 2016). Nas fecularias, para cada tonelada de mandioca processada, são gerados 928,6 kg de bagaço (FIORDA *et al.*, 2013). O bagaço de mandioca pode ser utilizado como substrato para o crescimento de *Rhizopus oryzae*, e concomitante produção de produtos de interesse industrial, tais como enzimas.

Lacases são multicobre oxidases que reduzem oxigênio a água ao mesmo tempo em que oxidam um substrato do tipo p-diidroxi fenol ou outro composto fenólico. São enzimas comuns a vários organismos, mas a maior parte foi isolada de fungos. Sua baixa especificidade a substratos torna a lacase uma enzima com potencial para aplicação em diversos processos industriais (VALLE, 2012). Dentro deste contexto esse trabalho tem por objetivo otimizar a produção de lacase através de

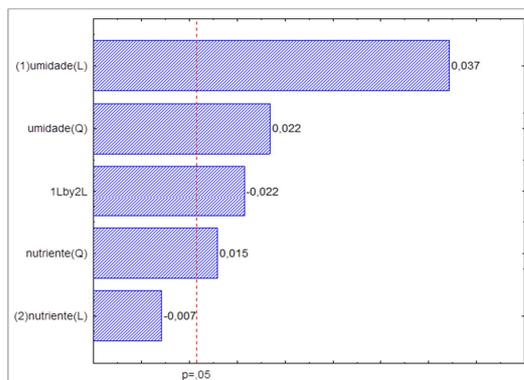
fermentação em estado sólido com o microrganismo GRAS *Rhizopus oryzae* empregando bagaço de mandioca como substrato, e também avaliar a cinética de produção enzimática.

## Materiais e Métodos

O resíduo de bagaço de mandioca foi adquirido na empresa Amifec (Maria Helena, Paraná) e estes foram secos em estufa a 65 °C durante 6 h, peneirados até granulometria padronizada (<0,5 mm), e acondicionados sob refrigeração até o momento de sua utilização. O processo biotecnológico foi conduzido em biorreatores do tipo bandeja. Após esterilização do meio, o substrato foi suplementado com solução nutriente (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 g L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub> 1 g L<sup>-1</sup> e CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> 1,8 g L<sup>-1</sup>), inoculado com suspensão de esporos de *Rhizopus oryzae* CCT 7560 e água destilada estéril, ajustando-se a umidade inicial do sistema (KUPSKI *et al.*, 2014). A otimização foi conduzida durante 48 h a 30 °C e foram avaliadas, através de planejamento experimental: umidade inicial do meio fermentativo e proporção de solução nutriente; tendo como variável resposta a atividade de lacase. Estabelecidas as melhores condições para o processo fermentativo, foi realizado um estudo cinético por um período de 120 h. A extração enzimática das biomassas foi realizada em NaCl 0,5% a 25 °C durante 30 min, seguida de centrifugação a 2300 xg a 4 °C por 15 min. O precipitado foi descartado e o sobrenadante utilizado como extrato bruto para determinação da lacase. A atividade da lacase foi determinada pela oxidação de ABTS por espectrofotometria a 420 nm. Uma unidade (U) de lacase foi definida como a quantidade de ABTS (µmol) oxidado por min (MEZA *et al.*, 2005). Todas as determinações foram realizadas em duplicata, sendo a análise do planejamento experimental realizada utilizando o software “Statistica 7.0”.

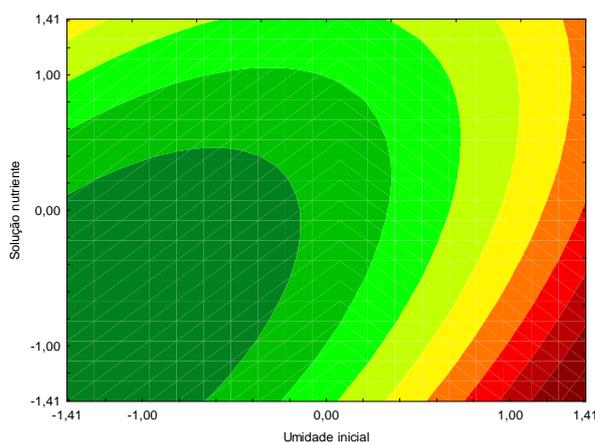
## Resultados e Discussão

Na Figura 1 está ilustrado os efeitos do planejamento experimental realizado. Onde observa-se que somente a variável linear da solução nutriente não apresentou efeito significativo ( $p > 0,05$ ). Dentre as variáveis significativas, destaca-se a umidade que apresentou efeito positivo, tanto para variável linear quanto para quadrática, indicando que um aumento nos níveis causa um aumento na atividade enzimática. A interação entre as variáveis apresentou um efeito negativo e significativo no aumento da produção de lacase.



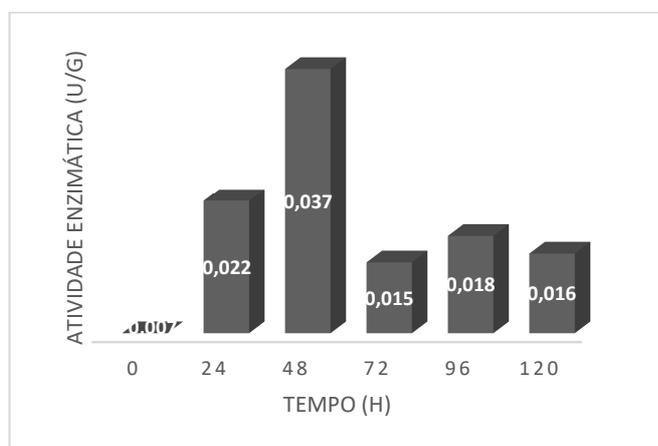
**Figura 1:** Efeitos do planejamento experimental.

Através da ANOVA observou-se que o modelo gerado é preditivo ( $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ ) e significativo ( $R=0,93$ ), sendo possível gerar a superfície de resposta (Figura 2), onde observa-se que a região de ótimo para produção de lacase situa-se nos limites superiores de umidade e inferior de solução nutriente.



**Figura 2:** Superfície de resposta de melhor produção da lacase.

A partir desse melhor ensaio foi realizado um segundo experimento com as condições otimizadas (60% de umidade e 30% de solução nutriente) variando os tempos de fermentação (Figura 3).



**Figura 3:** Cinética de produção enzimática

A Figura 3 apresenta os valores de fermentação nos tempos de 0h à 120h, tendo uma melhor atividade enzimática no tempo de 48h e uma menor no tempo de 0h. Percebe-se que depois das 48h há uma queda nas atividades, isso pode ter ocorrido devido ao *Rhizopus oryzae* que produz bastante protease, este causa a quebra de proteínas, e como a enzima é uma proteína, acaba quebrando a própria enzima.

## Conclusões

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que o bagaço de mandioca pode ser utilizado para produção de lacase por fermentação em estado sólido, sendo obtido a maior atividade em 48 h de processo a uma umidade 60% e 30% de solução nutritiva.

## Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao PIBIC/CNPq por conceder a bolsa e me dar a oportunidade de participar deste projeto. Agradeço também as minhas orientadoras que sempre estiveram a minha disposição pra ajudar e orientar em todo o processo deste estudo.

## Referências

FIORDA, F. A. et al. Farinha de bagaço de mandioca: aproveitamento de subproduto e comparação com fécula de mandioca. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, n. 4, p. 408-416, 2013. ISSN 1983-4063.

GONÇALVES, Louise Garbelotti. **Produção de amilases de *Rhizopus microsporus* var. *oligosporus* e hidrólise enzimática do bagaço de mandioca visando a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae***. 2016. 68 f. Dissertação (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2016.

KUPSKI, L. et al. Endoglucanase and total cellulase from newly isolated *Rhizopus oryzae* and *Trichoderma reesei*: production, characterization, and thermal stability. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 1, p. 458-68, Jan 2014. ISSN 1559-0291 (Electronic).

MEZA, J. C et al. Laccase production by *Pycnoporus cinnabarinus* grown on sugarcane bagasse: Influence of ethanol vapours as inducer. **Process Biochemistry**, 40, n. 10, p. 3365-3371, Oct 2005.

31º Encontro Anual de Iniciação Científica  
11º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior



10 e 11 de novembro de  
**2022**

VALLE, Juliana Silveira do. **PRODUÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE LACASES DE *Agaricus blazei* OBTIDAS POR FERMENTAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**. 2012. 171 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia de Bioprocessos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012