

VALORIZAÇÃO DOS RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS DE PUPUNHEIRA (*Bactris gasipaes* Kunth): PRODUÇÃO DE LACASES POR *Pleurotus ostreatus*

Danielly Maria Paixão Novi (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Rosane Marina Peralta
(Orientadora). E-mail: rmperalta@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá, PR.

Bioquímica, bioquímica dos microrganismos.

Palavras-chave: Enzimas; sacarificação; reutilização.

RESUMO

Lacases fúngicas são oxidases capazes de oxidar uma série de compostos fenólicos incluindo a lignina dos resíduos lignocelulósicos. Para avaliar a produção de lacase, o fungo *Pleurotus ostreatus* foi cultivado nos resíduos lignocelulósicos (bainhas interna e externa) da pupunha por um período de até 30 dias em condições estacionárias. Atividade de lacase de 20.000 U/L foi encontrada nos filtrados da cultura. A ação da lacase sobre os resíduos lignocelulósicos resultou em um afrouxamento das fibras da pupunha. Bainhas interna e externa de pupunha pré-tratadas biologicamente (pós cultivo do fungo) e não pré-tratadas, foram submetidas à hidrólise utilizando uma celulase comercial de *Trichoderma reesei*. As fibras da bainha interna pré-tratadas biologicamente mostraram-se mais suscetíveis a sacarificação enzimática o que resultou em um aumento de 7 vezes a liberação de açúcares redutores. Por outro lado, nas fibras da bainha externa da pupunha o fenômeno de afrouxamento não ocorreu, não havendo aumento da sacarificação dos resíduos pós cultivo do fungo. Análises por microscopia eletrônica e FTIR são consonantes com os resultados obtidos.

INTRODUÇÃO

As lacases (EC 1.10.3.2) são oxidases que catalisam a oxidação de grande variedade de substratos orgânicos e inorgânicos, incluindo mono-, di- e polifenóis, metoxifenóis, aminas aromáticas tendo grande aplicação em diferentes áreas da química verde (BACKES et al., 2022). A maioria das lacases com potencial biotecnológico são obtidas de fungos superiores, especialmente dos basidiomicetos de podridão branca, que degradam/alteram a lignina dos resíduos lignocelulósicos. Graças à facilidade de cultivo, baixo custo e obtenção de extratos enzimáticos com elevadas atividades, resíduos agroindustriais como farelo de trigo, bagaço de cana, casca de arroz, serragem de eucalipto, entre vários outros são utilizados como substratos em cultivos em estado sólido. Pesquisas que incluam outros substratos que possibilitem rápido crescimento dos fungos e elevada produção da enzima são

de grande importância, pois podem baratear a produção das lacases. Além disso, por terem as lacases capacidade de modificar a estrutura da lignina, o cultivo de fungos produtores de lacases em substratos lignocelulósicos é considerado um pré-tratamento biológico, afrouxando as fibras lignocelulósicos e melhorando a posterior hidrólise de celulose e hemiceluloses por enzimas hidrolíticas (BARCELOS et al., 2020). O material lignocelulósico do palmito pupunha (*Bactris gasipaes*) atualmente é subutilizado. Aproximadamente 37% do volume de toda a matéria vegetal que chega à indústria é considerado como resíduo (fibras das bainhas), sendo utilizado como ração animal ou fertilizante agrícola. Tais biomateriais poderiam ser explorados como fontes de moléculas de alto valor agregado, dentro dos conceitos de economia circular e *upcycling*, que transmite a ideia de reciclagem. Uma das formas de agregar valor a esses resíduos seria a sua utilização como substrato para cultivo de microrganismos, produção de enzimas e pré-tratamento biológico para favorecer a obtenção de açúcares fermentescíveis. Considerando o exposto, os objetivos deste trabalho foram avaliar a produção de lacases pelo fungo *Pleurotus ostreatus* cultivado em resíduos de pupunha e avaliar o efeito de pré-tratamento do resíduo através da produção de açúcares fermentescíveis via sacarificação enzimática das fibras lignocelulósicas pós cultivo do fungo.

MATERIAIS E MÉTODOS

P. ostreatus foi obtido da Coleção de Basidiomicetos do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Alimentos-UEM. O fungo foi mantido em laboratório através de repiques sucessivos em ágar-batata-dextrose. Para produção da lacase, utilizou-se as bainhas interna e externa da pupunha como substrato com umidade inicial de 90%. Os cultivos foram mantidos à 28°C em ambiente escuro e condições estacionárias por até 30 dias. Os extratos enzimáticos foram obtidos adicionando-se 15 mL de água destilada aos frascos que foram mantidos em geladeira por 30 min. seguido de filtração. A atividade da lacase foi avaliada conforme descrito previamente (BACKES et al., 2022). Os resíduos sólidos dos cultivos (bainhas interna e externa) foram lavados com água destilada e secos. Os resíduos foram submetidos à hidrólise enzimática utilizando-se celulase comercial (Novozyme). A quantidade de 0,5 g do resíduo pré-tratado ou não com o fungo foi colocada em um frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo a enzima celulase em 25 mL de tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8. As misturas foram mantidas em uma incubadora durante 48 horas, com agitação de 110 rpm e temperatura de 40 °C. Em seguida, as amostras foram filtradas a vácuo. Açúcares redutores presentes nos filtrados foram estimados pelo método do ácido 3,5 dinitro-salicílico (MILLER, 1959). Os açúcares redutores obtidos foram avaliados por cromatografia em camada delgada (TLC).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fungo desenvolveu-se bem no meio contendo resíduo de pupunha como substrato e a produção da lacase foi semelhante nos dois substratos (bainha interna e externa), em torno de 20.000 U/L (Fig. 1).

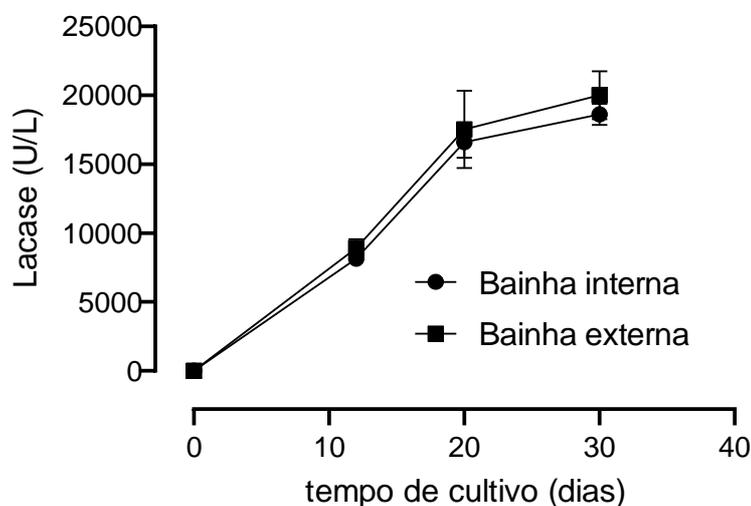


Fig. 1 . Produção de lacases por *P. ostreatus* cultivado em resíduo de pupunha. Os cultivos foram mantidos em condições estáticas, com umidade inicial de 90% por períodos de até 30 dias.

A Fig. 2 mostra a quantidade de açúcares redutores (AR) obtida pela sacarificação dos resíduos de pupunha utilizados ou não para os cultivos do fungo (pré-tratamento biológico). Quantidades significativamente maiores de AR foram obtidas da sacarificação enzimática dos resíduos da bainha interna da pupunha, mas não da bainha externa.

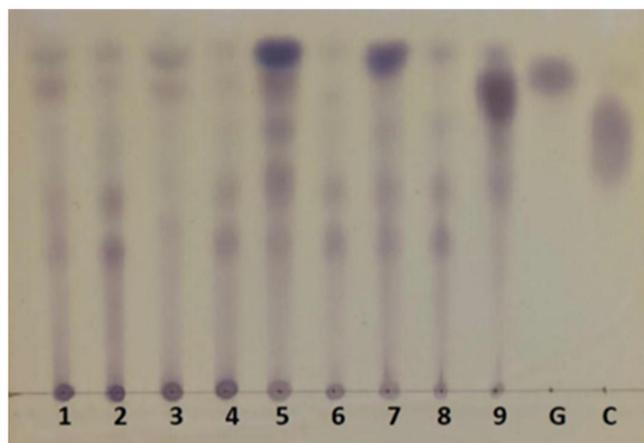
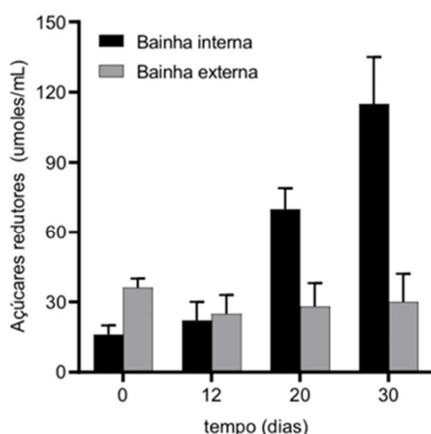


Figura 2. Açúcares redutores nos filtrados obtidos da sacarificação enzimática dos resíduos de pupunha obtidos após cultivo de *P. ostreatus* por diferentes tempos. 0 (controle, sem pré-tratamento), 12, 20 e 30 dias. À direita, TLC dos açúcares revelados utilizando-se orcinol. 1:pupunha interna sem pré-tratamento; 2: pupunha externa sem pré-tratamento.; 3: pupunha interna com pré-tratamento de 12 dias com *P. ostreatus*; 4: pupunha externa com pré-tratamento de 12 dias com *P. ostreatus*; 5: pupunha interna com pré-tratamento de 20 dias com *P. ostreatus*; 6: pupunha externa com pré-tratamento de 20 dias com *P. ostreatus*; 7: pupunha interna com pré-tratamento de 30 dias com *P. ostreatus*; 8: pupunha externa com pré-tratamento de 30 dias com *P. ostreatus*; 9:celulose microcristalina; Padrões- G:glicose; C: celobiose.

A cromatografia em camada delgada (TLC) permitiu claramente observar que a produção de glicose foi aumentada na bainha interna pré-tratada, mas não na bainha externa pré-tratada. Além disso, glicose, celobiose e oligossacarídeos foram aumentados na sacarificação enzimática da bainha interna, o que se diferenciou na bainha externa. Análises por microscopia eletrônica e FTIR não mostradas neste resumo são consonantes com os resultados obtidos.

CONCLUSÕES

O pré-tratamento biológico da bainha interna de pupunha por *Pleurotus ostreatus* em condições estacionárias pode aumentar a sacarificação enzimática em até 7 vezes. Nenhuma melhoria da sacarificação enzimática foi encontrada quando a bainha externa da pupunha foi submetida a tratamento idêntico. Assim, o tratamento da bainha interna com *P. ostreatus* oferece perspectivas favoráveis para reduzir a recalcitrância à hidrólise da bainha interna de pupunha. Todos os resultados obtidos neste trabalho podem ser obtidos em publicação dos autores (SPACKI et al., 2023).

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Maringá que possibilitou a realização do projeto, assim como a Fundação Araucária pelo apoio financeiro. À orientadora Dra. Rosane Marina Peralta pelo auxílio durante o desenvolvimento da pesquisa.

REFERÊNCIAS

BACKES, E.; KATO, C.G.; DA SILVA, T.B.V.; UBER, T.M.; PASQUARELLI, D.L.; BRACHT, A.; PERALTA, R.M. Production of fungal laccase on pineapple waste and application in detoxification of malachite green. **J. Environ. Sci. Health B.**, v.1, p.1-12, 2022 <https://doi.org/10.1080/03601234.2022.2025739>.

BARCELOS, M.C.S.; RAMOS, C.L.; KUDDS, M.; RODRIGUEZ-COUTO, S.; SRIVASTAVA, N.; RAMTEKE, P.W.; MISHRA, P.K.; MOLINA, G. Enzymatic potential for the valorization of agro-industrial by-products. **Biotechnol. Lett.**, v.42, p.1799–1827, 2020 <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02957-3>.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v.31, p.426–428, 1959. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>.

SPACKI, K.C.; NOVI, D.M.P.; OLIVEIRA, V.A.; DURIGON, D.C.; FRAGA, F.C.; SANTOS, L.F.O.; HELM, C.V.; LIMA, E.A.; PERALTA, R.A.; MOREIRA, R.F.P.M.; BRACHT, A.; PERALTA, R.M. Improving enzymatic saccharification of peach palm (*Bactris gasipaes*) wastes via biological pretreatment with *Pleurotus ostreatus*. **Plants**, v.12, article 2824, 2023. <https://doi.org/10.3390/plants12152824>.