

Área: Tecnologia de Alimentos

ESTUDO DA UTILIZAÇÃO DE CASCA DE ARROZ PARA A PRODUÇÃO DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA PELO FUNGO *Pleurotus tailandia*

Gisele Teixeira Barros^{1*}, Isis Serrano Silva², Lucia Regina Durrant², Cristiano
Ragagnin de Menezes³

*1*Bolsista REUNI, Curso Superior de Tecnologia dos Alimentos, Departamento de Tecnologia e
Ciência de Alimentos; UFSM-Santa-Maria/RS;

2 UNICAMP; Campinas/SP;

3 Prof. Dr. Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos; UFSM-Santa-Maria/RS.

*E-mail: gisele_barros_t@hotmail.com

RESUMO

Na produção mundial de arroz, o Brasil se destaca como o principal produtor entre os países ocidentais. Durante o processamento do arroz é gerada uma grande quantidade de resíduos deste produto, sendo que o principal é a casca. A casca de arroz apresenta como principais constituintes orgânicos a celulose, hemicelulose e a lignina. Os fungos do gênero *Pleurotus*, possuem um complexo enzimático potente capaz de atuar sobre estes tipos de resíduos agroindustriais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas e ligninolíticas pelo fungo *Pleurotus tailandia*. O fungo foi cultivado em meio BDA por 7 dias a 30 °C e foi utilizado como inóculo na forma de discos. A fermentação foi realizada em cultivo submerso. A incubação foi feita a 30 °C, durante 30 dias, sem agitação (cultivo estacionário). Foram coletadas amostras, em triplicata, a partir do 5° dia de incubação, até o 30° dia. Após centrifugação, o sobrenadante foi utilizado como extrato enzimático bruto, para a determinação da atividade enzimática, utilizando a metodologia específica para cada enzima. O fungo *Pleurotus tailandia* produziu enzimas ligninolíticas lacase e manganês peroxidase, com atividades relativamente maiores do que os encontrados por MENEZES et al (2009), utilizando bagaço de cana-de açúcar. Em relação as demais enzimas também foram detectados valores de atividades enzimáticas durante todo o período de fermentação. Os resultados demonstram que o fungo *Pleurotus tailandia* utilizado na fermentação apresentou um grande potencial para produção de enzimas ligninolíticas, principalmente a enzima manganês-peroxidase e lacase.

Palavras-chave: Fungos *Pleurotus*, resíduos agroindustriais, casca de arroz, biodegradação, enzimas lignocelulolíticas.

1 INTRODUÇÃO

Na produção mundial de arroz, o Brasil se destaca como o principal produtor entre os países ocidentais. Apesar das reduções de produção em algumas safras nos últimos anos, devido a adversidades climáticas, a produção brasileira de arroz vem apresentando uma tendência de crescimento, em função, principalmente, do constante incremento de produtividade. Em 2003, a produção Brasileira representou 2,1% do total mundial, ocupando a 9º posição entre os produtores mundiais de arroz, com cerca de 13 milhões de toneladas por ano. O sistema de cultivo de arroz irrigado, tradicionalmente praticado na Região Sul do Brasil, vem contribuindo, em média, com 48% da produção nacional, sendo o RS o maior produtor brasileiro (IRGA, 2003). Durante o processamento do arroz é gerada uma grande quantidade de resíduos deste produto, sendo que o principal é a casca. A casca de arroz apresenta como principais constituintes orgânicos a celulose, hemicelulose e a lignina, o que dificulta a sua biodegradação, gerando problemas ao meio ambiente. Os fungos do gênero *Pleurotus*, possuem um complexo enzimático potente capaz de atuar sobre estes tipos de resíduos agroindustriais, auxiliando no trabalho de biodegradação, como também podendo ser uma alternativa viável para a obtenção de enzimas para utilização em processos biotecnológicos.

Este trabalho objetivou a avaliação da produção de enzimas celulolíticas (carboximetilcelulase e avicelase), hemicelulolíticas (xilanase) e ligninolíticas (lacase e manganês peroxidase) pelo fungo basidiomiceto, do gênero *Pleurotus tailândia*, através de fermentação submersa, utilizando casca de arroz como única fonte de carbono, criando desta forma alternativas para o mercado de enzimas, além de agregar valor a este resíduo e reduzir o impacto ambiental gerado.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizado o fungo *Pleurotus tailândia*, disponível do banco de culturas do DTCA/UFSM, para a produção de enzimas utilizando a casca de arroz. O fungo foi cultivado

em meio batata dextrose ágar por 7 dias a 30 °C e foi utilizado como inóculo na forma de discos de 6 mm de diâmetro. A fermentação foi realizada em cultivo submerso, utilizando frascos Erlenmeyers contendo 30 ml de meio basal (em pH 5,5) adicionado de 1% (m/v) dos substratos avaliados. O meio basal apresenta a seguinte composição: 1,4 g/L de (NH₄)₂SO₄; 2,0 g/L de KH₂PO₄; 0,1 g/L de uréia; 0,3 g/L de MgSO₄.7H₂O; 0,3 g/L de CaCl₂; 5,0 mg/L de FeSO₄.7H₂O; 1,56 mg/L de MnSO₄.H₂O; 2,0 mg/L de CoCl₂ e 1,4 mg/L de ZnSO₄.7H₂O a pH 5,5. Os frascos foram fechados e esterilizados a 121°C por 15 minutos. A incubação foi feita a 30 °C, durante 30 dias, sem agitação (cultivo estacionário). Foram coletadas amostras a cada 5 dias, em triplicata, a partir do 5° dia de incubação, até o 30° dia.

2.1.2 Determinação da atividade enzimática

As atividades enzimáticas iniciais foram determinadas em espectrofotômetro ultravioleta, acompanhadas por controles (caldos enzimáticos e substratos analisados isoladamente), para descartar possíveis interferentes com os métodos de determinação.

2.1.2.1 Atividade das enzimas ligninolíticas

As atividades das enzimas lacase (Lac, EC 1.10.3.2) e manganês peroxidase (MnP, EC 1.11.1.13), foram determinadas, a partir do cálculo da diferença de absorbância, conforme descrito a seguir. Todas as atividades foram expressas em U/L.min-1 (□ moles produto/min.L). Os cálculos realizados a partir da equação 1.

$$U/L = \frac{Y \text{ abs} \times 106}{E \times R \times t} = U/L.\text{min}^{-1} \quad (1),$$

onde A, absorbância final - absorbância inicial; E, □ (do produto formado); R, quantidade de caldo enzimático(L); t, tempo de reação (minutos).

2.1.2.1.1 Atividade da lacase

A atividade da lacase foi determinada, utilizando-se siringaldazina como substrato enzimático (Szklarz et al., 1989). A oxidação de siringaldazina até sua forma quinona foi acompanhada por 10 minutos a 525 nm, a temperatura ambiente. A mistura da reação foi

constituída por 0,6 mL de caldo enzimático, 0,2 mL de tampão citrato-fosfato 0,05 M (pH 5,0), 0,1 mL água destilada e 0,1 mL de siringaldazina 1,0mM preparada em etanol.

2.1.2.1.2 Atividade da manganês peroxidase

A atividade de peroxidase dependente de Mn(II), foi determinada pela oxidação de vermelho de fenol (Kuwahara et al., 1984). A mistura de reação (1,0 mL) foi constituída por 0,5 mL de caldo enzimático, 0,1mL de lactato de sódio 0,25M, 0,2 mL de albumina bovina 0,5%, 0,05 mL de MnSO₄ 2,0 mM, 0,05 mL de uma solução de H₂O₂ 2,0 mM preparada em tampão succinato de sódio 0,2 M (pH 4,5) e 0,1 mL de vermelho de fenol 0,1%. A mistura foi incubada durante 5 minutos e a reação foi interrompida pela adição de 40 μ L de NaOH 2,0 N, com a leitura em absorbância de 610 nm.

2.1.2.2 Atividade de enzimas celulolíticas

Nas determinações de carboximetilcelulase e avicelase, a glicose foi utilizada como padrão. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como o número de μ moles de açúcar redutor produzido por minuto por ml de enzima.

2.1.2.2.1 Atividade de avicelase

A atividade de avicelase (EC 3.2.1.91) consiste na adição de 1mL do extrato enzimático bruto em 1 mL de solução 1% de celulose microcristalina (avicel), em tampão acetato 0,05M, pH 5,0 e incubado a 50° C, por 30 minutos. Periodicamente, o sistema substrato-enzima foi agitado com a finalidade de manter a celulose em suspensão. Os açúcares redutores liberados foram determinados pelo método do ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS), de acordo com Miller (1959).

2.1.2.2.2 Atividade de carboximetilcelulase (CMCase)

A atividade de Carboximetilcelulase (CMCase, EC 3.2.1.4) consiste na adição de 1mL do extrato enzimático bruto em 1 mL de solução de carboximetilcelulose 1% em tampão

acetato 0,05M, pH 5,0 e incubado a 50°C, por 30 minutos. Periodicamente, o sistema substrato-enzima foi agitado com a finalidade de manter a celulose em suspensão. Os açúcares redutores liberados foram determinados pelo método do ácido-3,5-dinitrosalicílico (DNS), de acordo com Miller (1959).

2.1.2.3 Atividade de enzima hemicelulolítica

2.1.2.3.1 Atividade de xilanase

A atividade da enzima xilanase (endo-1,4-Z-xilanase, EC 3.2.1.8) foi determinada segundo Miller (1959). A reação consiste na mistura contendo 1 mL de sobrenadante da cultura (extrato enzimático), 1 mL de solução de 1% de xilana (Sigma) em 0,05 M de tampão acetato pH 5,0, e 2 mL da solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) foi incubado em 50° C por 30 minutos, e o sistema enzima-substrato foi agitado periodicamente para manter a xilana em suspensão. Os tubos contendo as reações foram lidas em espectrofotômetro em 550nm. Os valores foram expressos em U/mL , onde 1 unidade representa 1 [mol de xilose produzido por minuto.

2.1.3 Tratamento dos dados

Os dados obtidos foram submetidos ao teste ANOVA e comparados pelo teste Tukey ($p > 0,05$).

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fungo *Pleurotus tailandia* produziu enzimas ligninolíticas lacase e manganês peroxidase, com atividades relativamente maiores do que os encontrados por MENEZES et al (2009), utilizando bagaço de cana-de-açúcar, em fermentação submersa, incubando durante 30 dias a 30 °C, sem agitação (cultivo estacionário), que obteve as maiores atividades para a enzima lacase no 10° dia com 1,63 U/L e para enzima manganês peroxidase no 15° dia com 23,58 U/L. Para a atividade de lacase, foi detectada atividade desde o 5° dia de incubação,

sendo que ocorreu um aumento desta atividade no 30° dia (2,04 UI. L⁻¹). Para a enzima manganês peroxidase também ocorreu atividade desde o 5° dia de incubação, sendo que a maior atividade obtida foi no 25° dia, com 30,52 UI. L⁻¹. A enzima hemicelulolítica xilanase teve a maior atividade no 10° dia de incubação (0,056 UI.mL⁻¹). Estes resultados ficaram bem abaixo aos obtidos por QINNGHE et al. (2004), onde obteve-se 24,98 U/mL de atividade de xilanase, utilizando como substrato sabugo de milho e aveia utilizando fungo *Pleurotus ostreatus*- CY012 em fermentação líquida, sob condições otimizadas. Em relação as demais enzimas também foram detectados valores de atividades enzimáticas durante todo o período de fermentação, sendo que as maiores foram no 15° dia para a enzima avicelase (0,05 UI. mL⁻¹) e no 10° dia para a carboximetilcelulase (0,03 UI. mL⁻¹). Os valores obtidos para carboximetilcelulose ficaram um pouco abaixo dos encontrados por MENEZES et al (2009) em seu trabalho citado anteriormente. REDDY et al. (2003), estudaram a atividade enzimática celulolítica de fungos *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus sajor-caju*, utilizando substrato de resíduos lignocelulósicos de banana em fermentação semi-sólida, observaram também baixa atividade das enzimas celulolíticas. Embora as atividades enzimáticas celulolíticas e hemicelulolíticas tenham sido relativamente pequenas, são de grande potencialidade mediante aplicação de ferramentas de otimização para estes processos fermentativos.

Tabela 1: Atividade média das enzimas celulolíticas, hemicelulolíticas e ligninolíticas durante o período de incubação de 5 a 30 dias, sob fermentação submersa, a 30 °C.

Dias de Incubação	Enzimas Celulolíticas (UI.ML ⁻¹)		Enzimas Hemicelulolítica (UI.mL ⁻¹)	Enzimas Ligninolíticas (UI.L ⁻¹)	
	Avicelase ²	Carboximetilcelulase ²	Xilanase ²	Lacase ²	Manganês-Peroxidase ²
	M±DP ¹	M±DP ¹	M±DP ¹	M±DP ¹	M±DP ¹
5	0.054±0.000 a	0.014±0.002 a	0.032±0.016 a	1.196±0.149 a	3.498±0.323 a
10	0.033±0.011 b	0.035±0.001 b	0.056±0.005 b	1.809±0.064 a	12.735±0.718 b
15	0.056±0.001 a	0.030±0.011 b	0.021±0.002 a	1.732±0.064 a	22.659±0.274 c
20	0.016±0.002 cd	0.019±0.003 a	0.036±0.002 a	1.648±0.039 a	20.357±2.832 c
25	0.014±0.002 cd	0.015±0.002 a	0.033±0.011 a	1.429±0.563 a	30.521±0.852 d
30	0.014±0.006 cd	0.019±0.004 a	0.037±0.001 a	2.043±0.136 b	24.991±1.976 cd

¹ M=Atividade média da enzima, D= Desvio Padrão.

² Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo Teste Tukey a 5% de probabilidade.

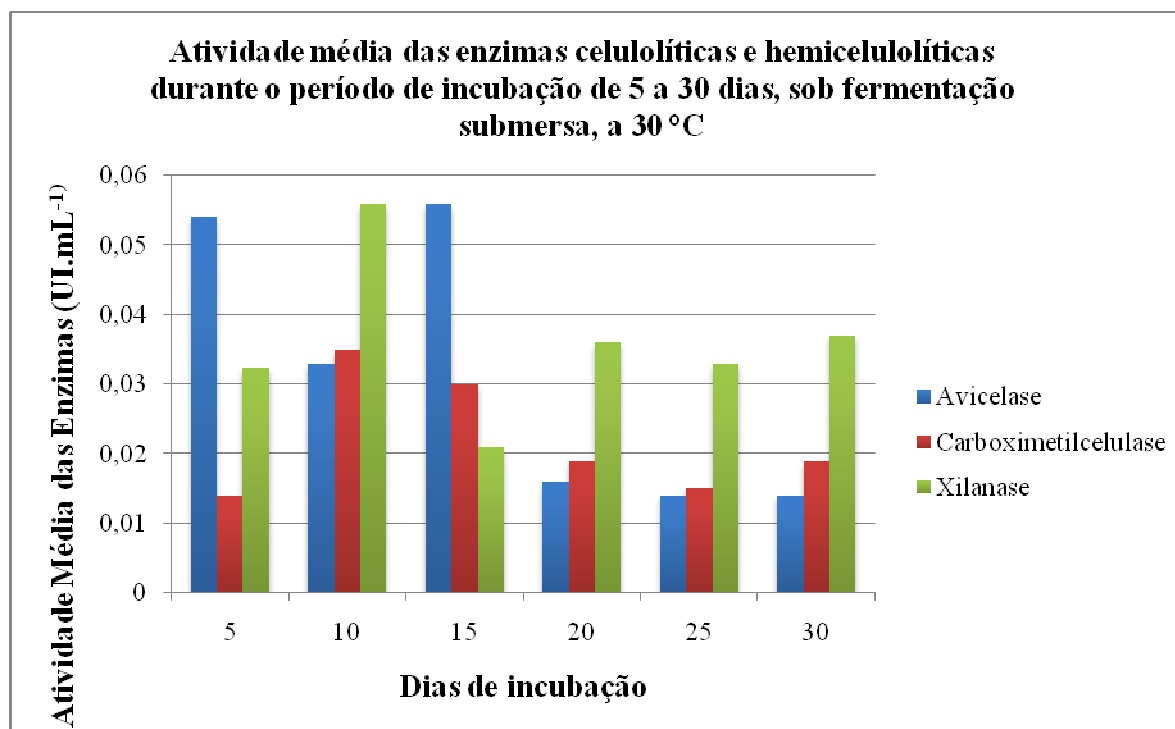


Figura 1: Atividade de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas após crescimento do fungo *Pleurotus tailândia* em resíduos de casca de arroz, no período de 5 a 30 dias, sob fermentação submersa, a 30 °C.

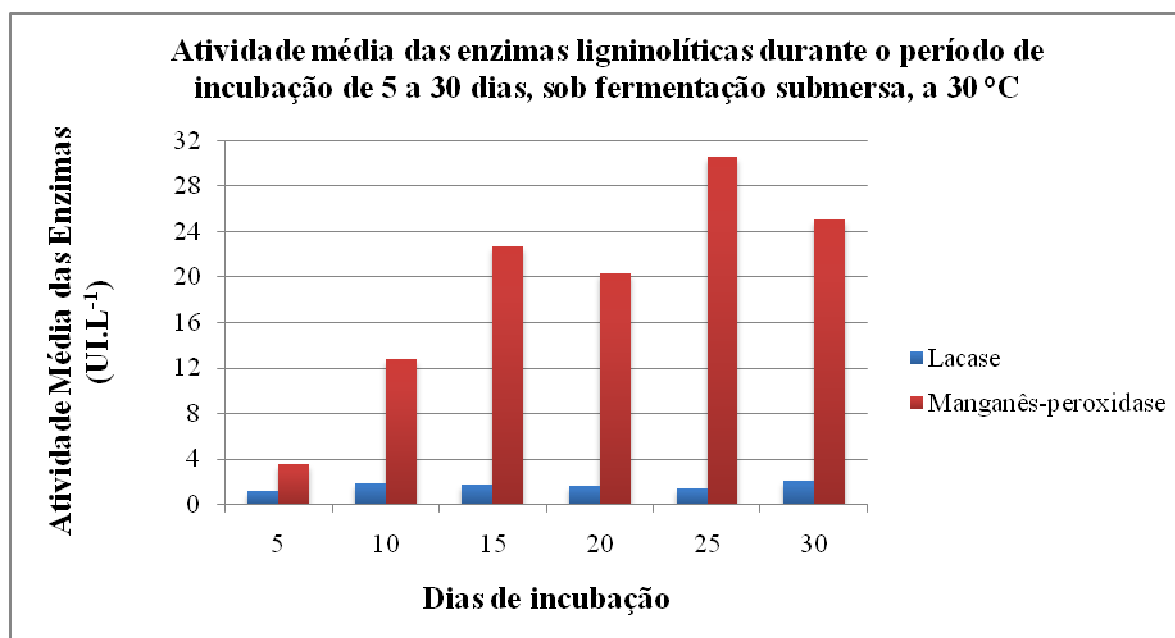


Figura 2: Atividade de enzimas ligninolíticas após crescimento do fungo *Pleurotus tailândia* em resíduos de casca de arroz, no período de 5 a 30 dias, sob fermentação submersa, a 30 °C.

3 CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que a casca de arroz é uma fonte viável para a produção de enzimas lignocelulolíticas, indicando assim que este resíduo pode mais estudado em relação a sua degradação. O fungo *Pleurotus tailândia* utilizado na fermentação apresentou um grande potencial para produção de enzimas ligninolíticas, principalmente a enzima manganês-peroxidase e lacase. Tendo em vista a grande quantidade de resíduos lignocelulósicos gerados pelas atividades agrícolas e pelas indústrias de processamento de alimentos, este processo pode ser utilizado, mediante maiores estudos, como uma alternativa para obtenção de enzimas com um custo mais barato em relação às enzimas que estão no mercado.

REFERÊNCIAS

www.irga.rs.gov.br/arquivos/INFORMATIVOOut2003.doc

<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrrigadoBrasil/cap01.htm>

QINNGHE, C.; XIAOYU, Y.; TIANGUI, N. CHENG, J. QIUGANG, M.. The screening of culture condition and properties of xylanase by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Process Biochemistry*. v.39, p. 561-1566, 2004.

MENEZES, C. R. de; SILVA, I. S.; DURRANT, L. R. Bagaço de cana: fonte para produção de enzimas lignocelulolíticas. *Estudos Tecnológicos - Vol. 5, n° 1*, p.68-78, jan/abr, 2009.

MILLER, G. L. Use of the dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, v.31, p.426-428, 1959.

REDDY, G.V.; BABU, R.; KOMARAIHAH, P.; ROY, K. R. R. M.; KOTHARI, I. L. 2003. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P.ostreatus* and *P. sajor-caju*). *Process of Biochemistry*, 38:1457-1462.

SZKLARZ, G. D.; ANTIBUS, R. K.; SINSABAUGH, R. L.; LINKINS, A. Production of phenol oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. *Mycologia*. v.81, p.234-240, 1989.

KUWAHARA, M.; GLENN, J. K.; MORGAN, M. A.; GOLD, M. H. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters*, v. 169, p. 247-250, 1984.