

## FERMENTAÇÃO EXTRATIVA DE ENZIMAS LIGNINOLÍTICAS PROVENIENTES DO *PLEUROTUS SAJOR-CAJU*

Nathalia dos Santos Canuto<sup>1,2</sup> (PROVIC/Unit); Carlos Eduardo Maynard Santana<sup>2,3</sup>,  
Luiz Fernando R. Ferreira<sup>2,3</sup>  
Ranyere Lucena de Souza<sup>2,3</sup> (Orientador)  
nathalia.canuto@souunit.com.br

<sup>1</sup>Universidade Tiradentes/Biomedicina/Aracaju/SE.

<sup>2</sup>Universidade Tiradentes/Engenharia de Processos/Aracaju/SE.

<sup>3</sup>Instituto de Tecnologia e Pesquisa/Aracaju/SE.

2.12.00.00-9 – Microbiologia; 2.12.02.02-8 Microbiologia Industrial e de Fermentação;

### RESUMO

**Introdução:** O Brasil é reconhecido em escala global na produção de laranja<sup>1</sup>. Em contrapartida, originam-se toneladas de substratos que podem ser descartados inadequadamente<sup>2</sup>. A aplicação de constituintes da fruta como o bagaço, farelo, casca e sementes, para reaproveitamento substituindo a matéria-prima, viabiliza economia e redução de custos significativos para o setor. Aspectos que são um grande destaque nos debates relacionados ao tema<sup>3</sup>. Após a extração do suco da laranja, a polpa residual é condicionada a uma segunda etapa de extração resultando no *Pulp Wash* (PW)<sup>4</sup>, que pode ser importante meio indutor para a produção de enzimas modificadoras de lignina (EML), como a lacase (Lac, E.C.1.10.2.2). Neste sentido, afim de viabilizar o uso destes biocatalisadores em aplicações industriais, processos downstream para a separação e purificação de enzimas a partir de processos fermentativos utilizando extração líquido-líquido, pode ser uma alternativa promissora, ao considerar sua biocompatibilidade, baixo-custo, redução do número de etapas de purificação, e seletividade. **Objetivo:** O presente estudo objetivo, a utilização da fermentação extrativa de enzimas ligninolíticas produzidas pelo fungo *P. sajor-caju* pós fermentação submersa em efluente cítrico *Pulp wash*, utilizando extração líquido-líquido, tendo o copolímero tri-bloco termosensível Pluronic® L-61 PEG-PPG-PEG (polipropilenoglicol-polipropilenoglicol-poli(etil)enoglicol) como indutor de fase. **Metodologia:** O *Pulp Wash*, cedido pela Indústria Alimentícia MARATÁ Sucos do Nordeste LTDA (Estância-SE), foi processado no Laboratório de Tratamentos de Resíduos e Efluentes (LTRE) e no Laboratório de Pesquisa em Alimentos (LPA) – ITP/Aracaju-SE. Já as cepas fúngicas de *Pleurotus sajor-caju*, da coleção de microrganismos do Laboratório de Biologia Molecular (LBM) – ITP/Aracaju-SE, foram inoculadas em Erlenmeyers com 100 mL do pulp wash, com o pH corrigido<sup>5</sup>. Cada frasco recebeu 3 discos miceliais do meio MEA sendo incubados por até 8 dias em orbital refrigerado, depois filtrado à vácuo separando a biomassa fúngica. Os sistemas líquido-líquido foram formados com a adição de Pluronic® L-61. As condições experimentais de temperatura, concentração e pH para o processo de separação foram investigadas em triplicatas. **Resultados:** A fermentação submersa se mostrou altamente eficiente na produção de Lacase via *P. sajor-caju* em PW. O resíduo cítrico apresenta açúcares redutores, potencializando o desenvolvimento fúngico e aumento na

excreção da Lac. Após a extração líquido-líquido (LLE) observou-se a presença predominante da enzima na fase polimérica (topo), ao apresentar um  $KE < 1$ . O Pluronic L-61, permitiu a purificação da lacase em 28,45 vezes e sua recuperação de 83,64% na fase aquosa (fundo), sob parâmetros de purificação em concentração (m.m-1) de 45% Pluronic L-61, pH 5,0 e 25°C. O solvente polimérico influiu na termoseparação da fase de topo do sistema, onde a temperatura crítica de solução inferior foi estabelecida em 32°C. **Conclusões:** Os dados experimentais evidenciaram a capacidade integrativa da fermentação submersa do *P. Sajor-caju* em efluente cítrico, usando o método LLE para recuperação da Lacase, através de polímero termossensível, sendo promissora para escalonamento e redução de custos de downstream.

**PALAVRAS-CHAVE:** fermentação extrativa, *P. sajour-caju*, purificação enzimática.

**AGRADECIMENTOS:** CNPq, CAPES e FAPITEC pela concessão de bolsas a ao BNB pelo suporte financeiro à pesquisa.

## ABSTRACT

**Introduction:** Brazil is recognized on a global scale in the production of orange<sup>1</sup>. On the other hand, tons of substrates are originated that can be inadequately discarded<sup>2</sup>. The application of fruit constituents such as bagasse, bran, peel and seeds, for reuse by replacing the raw material, enables significant savings and cost reduction for the sector. These aspects are a great highlight in the debates related to the theme<sup>3</sup>. After orange juice extraction, the residual pulp is conditioned to a second extraction step resulting in Pulp Wash (PW)<sup>4</sup>, which can be an important inductive medium for the production of lignin modifying enzymes (LMA), such as lacase (Lac, E.C.1.10.2.2). In this sense, in order to enable the use of these biocatalysts in industrial applications, downstream processes for the separation and purification of enzymes from fermentative processes using liquid-liquid extraction may be a promising alternative, when considering their biocompatibility, low-cost, reduced number of purification steps, and selectivity. **Objective:** The present study aims the use of extractive fermentation of ligninolytic enzymes produced by the fungus *P. sajour-caju* after submerged fermentation in citrus Pulp wash effluent, using liquid-liquid extraction, having the tri-block thermosensitive copolymer Pluronic® L-61 PEG-PPG-PEG (polypropylene glycol-polyethylene glycol-polyethylene glycol) as phase inducer. **Methodology:** The Pulp Wash, provided by the Food Industry MARATÁ Sucos do Nordeste LTDA (Estância-SE), was processed in the Waste and Effluent Treatment Laboratory (LTRE) and in the Food Research Laboratory (LPA) - ITP/Aracaju-SE. The fungal strains of *Pleurotus sajour-caju* from the microorganism collection of the Laboratory of Molecular Biology (LBM) - ITP/Aracaju-SE, were inoculated in Erlenmeyers with 100 mL of pulp wash, with the pH corrected<sup>5</sup>. Each flask received 3 mycelial discs of the MEA medium, which were incubated for up to 8 days in a refrigerated orbital, and then vacuum filtered to separate the fungal biomass. Liquid-liquid systems were formed with the addition of Pluronic® L-61. The experimental conditions of temperature, concentration and pH for the separation process were investigated in triplicates. **Results:** Submerged fermentation proved highly efficient in lacase production via *P. sajour-caju* in PW. The citrus residue presents reducing sugars, enhancing fungal development and increasing Lac excretion. After liquid-liquid extraction (LLE) it was observed the predominant presence of the enzyme in the polymeric phase (top), by presenting a  $KE < 1$ . The Pluronic L-61, allowed the purification of lacase in 28.45 times and its recovery of 83.64% in the aqueous phase (bottom), under purification parameters in concentration (m.m-1) of 45% Pluronic L-61, pH 5.0 and 25°C. The polymeric solvent influenced the thermoseparation of the top phase of the system, where the critical bottom solution temperature was set at 32°C. **Conclusions:** The experimental data evidenced the integrative capacity of submerged fermentation of *P. Sajor-caju* in citrus effluent, using the LLE method for Lacase recovery, through thermosensitive polymer, being promising for scale-up and downstream cost reduction.

**KEYWORDS:** extractive fermentation, *P. sajour-caju*, enzyme purification.

**ACKNOWLEDGEMENTS:** CNPq, CAPES and FAPITEC for granting scholarships a to BNB for financial support to the research.

**REFERENCES:**

1. USDA. Citrus: World Markets and Trade. Disponível em: <<https://www.fas.usda.gov/search/brazil>> Acesso em: 11 set. 2020.
2. Mahato, N., Sharma, K., Sinha, M., Baral, E. R., Koteswararao, R., Dhyani, A., Hwan Cho, M., & Cho, S. (2020). Bio-sorbents, industrially important chemicals and novel materials from citrus processing waste as a sustainable and renewable bioresource: A review. *Journal of advanced research*, 23, 61–82.
3. Dorte, Renato Pinheiro. Investigação de fungos ligninolíticos na produção de lacase utilizando lignina kraft e borra de café. MS thesis. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2019.
4. Cruz, Y., Vieira, Y. A., Vilar, D. S., Torres, N. H., Aguiar, M. M., Cavalcanti, E. B., Américo-Pinheiro, J., Soriano, R. N., Bharagava, R. N., Lima, Á. S., & Ferreira, L. (2020). Pulp wash: a new source for production of ligninolytic enzymes and biomass and its toxicological evaluation after biological treatment. *Environmental technology*, 41(14), 1837–1847.
5. Vilar, D. S., Fernandes, C. D., Nascimento, V. R., Torres, N. H., Leite, M. S., Bharagava, R. N., ... & Ferreira, L. F. R. (2021). Hyper-production optimization of fungal oxidative green enzymes using citrus low-cost byproduct. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(1), 105013.