

"Tecnologia e Inovação: o papel da ciência nos novos desafios da indústria de alimentos"

## VIABILIDADE DO FARELO DE SOJA (*Glycine max*) PARA A PRODUÇÃO DE LACASE POR MEIO DA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

Thaís Santos Moraes LIMA<sup>1\*</sup>, Alexsandra Nascimento FERREIRA<sup>1</sup>, Izabella de Carvalho Batista MUNIZ<sup>1</sup>, Jéssica Ferreira BORGES<sup>1</sup>, Charline Soares dos Santos ROLIM<sup>1</sup>, Renata Cristina Ferreira BONOMO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pós-Graduação em Ciências Ambientais; Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia;

<sup>1</sup>Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos, Departamento de Tecnologia Rural e Animal;

<sup>2</sup> Docente/pesquisador, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Departamento de Tecnologia Rural e Animal.

\*E-mail para contato: tmoraes2559@gmail.com

**RESUMO** - *A enzima lacase é uma oxidase multicobre com amplas aplicações industriais, como biorremediação de efluentes e clarificação de sucos e vinhos. A fermentação em estado sólido (FES) se destaca na produção de enzimas microbianas por seu baixo custo e alinhamento com os princípios da economia circular e sustentabilidade. Este estudo investigou o uso de farelo de soja como substrato na FES para produção de lacases pelo fungo Pleurotus ostreatus. Com objetivo de avaliar a viabilidade da produção utilizando farelo de soja como única fonte de nutrientes e minerais. Na fermentação em batelada utilizou 5 g de substrato e água estéril. Três halos de micélio fúngico foram inoculados em meio e incubados a 28 °C. O experimento foi realizado em triplicata, o resultado foi avaliado pela média da atividade enzimática a cada 24 horas durante 240 horas de produção da enzima. A atividade enzimática máxima de lacase foi de 500,22 U.L<sup>-1</sup> em 168 horas. Os resultados indicaram que *P. ostreatus* foi capaz de produzir lacases utilizando apenas farelo de soja como fonte de nutrientes. Portanto, o uso de farelo de soja na FES é uma alternativa viável e promissora para a produção de lacases por *P. ostreatus*.*

**Palavras-chave:** Bioconversão; Indústria Verde; Catalisadores Naturais.

## FEASIBILITY OF SOYBEAN BRAN (*Glycine max*) FOR LACCASE PRODUCTION VIA SOLID-STATE FERMENTATION

**ABSTRACT** - *Laccase enzyme is a multicopper oxidase with wide industrial applications, such as effluent bioremediation and clarification of juices and wines. Solid-state fermentation (SSF) stands out in the production of microbial enzymes due to its low cost and alignment with the principles of circular economy and sustainability. This study investigated the use of soybean meal as a substrate in SSF for the production of laccases by the fungus *Pleurotus ostreatus*,*

"Tecnologia e Inovação: o papel da ciência nos novos desafios da indústria de alimentos"

*with the objective of assessing the feasibility of production using soybean meal as the sole source of nutrients and minerals. In the batch fermentation, 5 g of substrate and sterile water were used. Three fungal mycelium discs were inoculated in the medium and incubated at 28°C. The experiment was conducted in triplicate, and the result was evaluated by the average enzymatic activity every 24 hours over 240 hours of enzyme production. The maximum laccase enzymatic activity was 500.22 U. L<sup>-1</sup> at 168 hours. The results indicated that *P. ostreatus* was able to produce laccases using only soybean meal as a nutrient source. Therefore, the use of soybean meal in SSF is a viable and promising alternative for the production of laccases by *P. ostreatus*.*

**Keywords:** Bioconversion; Green Industry; Natural Catalysts.

## 1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda por processos biotecnológicos sustentáveis tem impulsionado a busca por substratos alternativos e de baixo custo para a produção de bioproductos de interesse industrial. Nesse contexto, o farelo de soja, o qual é obtido após a remoção do óleo, é um exemplo significativo, devido aos teores de lignina, celulose e hemicelulose, que o torna um meio nutritivo ideal para o crescimento de fungos das classes Ascomiceto e Basidiomiceto. Isso ocorre devido as condições geradas na técnica da fermentação em estado sólido (FES), a qual gera uma condição de semelhança ao habitat natural para esses organismos (Huang et al., 2023). Além disso, a FES se sobressai, quando comparada a outras técnicas de fermentação, pois, utilizam uma baixa quantidade de água, é econômica, não precisa adicionar reagentes químicos, pois o subproduto orgânico já apresenta os nutrientes necessários para o crescimento dos fungos, como (C, N<sub>2</sub>, Mg). Além disso, essa prática se alinha aos princípios da economia circular, promovendo a sustentabilidade ao reduzir o desperdício e estimular o reaproveitamento de materiais (Teigiserova et al., 2021).

Além disso, essa técnica, tem se revelado extremamente eficaz na produção de biomoléculas e na produção enzimática, como as benzenodiol oxidoredutases (EC 1.10.3.2), popularmente conhecidas como lacases. Essas enzimas, pertencem ao grupo das oxidases multicobre, as quais podem ser sintetizadas por uma variedade de organismos, incluindo insetos, plantas, bactérias e fungos. Essa enzima é uma biocatalisadora, capaz de oxidar uma vasta variedade de compostos orgânicos, incluindo fenóis e aminas aromáticas, sendo a lignina seu principal substrato (Mayolo-Deloisa et al., 2020). Devido à presença desta característica, essa enzima é utilizada em diversas indústrias, principalmente por causa do apelo ambiental, devido a mesma ser extremamente utilizada em pesquisas e processos de biorremediação em efluentes têxteis, pesticidas, e compostos fenólicos, os quais poluem o solo e os corpos d'água. Atuam também, nas indústrias, de papel e celulose, para o branqueamento da polpa e com a degradação da lignina, na indústria de alimentos atua na clarificação de sucos e vinhos. Para tanto, as lacases fúngicas, são as mais utilizadas dentro das indústrias, isso porque as mesmas apresentam maior eficiência de reprodutibilidade e estabilidade térmica e de pH. Sendo, portanto, uma enzima de extrema importância ambiental e biotecnológica (Gutiérrez et al., 2023).

"Tecnologia e Inovação: o papel da ciência nos novos desafios da indústria de alimentos"

Os fungos conhecidos como, os da podridão branca, denominação feita aos fungos de compostos lignocelulósicos, são os mais utilizados para a excreção das oxirredutases. Um dos principais exemplares, é o *Pleurotus ostreatus*, conhecido na indústria alimentícia como *shimeji preto*. Existem diversos estudos, que visam a sua ampla aplicabilidade e desempenho industriais, sendo utilizado na produção de compostos bioativos e excretos enzimáticos. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar a produção da lacase de *Pleurotus ostreatus*, por meio da FES, utilizando farelo de soja como única fonte de nutrientes, minerais e indutores na excreção enzimática, avaliando a atividade enzimática em função do tempo de produção.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Microrganismo

O cogumelo *Pleurotus ostreatus* foi adquirido da empresa P&D cogumelos LTDA, encontrada em Itapetinga-BA.

### 2.2 Método de Cultivo e Domesticação

Os fragmentos cortados foram passados em série, em placas de Petri descartáveis contendo etanol 70%, por 30 segundos, e, posteriormente, limpo passando por água deionizada estéril. Após esta etapa os fragmentos dos cogumelos foram secos em papel filtro e depositados no centro de uma placa de Petri contendo meio Batata Dextrose Ágar (BDA). Após este processo, as placas foram incubadas em estufa BOD a 28 °C por sete dias ou até o micélio crescer em toda a placa (Miles et al., 2004). Após o meio ser completamente colonizado, foram realizados repiques para manutenção da cultura.

### 2.3 Preparação do Subproduto

O resíduo foi previamente seco a 65 °C em estufa por 12 horas. Depois de seco, o farelo de soja foi moído em granulometria em 2,0 mm de diâmetro para facilitar o crescimento do fungo na fermentação em estado sólido, posteriormente foram embalados em sacos plásticos e estocados em ambiente fresco.

### 2.4 Produção da Lacase em Fermentação em Estado Sólido (FES)

O farelo de soja foi utilizado como substrato na FES, que ocorreram em Erlenmayers de 100 mL, simulando biorreatores, contendo 5g do substrato. Os recipientes com o subproduto a 60% de umidade, foram previamente esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 min. Após o resfriamento, 3 halos de 6 mm contendo o micélio fúngico foram inoculados no meio. Em seguida, as fermentações foram incubadas em BOD a 28 °C durante 240 horas, sendo que a cada 24 horas uma triplicata foi retirada. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média e desvio padrão.

### 2.5 Extração da Enzima do Sólido Fermentado

"Tecnologia e Inovação: o papel da ciência nos novos desafios da indústria de alimentos"

Ao final da fermentação, foram adicionados 25 mL de água destilada, a extração do preparado enzimático foi realizada em agitador rotatório com tempo estabelecido em 60 min e velocidade de agitação controlados a 220 rpm. A torta foi prensada para a obtenção do extrato enzimático bruto, o qual, posteriormente foi centrifugado a 9.000g por 15 min para remoção de sólidos mais finos. O sobrenadante foi estocado em tubos falcons de 15 mL para posteriores ensaios de atividade enzimática.

## 2.6 Atividade da Lacase

A atividade de lacase foi determinada conforme descrito por Barbosa et al. (1996), utilizando-se como substrato o ABTS (2,2 azino-bis ácido 3-etylbenzotiazolina-6-sulfônico) a 50 mM. O sistema de incubação será constituído de 900  $\mu$ L de ABTS, 2 mL de tampão McIlvaine (pH 5,0), 100  $\mu$ L de solução enzimática. Depois, as amostras foram incubadas em banho Maria por 30 min a 30 °C, para paralisar a reação, as mesmas amostras foram paralisadas em banho com gelo por 15 min. A leitura foi determinada em espectrômetro a 420 nm. Uma unidade de atividade de lacase é expressa como o número de  $\mu$  mols de substrato oxidado por minuto, por mL da solução de enzima.

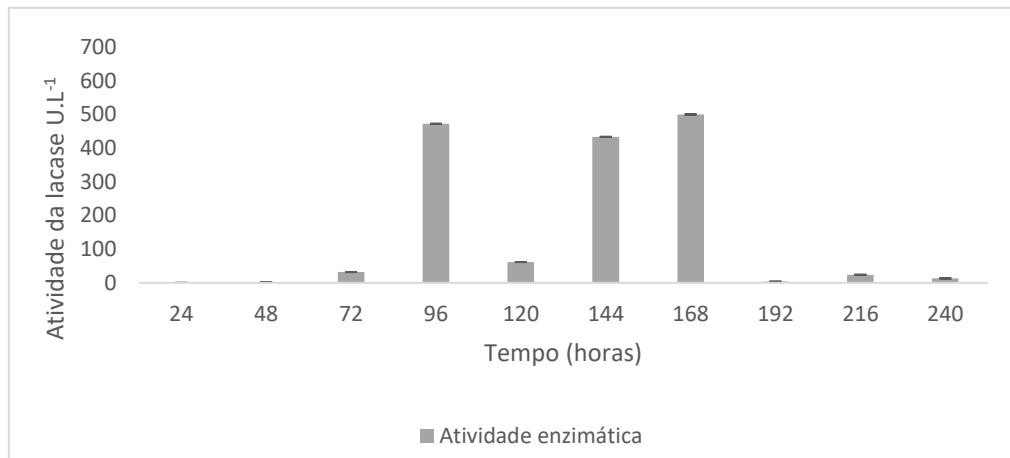
$$UL^{-1} \frac{\Delta abs \cdot V_t \cdot 10^{-6}}{\varepsilon \cdot d \cdot V_a \cdot t} \quad (1)$$

Onde:  $\Delta abs$  é a diferença entre absorbância final e inicial,  $V_t$  é o volume total da reação (mL),  $\varepsilon$  é o coeficiente de extinção molar ( $36000 \text{ L M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ),  $d$  é o comprimento do passo (cm),  $V_a$  é o volume de amostra (mL) e  $t$  é o tempo de reação (min). A atividade da lacase também foi expressa em  $U$  por grama de SRC, para isso, o valor em  $UL^{-1}$  foi multiplicado pelo volume de solução tampão acetato de sódio (150 mL) e dividido pela quantidade (gramas) de SRC.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fungo *P. ostreatus* produziu lacases na fermentação do farelo de soja a partir de 48 horas. Na figura 1 são apresentadas as médias de atividade de lacase obtidas de cada triplicata das fermentações, durante 240 horas. No processo de fermentação em estado sólido o fungo secreta enzimas lignolíticas, como lacases, responsáveis por degradar a lignina presente na biomassa vegetal (Bezerra., 2023). Este comportamento foi observado, ao logo do tempo da fermentação do farelo de soja, pela atividade enzimática de cada fermentação.

"Tecnologia e Inovação: o papel da ciência nos novos desafios da indústria de alimentos"



**Figura 1:** Influência do tempo de fermentação na produção de lacase de *P. ostreatus*.

Na tabela 1 foi apresentado o valor do  $\pm$  desvio padrão, observado entre a variação entre o valor de atividade enzimática ( $U.L^{-1}$ ), em função do tempo de fermentação, para tanto, foi utilizado um cálculo do somatório dos valores individuais e médias das triplicatas de cada hora, como exemplificado na equação a seguir. Com isso, pode-se observar que a variação entre as desvios padrão das médias das triplicatas a cada 24 horas de fermentação foi baixa. Os valores no cálculo do desvio padrão, foram consistentes, mostrando uma baixa dispersão dos valores, apresentando, portanto, uma maior consistência entre as repetições.

**Tabela 1.** Atividade enzimática da lacase, em função do tempo de 24/24 horas, com a temperatura fixada em 28°C, durante as 240h.

Temperatura (°C)	Tempo (h)	Atividade enzimática ( $U.L^{-1}$ )	Desvio Padrão $\pm$
28	24	0,00	0,00
	48	2,21	0,01
	72	31,95	0,02
	96	472,62	0,07
	120	61,66	0,06
	144	433,86	0,03
	168	500,21	0,02
	192	3,46	0,03
	216	23,87	0,02
	240	12,92	0,03

$$Dp = \sqrt{\frac{(x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad (2)$$

"Tecnologia e Inovação: o papel da ciência nos novos desafios da indústria de alimentos"

$x_i$  = Valor individual

$\bar{x}$  = Média dos valores

$n$  = Número de valores

Como observado, as primeiras 48 horas não apresentam atividades significativas, isso se deve pela fase lag, que é aquela na qual o fungo ainda está assimilando os nutrientes presentes no meio. Entre 72 e 96 horas de fermentação todos os tratamentos apresentaram aumento na atividade enzimática, a exceção do tempo de 120 horas que duplicou o seu crescimento, quando comparado ao tempo 72 horas. A elevação após 168 horas pode ser devido ao consumo do açúcar gerado até então, causando esgotamento de substrato e reativando o mecanismo de expressão da enzima. Em 168 horas, as triplicatas apresentaram um pico na atividade. Após esse período, os tempos 192 - 240 começaram mostrar redução na atividade, certamente, por esgotamento dos nutrientes ou por acúmulo de produtos inibidores da síntese enzimática. Segundo Ibarri et al., (2019), o tempo de fermentação aumenta a atividade metabólica fúngica, de modo que as altas funções metabólicas geram uma assimilação de aminoácidos para a produção de biomassa e, por este motivo, determina o teor pra mais ou pra menos na atividade enzimática em função do tempo.

Suryadi et al., (2022), em seu artigo sobre fermentação em estado sólido, destacou que os dois nutrientes mais importantes presentes nos substratos são o carbono, que atua no crescimento celular, e o nitrogênio, que é o segundo composto mais abundante no meio de fermentação, e atua na síntese anabólica de compostos celulares. Levando em consideração a análise bromatológica do farelo de soja, de acordo com o CQBAL (2024) o farelo apresenta 1,58% de lignina, 7,14% de celulose e 6,06% de hemicelulose, compostos essenciais para o bom desempenho fúngico e excreção enzimática.

O *Pleurotus ostreatus* é um fungo que tem seu crescimento favorecido em temperaturas ambientes, variando de  $28 \pm 2$  °C, estudos recentes, descrevem a temperatura de 28 °C como a temperatura ideal para o crescimento do micélio fúngico no meio de BDA. Edae e Alemu (2017), relataram em sua pesquisa, que após o período de crescimento total do *P. ostreatus* em meios de cultura lignocelulósicos a atividade registrada para lacase, mostrou 0,264 U/mL<sup>-1</sup> em 17 dias de fermentação, utilizando indutor sintético e incubados a 28 °C, nessa pesquisa eles avaliaram que a temperatura apresentou uma maior significância, quando comparado ao indutor. Corroborando, assim, com a faixa de temperatura escolhida para este trabalho.

#### 4. CONCLUSÃO

Neste trabalho, o fungo *Pleurotus ostreatus* foi capaz de produzir lacases, durante a fermentação do farelo de soja sem adição de nenhum nutriente, com atividade máxima de 500,22 (U.L<sup>-1</sup>) em 168 horas de fermentação. O uso deste subproduto na FES, mostrou ser altamente viável, demonstrando ser vantajoso para a biotecnologia de processos agroindustriais, fomentando o desenvolvimento de novos produtos de interesse industrial. Em estudos posteriores, será otimizada a produção da enzima, bem como avaliada a estabilidade enzimática frente as características de temperatura, pH e umidade.

"Tecnologia e Inovação: o papel da ciência nos novos desafios da indústria de alimentos"

## 5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão de bolsas que permitem a dedicação exclusiva para a pesquisa.

## 6. REFERÊNCIAS

- BARBOSA, AM; DEKKER, RFH; HARDY, GE St. Álcool veratrílico como indutor de lacase por um ascomiceto, *Botryosphaeria sp.*, quando rastreado no corante polimérico Poly R-478. **Letters in Applied Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 93-96, 1996.
- EDAE, T.; ALEMU, M. Selection and optimization of lignocellulosic substrate for laccase production from *Pleurotus spp.* **International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research**, v. 8, n. 4, p. 38-48. 2017.
- GOMBERT A.K., ANNETTE L.P., LEDA R.C., FREIRE DMG. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake substrate. **Process Biochemistry** 35, 85-90. 1999.
- GUTIÉRREZ-ANTÓN, M., SANTIAGO-HERNÁNDEZ, A., RODRÍGUEZ-MENDOZA, J., CANO-RAMÍREZ, C., BUSTOS-JAIMES, I., AGUILAR-OSORIO, G., CAMPOS, J., & HIDALGO-LARA, M. Melhoria da produção de lacase por *Thielavia terrestris* Co3Bag1. Melhorando o desempenho biocatalítico do TtLacA termofílico nativo por meio da imobilização em esferas de gel de alginato de cobre. **Journal of Fungi**, 9. 2023.
- MILES, PHILIP G.; CHANG, SHU-TING. Cogumelos: cultivo, valor nutricional, efeito medicinal e impacto ambiental. **CRC press**, 2004.
- HUANG, J., DAI, Y., ZHANG, Y., LIU, G., PENG, F., XIE, M., & XIONG, T. Dinâmica da comunidade bacteriana, perfil de metabólitos e características físico-químicas durante a fermentação em estado sólido de farelo de soja e substratos mistos de milho inoculados com *Bacillus pumilus* e *Limosilactobacillus fermentum*. **Journal of the science of food and agriculture**. 2023.
- IBARRURI, J., CEBRIÁN, M., & HERNÁNDEZ, I. Solid state fermentation of brewer's spent grain using *Rhizopus sp* to enhance Nutritional value. **Waste and Biomass Valorization**. 2019.
- MAYOLO-DELOISA, K., GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, M., & RITO-PALOMARES, M. Lacases na indústria de alimentos: bioprocessamento, potenciais aplicações industriais e biotecnológicas. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, 8. 2020.
- SURYADI, H., JUDONO, J. J., PUTRI, M. R., ECLESSIA, A. D., ULHAQ, J. M., AGUSTINA, D. N., & SUMIATI, T. Biodelignification of lignocellulose using ligninolytic enzymes from white-rot fungi. **Heliyon**, p. e08865. 2022.
- TEIGISEROVA, D., BOURGINE, J., & THOMSEN, M. Fechando o ciclo de resíduos e resíduos de cereais com tecnologias sustentáveis: Uma visão geral da produção de enzimas por meio da fermentação fúngica em estado sólido. **Produção e consumo sustentáveis**. 2021.
- VALADARES FILHO, S.C., LOPES, S.A. Tabelas Brasileiras de Composição de Alimentos para Ruminantes. **CQBAL 4.0**. 2024.