

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MANGANÊS PEROXIDASE POR *Ganoderma lucidum* EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO MISTURAS DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Marise S. Carvalho[2]; Adriana B. Pimentel[2]; Alisson S. S. Quinto[1,2]; Gabriel L. S. Jesus[1,2]; Guilherme M. Madureira[4]; Rafael Rocha Teixeira[5]; Izis R. A. S. Vieira[1]; Marcelo Franco[1]

[1] Grupo de Pesquisa em Biotransformação e Biocatálise Orgânica, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, CEP 45654-370, Brasil.
[2] Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, CEP 40110-100, Brasil.
[3] Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, CEP 81531-980, Brasil.
[4] Departamento de Engenharias e Computação, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, CEP 45654-370, Brasil.
[5] Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, CEP 45654-370, Brasil.
marisecarvalho.tec@gmail.com

Palavras-Chave: biomassas lignocelulósicas, planejamento experimental, atividade enzimática.

Introdução

As enzimas ligninolíticas produzidas por fungos de podridão branca despertam crescente interesse biotecnológico devido à sua capacidade de oxidar compostos aromáticos complexos. Entre elas, a manganês peroxidase (MnP) destaca-se como uma oxidoredutase extracelular dependente de peróxido de hidrogênio e íons manganês, desempenhando papel fundamental no sistema enzimático responsável pela modificação da lignina. Em razão de sua elevada capacidade catalítica, a MnP tem sido amplamente investigada em aplicações ambientais e industriais. Entretanto, seu rendimento está diretamente relacionado ao microrganismo empregado, à composição do substrato e às condições de cultivo utilizadas (CHAUHAN e CHOUDHURY, 2021).

Nesse contexto, a fermentação em estado sólido (FES) constitui uma estratégia promissora para a produção de enzimas, pois favorece o crescimento fúngico sobre substratos com baixa disponibilidade de água livre e possibilita o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos como fonte de nutrientes. Além de reduzir a dependência de meios sintéticos, essa abordagem agrega valor a biomassas agroindustriais e contribui para o desenvolvimento de processos mais sustentáveis. Contudo, fatores como a composição da matriz fermentativa, o tempo de cultivo, a umidade inicial e a temperatura exercem influência significativa sobre o

desempenho do processo, tornando necessária a otimização dessas variáveis (QUINTO et al., 2025).

Entre os fungos de podridão branca, *Ganoderma lucidum* destaca-se pela capacidade de produzir enzimas oxidativas extracelulares quando cultivado em resíduos vegetais, característica que amplia seu potencial para aplicações biotecnológicas baseadas em FES (CHEVREUIL et al., 2022). No presente estudo, foram selecionados palma forrageira, casca de coco-verde e palha de milho como componentes da matriz fermentativa, considerando sua ampla disponibilidade regional e o potencial de aproveitamento como substratos para a produção enzimática.

A obtenção de elevados rendimentos depende da avaliação integrada dos fatores que influenciam o processo fermentativo. Nesse sentido, o emprego de planejamentos experimentais multivariados permite investigar simultaneamente os efeitos individuais e as interações entre as variáveis, reduzindo o número de experimentos e aumentando a confiabilidade estatística dos resultados. O planejamento de mistura simplex-centroide é particularmente adequado para otimizar as proporções dos diferentes resíduos que compõem a matriz fermentativa, enquanto o planejamento Doehlert possibilita avaliar variáveis quantitativas, como umidade e temperatura, por meio da construção de superfícies de resposta capazes de indicar as condições experimentais mais favoráveis.

Após a etapa de produção, a avaliação das condições de atividade da enzima torna-se essencial para definir seu potencial de aplicação. A atividade da MnP pode variar em função do pH, da temperatura e do tempo de incubação, parâmetros que influenciam diretamente seu desempenho catalítico e sua utilização em diferentes processos biotecnológicos. Assim, a determinação dessas condições complementa a otimização da produção e fornece informações importantes sobre o comportamento do extrato enzimático obtido por FES (NAZ; GUPTA; CHATTERJEE, 2022; SI et al., 2021).

Diante desse contexto, este trabalho teve como objetivo otimizar a produção de MnP por *G. lucidum* em fermentação em estado sólido utilizando misturas de palma forrageira, casca de coco-verde e palha de milho como matriz fermentativa. Para isso, foram avaliados os efeitos da composição da mistura, do tempo de cultivo, da umidade e da temperatura sobre a produção da enzima. Adicionalmente, foram determinadas as condições de pH e temperatura que

proporcionam maior atividade da MnP, bem como a manutenção de sua atividade ao longo do tempo.

Material e Métodos

A palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) (P) foi obtida na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, em Itapetinga-BA. A casca de coco-verde (*Cocos nucifera*) (CCV) e a palha de milho (*Zea mays*) (PM) foram obtidas de produtores e comerciantes em Ilhéus-BA. Os materiais foram higienizados, secos a 65 °C por três dias, triturados e armazenados. *Ganoderma lucidum*, cedido pela Universidade Federal da Bahia, foi cultivado em ágar sabouraud a 28 °C por sete dias. Quatro discos miceliais de 7 mm foram inoculados em erlenmeyers de 125 mL contendo 5 g de substrato.

O perfil fermentativo foi determinado em sete frascos contendo mistura igualitária de P, CCV e PM, com 65% de umidade, incubados a 28 °C. Foi utilizado um frasco independente para cada tempo de cultivo, sendo um frasco retirado a cada 24 h durante sete dias para extração da MnP. Portanto, cada tempo correspondeu a uma única réplica biológica (n = 1). A determinação da atividade enzimática de cada extrato foi realizada em triplicata analítica (n = 3). O extrato foi obtido pela adição de 50 mL de água destilada estéril ao material fermentado, seguida de agitação a 200 rpm por 30 min, extração mecânica e centrifugação a 4.000 rpm por 10 min.

A atividade de MnP foi determinada segundo Lundell et al. (1990), com adaptações. A reação continha 50 µL de $MnSO_4$, 50 µL de H_2O_2 em tampão succinato, 100 µL de lactato de sódio, 200 µL de albumina sérica bovina, 600 µL de extrato e 100 µL de vermelho de fenol. A absorbância foi medida a 610 nm nos tempos 0 e 5 min, utilizando coeficiente de absorção molar de 44.600 $L.mol^{-1}\ cm^{-1}$. A atividade foi expressa em U/mL.

A composição da matriz foi avaliada por planejamento de mistura simplex-centroide com nove experimentos, incluindo os substratos isolados, combinações binárias e três repetições da mistura igualitária no ponto central. P, CCV e PM foram as variáveis independentes, mantendo-se 5 g por ensaio, e a atividade de MnP foi a variável-resposta. Após a seleção da composição, um planejamento Doehlert com nove experimentos avaliou umidade de 45 a 85% e temperatura de 22 a 34 °C, com três repetições no ponto central.

A manutenção da atividade foi avaliada pela incubação do extrato enzimático a 45 °C e pH 6,0 durante nove horas, com determinações em intervalos de uma hora. As determinações da atividade enzimática foram realizadas em triplicata. A atividade determinada no tempo zero, antes da incubação, foi considerada como 100%, e os valores obtidos nos demais tempos foram expressos como atividade relativa (%).

A influência conjunta do pH e da temperatura foi estudada por planejamento Doehlert com nove experimentos, incluindo três repetições do ponto central, nas faixas de pH 3,0–7,0 e 30–70 °C. Os modelos foram avaliados por análise de variância, considerando a significância da regressão, o coeficiente de determinação (R^2) e a falta de ajuste, quando disponível, adotando-se nível de confiança de 95% e $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

O perfil fermentativo mostrou que a maior atividade de manganês peroxidase (MnP) ocorreu no quarto dia de cultivo. Considerando a ausência de replicatas biológicas independentes em cada tempo de cultivo, o quarto dia foi interpretado como o período de maior resposta observado no perfil realizado, devendo essa seleção ser considerada de caráter exploratório.

A composição da matriz fermentativa influenciou a produção de MnP por *Ganoderma lucidum*. No planejamento de mistura simplex-centroide, as atividades variaram de 44,84 a 179,37 U/mL, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Planejamento de mistura simplex-centroide para a produção de MnP por *G. lucidum*.

Ensaio	P (g)	CCV (g)	PM (g)	MnP (U/mL)
1	5,00	0	0	47,08
2	0	5,00	0	156,95
3	0	0	5,00	44,84
4	2,50	2,50	0	112,10
5	0	2,50	2,50	67,26

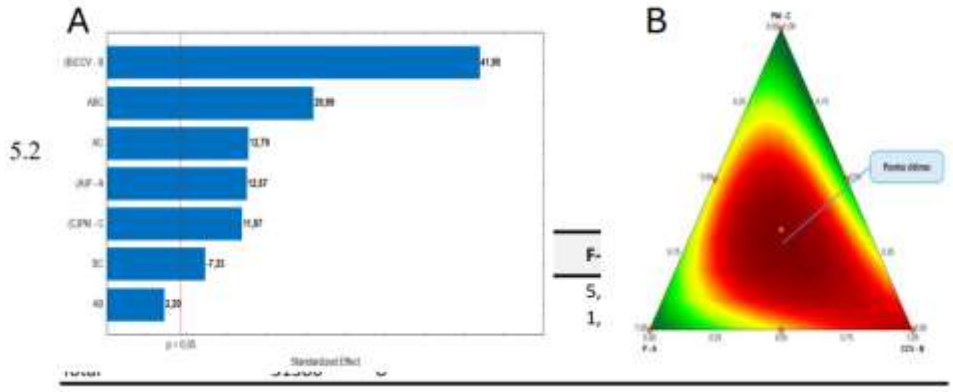
Ensaio	P (g)	CCV (g)	PM (g)	MnP (U/mL)
6	2,50	0	2,50	104,63
7[a]	1,66	1,66	1,66	179,37
8[a]	1,66	1,66	1,66	171,89
9[a]	1,66	1,66	1,66	175,98

[a] Ponto central.

Entre os substratos isolados, a casca de coco-verde (CCV) apresentou a maior atividade, com 156,95 U/mL, enquanto a palma forrageira (P) e a palha de milho (PM) resultaram em 47,08 e 44,84 U/mL, respectivamente. As combinações binárias produziram atividades entre 67,26 e 112,10 U/mL. Entretanto, os maiores valores foram registrados nas repetições da mistura igualitária, cuja média foi de 175,75 U/mL. A proximidade entre essas respostas também indicou repetibilidade no ponto central.

O modelo cúbico especial foi significativo, com $F = 293$, $p = 0,003$ e $R^2 = 0,998$, demonstrando que 99,8% da variação observada foi explicada pelo modelo. O diagrama de Pareto mostrou que a CCV apresentou o maior efeito padronizado positivo, seguida pela interação entre os três componentes. A superfície de resposta concentrou a região de maior atividade no interior do diagrama, confirmando que o uso conjunto dos substratos foi mais favorável do que as demais proporções avaliadas.

Figura 1 - Efeito da composição da matriz fermentativa sobre a produção de MnP por *G. lucidum*: (A) diagrama de Pareto dos efeitos padronizados; e (B) superfície de resposta do planejamento de mistura simplex-centroide. A linha vertical representa o limite de significância a 95% de confiança.



Esses resultados demonstram a importância de avaliar as interações entre as biomassas, pois a seleção baseada apenas nos componentes isolados não identificaria a mistura de maior resposta. Planejamentos de mistura têm sido empregados para selecionar biomassas destinadas à produção de enzimas oxidativas, permitindo avaliar simultaneamente os componentes e suas interações (QUINTO et al., 2025).

Após a seleção da mistura igualitária, os efeitos da umidade e da temperatura foram avaliados por planejamento Doehlert. A atividade variou de 37,36 a 186,84 U/mL, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Planejamento Doehlert para avaliação dos efeitos da umidade e da temperatura sobre a produção de MnP.

Ensaio	Umidade (%)	Temperatura (°C)	MnP (U/mL)
1	85	28	44,84
2	75	34	82,81
3	45	28	67,26
4	55	22	156,95
5	75	22	37,36
6	55	34	119,58
7[a]	65	28	186,84
8[a]	65	28	186,84
9[a]	65	28	186,84

[a] Ponto central.

A maior atividade foi obtida a 65% de umidade e 28 °C, com 186,84 U/mL nas três repetições. A menor resposta ocorreu a 75% de umidade e 22 °C, com 37,36 U/mL,

demonstrando que a produção dependeu da combinação entre as variáveis, e não apenas do aumento ou da redução isolada de uma delas.

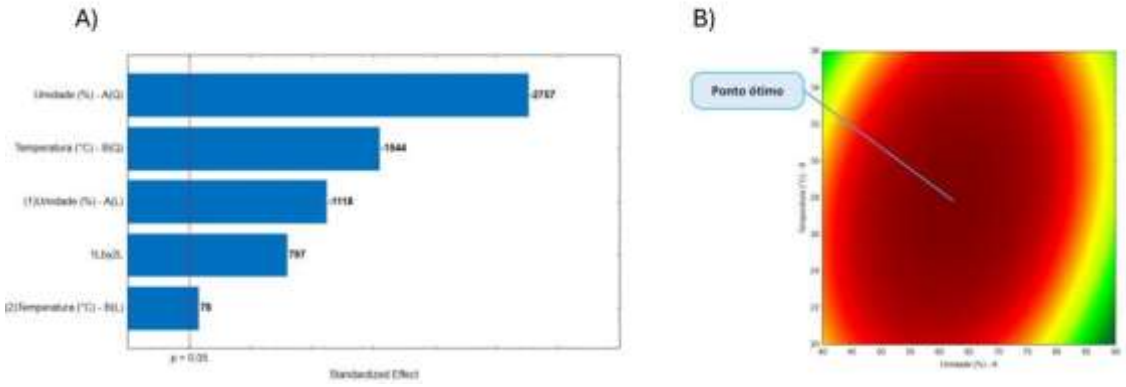
Tabela 3 – Análise de variância do modelo quadrático aplicado ao planejamento Doehlert para avaliação dos efeitos da umidade e da temperatura sobre a produção de MnP.

Fonte de variação	SS	Df	MS	F-calculado	*p*-value	R^2
Regressão	28396	5	5679	5,70	0,091**	0,904 (90,4%)
Falta de ajuste	2989	1	2989	1,1 E6	0,001***	
Erro puro	0,005	2	0,002			
Total	31386	8				

SS: soma quadrática; Df: graus de liberdade; MS: média quadrática; R^2: coeficiente de determinação. Nível de confiança de 95% (p = 0,05).

A regressão do modelo não foi estatisticamente significativa ao nível de 5% (F = 5,70; p = 0,091), embora tenha apresentado coeficiente de determinação de R^2 = 0,904. A falta de ajuste foi significativa (p = 0,001), indicando que o modelo quadrático não representou integralmente a variação experimental. Em sistemas de fermentação em estado sólido, a resposta biológica pode ser influenciada pela heterogeneidade da matriz fermentativa, pela dinâmica da água no substrato e por alterações nas condições locais de crescimento e metabolismo do fungo, fatores que podem contribuir para comportamentos não completamente descritos pelo modelo matemático empregado (HU et al., 2022; JIN et al., 2019). Dessa forma, o modelo foi utilizado para auxiliar na interpretação das tendências observadas dentro do domínio experimental, sem ser empregado para validação de uma condição ótima.

Figura 2 - Efeito da umidade e da temperatura sobre a produção de MnP por *G. lucidum*: (A) diagrama de Pareto dos efeitos padronizados; e (B) gráfico de contorno da atividade enzimática. A linha vertical representa o limite de significância a 95% de confiança.



O diagrama de Pareto indicou maiores efeitos padronizados associados aos termos quadráticos da umidade e da temperatura, ao termo linear da umidade e à interação entre os fatores, enquanto o termo linear da temperatura não foi significativo. O gráfico de contorno apresentou a região de maior resposta próxima ao ponto central. Entretanto, considerando a ausência de significância global da regressão e a falta de ajuste significativa, esses resultados foram interpretados de forma descritiva. Assim, 65% de umidade e 28 °C correspondem à condição de maior resposta experimental entre aquelas avaliadas, e não a uma condição ótima experimentalmente validada.

A MnP apresentou atividade relativa superior a 100% durante o período de incubação a 45 °C e pH 6,0. Foi observado aumento da atividade relativa ao longo do ensaio, com resposta mais elevada no oitavo horário, seguida de redução no nono. As determinações foram realizadas em triplicata; entretanto, os valores individuais das repetições não estavam disponíveis para recuperação das medidas de dispersão nesta etapa de revisão. Dessa forma, o comportamento observado foi interpretado de maneira descritiva, sem atribuição de mecanismo específico para o aumento da atividade.

Valores de atividade relativa superiores a 100% indicam que a atividade determinada após a incubação foi maior que aquela utilizada como referência no tempo inicial. Contudo, na ausência dos valores individuais das triplicatas e das respectivas medidas de dispersão, não é possível determinar com segurança se a magnitude do aumento observado decorre de uma alteração consistente da atividade enzimática ou da variabilidade experimental.

O efeito conjunto do pH e da temperatura sobre a atuação da MnP foi avaliado por um segundo planejamento Doehlert, com atividades relativas entre 30,77 e 130,78%, conforme apresentado na Tabela 4.

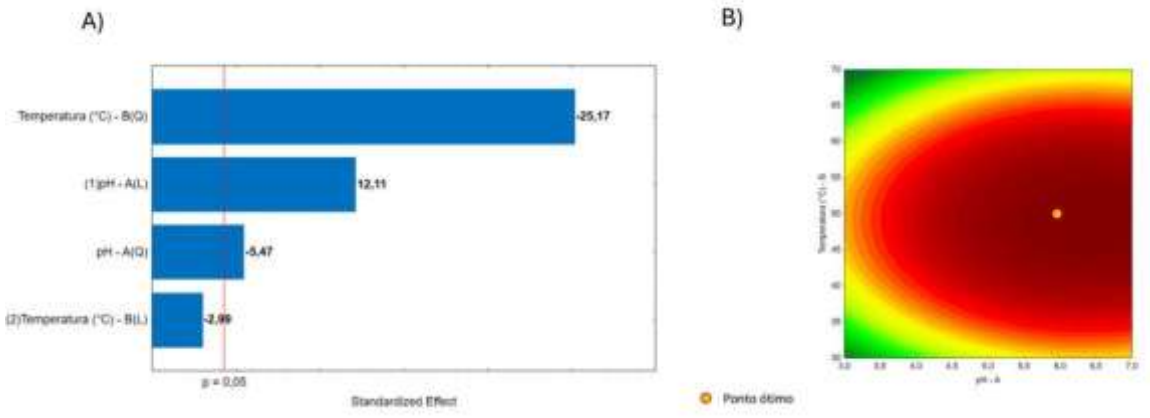
Tabela 4 - Planejamento Doehlert para avaliação da influência do pH e da temperatura sobre a atividade relativa da MnP.

Ensaio	Temperatura (°C)	pH	Atividade relativa (%)
1	50	7	123,08
2	70	6	69,23
3	50	3	92,31
4	30	4	30,77
5	30	6	92,31
6	70	4	30,77
7[a]	50	5	123,08
8[a]	50	5	130,78
9[a]	50	5	126,93

[a] Ponto central.

As repetições realizadas a 50 °C e pH 5 apresentaram média de 126,93%. Também foi observada atividade superior a 100% a 50 °C e pH 7. Os menores valores ocorreram em pH 4, tanto a 30 quanto a 70 °C, correspondendo a 30,77%. Portanto, a atuação da MnP foi determinada pela combinação entre os dois fatores, não sendo adequada a interpretação isolada do pH ou da temperatura.

Figura 3 - Influência do pH e da temperatura sobre a atividade da MnP: (A) diagrama de Pareto dos efeitos padronizados; e (B) gráfico de contorno da atividade relativa. A linha vertical representa o limite de significância a 95% de confiança.



O termo quadrático da temperatura apresentou o maior efeito padronizado, seguido pelos termos linear e quadrático do pH. O termo linear da temperatura não foi significativo. A região de maior resposta ocorreu próxima a 50 °C e pH entre 5 e 6, em concordância com os valores experimentais.

A regressão foi significativa, com $F = 12,20$, $p = 0,016$ e $R^2 = 0,942$. Entretanto, a falta de ajuste também foi significativa ($p = 0,031$), indicando que o modelo não descreveu integralmente o comportamento da atividade enzimática nas condições avaliadas. Respostas enzimáticas frente a variações simultâneas de pH e temperatura podem apresentar comportamento complexo e não linear, não necessariamente representado integralmente pelo modelo quadrático ajustado. Dessa forma, a interpretação foi fundamentada principalmente nos valores experimentais e na tendência gráfica, evitando o uso isolado do modelo para fins preditivos.

O pH pode alterar o estado de ionização de grupos envolvidos na catálise e na interação entre a enzima e o substrato, enquanto a temperatura influencia a conformação e a estabilidade da proteína. Por esse motivo, a condição de maior atividade inicial não necessariamente corresponde à condição de maior estabilidade durante períodos prolongados, tornando necessária a avaliação conjunta desses parâmetros (SI et al., 2021).

Os resultados da caracterização demonstraram que a atividade da MnP variou em função das condições avaliadas. No planejamento de pH e temperatura, a maior resposta experimental ocorreu em torno de 50 °C e pH 5. Entretanto, considerando a falta de ajuste observada, esses resultados devem ser interpretados dentro do domínio experimental estudado e em conjunto com os valores experimentais obtidos.

Conclusões

A produção de manganês peroxidase por *Ganoderma lucidum* em fermentação em estado sólido foi influenciada pelo tempo de cultivo, pela composição da matriz fermentativa, pela umidade e pela temperatura. O quarto dia apresentou a maior resposta observada no perfil fermentativo. Entre as composições avaliadas, a mistura igualitária de palma forrageira, casca de coco-verde e palha de milho apresentou a maior resposta média, com 175,75 U/mL. A combinação de 65% de umidade e 28 °C proporcionou atividade de 186,84 U/mL, sendo adotada como condição fermentativa selecionada.

Na avaliação das condições de pH e temperatura, a MnP manteve atividade relativa superior a 100% durante nove horas de incubação a 45 °C e pH 6,0. A avaliação conjunta do pH e da temperatura demonstrou maior resposta experimental a 50 °C e pH 5, com média de 126,93% de atividade relativa no ponto central.

Em conjunto, os resultados permitiram identificar condições experimentais promissoras para a produção e atuação da MnP. A mistura igualitária apresentou a maior resposta entre as composições avaliadas, enquanto 65% de umidade e 28 °C corresponderam à maior atividade observada no planejamento fermentativo. Na avaliação de pH e temperatura, a maior resposta experimental ocorreu a 50 °C e pH 5; entretanto, a falta de ajuste significativa do modelo ($p = 0,031$) limita sua utilização para fins preditivos. Assim, as condições identificadas devem ser interpretadas dentro do domínio experimental avaliado e requerem validação adicional antes de extrapolações para aplicações biotecnológicas.

Agradecimentos

Agradecemos à Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) e ao Grupo de Pesquisa em Biotransformação e Biocatálise Orgânica (LABIOCAT), pelo apoio e infraestrutura disponibilizados.

Referências

CHAUHAN, A. K.; CHOUDHURY, B. Synthetic dyes degradation using lignolytic enzymes produced from Halopiger aswanensis strain ABC_IITR by solid-state fermentation. **Chemosphere**, 273, 129671, 2021.

CHEVREUIL, L. R.; OLIVEIRA JÚNIOR, S. D.; VASCONCELOS, A. S.; BINDÁ, V. S.; PESSOA, V. A.; NASCIMENTO, L. B. B.; GOUVÊA, P. R. S.; SALES-CAMPOS, C. Screening of ligninolytic enzymes produced by Ganoderma lucidum in solid residues from the Amazon. **Research, Society and Development**, 11(14), e243111436257, 2022.

HU, S.; ZHU, Q.; REN, A.; GE, L.; HE, J.; ZHAO, M.; HE, Q. Roles of water in improved production of mycelial biomass and lignocellulose-degrading enzymes by water-supply solid-state fermentation of Ganoderma lucidum. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 133(2), 126–132, 2022.

JIN, G.; ZHU, Y.; RINZEMA, A.; WIJFFELS, R. H.; GE, X.; XU, Y. Water dynamics during solid-state fermentation by Aspergillus oryzae YH6. **Bioresource Technology**, 277, 68–76, 2019.

LUNDELL, T.; LEONOWICZ, A.; ROGALSKI, J.; HATAKKA, A. Formation and action of lignin-modifying enzymes in cultures of Phlebia radiata supplemented with veratric acid. **Applied and Environmental Microbiology**, 56(9), 2623–2629, 1990.

NAZ, S.; GUPTA, S.; CHATTERJEE, T. A review: optimization of fungal laccase production and their potential application in effluents treatment. **Journal of Scientific Research**, 66(1), 86–102, 2022.

QUINTO, A. S. S.; SAMPAIO, I. C. F.; CARVALHO, M. S.; CÉZAR, K. S.; SILVA, F. N.; COSTA, F. S.; SOUZA, M. S.; PIMENTEL, A. B.; TAVARES, I. M. C.; NASCIMENTO, N. A.; SANTANA, E. C.; LIMA, M. D.; IRFAN, M.; FRANCO, M. Valorization of agri-food by-products for laccase oxidative multienzyme extract production and dye degradation: a sustainable biodegradation approach. **Journal of the Indian Chemical Society**, 102(6), 101717, 2025.



SI, J.; WU, Y.; MA, H.-F.; CAO, Y.-J.; SUN, Y.-F.; CUI, B.-K. Selection of a pH- and temperature-stable laccase from Ganoderma australe and its application for bioremediation of textile dyes. **Journal of Environmental Management**, 299, 113619, 2021.