



Produção sustentável de lacase por *Ganoderma lucidum*: Aplicação de planejamento multivariado no reaproveitamento do bagaço de Cana-de-açúcar

Alisson S. da S. Quinto¹; Júlia L. Nascimento¹; Guilherme M. Madureira¹; Adriana. B. Pimentel¹; Marise. S. de Carvalho¹; Gabriel. L. S. de Jesus¹; Izis. R. A. S. Vieira¹; Marcelo Franco¹

¹Grupo de Pesquisa em Biotransformação e Biocatálise Orgânica, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus-BA, Brasil.
julialima0390@gmail.com

Palavras-Chave: Resíduos agroindustriais, Fermentação em estado sólido, Bioprocessos.

Introdução

Na economia circular, o desenvolvimento de bioprocessos surge como uma alternativa sustentável para a valorização de resíduos agroindustriais. O setor sucroenergético brasileiro gera anualmente grandes volumes de bagaço de cana-de-açúcar, uma biomassa lignocelulósica que pode se tornar um passivo ambiental se não for gerida adequadamente. Por ser rico em carbono e de baixo custo, o bagaço representa um substrato promissor para a Fermentação em Estado Sólido (FES), técnica vantajosa por simular o habitat natural de fungos filamentosos e reduzir significativamente os custos operacionais do bioprocessos (SODHI et al., 2024).

Nesse contexto, o basidiomiceto *Ganoderma lucidum*, fungo causador da podridão branca, destaca-se por seu alto potencial na produção de enzimas ligninolíticas, especialmente as lacases. Estas enzimas são oxidorreduções de imensa relevância para aplicações biotecnológicas contemporâneas, pois utilizam o oxigênio molecular como aceptor de elétrons na oxidação de uma ampla gama de compostos fenólicos e aromáticos. Em decorrência desse mecanismo eficiente e sem a necessidade de cofatores tóxicos, as lacases são cruciais para processos industriais sustentáveis, como a biorremediação de efluentes, biopolpação da celulose, síntese de produtos químicos e aplicações nas indústrias alimentícia e têxtil (KYOMUHIMBO e BRINK, 2023).

Contudo, para que a viabilidade industrial seja alcançada, a produção de lacases via FES exige o controle rigoroso de condições de cultivo, como pH e temperatura, que influenciam tanto a biossíntese quanto a integridade estrutural da enzima. Além de proporcionar altas titulações, avaliar a termoestabilidade do extrato enzimático é de suma relevância, uma vez que processos industriais frequentemente submetem os biocatalisadores a condições severas, exigindo enzimas robustas que mantenham sua atividade ao longo do



tempo. Apesar de existirem estudos sobre lacases, há uma evidente lacuna na literatura científica no que tange à integração da otimização produtiva por *G. lucidum* em bagaço de cana aliada à investigação detalhada da estabilidade térmica de seu extrato bruto, visando a aplicação industrial direta. Para superar esse desafio, o uso de planejamentos experimentais multivariados, como a matriz de Doehlert, constitui uma estratégia eficiente para modelar essas respostas e otimizar as condições operacionais com um número reduzido de experimentos (FAUZIAH et al., 2025).

Assim, fortalecendo a conexão entre o potencial enzimático do fungo e a necessidade de bioprocessos industriais robustos, o objetivo deste trabalho foi otimizar a produção de lacase por *Ganoderma lucidum* utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato por FES. Para tanto, investigou-se a influência do pH e da temperatura na produção enzimática por meio do planejamento Doehlert, seguida da avaliação multivariada da termoestabilidade do extrato enzimático bruto obtido.

Material e Métodos

Microorganismo e inóculo

O fungo *Ganoderma lucidum* (originário da coleção do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá, Brasil) foi cultivado em placas de Petri contendo Potato Dextrose Agar (PDA). A incubação ocorreu a 28 °C por 7 dias em incubadora bacteriológica, sendo as placas conservadas a 4 °C (por no máximo 30 dias) até a utilização nos ensaios.

Substrato

O resíduo do bagaço de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), obtido de uma agroindústria de beneficiamento em Uruçuca (Bahia, Brasil), foi seco em estufa de circulação de ar a 70 °C por 24 h. Em seguida, o material foi triturado em moinho de facas para a obtenção de uma granulometria de 2 mm. A umidade da biomassa foi determinada em balança de infravermelho prévia à utilização.

Fermentação em Estado Sólido (FES) e extração enzimática

A FES foi conduzida em frascos Erlenmeyer contendo 5 g do substrato com a umidade inicial ajustada para 80% (m/m). Os meios foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 minutos (1 atm). Após resfriamento, foram inoculados com quatro discos de micélio (aproximadamente 6 mm de diâmetro) de *G. lucidum* e incubados a 28 °C por 5 dias. Para a produção do extrato multienzimático (EM), adicionou-se 100 mL de água destilada estéril aos



frascos, mantendo-os em agitação orbital (200 rpm) por 30 minutos. Após extração mecânica e centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante (EM) foi recolhido para quantificação.

Determinação da atividade de lacase

A atividade enzimática foi determinada em espectrofotômetro a 470 nm, conforme proposto por Umar e Ahmed (2022), com adaptações. O meio reacional foi composto por 0,75 mL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0), 0,5 mL do EM e 0,75 mL de solução de guaiacol 100 mM. A mistura foi incubada a 28 °C por 30 minutos. A unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 µmol de guaiacol. A atividade enzimática foi expressa em U.L⁻¹.

Planejamento experimental e análise estatística

Para otimizar a produção enzimática, aplicou-se um planejamento experimental matriz de Doehlert. Foram investigados os efeitos das variáveis independentes temperatura (24 a 32 °C) e pH (5 a 9) sobre a atividade da lacase (U.L⁻¹), totalizando nove experimentos. Posteriormente, a otimização da termoestabilidade da enzima no extrato bruto foi avaliada via delineamento Box-Behnken, investigando-se os efeitos combinados do pH (5, 7 e 9), temperatura (40, 60 e 80 °C) e tempo de incubação (1, 2 e 3 horas). A resposta monitorada foi a atividade relativa (%), calculada em relação à atividade inicial antes da exposição térmica. Os dados experimentais foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) para validação dos modelos quadráticos, adotando-se um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

A otimização da produção de lacase por *Ganoderma lucidum* foi avaliada por meio da matriz de Doehlert. As condições experimentais avaliadas e as respectivas respostas de atividade enzimática (U.L⁻¹) obtidas estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Matriz experimental Doehlert apresentada em valor real e codificado usada para otimizar as condições experimentais aplicadas à fermentação em estado sólido para produção de lacase por *Ganoderma lucidum*

Experimento	Temperatura (°C) – A	pH – B	Resposta (U.L ⁻¹)
1	32 (+2)	7 (0)	66,69
2	30 (+1)	9 (+1)	10,39
3	24 (-2)	7 (0)	197,62

Experimento	Temperatura (°C) – A	pH – B	Resposta (U.L ⁻¹)
4	26 (-1)	5 (-1)	358,75
5	30(+1)	5 (-1)	333,75
6	26 (-1)	5 (+1)	9,50
7*	28 (0)	7 (0)	259,05
8*	28 (0)	7 (0)	232,34
9*	28 (0)	7 (0)	251,04

Nota: (*) Pontos centrais do delineamento

A partir desses dados, a análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 2, confirmou a robustez estatística do modelo quadrático gerado. O coeficiente de determinação (R^2) de 0,984 indica que 98,4% de variabilidade dos dados é explicada pela regressão, que foi altamente significativa ($p = 0,007$). A falta de ajuste não foi significativa ($p = 0,086$), validando a capacidade preditiva do modelo.

Tabela 2 : Análise de variância para o modelo quadrático.

Fonte de variação	SS	Df	MS	Fcalculado	p-values	R^2
Regressão	1,37E+5	5	2,75E+04	36,12	0,007**	0,984 (98,4%)
Falta de ajuste	1,90E+3	1	1,90E+03	10,14	0,086***	
Erro puro	3,76E+02	2	1,88E+02			
Total	1,40E+5	8				

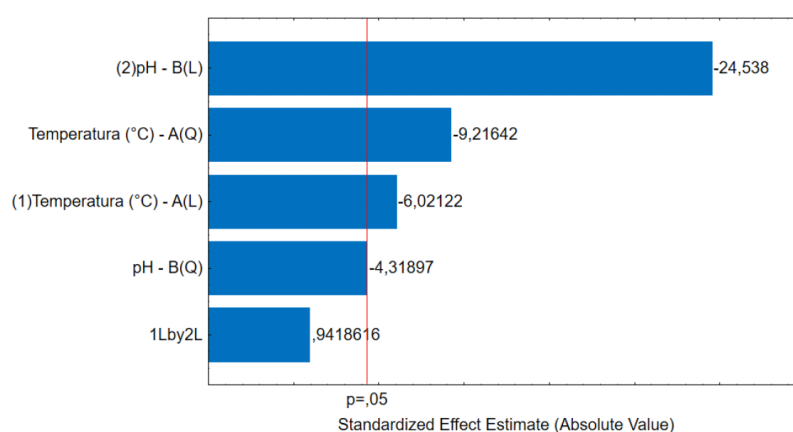
Nota: Soma quadrática (SS), grau de liberdade (Df), média quadrática (MS), coeficiente de determinação (R^2). Nível de confiança de 95% ($p = 0,05$). Modelo significativo ($p < 0,05$). Falta de ajuste não significativa ($p > 0,05$).*

Os efeitos das variáveis independentes e as interações ótimas podem ser observados na superfície de resposta e no gráfico de Pareto (Figura 1). A análise estatística confirmou as condições ideais para a máxima atividade enzimática, com a resposta predita pelo modelo corroborando os achados experimentais, conforme detalhado na Tabela 3.

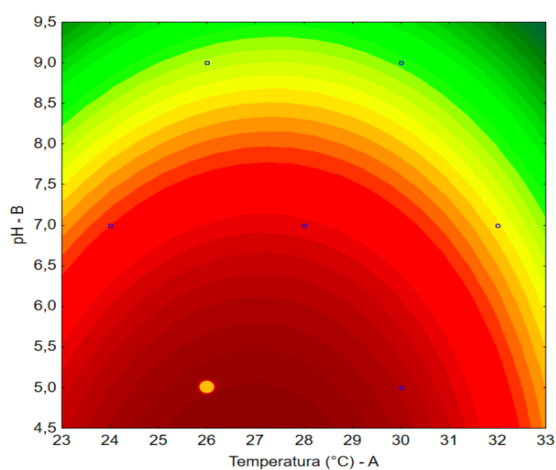


Figura 1: Efeitos das variáveis temperatura e pH na atividade da lacase: (A) Gráfico de Pareto com nível de confiança de 95% e (B) Superfície de Resposta.

(A)



(B)



As condições ótimas previstas para a produção enzimática, baseadas na análise gráfica e estatística, foram estabelecidas em 26 °C e pH 5,0 (Tabela 3), projetando uma atividade máxima de 376,56 U.L⁻¹. Este perfil corrobora as exigências fisiológicas de fungos basidiomicetos, que secretam maiores níveis de enzimas ligninolíticas em ambientes levemente ácidos e de temperaturas brandas.



Tabela 3 - Condição ótima determinada pelo modelo estatístico.

Fator	Unidade	Valor*	R-Predita
A - Temperatura	°C	26	376,56
B - pH		5	

A validação experimental nessas condições ótimas (Tabela 4) resultou em uma atividade de $368,40 \pm 3,57 \text{ U.L}^{-1}$. A proximidade estreita entre os valores predito e experimental ($T_{cal} = 3,23$) atesta a eficácia e a confiabilidade da otimização do bioprocesso.

Tabela 4 - Validação experimental (Predito vs. Experimental).

Fator	Unidade	Valor*	R-Predita	R-Experimental
A - Temperatura	°C	26	376,56	$368,40 \pm 3,571$
B - pH		5		$T_{cal} = 3,23$

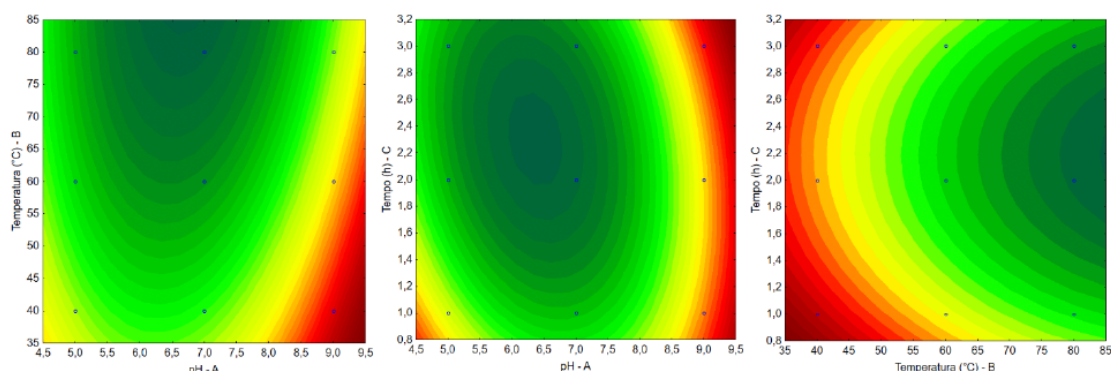
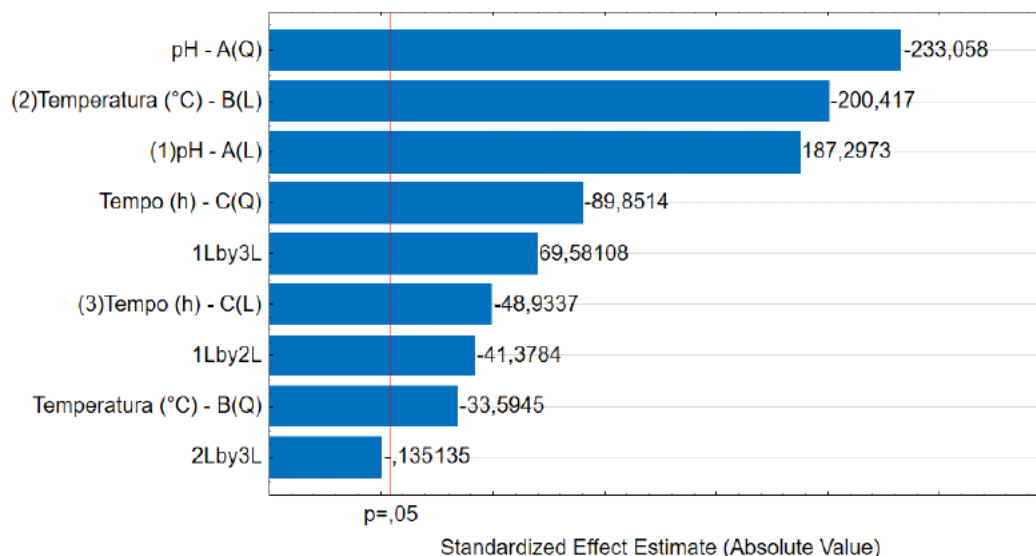
Visando a aplicação do extrato multienzimático, avaliou-se a sua termoestabilidade por meio do delineamento Box-Behnken (Tabela 5). Os efeitos padronizados das variáveis investigadas (pH, temperatura e tempo) e as superfícies de resposta correspondentes encontram-se ilustrados na Figura 2. Observou-se uma variação expressiva na retenção da atividade catalítica entre os ensaios. O Ensaio 1 (pH 5,0; 40 °C; 2 h) apresentou o melhor desempenho, retendo 92,47% da atividade relativa inicial, ao passo que condições mais drásticas (Ensaio 12: pH 7,0; 80 °C; 3 h) promoveram desnaturação severa, restando apenas 1,45% de atividade.

Tabela 5: Matriz experimental do planejamento Box-Behnken aplicado à otimização da estabilidade térmica da lacase produzida por *Ganoderma lucidum* em bagaço de cana.



Ensaio	pH - A	Temperatura (°C) - B	Tempo (h) - C	Ativ. Experimental (U.L. ⁻¹)	Atividade relativa (%)
1	5 (-1)	40 (-1)	2 (0)	306,23	92,47
2	9(+1)	40 (-1)	2 (0)	42,72	12,9
3	5 (-1)	80 (+1)	2 (0)	73,56	22,21
4	9 (+1)	80 (+1)	2 (0)	102,07	30,82
5	5 (-1)	60 (0)	1 (-1)	161,4	48,73
6	9 (+1)	60 (0)	1 (-1)	16,61	5,01
7	5 (-1)	60 (0)	3 (+1)	97,5	29,44
8	9 (+1)	60 (0)	3 (+1)	18,99	5,73
9	7 (0)	40 (-1)	1 (-1)	113,9	34,35
10	7 (0)	80 (+1)	1 (-1)	16,61	5,01
11	7 (0)	40 (-1)	3 (+1)	104,4	31,52
12	7 (0)	80 (+1)	3 (+1)	4,74	1,45
13 ^a	7 (0)	60 (0)	2 (0)	49,85	15,05
14 ^a	7 (0)	60 (0)	2 (0)	64,09	19,35
15 ^a	7 (0)	60 (0)	2 (0)	52,2	15,76

Figura 2: Gráfico de efeitos padronizados (Pareto) e superfícies de resposta obtidos no planejamento Box-Behnken



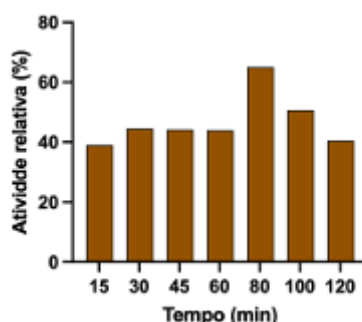
Devido à complexidade termodinâmica associada à desnaturação de enzimas em extratos brutos não purificados, o modelo estatístico do delineamento não apresentou um ajuste preditivo satisfatório. Por esta razão, adotou-se uma abordagem empírica e segura, selecionando a condição de pH 5,0 e 40 °C por apresentar a maior retenção de atividade. Esse comportamento está fortemente alinhado à literatura recente, uma vez que lacases fúngicas secretadas por basidiomicetos geralmente exibem maior estabilidade térmica em temperaturas moderadas (30–40 °C) e pH levemente ácido. A exposição a temperaturas elevadas e a ambientes neutros ou alcalinos promove a rápida desnaturação da estrutura proteica e a alteração da integridade do sítio ativo de cobre (ABDEL-HAMID et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2023).

Mantidas essas variáveis fixas (pH 5,0 e 40 °C), acompanhou-se a cinética de desnaturação do extrato ao longo de 2 horas (Figura 3). A avaliação confirmou a manutenção da estabilidade operacional da enzima, que reteve 92,47% de sua atividade inicial ao final do processo. Essa alta estabilidade do extrato bruto é tecnologicamente vantajosa, pois elimina a



necessidade de etapas dispendiosas de purificação (ZHOU et al., 2022 e SANTOS et al., 2024), viabilizando a sua utilização direta e eficiente nos ensaios subsequentes de biorremediação

Figura 3: Termoestabilidade da lacase em condições de pH 5,0 e temperatura de 40°C ao longo de 2 horas.



Conclusões

A utilização do bagaço de cana-de-açúcar como suporte e substrato na fermentação em estado sólido por *Ganoderma lucidum* demonstrou ser uma estratégia altamente eficaz e sustentável para a produção de lacase. A aplicação da matriz de Doehlert permitiu otimizar o bioprocessamento com precisão, estabelecendo que a máxima secreção enzimática ocorre em temperatura branda (26 °C) e pH levemente ácido (5,0), condição validada experimentalmente ($368,40 \pm 3,57 \text{ U.L}^{-1}$) e em consonância com a fisiologia do fungo.

Embora a complexidade termodinâmica da mistura enzimática bruta tenha limitado o ajuste preditivo do modelo de Box-Behnken para a termoestabilidade, a investigação experimental definiu empiricamente parâmetros operacionais seguros. A manutenção de elevada atividade catalítica (92,47%) por até duas horas sob pH 5,0 e 40 °C comprova a robustez biocatalítica do extrato produzido.

Dessa forma, atesta-se a viabilidade técnica e a estabilidade operacional do bioprocessamento sem a necessidade de etapas dispendiosas e onerosas de purificação. O extrato bruto obtido qualifica-se, portanto, como um biocatalisador promissor para aplicações biotecnológicas subsequentes, notadamente em ensaios de biorremediação ambiental.



Agradecimentos

Agradecemos à Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) e ao Laboratório de Biocatálise e Biotransformação (LaBioCat) pelo apoio e pela infraestrutura disponibilizada para a realização deste trabalho.

Referências

AGUIRRE-FIORENZA, P.; ZÚÑIGA-NAVARRO, M.; DÍAZ-GODÍNEZ, G. Optimization of laccase production by *Ganoderma lucidum* in solid-state fermentation using agricultural residues. **Journal of Environmental Management**, v. 280, p. 111680, 2021.

SINGH, G. et al. Laccases and their applications in bioremediation of industrial effluents: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 12, p. 11345-11365, 2018.

SODHI, A. S.; BHATIA, S.; BATRA, N. Laccase: Sustainable production strategies, heterologous expression and potential biotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 280, p. 135745, 2024.

KYOMUHIMBO, M.; BRINK, H. Laccase: a robust enzyme for biotechnological advancement. **FUDMA Journal of Sciences**, 2023

FAUZIAH, Y. et al. Laccase Characterization from *Ganoderma lucidum* Grown in Pineapple and Coffee Waste Substrates under Solid Fermentation. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, 2025.

ABDEL-HAMID, A. M. et al. Microbial laccases: Industrial applications and recent advances in production, immobilization, and characterization. **Biotechnology Advances**, v. 45, p. 107647, 2020.

OLIVEIRA, F. C. et al. Characterization and thermal stability of laccases from white-rot fungi for biotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 242, p. 125120, 2023.

SANTOS, A. L. et al. Crude vs. purified laccase extracts: Comparative evaluation for industrial bioprocesses and dye decolorization. **Journal of Environmental Management**, v. 351, p. 119850, 2024.

ZHOU, Y. et al. Production and application of fungal laccases in solid-state fermentation: A review on recent developments. **Bioresource Technology**, v. 344, p. 126233, 2022.