

Produção de lacases pelo fungo filamentoso de origem marinha
***Peniophora* sp. CBMAI 1063 em biorreator de bancada**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Microbiologia Aplicada

Discente: Pedro Henrique Mainardi

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Lara Durães Sette

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rafaella Bonugli Santos

Rio Claro-SP
2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Instituto de Biociências - Campus de Rio Claro
Departamento de Bioquímica e Microbiologia

Produção de lacases pelo fungo filamentoso de origem marinha
***Peniophora* sp. CBMAI 1063 em biorreator de bancada**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Microbiologia Aplicada

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área: Microbiologia Aplicada).

Discente: Pedro Henrique Mainardi

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Lara Durães Sette

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rafaella Bonugli Santos

Rio Claro-SP
2015

547.758 Mainardi, Pedro Henrique
M224p Produção de lacases pelo fungo filamentoso de origem
marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 em biorreator de
bancada / Pedro Henrique Mainardi. - Rio Claro, 2015
68 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Lara Durães Sette

Coorientador: Rafaella Bonugli Santos

1. Enzimas. 2. Fermentação. 3. Biorreator. 4. Fungo
marinho. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

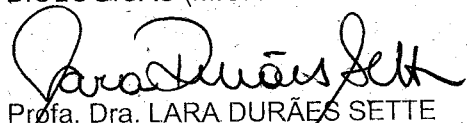
TÍTULO: Produção de lacases pelo fungo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 em biorreator de bancada

AUTOR: PEDRO HENRIQUE MAINARDI

ORIENTADORA: Profa. Dra. LARA DURÃES SETTE

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. RAFAELLA COSTA BONUGLI SANTOS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. LARA DURÃES SETTE

Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências de Rio Claro



Prof. Dr. LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES

Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto / Universidade de São Paulo



Profa. Dra. ELEONORA CANO CARMONA

Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências de Rio Claro

Data da realização: 18 de junho de 2015.

AGRADECIMENTO

Agradeço principalmente aos meus pais José Francisco e Carmem, irmãs Camila e Gabriela. São os pilares de minha construção, que durante todos meus passos, forneceram todo o amor, compreensão, carinho e apoio necessários.

Aos meus tios, avôs e primos, que mesmo distantes fisicamente, estavam presentes com seus valores de perseverança e determinação.

À minha orientadora Lara Durães Sette, que durante todos os momentos, transpareceu confiança, empenho, e sobretudo atitude. Sua orientação foi crucial no desenvolvimento dessa dissertação, e também sei que será nas futuras experiências que terei em minha vida.

A minha co-orientadora Rafaella Bonugli Santos, que me forneceu alívio e respostas em diversas ocasiões importantes para esta dissertação.

Aos integrantes do Laboratório Micologia Ambiental e Industrial (LAMAI) e do Laboratório de Ecologia e Sistemática Fúngica (LESF). Vou guardar no peito e pra vida as amigas e amigos que construí nessa etapa.

Aos professores e colegas da pós graduação em Microbiologia Aplicada e dos laboratórios associados, que me forneceram experiências únicas, tão importantes para a minha formação.

Aos integrantes do Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade de São Paulo, em especial ao Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior e ao Mestre Walker Feitosa, que foram muito participativos na construção desse projeto.

Aos professores Pedro de Oliva Neto e João Cláudio Thoméo, pelos generosos comentários no exame de qualificação.

Aos meus grandes amigos da república Catota, sempre me inspirando e inovando. “A vida até parece uma festa”.

E, por fim a Fapesp pelos recursos financeiros necessários à realização desta pesquisa.

RESUMO

As lacases são enzimas que catalisam uma reação que oxida moléculas aromáticas fenólicas. Com grande potencial biotecnológico, as lacases podem ser empregadas em diversos setores industriais. Suas principais aplicações são referentes a indústria de polpa e papel, têxtil, alimentícia, bem como na química sintética e biorremediação. Em estudos prévios, o fungo basidiomiceto *Peniophora* sp. CBMAI 1063, isolado da esponja marinha *Amphimedon viridis*, apresentou 1.350 U/L de atividade para lacases em meio submerso salino otimizado. Tendo em vista a importância dos fungos e dessas enzimas para a biotecnologia, o objetivo do trabalho foi estudar a produção de lacases pelo basidiomiceto de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 em biorreatores de bancada. Foram conduzidos 11 cultivos em biorreatores de agitação mecânica (STR) e um em biorreator pneumático (*air-lift*), definindo parâmetros como o tempo em que o inóculo do biorreator deve ser incubado, frequência de agitação, k_{La} e valor do pH inicial. A atividade máxima para lacases obtida em biorreator de agitação mecânica foi de 2.700 U/L em 120h de cultivo, em 150 rpm de agitação (1,0 vvm: k_{La} de 17,2 h⁻¹) e pH 4,5 inicial. Nessas condições e com o inóculo cultivado também por 120h, a taxa máxima de formação do produto foi de 60 U/L.h e produtividade máxima de 25,5 U/L.h. O fungo quando cultivado em biorreator *air-lift* sob 1,0 vvm de aeração apresentou atividade de 4.014 U/L em 96 horas de cultivo, com taxa máxima de formação do produto de 55 U/L.h e produtividade máxima de 40 U/L.h. Análises da macro-morfologia fúngica ao término do bioprocessamento indicaram que o biorreator STR causou mais danos ao micélio fúngico do que o cultivo em biorreator *air-lift*. Experimentos adicionais em frascos agitados demonstraram que o fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 apresentou melhores atividades para lacases e maiores índices de biomassa seca na presença de 65% (v/v) de água do mar artificial (ASW) e 2mM de concentração de sulfato de cobre, demonstrando dependência desses dois componentes para produção de lacases. Outros experimentos indicaram que a presença de 5 dos 9 sais constituintes da ASW eram suficientes para a formação da biomassa celular e atividade de lacases em frascos agitados. Os resultados indicam que o fungo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 foi capaz de produzir lacases em escala de biorreator de bancada e é um importante recurso genético para futuras aplicações biotecnológicas.

ABSTRACT

Laccases are enzymes that catalyzes a reaction that oxidizes phenolic compounds. With a great biotechnological potential, laccases can be applied in many industrial areas. Most of the applications are related to pulp and paper, textile, food and beverage industries, as well as in synthetic chemistry and bioremediation. In earlier studies, the basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063, isolated from marine sponge *Amphimedon viridis*, exhibited 1.350 U/L of laccases' activity under submerged culture in optimized saline medium. Taking into consideration the importance of the fungi and these enzymes for biotechnology, the purpose of this work was to study the laccases' production by the marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063 in bench bioreactors. It was performed 11 experiments in stirred tank reactor (STR) and one in pneumatic bioreactor (air-lift), establishing parameters such as inoculum incubation time, frequency of agitation, k_{La} , and initial pH value. The maximum laccases activity obtained in stirred tank reactor was 2.700 U/L in 120 hours of cultivation under 150 rpm of agitation (1,0 vvm: k_{La} de 17.2 h^{-1}) and initial pH value of 4.5. In those conditions, with the inoculum cultivated for 120 hours, the maximum product formation rate was 60 U/L.h and the maximum productivity was 25.5 U/L.h. The fungus when cultivated in air-lift bioreactor under 1.0 vvm of aeration showed the activity of 4.014 U/L in 96 hours of growth. The maximum product formation rate obtained in that experiment was 55 U/L.h and the maximum productivity was 40 U/L.h. Analysis of the macro-morphology at the end of the processes indicated that STR bioreactor caused more damage to the fungus' mycelium than the air-lift bioreactor. Additional experiments in agitated flasks showed that the fungi *Peniophora* sp. CBMAI 1063 had higher laccases' activity and higher yields of dry biomass in the presence of 65% (v/v) of artificial seawater (ASW) and 2mM of copper sulphate, indicating the dependency of those two composites for laccases production. Another experiments indicated that the presence of 5 of the 9 ASW salt constituents is enough for dry biomass formation and laccases' activity in agitated flasks. The results showed that the marine-derived fungus *Peniophora* sp. CBMAI 1063 could produce laccases in bench bioreactors and it is an important genetic resource for future biotechnological applications.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** (a) Monômeros primários de lignina e suas unidades correspondentes (WONG, 2009). (b) Esquema da fórmula estrutural da lignina (ADLER, 1977), adaptado de Arora & Sharma (2010).
- Figura 2.** Diagrama esquemático da degradação enzimática da lignina (Adaptado de Dashtban et al., 2010).
- Figura 3.** Mediadores químicos sintéticos das lacases. HBT: 1-hidroxibenzotriazol, HPI: N-hidroxifthalimide, VLA: ácido violúrico, NHA: N-hidroxiacetanilide (Fonte: CANAS & CAMARERO, 2010).
- Figura 4.** (a) Diagrama estrutural (em fitas) da lacase de *Trametes versicolor* ATCC 20869. Os íons de cobre estão desenhados como esferas azuis (Fonte: PIONTEK et al., 2002). (b) Representação do ciclo catalítico de uma lacase, produzindo duas moléculas de água da redução de uma molécula de oxigênio molecular, e a concomitante oxidação (no sítio T1) de quatro moléculas de substratos (Fonte: ERIKSOON & BERMEK, 2009).
- Figura 5.** (a) Coleta da seiva *urushi*. (b) Tesouro nacional japonês: caixa feita de *urushi* por Kohrin Ogata no século XVII. (Adaptado de KOBAYASHI et al., 2001)
- Figura 6.** Tipos de biorreatores: (a) Biorreator STR – stirred tank reator – agitação mecânica. (b) Biorreator tipo *air-lift*. Adaptado de Schmidell et al. (2001)
- Figura 7.** Fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 e sua respectiva fonte de isolamento (esponja marinha *Amphimedon viridis*).
- Figura 8.** (a) Biorreator STR 1: Fermac 320 (Electrolab Limited, UK); 3,5 L de volume de trabalho. (b) Biorreator STR 2: BioFlo 115 (New Brunswick, US); 1,2 L de volume de trabalho. (c) Biorreator STR 3 - modificado *Air-lift*: Observar o cilindro de aço inox acoplado entre as chicanas de resfriamento/aquecimento. (d) Mangueira usada no biorreator STR 4 – modificado. (e) Diagrama esquemático de um borrifador de ar em espiral (Adaptado de Zhong, 2011).
- Figura 9.** Variáveis obtidas no cultivo 1 no biorreator STR 1 em temperatura (28°C) e agitação (50 rpm) constantes e aeração ajustada para concentração mínima de 80% de oxigênio dissolvido.
- Figura 10.** Variáveis obtidas no cultivo 2 no biorreator STR 1 em temperatura (28°C), agitação (50 rpm) e aeração (1,0 vvm) constantes. O tempo de cultivo do inóculo para esse cultivo foi de 120h.
- Figura 11.** Variáveis obtidas no cultivo 3 no biorreator STR 1 em temperatura (28°C), agitação (50 rpm) e aeração (1,0 vvm) constantes. O tempo de cultivo do inóculo para esse cultivo foi de 168h.
- Figura 12.** (a) k_{LA} obtido da dorna de cultivo do STR 1. (b) k_{LA} obtido utilizando dois tipos diferentes de borrifadores de ar: o borrifador de fábrica (em “L”) e o borrifador modificado (SM). A vazão de entrada de ar foi mantida constante durante todo o processo (1,0 vvm). $V_s = 0,003789 \text{ m s}^{-1}$
- Figura 13.** Variáveis obtidas no cultivo 4 no biorreator STR 1 com aspersor modificado em temperatura (28°C), agitação (50 rpm) e aeração (1,0 vvm) constantes.
- Figura 14.** Tamanho dos *pellets* fúngicos em relação a agitação estipulada quando *Peniophora* sp. CBMAI 1063 foi cultivado nos biorreatores STR 2. A aeração (1,0 vvm) foi mantida constante durante todo o bioprocessos.
- Figura 15.** Atividade relativa de lacases obtidas no cultivo 5, 6 e 7, em STR de 3,0 L, com 1,2 L de volume de trabalho. A temperatura de 28°C e a vazão de entrada de ar

(1,0 vvm) foram mantidas constantes durante todo os processos (100% corresponde a 1.397 U/L).

- Figura 16.** Variáveis obtidas no cultivo 8 no biorreator STR 1 em temperatura (28°C), agitação (150 rpm), e aeração (0,5 vvm) constantes.
- Figura 17.** Variáveis obtidas no cultivo 9 no biorreator STR 1 em temperatura (28°C), agitação (150 rpm), e aeração (1,0 vvm) constantes, com o inoculo incubado por 168 horas.
- Figura 18.** Variáveis obtidas no cultivo 10 no biorreator STR 1 em temperatura (28°C), agitação (150 rpm), e aeração (1,0 vvm) constantes, com o inoculo incubado por 120 horas.
- Figura 19.** Variáveis obtidas no cultivo 11 no biorreator STR 1 em temperatura (28°C), agitação (150 rpm), e aeração (1,0 vvm) constantes. O inóculo utilizado na fermentação foi incubado por 120 horas e o valor do pH inicial foi ajustado para 8,0.
- Figura 20.** Variáveis obtidas no cultivo no biorreator STR 3 – *air-lift*, em temperatura (28°C) e aeração (1,0 vvm) constantes. O inóculo utilizado na fermentação foi cultivado por 168 horas.
- Figura 21.** Macro-morfologia dos *pellets* fúngicos do *Peniophora* sp. CBMAI 1063 quando cultivado em biorreator *air-lift* em comparação com os *pellets* formados em cultivos submersos nos biorreatores STR 2. A aeração (1,0 vvm) foi mantida constante durante todo o bioprocesso.
- Figura 22.** Atividade de lacase (U L⁻¹) e biomassa seca (g L⁻¹) registada no cultivo do *Peniophora* sp. CBMAI 1063 por 7 dias a 28°C (140 rpm). **(a)** Em relação a presença ou ausência de ASW e CuSO₄. **(b)** Coloração do meio ao término do cultivo.
- Figura 23.** Placas contendo o fungo crescido utilizando extrato de malte 2% (w/v) e ágar-ágar 1,5% (w/v) **(a)** Placa com o fungo controle (sem adição de cobre ou guaiacol). **(b)** Placa acrescida de guaiacol (indicador fenol-oxidases) **(c)** Placa acrescida de guaiacol e CuSO₄ (2mM).
- Figura 24.** **(a)** Atividade relativa de lacases (U L⁻¹) e biomassa seca (g L⁻¹) do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 quando utilizado ASW padrão (vermelho) e ASW5tar (azul). **(b)** O experimento foi feito em triplicata.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS: 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid).
Agar plugs: Discos de ágar e micélio de cerca de 0,9 cm de diâmetro.
Air-Lift: Biorreator de agitação pneumática.
ASW: água do mar artificial.:
Bubble Column: Biorreator de agitação pneumática.
CBMAI: Coleção Brasileira de micro-organismos do ambiente e indústria (Brasil).
CBS: Coleção de culturas fúngicas (Holanda).
CRM-UNESP: Central de Recursos Microbianos da UNESP.
DO: Porcentagem da concentração de oxigênio dissolvido.
HAA: 3-hydroxyanthranilic acid.
HBT: 1-hidroxibenzotriazol
HBT: 1-hydroxybenzotriazole.
HPI: N-hidroxifthalimide
 k_{La} : Taxa de transferência de oxigênio em fluidos.
LAMAI: Laboratório de Micologia Industrial e Ambiental (UNESP/IB – Rio Claro-SP).
LiP: Lignina-peroxidase (EC 1.11.1.14).
LMS: Sistema Lacase Mediador
Marine-derived fungi: Fungos derivados do ambiente marinho.
MnP: Manganês-peroxidase (EC 1.11.1.13).
Monolignóis: Monômeros primários da lignina.
NHA: N-hidroxiacetoanilide
Pellets: Agregados macroscópicos de micélios fúngicos.
Rushton: Tipo mais comum de impelidor.
STR: Biorreator de agitação mecânica “*stirred tank reactor*”.
VLA: ácido violurico
VP: Versáti-peroxidase (EC 1.11.1.16).

SUMÁRIO

1. Introdução e Justificativa	8
2. Estado da Arte	9
2.1. Lignina	9
2.2. Enzimas ligninolíticas	10
2.3. Lacases	11
2.3.1. Aplicação biotecnológica	13
2.3.2. Distribuição e Papel Fisiológico	16
2.4. Fungos de Origem Marinha	19
2.5. Biorreator	20
2.5.1. Biorreator de bancada	22
2.6. Produção de lacases para aplicação biotecnológica	22
2.6.1. <i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063	24
3. Objetivos	25
3.1. Geral:	25
3.2. Específicos:	25
4. Materiais e Métodos	25
4.1. Micro-organismo	25
4.2. Meio líquido para produção de lacases	26
4.3. Cultivo em frascos agitados	26
4.5. Cultivo em biorreatores de bancada	26
4.5.1. Biorreator STR 1	26
4.5.2. Biorreator STR 2	27
4.5.3. Biorreator 3 modificado – <i>Air lift</i>	27
4.5.4. Biorreator STR 4 modificado – <i>Aspersor em mangueira</i>	28
4.6. Amostragem	29
4.7. Variáveis e Parâmetros.....	29
4.7.1. Variáveis estáticas	29
4.7.2. Variáveis operacionais	30
4.7.3. Parâmetros estequiométricos.....	31
4.7.4. Variáveis de transformação	31
5. Resultados e Discussão	32
5.1. Cultivo em biorreatores de agitação mecânica (STR).....	32
5.1.1. Cultivo 1: Aspectos iniciais	32

5.1.2. Cultivo 2 e 3: Tempo de cultivo do inóculo 1	34
5.1.3. Cultivo 4: Uso do aspersor modificado.....	36
5.1.4. Cultivos 5, 6 e 7: Agitação máxima	39
5.1.5. Cultivo 8: Aeração de 0,5 vvm	40
5.1.6. Cultivos 9 e 10: Aeração de 1,0 vvm e tempo de cultivo do inóculo 2.....	42
5.1.7. Cultivo 11: pH 8,0 inicial.....	44
5.2. Cultivo em biorreator <i>Air-lift</i>	45
5.4. Experimentos adicionais (em frascos sob agitação).....	48
5.4.1. Efeitos do sulfato de cobre e da salinidade	48
5.4.2. Estudos da composição da água do mar artificial	50
6. Conclusões	51
8. Referências bibliográficas	52

1. Introdução e Justificativa

Lacases (benzenodiol:oxygen oxidoreductase; EC 1.10.3.2) são polifenol oxidases, enzimas pertencentes a classe de oxidoreductases que catalisa uma reação que oxida moléculas aromáticas fenólicas. Na presença de mediadores químicos, as lacases também podem oxidar componentes aromáticos não fenólicos de alto potencial redox, o que aumenta a gama de substratos atacados por essa enzima. Suas principais aplicações são referentes a indústria de polpa e papel, alimentícia, química sintética e biorremediação.

Lacases podem ser encontradas em plantas, procariotos, insetos e fungos, e de acordo com a literatura, os melhores produtores são os fungos de degradação branca da madeira, que além de produzi-las extracelularmente, o que facilita o processo de obtenção do produto, produzem enzimas com maior potencial de redução em comparação ao potencial visto nas lacases de outros grupos de organismos.

Fungos de origem marinha são eucariotos heterotróficos que exercem um papel crucial na decomposição de matéria orgânica, e foram reportados como produtores de enzimas ligninolíticas como as lacases. As adaptações fisiológicas necessárias para que micro-organismos se desenvolvam nesse ambiente os torna produtores de biomoléculas únicas de alto valor biotecnológico. As enzimas sintetizadas por micro-organismos marinhos têm características estereoquímicas diferentes das espécies terrestres e apresentam propriedades únicas, como por exemplo, maior tolerância a alta salinidade e íons metálicos.

Biorreator de bancada é um equipamento que fornece adequadas condições ambientais para o cultivo de micro-organismos, enzimas, células, entre outros, para obtenção de produtos de interesse. Cultivo submerso é quando as células estão suspensas em um meio líquido. Geralmente têm três fases distintas: gasosa, líquida e micro-organismos suspensos no líquido, e necessitam de uma correta mistura para eficiente transferência de massa e calor. Até o ano de 2004, aproximadamente 90% de todas as enzimas industriais ainda eram produzidas em cultivo submerso.

O fungo filamentoso de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063, isolado da esponja marinha *Amphimedon viridis*, no âmbito do projeto FAPESP 05/60175-2: “Descoberta e desenvolvimento de potenciais agentes quimioterapêuticos a partir de invertebrados marinhos e de micro-organismos associados” foi descrito como produtor de 709 U/L de atividade para lacases em meio submerso salino e não salino. Após otimização do processo de produção o fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 alcançou 1.350 U/L e as condições de cultivo e uso da enzima foram patenteados (INPI: BR 10 2014 008502).

Neste contexto, o objetivo do presente projeto foi determinar os parâmetros de cultivo necessários para que o fungo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 produza lacases em escala de biorreator de bancada. Os objetivos específicos são: comparar a produção de lacases em biorreatores do tipo STR e tipo air-lift, determinar o tempo de incubação necessário para o inóculo do cultivo em biorreator, determinar a agitação necessária para produção da enzima, determinar o coeficiente de transferência de oxigênio (k_{La}) necessário para a produção da enzima e determinar o pH inicial do cultivo em biorreator.

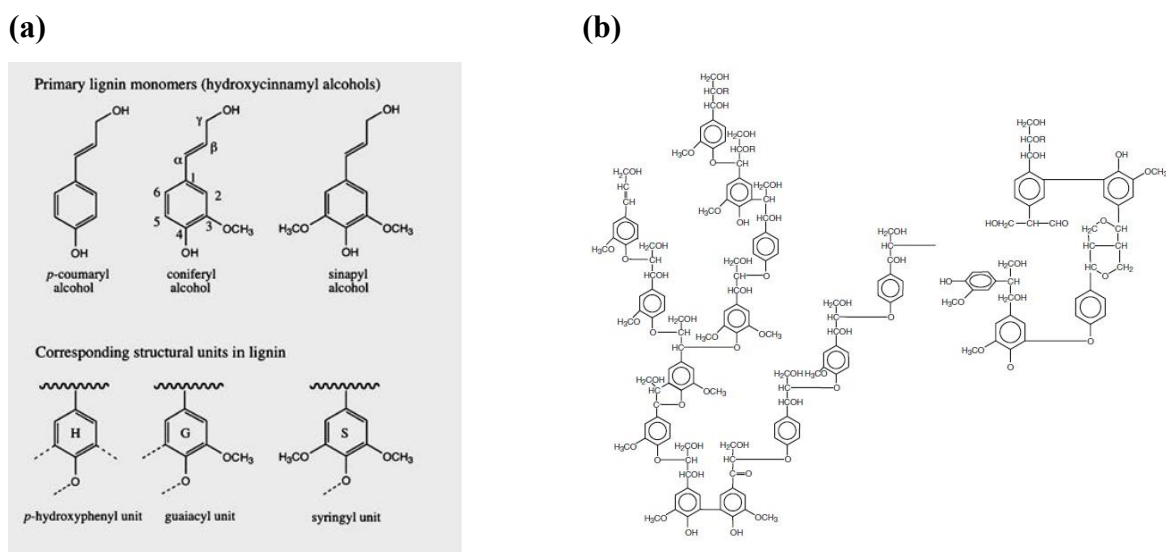
2. Estado da Arte

2.1. Lignina

A lignina é um polímero recalcitrante amorfo, que não apresenta regularidade estereoquímica. A lignina está presente em todas as plantas vasculares e sua função é proporcionar maior resistência e rigidez à parede celular, como uma cola que une as fibras e filamentos de celulose e hemicelulose (ADLER, 1977; ARORA & SHARMA, 2010).

A lignina é sintetizada a partir dos monômeros primários fenol-alcoólicos p-coumaril, coniferil e sinapil (Figura 1a), chamados também de monolignóis, que se acoplam via reação não enzimática (Figura 1b). A proporção das subunidades monoméricas varia entre diferentes táxons e espécies de plantas (ERIKSSON & BERMEK, 2009; HISANO 2009).

Figura 1. (a) Monômeros primários de lignina e suas unidades correspondentes (WONG, 2009). **(b)** Esquema da fórmula estrutural da lignina (ADLER, 1977), adaptado de Arora & Sharma (2010).



2.2. Enzimas ligninolíticas

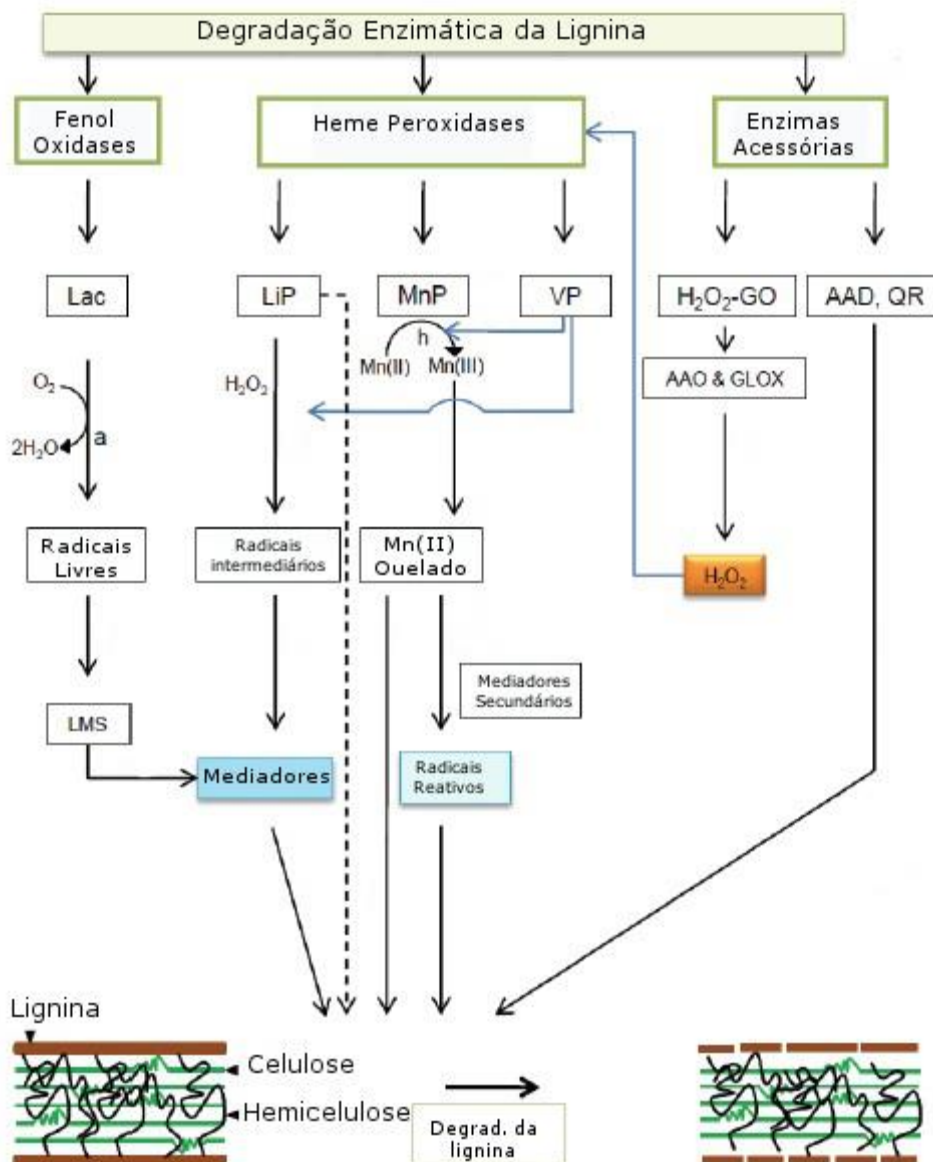
A heterogeneidade das ligações da lignina a torna um polímero muito complexo e de difícil biodegradação. Sua quebra não é feita por enzimas hidrolíticas, como no caso dos componentes da madeira, mas sim por enzimas oxidativas extracelulares, chamadas de enzimas ligninolíticas (ARORA & SHARMA, 2010; ABDEL-HAMID et al., 2013).

As enzimas ligninolíticas são agrupadas em peroxidases, oxidoredutases, e enzimas acessórias (Figura 2). Peroxidases como lignina peroxidases (LiP; EC 1.11.1.14), manganês peroxidases (MnP; EC 1.11.1.13), e versátil peroxidases (VP; EC 1.11.1.16) são enzimas que catalisam um conjunto de reações oxidativas e hidroxilações usando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como aceitador de elétrons. Oxidoredutases como lacases (EC 1.10.3.2) são enzimas que catalisam a redução do oxigênio (O_2) a água (H_2O) com a oxidação concomitante de substratos orgânicos (RODGERS et al., 2009; WONG, 2009; HOFRICHTER et al., 2010; ABDEL-HAMID et al., 2013).

Enzimas acessórias como aril-álcool oxidases (AAO; EC 1.1.3.7) e glioxal oxidase (GLOX) foram descritas como geradoras de peróxido de hidrogênio, importantes para a atividade das peroxidases. As enzimas aril-álcool dehidrogenase (AAD) e quinona-redutase (QR) reduzem os componentes derivados da degradação da lignina (DASHTBAN et al., 2010).

Os fungos da podridão branca (*white-rot fungi*), nome baseado nas características de degradação da madeira, degradam a lignina mais rapidamente e extensivamente do que qualquer outro grupo microbiano. Esses fungos são responsáveis pela maior parte da decomposição da lignina na natureza e foram descritos como os melhores produtores de enzimas ligninolíticas (KIRK & FARRELL, 1987; TUOMELA et al., 2000).

Figura 2. Diagrama esquemático da degradação enzimática da lignina (Adaptado de Dashtban et al., 2010).



2.3. Lacases

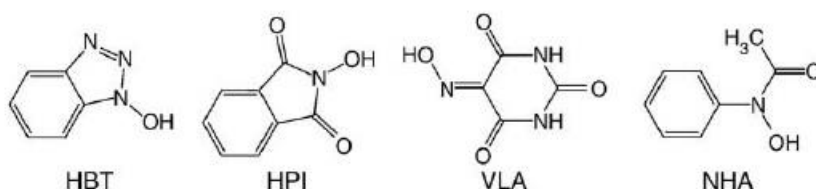
Lacases (benzenodiol:oxygen oxidoreductase; EC 1.10.3.2) são polifenol oxidases, enzimas pertencentes a classe de oxido redutases, que catalisa uma reação que oxida moléculas aromáticas fenólicas (BALDRIAN, 2005). A estequiometria é: quatro moléculas de um substrato redutor para cada oxigênio molecular, envolvendo um total de quatro transferências de elétrons [$4RH+O_2 \rightarrow 4R+2H_2O$] (Figura 4b) (WONG, 2009).

A redução do oxigênio à água é acompanhada da oxidação de substratos tipicamente fenólicos e seus derivados como *p*-difenois, *o*-difenois, polifenóis, poliaminas, arildiaminas, aminofenóis, hidroquinonas, assim como alguns íons inorgânicos (THURSTON, 1994; MAYER & STAPLES, 2002; ERIKSSON & BERMEK, 2009).

Na presença de mediadores químicos, as lacases também podem oxidar componentes aromáticos não fenólicos de alto potencial redox, o que aumenta a gama de substratos dessa enzima (BOURBONNAIS & PAICE, 1990). Os mediadores químicos agem como *shuttle* de elétrons, oxidando por via não enzimática substratos que são grandes demais para entrarem no sítio catalítico enzimático, e substratos que possuem elevado potencial redox (CANAS & CAMARERO, 2010; FERRARONI, 2007).

Os mediadores químicos têm baixa massa molecular e podem ser sintéticos como ABTS [2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazolina-6-ácido sulfônico)] e HBT [1-hidroxibenzotriazol], ou naturais como HAA [ácido 3-hidroxi-antrânico], ácido 4-hidroxibenzoico e álcool 4-hidroxibenzil (Figura 3) (BOURBONNAIS et al., 1997; JOHANNES & MAJCHERCZYK, 2000).

Figura 3. Mediadores sintéticos das lacases. HBT: 1-hidroxibenzotriazol, HPI: N-hidroxifthalimide, VLA: ácido violúrico, NHA: N-hidroxiacetoanilide (Fonte: CANAS & CAMARERO, 2010).

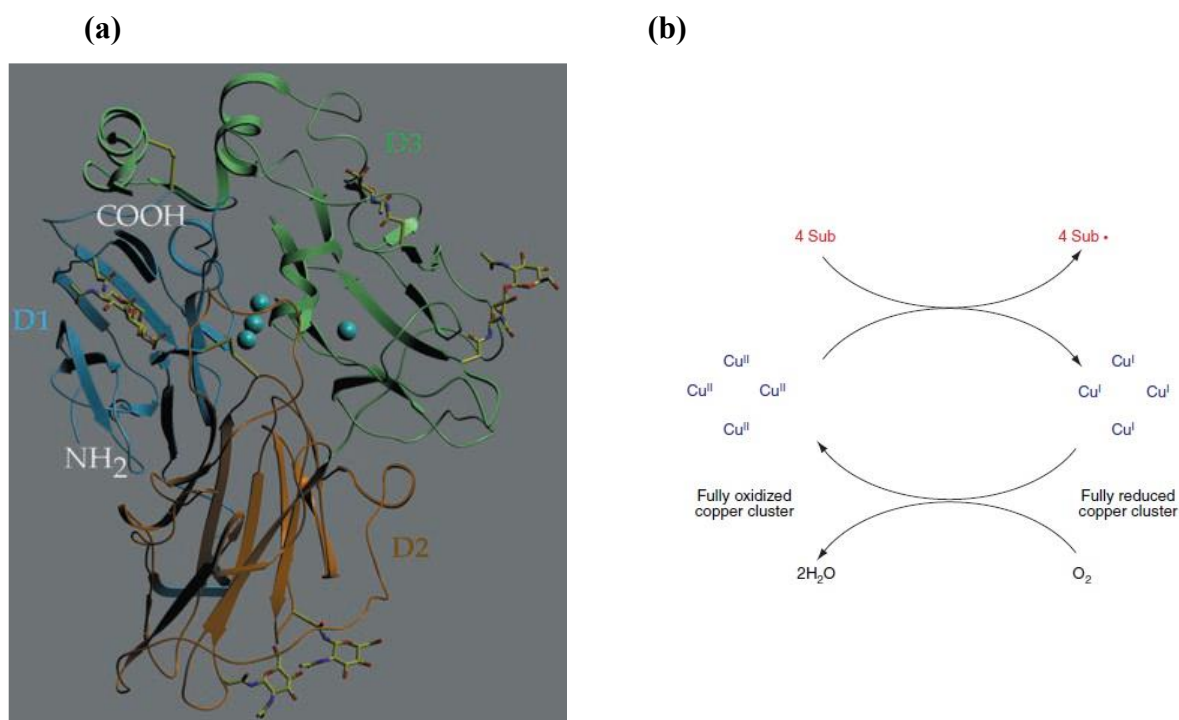


Lacases frequentemente ocorrem como isoenzimas que se oligomerizam para formar complexos multiméricos (CLAUS, 2004). Um monômero típico é geralmente uma molécula de 60 a 80 kDa com o ponto isoelétrico ácido de aproximadamente 4,0 (BALDRIAN, 2005). Cada monômero contém em sua estrutura um átomo de cobre denominado “Type-1” (T1), possivelmente e como responsável pelo sítio da oxidação primária. Há outros três átomos de cobre arranjados em um *cluster* trinuclear que reduz o oxigênio a água: denominados de “Type-2” e “Type-3” (T2/T3) (Figura 4a) (PIONTEK et al., 2002).

Outra importante característica estrutural é a porção de carboidratos ligados covalentemente (10-45%), que contribui para sua estabilidade conformacional e proteção

contra degradação de proteases (YOSHITAKE, et al., 1993; CLAUS, 2004; HILDEN et al., 2009).

Figura 4. (a) Diagrama estrutural (em fitas) da lacase de *Trametes versicolor* ATCC 20869. Os íons de cobre estão desenhados como esferas azuis (Fonte: PIONTEK et al., 2002). **(b)** Representação do ciclo catalítico de uma lacase, produzindo duas moléculas de água da redução de uma molécula de oxigênio molecular, e a concomitante oxidação (no sítio T1) de quatro moléculas de substratos (Fonte; ERIKSOON & BERMEK, 2009).



2.3.1. Aplicação biotecnológica

Lacases têm um grande potencial biotecnológico devido a sua habilidade de oxidar uma ampla gama de substratos que são empregados em diversos setores industriais (COUTO & TOCA-HERRERA, 2006; MACIEL et al., 2010; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ et al., 2013). Referidas como “*green component*”, sua catálise gera água a partir do oxigênio atmosférico, diferente das peroxidases que necessitam de peróxido de oxigênio para completarem seu ciclo catalítico (DASHTBAN et al., 2002 MARTÍNEZ et al., 2005; RIVA, 2006). Exemplos de aplicações biotecnológicas das lacases estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Aplicações industriais e biotecnológicas das lacases.

Indústria Alimentícia	Indústria de Polpa e Papel	Indústria Têxtil	Bioremediação	Química Sintética e Nanobiotecnologia
Remoção de Fenóis de Alimentos e Bebidas; Diminuição de Turbidez	Despolimezação da Lignina; Deslignificação da Polpa na Madeira; Bio-branqueamento da Polpa Kraft	Degradação de Corantes	Biodegradação ou remoção de componentes xenobióticos	Produção de Polímeros; Agentes Farmacêuticos; Biosensores; Novos Produtos Sintéticos.

2.3.1.1. Indústria de polpa e papel

A fabricação do papel que conhecemos gera enormes quantidades de efluentes tóxicos com alta demanda biológica de oxigênio (DBO), alta demanda química de oxigênio (DQO), e inúmeros componentes tóxicos não caracterizados (PECK & DALEY, 1994; ALI & SREEKRISHNAN, 2001). As lacases podem ser aplicadas no despolpamento e biobranqueamento da madeira, e assim diminuir os resíduos gerados nessas etapas (BOURBONNAIS et al., 1995; BOURBONNAIS et al., 1997; WIDSTEN & KANDELBAUER, 2008). Em adição, as lacases podem ser utilizadas para sintetizar papéis de melhor qualidade, que apresentam maior resistência mecânica (WONG et al., 2000).

2.3.1.2. Indústria de Alimentos e Bebidas

Lacases podem ser aplicadas em diversos processos que modificam a aparência e sabor de alimentos e bebidas MINUSSI et al., 2002; OSMA et al., 2010a. Por exemplo, na remoção de compostos fenólicos que alteram o gosto e aroma de bebidas como vinhos, sucos e cervejas (BRENNAN & BIANCHI, 1994; SCHROEDER et al., 2008; RIBEIRO et al., 2010). Na formulação de pães com melhor textura e sabor, de massas com maior estabilidade mecânica, e também na síntese de novos ingredientes funcionais como gel de pectina (NORSKER et al., 2000; KUUVVA et al., 2003; SELINHEIMO et al., 2006; FLANDER et al., 2011; JUNG & WICKER, 2012; ZAIDEL et al., 2012).

2.3.1.3. Química Sintética

A oxidação de substratos fenólicos feito pelas lacases gera radicais intermediários que podem se acoplar em ligações C-C e C-O, formando dímeros, oligômeros, e eventualmente polímeros (IKEDA et al., 1996; MANDA et al., 2007). Os radicais podem também se acoplar à moléculas não oxidáveis pelas lacases e assim formar hetero-moléculas híbridas (MIKOLASCH & SCHAUER, 2009).

O acoplamento, seja hetero-molecular ou homo-molecular, possibilita a formulação de novos produtos de extremo interesse biotecnológico (MIKOLASCH & SCHAUER, 2009; WITAYAKRAN & RAGAUSKAS, 2009). Por exemplo, polímeros com características únicas (KOBAYASHI et al., 2001; LÓPEZ et al., 2013), antibióticos (MIKOLASCH et al., 2006), agentes antioxidantes (ALJAWISH et al., 2014), bloqueadores UV (SCHROEDER et al., 2007), pigmentos cosméticos (JEON et al., 2010), aldeídos aromáticos, pesticidas, flavonoides, entre outros (ARORA & SHARMA, 2010; GAVEZZOTTI et al., 2011).

2.3.1.4. Biosensores

Biosensor é um dispositivo com um componente biológico, que detecta a concentração de determinadas moléculas em uma amostra ao converter sinais físicos e químicos de uma biomatriz em sinais eletrônicos (HABERMULLER et al., 2000). Quando o componente biológico é uma enzima ou um conjunto de enzimas, é chamado de biosensor enzimático (PORTACCIO et al., 2006; DZYADEVYCH et al., 2008, KARIM & FAKHRUDDIN, 2012).

Lacases podem ser utilizadas em biosensores para detecção de fenóis e seus derivados em amostras ambientais (DAS et al., 2014; GIL et al., 2014), no mosto fermentativos de vinhos (FUSCO et al., 2010; MONTEREALI et al., 2010), na detecção de pesticidas (ZAPP et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013), e também na detecção de catecolaminas como dopamina, um importante neurotransmissor, em análises clínicas (MOCCELINI et al., 2011; WANG et al., 2014). Ressalta-se que o desenvolvimento de novos materiais de imobilização possibilita melhores rendimentos e/ou performance de biosensores enzimáticos (HAGHIGHI et al., 2003; FU et al., 2014).

2.3.1.5. Biorremediação

A utilização de produtos químicos em diversos processos agroindustriais gera deliberadamente ou acidentalmente enormes quantidades de compostos tóxicos ao ambiente (HARMS et al., 2011). A biorremediação é uma alternativa promissora para a remoção desses poluentes ambientais do solo e da água (JACQUES et al., 2007; PASSARINI et al., 2011).

Lacases catalisam a oxidação de uma grande gama de substratos, em especial os fenólicos, além de serem consideradas como não nocivas ao meio ambiente (BA et al., 2013; MUKHERJEE, 2013). Estudos indicam a capacidade das lacases na remoção (degradação) de compostos químicos como corantes (WESENBERG et al., 2003; HOU et al., 2004; WANG et al., 2011; ZENG et al., 2011; AGHAIE-KHOUSANI et al., 2012; BONUGLI-SANTOS et al., 2012; ZHENG et al., 2014), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (AKTAS & TANYOLAÇ, 2003; POZDNYAKOVA et al., 2006), inseticidas (AMITAI et al., 1998), herbicidas (ARORA & SHARMA et al., 2010), e também desreguladores endócrinos como bisfenol e estrogênio (FUKUDA et al., 2004; SAITO et al., 2004; AURIOL et al., 2008; LLORET et al., 2012; FENG et al., 2013; YU et al., 2013).

2.3.2. Distribuição e Papel Fisiológico

O primeiro relato das lacases foi feito por Yoshida em 1883 a partir de extratos da planta *Rhus vernicifera* (YOSHIDA, 1883; NAKAMURA et al., 1958). A angiosperma é muito conhecida na Ásia por sua resina, chamada de *urushi*, que é a seiva solidificada após contato com oxigênio (Figura 5). A solidificação, via catálise enzimática, é feita através da oxidação polimerizadora de alquil-catecóis presentes na seiva, chamado de *urushióis* (HUTTERMANN et al., 2001; KOBAYASHI et al., 2001). Estudos subsequentes indicaram a presença das lacases em plantas, procariotos, insetos e fungos (SUZUKI et al., 2003; CLAUS, 2004; DITTMER & KANOST, 2010).

Figura 5. (a) Coleta da seiva *urushi*. **(b)** Tesouro nacional japonês: caixa feita de *urushi* por Kohrin Ogata no século XVII. (Adaptado de KOBAYASHI et al., 2001)

(a)



(b)



2.3.2.1. Plantas Superiores

A existência das lacases foi comprovada em toda família Anacardiaceae, da qual a *Rhus vernicifera* é membro, mas existe pouca informação sobre outros táxons (HUTTERMAN et al., 2001; MAYER & STAPLES, 2002). De acordo com Sharma et al. (2007), é possível que as lacases tenham sido fortemente negligenciadas de muitas descrições científicas, em grande parte devido à dificuldades da detecção e purificação das mesmas, e a existência de loci multi-gênicos para codificá-las (SHARMA et al., 2007; TURLAPATI et al., 2011).

Estudos sugerem que as lacases têm participação na polimerização de compostos fenólicos e flavonóides, na pigmentação, endurecimento de sementes e cicatrização de feridas (POURCEL et al., 2005; CAPARRÓS-RUIZ et al., 2006; SHARMA & KUHAD et al., 2008; TURLAPATI et al., 2011).

Recentemente, em estudos com mutantes de couve (*Arabidopsis thaliana*) houve a confirmação da participação das lacases na polimerização da lignina. Os mutantes tinham 3 genes putativos para lacases desativados (LAC4, LAC11 e LAC17) de um total de 17 genes. A modificação causou severos retardos na síntese da lignina, bem como no crescimento e desenvolvimento do vegetal. O autor sugere que as lacases existem em todos vegetais superiores, e exercem um papel crucial e não redundante às peroxidases, (ZHAO et al., 2013).

2.3.2.2. Procariotos

Em procariotos as lacases foram encontradas em linhagens gram-negativas e gram-positivas, e não há um grupo produtor específico (SINGH et al., 2011). Sua presença foi descrita em *Azospirillum lipoferum* (FAURE et al., 1995), *Proteus hauseri* ZMd44 (ZHENG et al., 2013), e também no actinomiceto *Streptomyces lavendulae* REN-Y (SUZUKI et al., 2003).

Genes putativos de proteínas multi-cobre foram encontrados também em espécies de habitats extremos como *Oceanobacillus iheyensis*, *Aquifex aeolicus* e na arqueia *Pyrobaculum aerophilum* (CLAUS et al., 2003). As hipóteses sobre sua função fisiológica referem-se a morfogênese celular e proteção contra estresses oxidativos como luz ultravioleta (UV) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (SHARMA et al., 2007; DWIVEDI et al., 2011).

2.3.2.3. Fungos

Lacases foram demonstradas e purificadas em muitas espécies de fungos, incluindo ascomicetos, fungos anamórficos e basidiomicetos. Lacases fúngicas geralmente têm maior potencial de redução quando comparada às lacases de outros organismos, e têm sido o grande alvo para produção industrial (RODGERS et al., 2009; ABDEL-HAMID, 2013).

Espécies saprofíticas e degradadoras de madeira frequentemente produzem lacases, como por exemplo *Trametes versicolor*, *Trametes hirsute*, *Trametes ochracea*, *Trametes villosa*, *Cerrena máxima*, *Phlebia radiata*, *Coriolopsis polyzona*, *Lentinus tigrinus*, *Pleurotus eryngii*, *Lentinula edodes*, *Phanerochaete chrysosporium* (SRINIVASAN et al., 1995; MAYER & STAPLES, 2002; BALDRIAN, 2005; MOROZOVA et al., 2007; DWIVEDI et al., 2011).

Com relação aos fungos leveduriformes, as lacases só foram purificadas até o momento a partir de *Cryptococcus neoformans*, uma levedura basidiomicética humano-patogênica (WILLIAMSON, 1994). A produção de lacases não foi demonstrada em leveduras ascomicéticas, porém, sequências de multi-cobre oxidase Fet3p de *Saccharomyces cerevisiae* sugerem homologia com lacases fúngicas (MACHONKIN et al., 2001).

As hipóteses sobre sua função fisiológica referem-se a pigmentação e morfogênese dos micélios (MADHAVI & LELE, 2009), formação dos corpos de frutificação (LEATHAM & SATHMANN, 1981), respostas a estresses oxidativos (JASZEK, et al., 2006a; JASZEK, et al., 2006b), biodegradação da lignina vegetal (EGGERT et al., 1997; THURSTON, 1994), e

fator de virulência em fungos patogênicos, protegendo-os dos compostos tóxicos produzidos pelo hospedeiro (MAYER & STAPLES, 2002).

2.4. Fungos de Origem Marinha

Fungos marinhos são classificados como obrigatórios ou facultativos. Os marinhos obrigatórios são os que crescem e esporulam exclusivamente em ambiente marinho ou estuarino, e os facultativos são linhagens de água doce ou terrestres que são capazes de crescer em ambientes marinhos (KOHLMAYER & KOHLMAYER, 1979). Como um método de classificação mais generalista, estipulou-se o termo fungo de origem marinha (*marine-derived fungi*), englobando todos os fungos isolados desse ambiente (OSTERHEGE, 2001).

Fungos de origem marinha geralmente mantém relações simbióticas com macro-organismos como corais, esponjas, ascídias, moluscos, entre outros. Os gêneros com maior incidência são *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Phoma*, *Cladosporium* e *Acremonium* (BERLINCK et al., 2004, da SILVA et al., 2008, MENEZES et al., 2010, PASSARINI et al., 2013). Em alguns casos como o da esponja *Aplysina aerophoba*, a biomassa do organismo é composta por até 40% de micro-organismos (KÖNIG et al. 2006).

Fungos de origem marinha são eucariotos heterotróficos que exercem um crucial papel na decomposição de matéria orgânica, liberando os nutrientes de volta ao ecossistema (PRASANNARAI & SRIDHAR, 2001; BUGNI & IRELAND, 2004). Os padrões de degradação dos componentes lignocelulósicos feito por fungos marinhos, a nível microscópico, aparentam estar correlacionados ao feito por fungos terrestres (POINTING & HYDE, 2000).

As adaptações fisiológicas necessárias para esses fungos se desenvolvam nesse ambiente os torna produtores de biomoléculas únicas de alto valor biotecnológico, como antibióticos, fármacos, enzimas, surfactantes, anticoagulantes, entre outros. (RAGHUKUMAR; 2002; BHADURY et al., 2006; VERBIST, 2000; BHATNAGAR & KIM, 2012; COLWELL, 2012).

As enzimas sintetizadas por linhagens marinhas apresentam características estereoquímicas diferentes das encontradas em linhagens homólogas terrestres, além de também terem diferenças em seus genes transcritores enzimáticos (CHI et al., 2009; ZHANG & KIM, 2010). Enzimas desse hábitat foram relatadas com maior tolerância a alta salinidade

e íons metálicos, maior termoestabilidade, e mais adaptadas ao frio e pressão atmosférica quando coletados em mar profundo (HOU et al., 2006; TRINCONE, 2010).

2.5. Biorreator

Biorreator é um termo moderno que refere-se a qualquer recipiente que forneça condições ambientais adequadas para que uma ou mais reações biológicas aconteçam. As reações biológicas podem ser feitas por micro-organismos, enzimas, células animais ou vegetais, e inclusive estruturas subcelulares como cloroplastos e mitocôndrias (ERICKSON, 2011; CHISTI & MOO-YOUNG, 2002).

Biorreatores foram utilizados há milhares de anos para produção de alimentos e bebidas como molho de soja, álcool potável, queijo, entre outros. As pesquisas foram então intensificadas a partir da década de 40 durante a segunda guerra devido a demanda de antibióticos (MCNEIL & HARVEY, 2008). Atualmente, os biorreatores são utilizados na síntese de vacinas, anticorpos, antibióticos, enzimas, e também no tratamento de esgoto doméstico e industrial (CHISTI & MOO-YOUNG, 2002)

Sua função de acordo com Zhong (2011) é fornecer condições necessárias para a fisiologia e metabolismo celular, regulando os fatores químicos e físicos existentes no sistema. A escolha do tipo e do *design* de cada biorreator é único, mas existem alguns fundamentos principais. Os critérios para o desenvolvimento do *design* do biorreator devem considerar uma adequada transferência de oxigênio, pouco estresse de cisalhamento, e uma boa homogeneização (ZHONG, 2011).

Um biorreator, também chamado de fermentador, mesmo que conduzido em aerobiose, pode operar assepticamente ou não, conter um ou vários tipos de células (ou qualquer componente biológico) estando ou não imobilizadas. Quando as células estão suspensas em um meio líquido, é chamado de cultivo submerso. Biorreatores quando utilizados em cultivo submerso geralmente têm três fases distintas: gasosa, líquida e micro-organismos suspensos no líquido, e necessitam de uma correta mistura para eficiente transferência de massa e calor (CHISTI & MOO-YOUNG, 2002; ERICKSON, 2011).

Cultivo em estado sólido é quando os micro-organismos crescem em partículas sólidas na ausência de água livre. O cultivo em estado sólido possibilita um maior contato entre o micro-organismo, maiores concentrações de substrato, e a utilização de inúmeros resíduos agroindustriais, diminuindo consideravelmente o custo da fermentação. O cultivo

sólido têm sido referido como superior ao líquido, pois é mais similar ao ambiente natural dos micro-organismos, em especial de fungos filamentosos. Porém, há ainda muitos problemas para sua aplicação industrial, relacionados principalmente com os gradientes de temperatura, substrato, oxigênio formados durante o cultivo, que são difíceis de se controlar na ausência de água livre (MITCHELL et al., 2006). Até o ano de 2004, aproximadamente 90% de todas as enzimas industriais ainda eram produzidas em cultivo submerso (HOLKER et al., 2004).

O tipo mais comum de biorreator para cultivo submerso é o de agitação mecânica, chamado de STR “*stirred tank biorreator*” (Figura 6a). Biorreatores STRs têm o meio de cultivo agitado mecanicamente por um motor elétrico, que gera boa mistura de fluido e oxigenação. As desvantagens desse tipo de biorreator é o estresse gerado pela agitação, impraticável pra certos micro-organismos, e a alta demanda de energia elétrica em altas agitações. Esse tipo de biorreator é o mais utilizado em estudos laboratoriais de escalonamento (CHISTI & MOO-YOUNG, 2002; ZHONG, 2011).

Biorreatores agitados pneumaticamente, chamados de biorreatores *air-lifts* (Figura 6b), são muito parecidos com biorreatores STRs, porém, a mistura do fluido é feito pela injeção de ar ou gás comprimido na base do biorreator. Esse tipo de biorreator é usualmente cilíndricos para que as bolhas de ar permaneçam o mais tempo possível no fluido. Biorreatores *Air-lifts* têm pior mistura de fluido em comparação a biorreatores STR, porém, geram menos estresse ao micro-organismo cultivado. (CHISTI & MOO-YOUNG, 2002; ZHONG, 2011).

Figura 6. Tipos de biorreatores: **(a)** Biorreator STR – stirred tank reator – agitação mecânica. **(b)** Biorreator tipo *air-lift*. Adaptado de Schmidell et al. (2001)



2.5.1. Biorreator de bancada

Biorreatores industriais têm geralmente o volume de 25 a 500 L, porém, a capacidade total pode variar muito. Como seria impraticável conduzir estudos em biorreatores industriais, são utilizados biorreatores de bancada que têm volume menor (1 a 20 L) (BLIEM & KATINGER, 1988). Biorreatores de bancada fornecem dados para construção de modelos, que podem ser expressos em equações matemáticas, gráficos, tabelas, etc. Os modelos são utilizados para entender e descrever as características do sistema, para que futuramente o cultivo do micro-organismo possa ser reproduzido e então escalonado (MCNEIL & HARVEY, 2008).

As variáveis de interesse podem ser temperatura, pH, agitação, quantidade de inóculo, oxigenação, entre outras, e devem estar relacionadas aos fatores que limitam o desenvolvimento do micro-organismo ou que inibam a síntese do produto desejado. Do ponto de vista industrial, as variáveis ideais são aquelas que independem da escala e configuração do biorreator (ENGASSER, 1988; BLIEM & KATINGER, 1988; ZHONG, 2011).

2.6. Produção de lacases para aplicação biotecnológica

Um dos maiores desafios no desenvolvimento de aplicações industriais de enzimas é conseguir produzir grandes quantidades das mesmas com bom custo benefício, de forma que sejam alternativas atraentes para os processos mais tradicionais (MOILANEN et al., 2015).

De acordo com a literatura, é necessária uma combinação de fatores para uma eficiente produção de lacases, como por exemplo a escolha de um bom micro-organismo produtor, meio de cultivo e indutores enzimáticos adequados, além da escolha do tipo correto de biorreator e condução do bioprocesso (COUTO & TOCA-HERRERA, 2007; TINOCO-VALENCIA et al. 2014).

Os melhores produtores de lacases são os fungos de degradação branca da madeira, que além de produzi-las extracelularmente, o que facilita o processo de obtenção do produto, produzem enzimas com maior potencial de redução em comparação ao potencial visto nas lacases de outros grupos de organismos (RODGERS et al., 2009).

O atual detentor da maior atividade enzimática para lacases, utilizando ABTS como substrato oxidante nas devidas condições de reação, é o basidiomiceto *Trametes pubescens* MB 89 (CBS 696.94) isolado na Áustria. O fungo indicou a atividade de 330.000 U/L em

405h de cultivo em batelada em biorreator STR de 20 L e 15 L de volume de trabalho. A suplementação com baixas concentrações de glicose durante o cultivo (batelada alimentada) culminou em um grande aumento de atividade: 740.000 U/L em 692h de cultivo (GALHAUP & HALTRICH, 2001; GALHAUP et al., 2002).

O isolado na Alemanha de mesmo gênero *Trametes multicolor* MB 49 indicou atividade de 8.000 U/L (no ponto 265h) quando cultivado também em biorreator STR de 20 L. O fungo indicou redução de atividade quando cultivado em biorreator, que em frascos agitados, foi de aproximadamente 86.400 U/L (HESS et al., 2002).

O basidiomiceto de degradação branca *Pycnoporus sanguineus* CS43 obtido da coleção de cultura da Universidade Autónoma de Nuevo Leon-México indicou índices de 143.000 U/L (no ponto 312h) para lacases em biorreator STR de 10 L e 8 L de volume de trabalho (RAMÍREZ-CAVAZOS et al., 2014). Uma outra linhagem de *Pycnoporus sanguineus*, obtida na coleção de cultura da Malásia, indicou atividade máxima de 325 U/L (em 408 horas) em biorreator de 2,0 L e 1,2 L de volume de trabalho (SAAT et al., 2014).

Em escala piloto, He et al. (2014) descreveram a atividade máxima de 1.361 U/L pelo fungo isolado na China *Abortiporus biennis* (no.SWUST2009111001) em biorreator STR de 300 L de volume total em 192 horas de cultivo. Também na China, Liu et al. (2013) obtiveram 72.000 U/L depois de 6 dias de cultivo do fungo *Pycnoporus* sp. SYBC-L3 em biorreator pneumático *air-lift* de 65 L. Recentemente, Songulashvili et al. (2015) obtiveram em biorreator STR piloto de 120 L a atividade de 416.400 U/L de lacase a partir do fungo isolado da Alemanha *Cerrena unicolor* C-139 em 288 horas de cultivo.

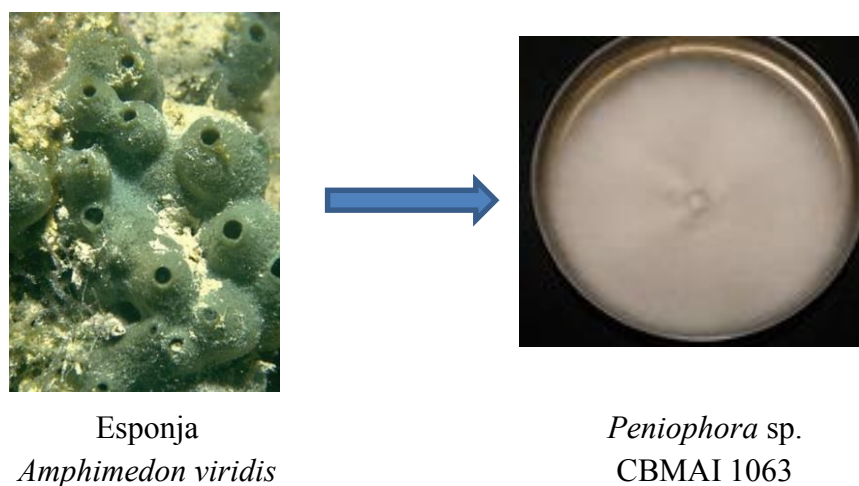
No Brasil, o fungo *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 da coleção de culturas do Instituto Biotecnológico da Universidade de Caxias do Sul, obteve índices de 40.000 U/L (em 144 horas de cultivo) de lacase em biorreator STR de 5,0 e 3,5 L de volume total e de trabalho respectivamente (BETTIN et al. 2011). Outro representante nacional, o fungo *Peniophora cinerea* CCIBT2541 obtido do Instituto de Botânica-São Paulo, indicou atividade de 100 U/L e 3.500 U/L, quando cultivado com micélios livres e imobilizados respectivamente, em biorreator de bancada de 1,0 L de volume de trabalho em 360 horas de cultivo (SILVÉRIO et al. 2013).

2.6.1. *Peniophora* sp. CBMAI 1063

O fungo basidiomiceto *Peniophora* sp. CBMAI 1063, isolado da esponja marinha *Amphimedon viridis* (Figura 7), no âmbito do projeto FAPESP 05/60175-2: “Descoberta e desenvolvimento de potenciais agentes quimioterapêuticos a partir de invertebrados marinhos e de micro-organismos associados” foi descrito como produtor de 709 U/L de atividade para lacases em meio submerso salino e não salino (MENEZES et al., 2010; BONUGLI-SANTOS et al., 2010b).

Após otimização de meio de cultivo em escala de frascos agitados por planejamento experimental, no âmbito do projeto Fapesp “Aplicação de fungos ligninolíticos isolados de esponjas marinhas na degradação de corantes sintéticos e efluente têxtil”, o índice para lacases do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 atingiu 1.350 U/L em 192 horas de cultivo (dados não publicados). Em 2014, as condições para o cultivo do fungo visando produção de lacases foram depositadas junto ao INPI para fins de patente: Processo de obtenção da enzima lacase por fungo marinho, enzima lacase e uso da mesma (INPI: BR 10 2014 008502).

Figura 7. Fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 e sua respectiva fonte de isolamento (esponja marinha *Amphimedon viridis*).



A lacase produzida pelo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 após purificação, indicou a atividade de 18 U/mL, com massa de 67 kDa, e pH e temperaturas ótimos de 3,0 e 60°C respectivamente. A enzima indicou notável estabilidade frente a diferentes valores de pHs, temperatura e íons metálicos. Estudos adicionais também confirmaram que a enzima purificada

foi capaz de descolorir 70% do corante Preto Reativo 5 (200 mg/L) sem adição de mediadores em 5 horas (dados não publicados).

Tendo em vista o potencial das lacases em aplicações biotecnológicas e o potencial do fungo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 como produtor dessa enzima, o objetivo do projeto foi estudar as condições necessárias para que o fungo produza essas enzimas.

3. Objetivos

3.1. Geral:

O objetivo do projeto foi determinar os parâmetros de cultivo necessários para que o fungo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 produza lacases em escala de biorreator de bancada.

3.2. Específicos:

- Comparar a produção de lacases em biorreatores do tipo STR e tipo *air-lift*;
- Determinar o tempo de incubação necessário para o inóculo do cultivo em biorreator;
- Determinar a agitação necessária para produção da enzima;
- Determinar o coeficiente de transferência de oxigênio (k_{La}) necessário para a produção da enzima;
- Determinar o pH inicial do cultivo em biorreator;

4. Materiais e Métodos

4.1. Micro-organismo

O micro-organismo utilizado no projeto foi isolado a partir de amostras da esponja marinha *Amphimedon viridis*, coletada na cidade de São Sebastião-SP (MENEZES et al., 2010) e identificado por taxonomia molecular como pertencente ao gênero *Peniophora*, classe Peniophoraceae, filo Basidiomycota (BONUGLI-SANTOS et al., 2010a). O fungo encontra-se depositado pelo método de criopreservação (glicerol a -80°C) e Castellani (preservação em água a -4°C) na Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) do CPQBA/UNICAMP e na Coleção de Culturas do Instituto de Biociências de Rio Claro, intitulada Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP).

4.2. Meio líquido para produção de lacases

O meio de cultivo utilizado no projeto foi adaptado da otimização por planejamento estatístico experimental feita em escala de frascos agitados em estudos anteriores do grupo de pesquisa (dados patenteados). O meio era constituído de extrato de levedura 0,20% (w/v), peptona bacteriológica de caseína 0,27% (w/v), extrato de malte 0,14% (w/v) e glicose 0,27% (w/v). Dissolvidos em água do mar artificial (ASW) adaptado de Kester et al. (1967): $MgCl_2$ 0,704% (w/v), $CaCl_2$ 0,098% (w/v), $SrCl_2$ 0,001 (w/v), $NaCl$ 1,555% (w/v), Na_2SO_4 0,261% (w/v), KCl 0,044% (w/v), $NaHCO_3$ 0,013% (w/v), KBr 0,006% (w/v) e H_3BO_3 0,002% (w/v), suplementado com 2mM de $CuSO_4$.

4.3. Cultivo em frascos agitados

O cultivo em escala de frascos agitados foi feito em Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL do mesmo meio utilizado no biorreator. Os frascos foram mantidos sob agitação de 140 rpm a 28°C durante 5 dias ou 7 dias, dependendo do experimento. O inóculo dos Erlenmeyers eram seis discos de ágar com o micélio fúngico de 0,9 cm de diâmetro. Os discos foram retirados de culturas puras do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 cultivado por 7 dias em meio sólido ágar-malte a 28°C. (extrato de malte 2,0% (w/v) e ágar-ágar 1,5% (w/v). A temperatura de cultivo foi estipulada para 28°C, como determinado pela otimização.

4.5. Cultivo em biorreatores de bancada

O cultivo em biorreatores foi realizado nos equipamentos descritos abaixo. Como inóculos foram utilizados os frascos agitados descritos acima na proporção referente a 8,5% do volume de trabalho da dorna.

4.5.1. Biorreator STR 1

Os experimentos realizados na UNESP de Rio Claro-SP foram conduzidos no biorreator de bancada Fermac 320 (Electrolab Limited, UK) com dorna de 246 mm de diâmetro e 475 mm de altura. Volume total de 6,4 L e volume de trabalho estipulado para 3,5 L. A homogeneização foi feita por um mastro com 2 impelidores *rushton* (2 x 55 mm) conectados ao motor elétrico. A aeração foi feita por ar comprimido filtrado (Midisart 2000 PTFE 0,2µm – Sartorius, GER) e liberado no sistema através de um aspersor ar em forma de “L” com

cinco furos basais. A temperatura foi mantida a 28°C por uma manta térmica e chicanas com água resfriada (15~20°C), utilizada também para resfriar o condensador (Unichiller, UK). O biorreator contava também com sensores de pH e polarográfico de densidade de oxigênio, ambos da empresa Broadley James, US. Dados de agitação, temperatura, pH e DO foram adquiridos e armazenados em tempo real através do software Electrolab Fermentation Management Software (Figura 8a).

4.5.2. Biorreator STR 2

Os experimentos feitos na USP/FCF/São Paulo-SP foram conduzidos no biorreator de bancada BioFlo 115 (New Brunswick, US) com dorna de 240 mm de largura e 290 mm de altura. Volume total de 3,0 L e volume de trabalho estipulado para 1,2 L. A mistura foi feita por um mastro com 2 impelidores *rushton* conectados ao motor elétrico. A aeração foi feita por ar comprimido filtrado (PTFE 0,2µm – Millipore, USA) e liberado no sistema através de um borrifador de ar em forma de “anel” com um furo basal. A temperatura foi mantida a 28°C por jaquetas externas com água. O condensador foi resfriado com água a 15~20°C. O biorreator contava também com sensor de pH da empresa Mettler Toledo, SW. Dados de agitação, temperatura, pH e DO foram adquiridos em tempo real através do software interno do biorreator (Figura 8b). Os estudos foram conduzidos no Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica (Depto de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica – USP/FCF) em colaboração com o Prof. Dr. Adalberto Pessoa Jr e com o Mestre Valter Feitosa.

4.5.3. Biorreator 3 modificado – Air lift

Outros experimentos feitos na USP/FCF/São Paulo-SP foram conduzidos no biorreator de bancada BioFlo 115 (New Brunswick, US) com volume total de 5,0 L e volume de trabalho estipulado para 3,5 L. O biorreator teve os impelidores retirados e um cilindro de aço inox (8,5 cm de diâmetro e 13,0 cm de comprimento) foi acoplado entre as chicanas de temperatura. A aeração foi feita por ar comprimido filtrado (PTFE 0,2µm – Millipore, USA) e liberado no sistema através de um borrifador de ar em forma de “anel” com um furo basal. Com a injeção de ar, um fluxo de movimento foi formado, como visto em reatores *air-lift* comerciais. A temperatura foi mantida a 28°C por jaquetas externas com água. O condensador foi resfriado com água a 15~20°C. O biorreator contava também com sensor de pH da empresa Mettler

Toledo, SW. Dados de agitação, temperatura, pH e DO foram adquiridos em tempo real através do software interno do biorreator (Figura 8c).

4.5.4. Biorreator STR 4 modificado – *Aspersor em mangueira*

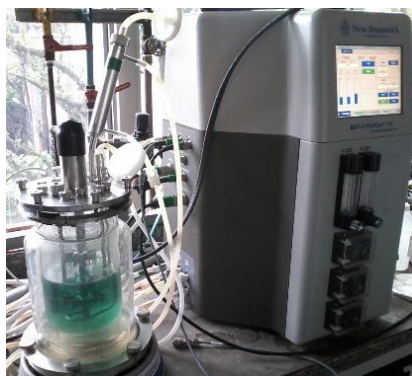
O biorreator STR 1, descrito anteriormente, foi modificado para aumentar a taxa de transferência de oxigênio. O aspersor em forma de “L” foi substituído por uma mangueira de silicone industrial de aproximadamente 230 cm de comprimento (0,8 cm de diâmetro externo e 0,4 cm de diâmetro interno) enrolada sobre si (Figura 8d). A mangueira foi posicionada no fundo do biorreator e dois furos de 1,0 mm de diâmetro foram feitos a cada centímetro de mangueira submersa. O diagrama esquemático está apresentado na Figura 8e.

Figura 8. (a) Biorreator STR 1: Fermac 320 (Electrolab Limited, UK); 3,5 L de volume de trabalho. (b) Biorreator STR 2: BioFlo 115 (New Brunswick, US); 1,2 L de volume de trabalho. (c) Biorreator STR 3 - modificado *Air-lift*: Observar o cilindro de aço inox acoplado entre as chicanas de resfriamento/aquecimento. (d) Mangueira usada no biorreator STR 4 – modificado. (e) Diagrama esquemático de um borrifador de ar em espiral (Adaptado de Zhong, 2011).

(a)



(b)



(c)



(e)



(d)



4.6. Amostragem

Usando seringas de 20 mL, 10 mL de caldo bruto foi retirado do biorreator em intervalos determinados de tempo. Em seguida, as amostras foram devidamente rotuladas e estocadas em congelador (-20°C).

4.7. Variáveis e Parâmetros

4.7.1. Variáveis estáticas

4.7.1.1. Biomassa seca

A biomassa seca foi obtida após filtração a vácuo das amostras coletadas do biorreator. Os discos de celulose foram devidamente secos e pesados três vezes antes da filtração. Após filtração, os discos foram lavados com água destilada, secos a 105°C por 2 dias, e pesados até peso constante. A diferença entre o peso final e inicial da biomassa seca retida do disco foi utilizada para o cálculo, expresso em g L⁻¹. O método foi adaptado de Bailey et al. (2007).

4.7.1.2. Atividade enzimática para lacases

A atividade enzimática da lacase foi avaliada em triplicatas, utilizando 2.2-azino-bis-ethylbenthiazolina (ABTS) a 37°C de acordo com Buswell et al. (1995). A mistura foi composta de 0,3 mL de 0,1 M de tampão acetato de sódio (pH 5.0), 0,1 mL de 0.03 % (w/v) de solução ABTS e 0,6 mL de solução enzimática. A oxidação do ABTS foi avaliada monitorando-se o aumento da absorbância a 420 nm ($\epsilon_{420} = 36\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) e determinada através dos cálculos realizados a partir da equação 1, derivada da Lei de Beer-Lambert. Uma unidade enzimática de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 µmol de substrato por minuto e expressa em U/L.

$$U\text{ L}^{-1} = \Delta A \times V \times 10^6 / \epsilon \times R \times t \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

ΔA = Diferença entre a absorbância final e a inicial

V = Volume da reação (0.001 L)

10^6 = Fator de conversão (de ϵ moles para µmoles)

ϵ = Coeficiente de extinção ($\text{M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$)

R = Quantidade de caldo enzimático (L)

T = Tempo de reação (min)

4.7.1.3. Quantificação da Glicose

Para determinação quantitativa de glicose foi utilizado o Kit de Glicose – PP (Gold Analisa – BR). O kit se baseia no método enzimático-colorimétrico descrito por Barham & Trinder (1972), através da oxidação da glicose para ácido glicônico e peróxido de hidrogênio, seguido de uma reação oxidativa de acoplamento catalisado pela peroxidase do kit. O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol formando um complexo de cor vermelha (quinoneimina), cuja absorvância medida em 505 nm, é diretamente proporcional à concentração de glicose na amostra. Ressalta-se que para evitar possíveis interferências enzimáticas, as amostras foram desnaturadas a 105°C por 1 hora antes da quantificação de glicose.

4.7.2. Variáveis operacionais

4.7.2.1. Coeficiente de transferência de massa gasosa (k_{La})

O k_{La} foi calculado através da utilização do sensor polarográfico do biorreator para medida da concentração de oxigênio dissolvido em água destilada como descrito por Riet. (1979). Após a calibração do eletrodo, foi injetado nitrogênio no meio até que a concentração de oxigênio dissolvido (C), representada pelo percentual de oxigênio em relação à saturação, fora reduzida a zero. Em seguida, o meio foi aerado, cronometrando-se a variação do percentual de oxigênio dissolvido entre 10 e 90% de saturação.

A equação 2 define a transferência de oxigênio para o meio:

$$dC/dt = k_{La} (C_s - C) \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde:

dC/dt = variação da concentração de oxigênio dissolvido com o tempo.

C_s = concentração de oxigênio dissolvido na saturação do meio.

C = concentração de oxigênio dissolvido.

Com a integração da equação 3, com limites de C entre αC_s e βC_s e de t entre 0 e t, tem-se a Equação 3:

$$\ln [(1 - \beta) / (1 - \alpha)] = - k_{La} \cdot t \quad \text{(Equação 3)}$$

Onde: α e β são valores percentuais da concentração de oxigênio na saturação, registradas no biorreator. O gráfico resultante da equação 3 apresenta um perfil linear, cujo coeficiente angular representa “ $-k_{La}$ ”.

4.7.2.2. Velocidade superficial (μ_s)

A velocidade superficial do biorreator foi dada pela equação 4, e a área da seção transversal foi obtida pela equação 5.

$$\mu_s = Q/A \quad \text{(Equação 4)}$$

$$A = \pi R^2 \quad \text{(Equação 5)}$$

Onde:

Q = Taxa de volume de ar (m/s)

A = Área da seção transversal (m²)

R = raio (m)

4.7.3. Parâmetros estequiométricos

4.7.3.1. Produtividade

A produtividade enzimática ou da biomassa celular foi calculada pelas equações 6 e 7.

$$Pdp = (P_f - P_i) / t \quad \text{(Equação 6)}$$

$$Pdx = (x_f - x_i) / t \quad \text{(Equação 7)}$$

Onde:

Pdx = produtividade volumétrica de biomassa (g/L.h)

Pdp = produtividade volumétrica de lacases (U/L.h)

P_f = atividade enzimática final (U/L)

P_i = atividade enzimática inicial (U/L)

x_f = concentração celular final (g/L)

x_i = concentração celular inicial (g/L)

t = tempo de cultivo (horas)

4.7.4. Variáveis de transformação

4.7.4.1. Velocidades instantâneas (Taxas volumétricas)

As taxas volumétricas, chamado por Schimidell et al. (2001) de velocidades instantâneas de transformação, do crescimento celular, da formação do produto e do consumo de substrato, são dadas pelas equações 8, 9 e 10.

$$r_x = dx/dt \quad \text{(Equação 8)}$$

$$r_p = dp/dt \quad \text{(Equação 9)}$$

$$r_s = -ds/dt \quad \text{(Equação 10)}$$

Onde:

rx: Velocidade instantânea de crescimento celular (g/L.h),

rp: Velocidade instantânea de formação do produto (U/L.h),

rs: Velocidade instantânea de consumo de substrato (g/L.h),

dx/dt: Variação do crescimento celular pelo tempo,

dp/dt: Variação da formação do produto pelo tempo,

ds/dt: Variação do consumo de substrato pelo tempo,

4.7.4.2. Velocidades específicas

As velocidades específicas de transformação foram dadas pelas seguintes equações (SCHIMIDELL et al., 2001):

$$\mu_x = (1/x) / r_x \quad \text{(Equação 11)}$$

$$\mu_s = (1/x) / r_s \quad \text{(Equação 12)}$$

$$\mu_p = (1/x) / r_p \quad \text{(Equação 13)}$$

Onde:

x: Concentração celular (g/L)

μ_x : Velocidade específica de crescimento celular (h^{-1}),

μ_p : Velocidade específica de formação do produto (h^{-1}),

μ_s : Velocidade específica de consumo de substrato pelo tempo (h^{-1}),

rx: Velocidade instantânea de crescimento celular (g/L.h),

rp: Velocidade instantânea de formação do produto (U/L.h),

rs: Velocidade instantânea de consumo de substrato (g/L.h)

5. Resultados e Discussão

5.1. Cultivo em biorreatores de agitação mecânica (STR)

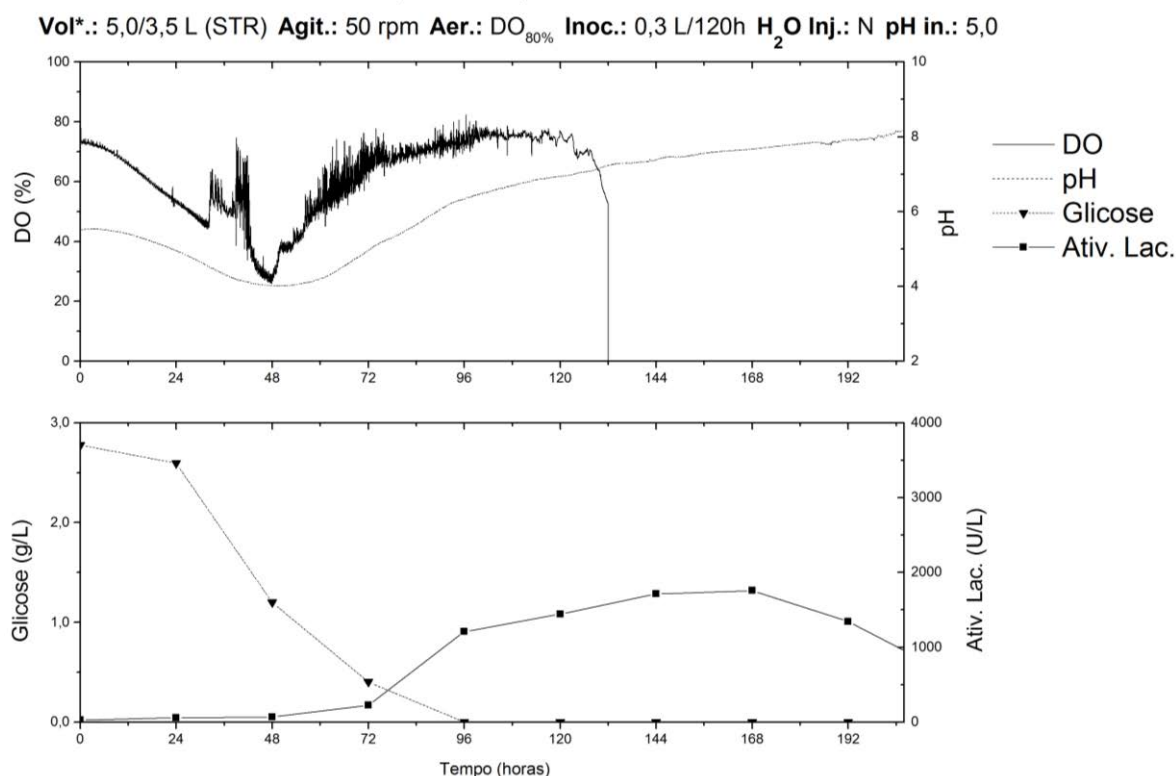
5.1.1. Cultivo 1: Aspectos iniciais

Considerando a fragilidade dos micélios fúngicos quanto às forças de estresse gerados pela agitação (ENGASSER 1988), o primeiro cultivo do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 foi feito em agitação constante de 50 rpm e aeração ajustada para no mínimo 80% de concentração de oxigênio dissolvido (DO80%). O mesmo procedimento foi realizado por Galhaup et al. (2002) em estudos com o fungo *T. pubescens* MB 89, sendo que o ajuste foi firmado em 40% de concentração de oxigênio e 100 rpm de agitação.

O inóculo do biorreator foi de 300 mL do fungo *Peniophora* sp. cultivado em frascos agitados, o que representa cerca de 8,5% do volume de trabalho. Galhaup et al. (2002) inoculou 1,5 L do fungo *T. pubescens* MB 89 em seu biorreator de 15 L, proporção de 10% do volume de trabalho. O autor utilizou frascos de 1 L com 200 mL do mesmo meio utilizado

no biorreator, porém, sem adição de cobre. Na Figura 9 estão apresentados os dados obtidos do primeiro cultivo do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 em biorreator de bancada.

Figura 9. Variáveis obtidas no cultivo 1 no biorreator STR 1 em temperatura (28°C) e agitação (50 rpm) constantes e aeração ajustada para concentração mínima de 80% de oxigênio dissolvido.



O experimento teve duração de aproximadamente 216 horas (9 dias) e indicou a atividade máxima de lacase de 1.758 U/L em 168 horas de cultivo (7º dia), cerca de 450 U/L superior ao obtido em frascos agitados também em 168 horas (1.350 U/L, dados não publicados). A taxa máxima de formação do produto foi de 11 U/L.h. e produtividade máxima de 12 U/L.h.

Durante o cultivo foi observado uma redução progressiva do meio de cultivo devido a evaporação, que inclusive a partir da hora 132, não teve mais contato com o sensor de concentração de oxigênio. Independente disso, a oxigenação aparentemente não limitou a síntese de lacases pelo *Peniophora* sp. CBMAI 1063, já que não atingiu índices abaixo de 25% durante todo o cultivo. Entretanto, a concentração de oxigênio registrada no meio de cultivo não se manteve acima de 80%, como ajustado

O pH inicial foi ajustado em 8,0, porém, após adição de CuSO₄ (procedimento feito depois da autoclavagem), o pH inicial diminuiu pra 5,0. Mudanças de pH ao adicionar sulfato

de cobre pode também ser vista nos estudos de Galhaup & Haltrich (2001) e Galhaup et al. (2002). Foi registrado uma acidificação até o segundo dia, seguido de alcalinização progressiva até o término processo. Esse mesmo padrão de mudança de pH foi observado também nos basidiomicetos *T. pubescens* MB 89 (GALHAUP et al., 2002), *T. multicolor* MB 49 (HESS et al., 2002) e *Pleurotus sojar-caju* PS-2001 (BETTIN et al., 2011). De acordo com Fazenda et al. (2008), fungos tendem a crescer bem em uma ampla gama de variação de pH (4~9) e mudanças observadas durante os cultivos podem estar relacionadas a formação de metabólitos secundários (FAZENDA et al. 2008).

O completo consumo da glicose foi feito em aproximadamente 96 horas de cultivo, com taxa máxima de consumo de glicose de 0,05 g/L.h. A velocidade do consumo de açúcar no meio de cultivo é uma variável muito importante para produção de lacases, alguns fungos como o *T. pubescens* MB 89 iniciam a síntese de lacases após a concentração de glicose atingir um certo limite mínimo (GALHAUP et al., 2002).

Nesse experimento a quantificação da biomassa seca micelial suspendida no meio de cultivo apresentou desvios incomuns e essa variável não foi considerada como confiável.

5.1.2. Cultivo 2 e 3: Tempo de cultivo do inóculo 1

Nos cultivos 2 e 3 em biorreatores, tanto a aeração quanto a agitação foram mantidas constantes em 50 rpm e 1,0 vvm (3,5 L de ar por min), o que representa um k_{La} de 13,9 h⁻¹. A proposta está de acordo com autores como He et al. (2014) que mantiveram 200 rpm de agitação e 1,0 vvm de aeração para o cultivo do fungo *Abortiporus biennis* (no.SWUST2009111001). A diferença entre os dois cultivos foi referente ao tempo de incubação do inóculo: que foram cultivados em agitação por 5 dias (120h) e 7 dias (168h). Os resultados estão apresentados nas Figuras 10 e 11.

Figura 10. Variáveis obtidas no cultivo 2 no biorreator STR 1 em temperatura (28°C), agitação (50 rpm) e aeração (1,0 vvm) constantes. O tempo de cultivo do inóculo para esse cultivo foi de 120h.

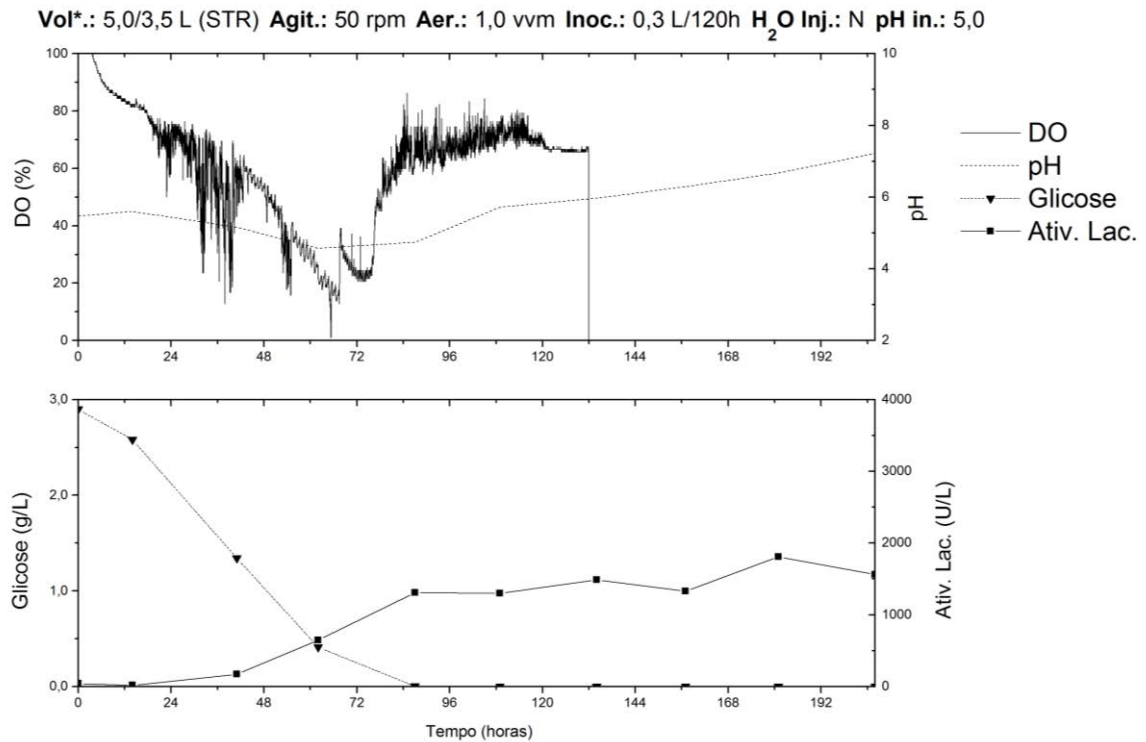
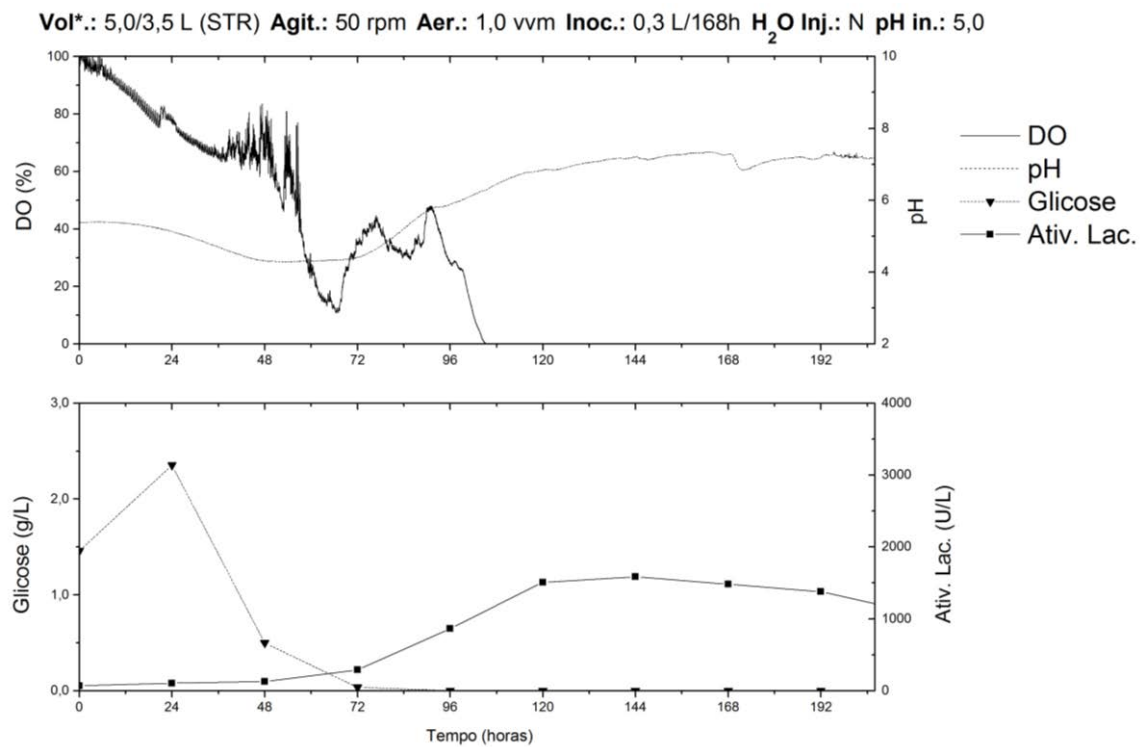


Figura 11. Variáveis obtidas no cultivo 3 no biorreator STR 1 em temperatura (28°C), agitação (50 rpm) e aeração (1,0 vvm) constantes. O tempo de cultivo do inóculo para esse cultivo foi de 168h.



Os experimentos também tiveram duração de aproximadamente 216h (9 dias) e indicaram a atividade máxima de lacases de 1.806 U/L quando o inóculo foi cultivado por 120h, e 1.586 U/L quando o inóculo foi cultivado por 168h (Figuras 10 e 11). A taxa de formação das lacases e a produtividade referentes ao cultivo 2 foram superiores ao cultivo 3, com respectivos índices de 43 U/L.h e 14,5 U/L.h e 25 U/L.h e 12 U/L.h.

Em ambos os cultivos foi observado uma redução progressiva do meio devido a evaporação, que também a partir da hora 132 horas, o fluido não tinha mais contato com o sensor de DO. Houve também formação de espuma e um aparente aumento da viscosidade do meio.

As taxas de degradação da glicose em ambos os cultivos foram de 0,05 g/L.h, e a completa exaustão da mesma foi visto no ponto 72h também em ambos os cultivos, cerca de 24 horas antes da completa degradação observada no cultivo 1. O pH registrado na dorna manteve-se parecido com o visto na batelada anterior e aparentemente não influenciou a produção de lacases entre os cultivos 1, 2 e 3. A quantificação da biomassa seca nesse experimento também apresentou variações e esta variável não foi utilizada.

A concentração de oxigênio dissolvido (DO) atingiu índices menores de 17% em ambos os cultivos, podendo então, ter inibido o potencial do *Peniophora* sp. CBMAI 1063 de sintetizar lacases. Autores como Fenice et al. (2002) reportaram uma redução na atividade de lacases quando o fungo filamentoso *Panus tigrinus* CBS 577.79 foi cultivado em baixas aerações.

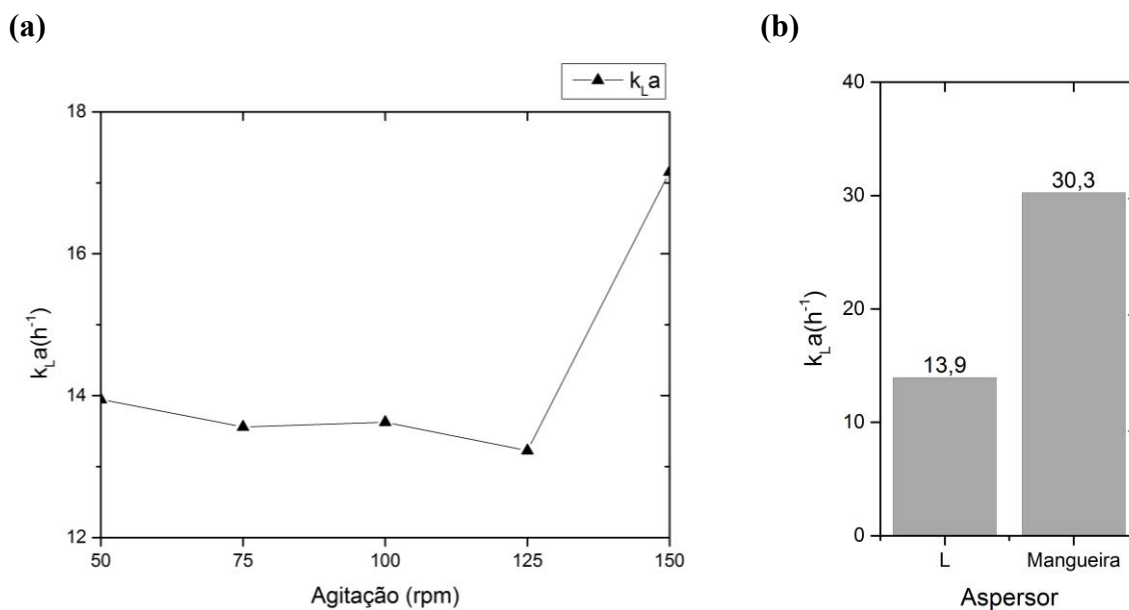
5.1.3. Cultivo 4: Uso do aspersor modificado

A taxa de transferência volumétrica de oxigênio em uma dorna de biorreator é dado pelo coeficiente “ k_{La} ”, que é influenciado por diversos fatores, como a viscosidade do meio, tamanho das bolhas de ar, tempo de permanência das bolhas de ar, agitação (no caso de biorreatores de agitação mecânica) e aeração (GARCIA-OCHOA & GOMEZ et al., 2009). Visando aumentar a taxa de transferência de oxigênio (k_{La}) sem aumentar o consumo de energia pela agitação, foi adaptado um aspersor em forma de mangueira que diminuía consideravelmente o tamanho das bolhas de ar introduzidas no sistema.

Os dados empíricos obtidos com o aspersor modificado indicaram um aumento de aproximadamente 46% na taxa de transferência de oxigênio em comparação ao aspersor de fábrica, sem aumento do consumo de energia. O k_{La} obtido em 50 rpm com borrifador de

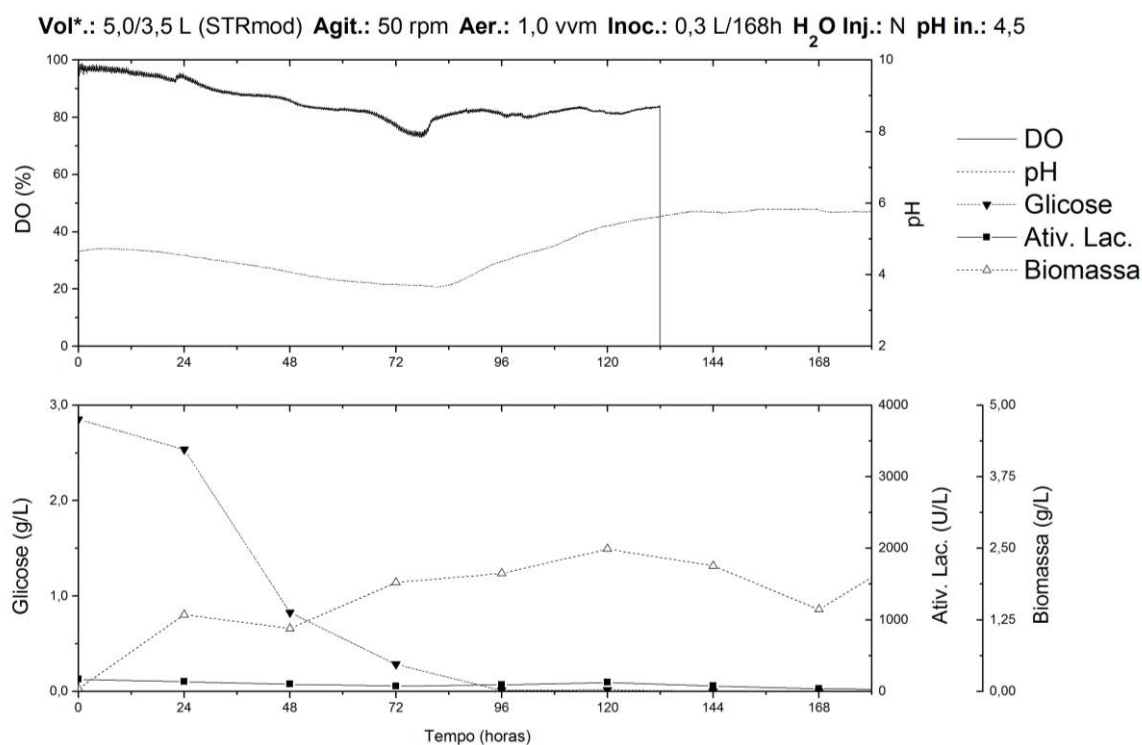
fábrica foi de $13,9 \text{ h}^{-1}$, e o k_{La} obtido com a mesma agitação e borrifador modificado foi de $30,3 \text{ h}^{-1}$ (Figura 12b). Neste experimento, foi também observado que baixas agitações (50 a 125 rpm) não foram suficientes para aumentar o valor do k_{La} . Somente a partir de 150 rpm foi observado um aumento significativo desse coeficiente (Figura 12a).

Figura 12. (a) k_{La} obtido da dorna de cultivo do STR 1. **(b)** k_{La} obtido utilizando dois tipos diferentes de borrifadores de ar: o borrifador de fábrica (em “L”) e o borrifador modificado (SM). A vazão de entrada de ar foi mantida constante durante todo o processo ($1,0 \text{ vvm}$). $V_S = 0,003789 \text{ m s}^{-1}$



Os dados do cultivo 4 estão demonstrados na Figura 13 e indicam que a concentração de oxigênio registrado na dorna do biorreator com o aspersor modificado ficou acima de 65% durante todo o cultivo, ou seja, aparentemente suficiente para a demanda do fungo. Porém, as atividades de lacases obtidas no ensaio diminuíram consideravelmente em relação aos anteriores, com índice máximo de apenas 125 U/L .

Figura 13. Variáveis obtidas no cultivo 4 no biorreator STR 1 com aspersor modificado em temperatura (28°C), agitação (50 rpm) e aeração (1,0 vvm) constantes.



O consumo de glicose foi observado em 96 horas de cultivo, cerca de 24h depois do consumo completo nos cultivos anteriores, que foi próximo a 72h. Os valores de pH registrados no cultivo indicam uma acidificação mais demorada em relação aos cultivos 1, 2 e 3, que indicaram índice mínimo entre os pontos 48 e 72 horas. Nesse experimento (cultivo 4), os valores mínimos de pH foram registrados entre 72 e 96 horas.

Durante o cultivo foi também observado uma diminuição do meio fermentativo, formação de espuma, aumento da viscosidade, além de uma deposição de micélios na mangueira do aspersor, que estava situado na base inferior do biorreator. Na literatura, existem inúmeros relatos de potencialização da atividade de lacases ao imobilizar os micélios em suportes inertes ou orgânicos (COUTO et al., 2004).

Como no estudo de Silvério et al. (2013), em que a atividade de lacase aumentou 35 vezes quando o fungo *Peniophora cinerea* CCIBT2541 foi cultivado com os micélios imobilizados. Porém, a imobilização natural dos micélios do *Peniophora* sp. CBMAI 1063 nesse experimento culminou em uma diminuição significativa na atividade de lacases. Nesse experimento foi possível quantificar a biomassa seca micelial suspensa no meio de cultivo, com pico máximo de 2,5 g/L em 120 horas de cultivo.

5.1.4. Cultivos 5, 6 e 7: Agitação máxima

Tendo em vista que no cultivo 4 a atividade da enzima foi bastante reduzida, muito provavelmente pela deposição de micélios no aspensor modificado, foi proposto manter o aspensor de fábrica e aumentar a frequência da agitação do biorreator.

A agitação do biorreator, além de interferir no $k_L a$ como dito anteriormente, interfere na morfologia do fungo, que pode exibir diversas formas. As duas morfologia mais comumente vistas são a de micélios dispersos no meio, e quando há formação de *pellets* miceliais, que são agregados macroscópicos de micélios (GIBBS et al. 2000). Ressalta-se que há outros fatores que influenciam a morfologia fúngica, que de acordo com Papagianni (2004) são os genes do fungo, a natureza do inóculo, e pelos parâmetros físico-químicos do meio de cultivo (PAPAGIANNI, 2004).

O aumento da agitação geralmente causa diminuição no comprimento das hifas e um aumento na frequência da ramificação, além dos *pellets* se tornarem mais compactos e com um núcleo mais denso (GIBBS et al., 2000; FAZENDA, 2008). A agitação está também intimamente relacionada com a síntese do produto, como descrito por Papagianni et al. (1998) em estudos com *Aspergillus niger* PM 1.

O autor observou uma relação entre a produção de ácido cítrico e a frequência da agitação, além de uma clara diminuição no tamanho dos *pellets* miceliais com o aumento da agitação. Em estudos anteriores de produção de lacases em biorreatores STRs foi observado que a síntese enzimática está intimamente relacionada com a aeração da dorna e o estresse hidrodinâmico gerado pela agitação (SAAT et al., 2014; TINOCO-VALENCIA et al., 2014).

O *Peniophora* sp. CBMAI 1063 apresentou diminuição do tamanho dos *pellets* com o aumento da agitação (Figura 14). A atividade máxima para lacases foi obtida sob 150 rpm de agitação, com índices de 1.397 U/L. Quando submetido a 250 rpm de agitação houve uma redução da atividade de lacases, com índices máximos de 748 U/L (Figura 15).

Em comparação aos dados da literatura, o *Peniophora* sp. CBMAI 1063 indicou maior sensibilidade em relação ao *Panus tigrinus* 577.79, que teve maior atividade quando cultivado a 250 rpm de agitação (FENICE et al., 2003) e menor sensibilidade quando comparado ao *Trametes pubescens* MB 89, que foi cultivado a 100 rpm (GALHAUP et al., 2002).

Figura 14. Tamanho dos *pellets* fúngicos em relação a agitação estipulada quando *Peniophora* sp. CBMAI 1063 foi cultivado nos biorreatores STR 2. A aeração (1,0 vvm) foi mantida constante durante todo o bioprocesso.

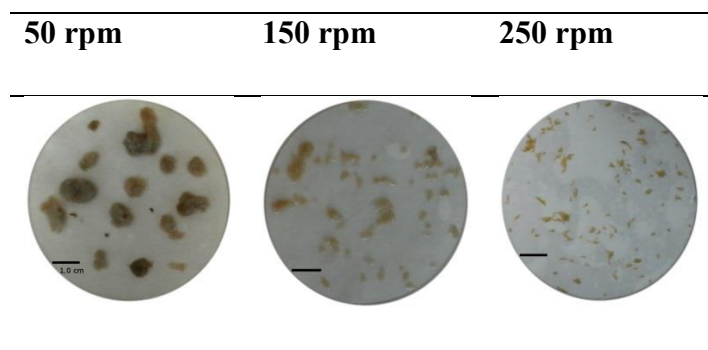
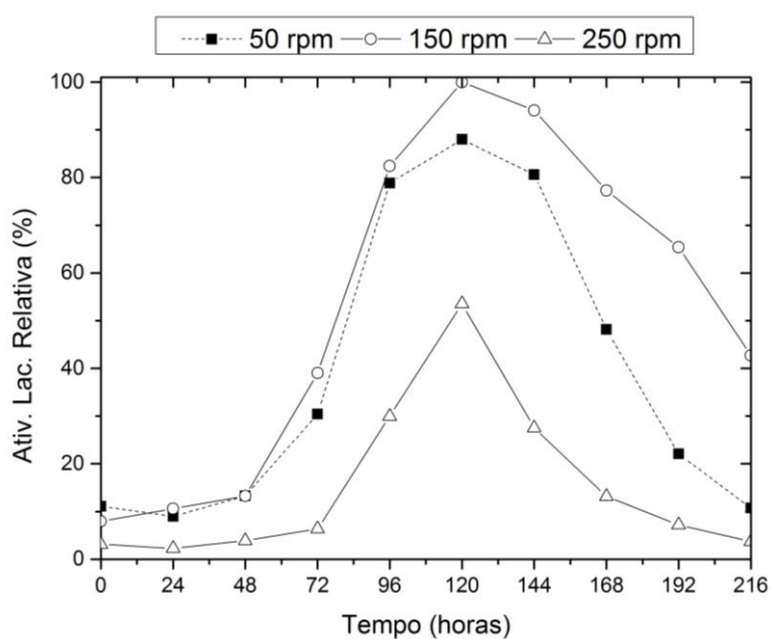


Figura 15. Atividade relativa de lacases obtidas no cultivo 5, 6 e 7, em STR de 3,0 L, com 1,2 L de volume de trabalho. A temperatura de 28°C e a vazão de entrada de ar (1,0 vvm) foram mantidas constantes durante todos os processos (100% corresponde a 1.397 U/L).



5.1.5. Cultivo 8: Aeração de 0,5 vvm

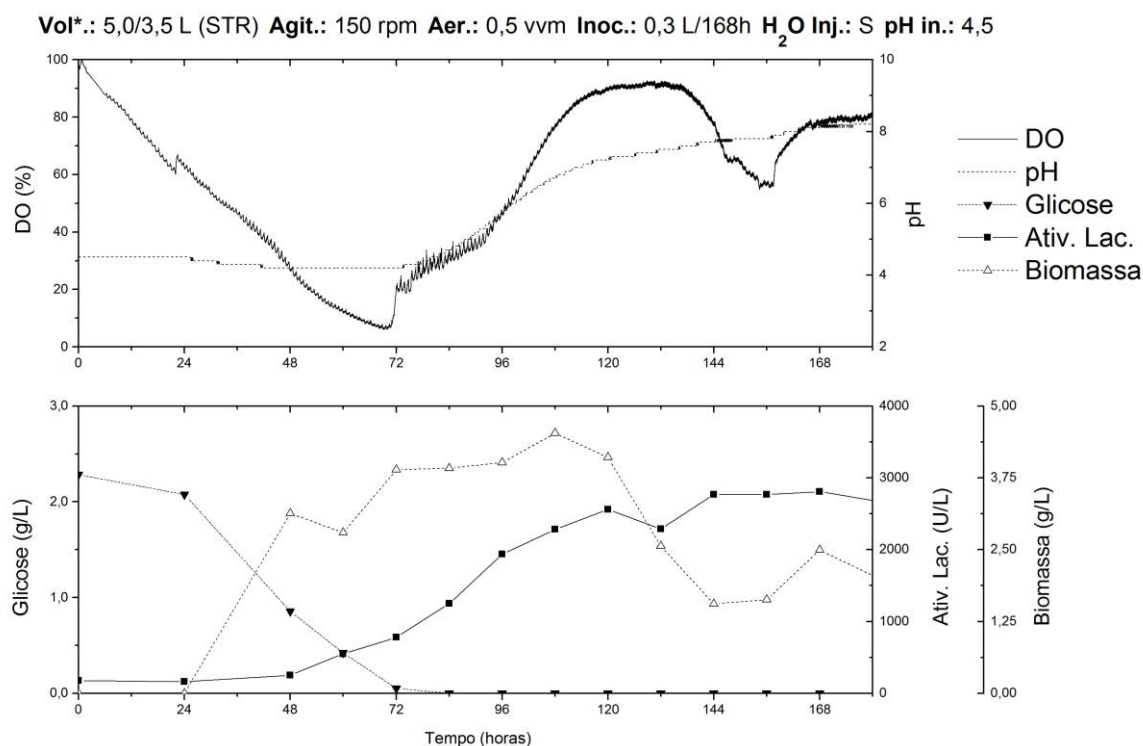
A partir dos experimentos anteriores, o cultivo 8 foi conduzido sob a frequência de 150 rpm de agitação e 0,5 vvm de aeração, o que representa a injeção de 1,75 L de ar por minuto na dorna. Nesse experimento, foi adicionado água destilada estéril no decorrer do bioprocesso para manter o volume de 3,5 L de meio de cultivo, procedimento também

realizado por Cui et al. (2007) para o cultivo do fungo *Coriolus versicolor* ATCC-20545 em biorreator.

As atividades de lacases obtidas nesse cultivo foram 2561 U/L, cerca de 755 U/L acima do cultivo 2. A taxa de formação do produto obtida foi de 45 U/L e produtividade de 20 U/L, ambos também acima dos dados do cultivo 2, com taxa de formação de 43 U/L e produtividade de 14,5 U/L (Figura 16).

O pH inicial foi de 4,5, e apresentou os mesmos padrões vistos nos ensaios anteriores: acidificação seguido de alcalinização. O consumo completo da glicose foi observado em 72 horas de cultivo, com taxa volumétrica de consumo de glicose de 0,05 g/L.h., o mesmo visto nos cultivos 2 e 3. A biomassa seca micelial máxima foi de 4,3 g/L após 108 horas de cultivo.

Figura 16. Variáveis obtidas no cultivo 8 no biorreator STR 1 em temperatura (28°C), agitação (150 rpm), e aeração (0,5 vvm) constantes.



A agitação de 150 rpm e a adição de água destilada estéril durante o cultivo aparentemente reduziu a viscosidade do meio, porém, os índices de concentração de oxigênio registrado na dorna atingiu valores abaixo de 10%. A baixa oxigenação novamente pode ter causado uma inibição na síntese de lacases. A proposta seguinte foi aumentar a aeração da dorna.

5.1.6. Cultivos 9 e 10: Aeração de 1,0 vvm e tempo de cultivo do inóculo 2

Os cultivos 9 e 10 foram ambos feitos sob 150 rpm de agitação e 1,0 vvm de aeração, e o tempo de incubação do inóculo foi de 168h e 120h, como feito nos cultivos 2 e 3. A atividade máxima de lacases obtida no cultivo 9 foi 2502 U/L, com taxa máxima de síntese de lacases de 38 U/L.h e produtividade máxima de 25 U/L.h (Figura 17). Já no cultivo 10, quando inóculo incubado por 120h, a atividade máxima foi de 2724 U/L.h com taxa volumétrica de formação do produto de 60 U/L.h e produtividade máxima de 25,5 U/L (Figura 18).

Figura 17. Variáveis obtidas no cultivo 9 no biorreator STR 1 em temperatura (28°C), agitação (150 rpm), e aeração (1,0 vvm) constantes, com o inóculo incubado por 168h.

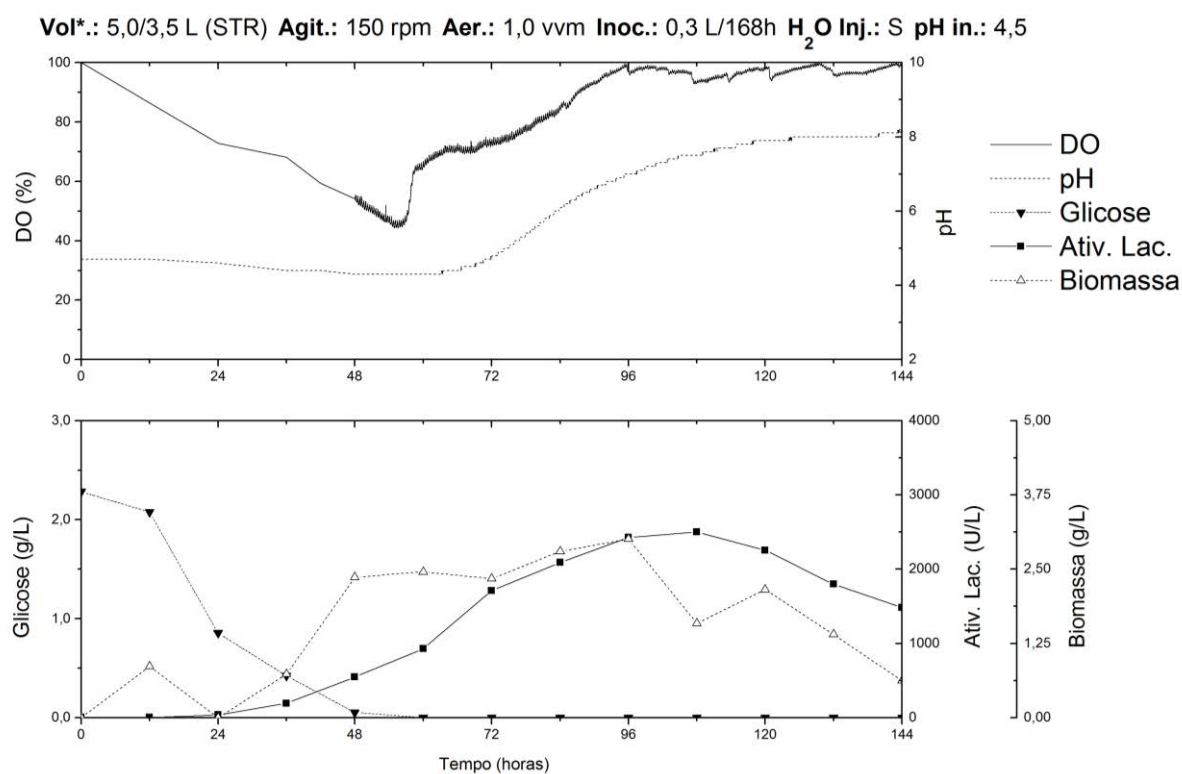
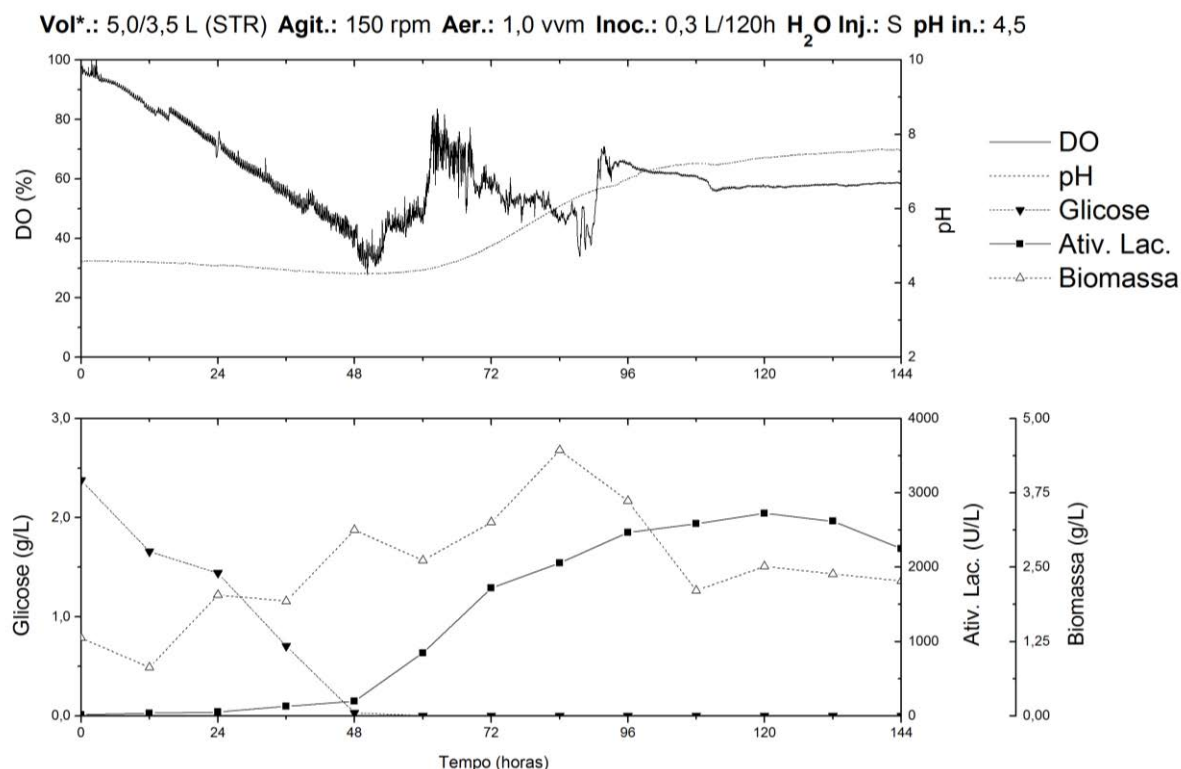


Figura 18. Variáveis obtidas no cultivo 10 no biorreator STR 1 em temperatura (28°C), agitação (150 rpm), e aeração (1,0 vvm) constantes, com o inoculo incubado por 120 horas.



A concentração de oxigênio registrada pelo sensor aparentou ser suficiente para a demanda do micro-organismo em ambos os cultivos e não atingiu índices abaixo de 25%. O valor do coeficiente de transferência de oxigênio (k_{La}) em ambos os cultivos era de $17,2 \text{ h}^{-1}$. Em relação aos dados da literatura, o fungo *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 descrito por Bettin et al. (2011), era cultivado em taxas de 13 h^{-1} de k_{La} .

O completo consumo da glicose foi observado em 48 horas em ambos cultivos, mais rápido do que visto nos cultivos 2 e 3. Pelos gráficos é possível observar que após a exaustão da glicose houve uma diminuição na demanda de oxigênio do micro-organismo.

A biomassa seca micelial no cultivo 10 (inoculo incubado por 120h) apresentou índices máximos de 4,3 g/L, já no cultivo 9 (inóculo incubado por 168h) os valores máximos da biomassa seca foram de 3 g/L. O μ_{max} do cultivo 10 também foi superior ao do cultivo 9, com valores de 23 h^{-1} e 16 h^{-1} respectivamente.

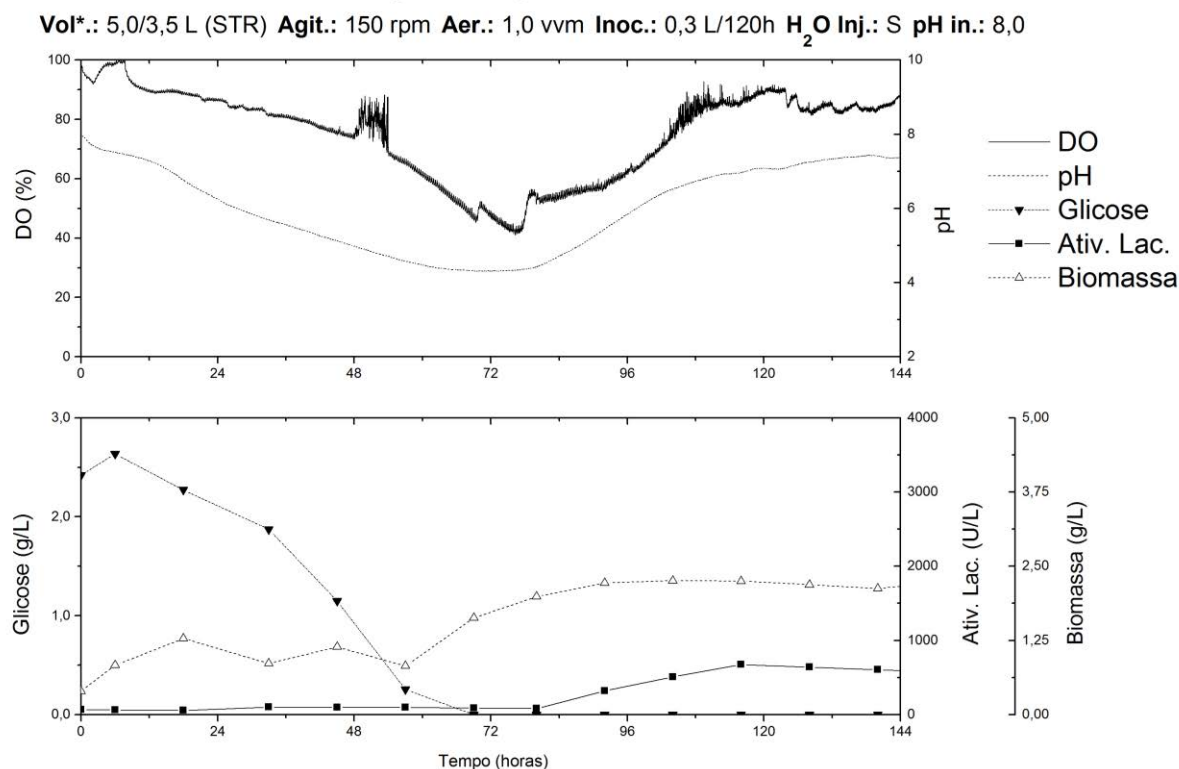
As atividades de lacases de ambos os cultivos indicaram valores parecidos, porém, a taxa volumétrica de formação do produto do cultivo 10 (60 U/L.h) foi superior ao do cultivo

9 (38 U/L.h). Assim, foi verificado que o tempo de incubação do inóculo pode ser de 120h, e não de 168h, diminuindo o tempo total do bioprocesso.

5.1.7. Cultivo 11: pH 8,0 inicial

O meio de cultivo do *Peniophora* sp. CBMAI 1063 foi otimizado em escala de frascos agitados e definido como pH inicial 8,0. Porém, como descrito anteriormente, o procedimento de adicionar sulfato de cobre (2 mM) após autoclavagem ocasionava uma mudança de pH para 4,5. O cultivo 11 foi realizado no intuito de estudar o comportamento do fungo e a produção de lacases em pH inicial 8,0. Os resultados estão apresentados na Figura 19.

Figura 19. Variáveis obtidas no cultivo 11 no biorreator STR 1 em temperatura (28°C), agitação (150 rpm), e aeração (1,0 vvm) constantes. O inóculo utilizado na fermentação foi incubado por 120 horas e o valor do pH inicial foi ajustado para 8,0.



A atividade máxima de lacases foi de 675 U/L em 116 horas de cultivo, abaixo do cultivo anterior, com taxa volumétrica máxima de formação de produto de 17 U/L.h, e $\mu_{\max}$ de 7,8 h⁻¹. O consumo completo da glicose foi evidenciado apenas no ponto 80h, cerca de 32h depois dos consumos observados nos cultivos 9 e 10, os quais que tinham o pH inicial de 5,0.

O padrão registrado pelo sensor de pH foi parecido com os cultivos anteriores, uma acidificação seguido de alcalinização, porém, com uma curva mais acentuada.

A concentração de oxigênio nesse experimento manteve-se acima do limite, porém, a demanda de oxigênio pelo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 aparentou ser menor do que nos cultivos anteriores. Houve uma diminuição na biomassa seca micelial cujo índice máximo foi de 2,25 g/L. No cultivo 10 o índice foi de 3 g/L e no cultivo 11 de 4,3 g/L. Assim sendo, o pH inicial para o cultivo do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 foi estipulado em 5,0.

5.2. Cultivo em biorreator *Air-lift*

Biorreatores *air-lift* apresentam uma dinâmica de fluido diferente dos biorreatores STRs. A mistura nesse tipo de biorreator é feita através da injeção de gás em um ponto único na base. Ao injetar o gás, cria-se uma diferença de pressão que força o fluido dos cantos inferiores para o topo, gerando a circulação do fluido (MERCHUK, 1990).

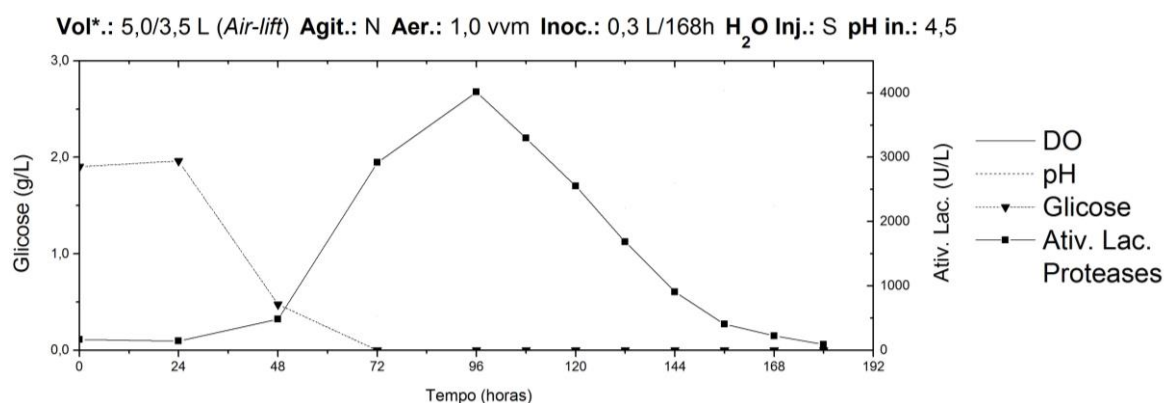
O *Peniophora* sp. CBMAI 1063 foi cultivado no biorreator *air-lift* modificado, descrito nos materiais e métodos, no Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica (Depto de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica – USP/FCF) em colaboração com o Prof. Adalberto Pessoa Jr e seu aluno Valter Feitosa. O inóculo foi cultivado por 168h, nas condições descritas em materiais e métodos.

Devido à ausência de impelidores, biorreatores *air-lifts* geram menos forças de cisalhamento quando comparados com os biorreatores STRs, podendo ser muito úteis para o cultivo de organismos e células sensíveis (MCNEIL & HARVEY, 2008). As desvantagens desse tipo de biorreator é a baixa mistura em fluidos muito viscosos e a formação de muita espuma em altas aerações (ZHONG, 2011). A macro-morfologia obtida no final do cultivo indicou uma maior heterogeneidade de *pellets*, em comparação aos *pellets* obtidos em biorreatores STRs. Observou-se também que os *pellets* eram de tamanhos maiores, indicando que o estresse gerado nesse tipo de biorreator é menor em relação aos biorreatores STRs (Figura 21).

A atividade máxima de lacases foi de 4.014 U/L (Figura 20), cerca de 1.300 U/L superior à obtida em biorreator STR 1 (2.724 U/L). A taxa volumétrica máxima de formação do produto foi de 55,14 U/L.h em biorreator *air-lift*, menor do que a obtida no cultivo 10, que foi de 60 U/L.h. Porém, a produtividade máxima observada no biorreator *air-lift* foi superior

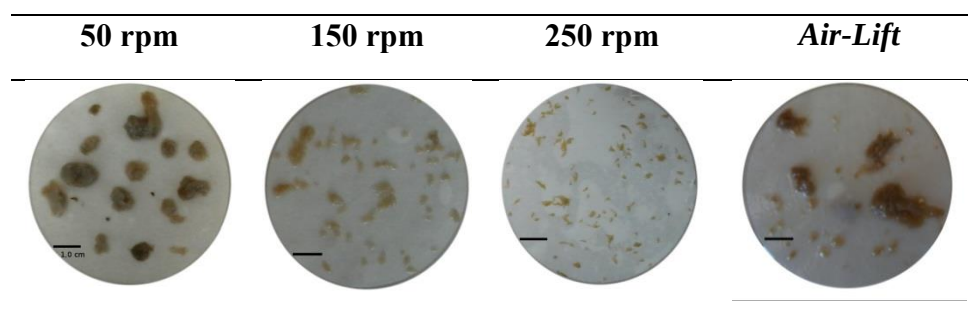
à obtida no cultivo 10, com valores de 40 U/L.h e 25,5 U/L.h, respectivamente. O completo consumo de glicose foi observado em 72 horas de cultivo.

Figura 20. Variáveis obtidas no cultivo no biorreator STR 3 – *air-lift*, em temperatura (28°C) e aeração (1,0 vvm) constantes. O inóculo utilizado na fermentação foi cultivado por 168 horas.



Com 96 horas de cultivo o pico máximo de atividade enzimática de lacases foi alcançado, seguido por uma rápida redução de atividade com taxa de diminuição de 66 U/L.h. Tal fato não foi observado em nenhum dos experimentos em biorreatores STRs. O experimento sugere que houve atividade de proteases, pois de acordo com a literatura a síntese dessas enzimas é comumente vista na cultivo de fungos produtores de lacases (RODGERS et al., 2009).

Figura 21. Macro-morfologia dos *pellets* fúngicos do *Peniophora* sp. CBMAI 1063 quando cultivado em biorreator *air-lift* em comparação com os *pellets* formados em cultivos submersos nos biorreatores STR 2. A aeração (1,0 vvm) foi mantida constante durante todo o bioprocesso.



5.3. Discussão geral dos cultivos em biorreatores

O fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 demonstrou-se apto para produzir lacases em biorreatores de bancada, tanto de agitação mecânica quanto pneumática. Na Tabela 2 estão apresentados os valores obtidos para atividade máxima de lacases, taxa volumétrica máxima de formação do produto, taxa máxima de consumo de substrato (glicose), $\mu_{\max}$ e produtividade máxima, bem como os valores dos parâmetros de cultivo estabelecidos para os ensaios (cultivos) em biorreatores SRTs e *air-lift* de 5,0 L.

Tabela 2. Variáveis obtidas para os cultivos realizados em biorreatores de bancada visando produção de lacases e definição de parâmetros de cultivo do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063.

Tipo de biorreator	Num. cultivo	Agit. (rpm)	Aer. (vvm)	Tempo de incub. inóculo (h)	pH inicial	Injeção de H ₂ O	Ativ. Máx de Lac. (U/L)	Hora	Taxa de form. Produto (U/L.h)	Taxa de consumo de substrato (g/L.h)	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	Produt. (U/L.h)
STR	1	50	Set65%	120	5	N	1758	168	11,5	0,05	ND	12
STR	2	50	1	120	5	N	1806	168	43	0,05	ND	14,5
STR	3	50	1	168	5	N	1586	144	25	0,05	ND	12
STR-AM	4	50	1	168	4,5	N	125	120	0	0,05	ND	0
STR	8	150	0,5	168	4,5	S	2561	120	45	0,05	ND	20
STR	9	150	1	168	4,5	S	2502	108	38	0,07	16,2	25
STR	10	150	1	120	4,5	S	2724	120	60	0,06	23,2	25,5
STR	11	150	1	120	8	S	675	116	17	0,07	7,8	5,2
Air-Lift	12	-	1	168	4,5	S	4014	96	55	0,04	ND	40

N = não; S = sim; (-) = ausente; ND = não determinado

Em todos os cultivos foi observado um aparente aumento da viscosidade. De acordo com Couto & Toca-Herrera (2007), esta viscosidade é comumente vista na produção de lacases por fungos filamentosos. A diminuição do meio de cultivo pela evaporação causou efeitos negativos na produção de lacases, além de aparentemente ter ajudado no aumento da viscosidade do fluido. A adição de água destilada estéril, como feito por Cui et al. (2009), resultou em um aumento da atividade de lacases e uma aparente diminuição na viscosidade do meio (cultivos 8, 9, 10, 11 e 12.).

As maiores atividades de lacases foram observadas quando o valor inicial do pH do meio de cultivo era de 4,5. Houve uma clara diminuição na atividade enzimática quando o fungo *Peniophora* sp CBMAI 1063 foi submetido ao meio de cultivo com valor de pH inicial de 8,0. O tempo de incubação do inóculo de 120 horas aparentou ser suficiente para manter,

ou mesmo superar, o mesmo padrão de produção enzimática em comparação ao inóculo cultivado por 168 horas.

Tanto a produção de lacases quanto a morfologia micelial foram influenciadas pela agitação e aeração em biorreator STR, cuja agitação e aeração ideal foram de 150 rpm e 1,0 vvm (k_{La} de $17,2 \text{ h}^{-1}$). Biorreatores do tipo *air-lift* aparentemente causaram menores danos aos micélios fúngicos, e a atividade máxima de lacases nesse biorreator foi maior atividade do que a vista nos biorreatores STR.

5.4. Experimentos adicionais (em frascos sob agitação)

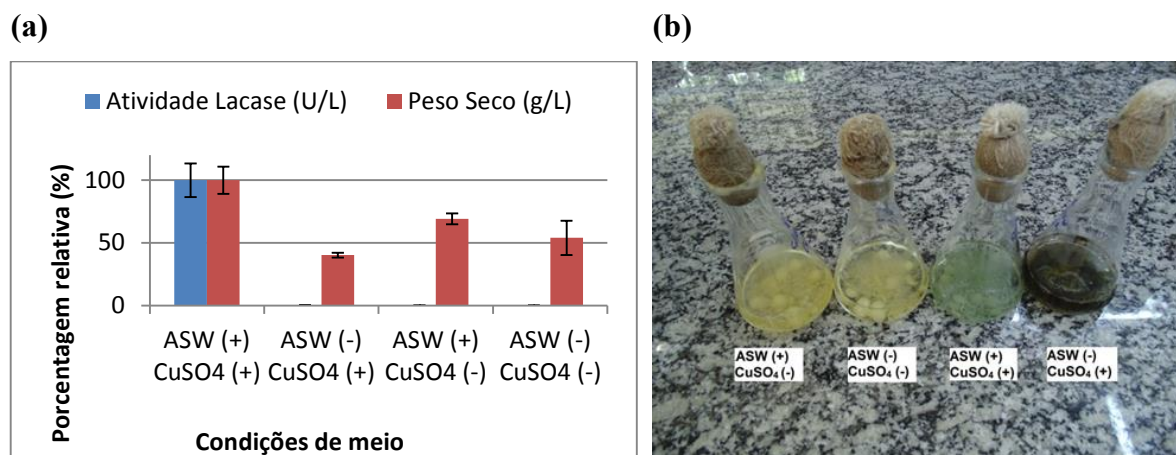
5.4.1. Efeitos do sulfato de cobre e da salinidade

Fungos são geralmente muito sensíveis a concentração de metais, como sulfato de cobre (CuSO_4). Estudos demonstraram uma relação entre a concentração de íons cúpricos, a produção de ácido cítrico, e a morfologia fúngica do *Aspergillus niger* GCB-47 (HAQ et al., 2002). Galhaup et al. (2002) não utilizaram sulfato de cobre no cultivo do inóculo e adicionaram o composto em 4 dias de cultivo em biorreator, após a fase estacionária do fungo *T. pubescens* MB 89. O mesmo procedimento foi realizado por Hess et al. (2002), porém, a adição do sulfato de cobre foi em 10 dias de cultivo em biorreator.

Para avaliar os efeitos da presença de cobre e da salinidade sob o *Peniophora* sp. CBMAI 1063, e assim estipular estratégias para aumentar a produção de lacases, foi proposto o estudo abaixo. O experimento foi feito em frascos agitados (triplicatas) contendo o mesmo meio de cultivo otimizado e o fungo *Peniophora*, porém, com ausência ou presença de água do mar artificial (ASW) e sulfato de cobre na concentração de 2mM.

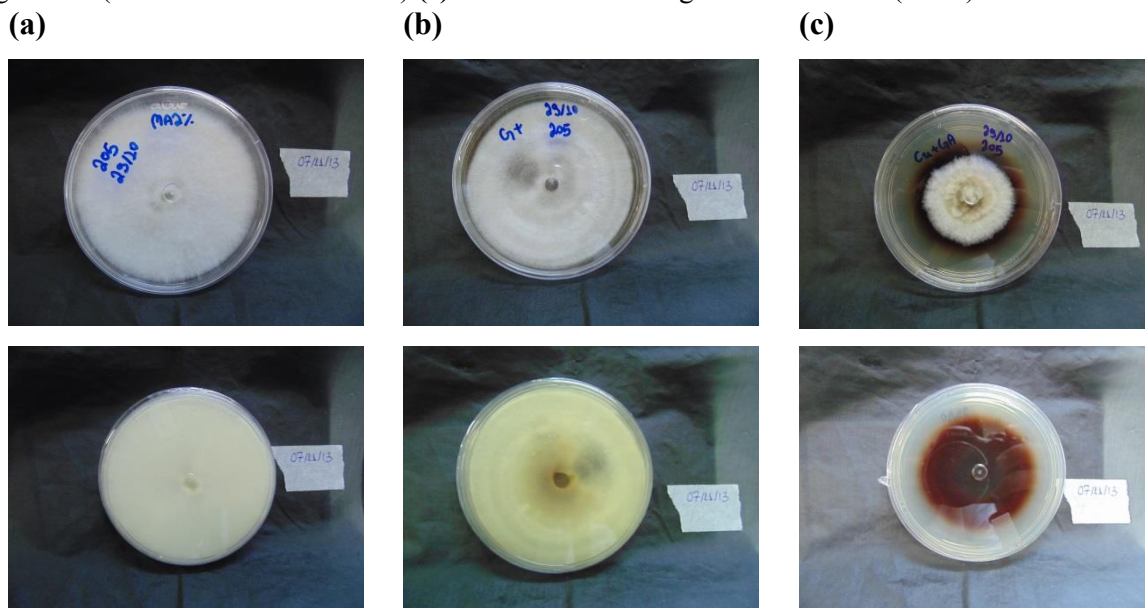
Os resultados, demonstrados na Figura 22, indicaram que os maiores índices para atividade de lacases e peso seco micelial foram obtidos nos frascos que continham ASW e sulfato de cobre. A biomassa seca foi menor nos outros experimentos e a atividade de lacases não foi detectada.

Figura 22. Atividade de lacase (U L^{-1}) e biomassa seca (g L^{-1}) registada no cultivo do *Peniophora* sp. CBMAI 1063 por 7 dias a 28°C (140 rpm). **(a)** Em relação a presença ou ausência de ASW e CuSO_4 . **(b)** Coloração do meio ao término do cultivo.



Outros experimentos testaram o efeito do sulfato de cobre em placas de Petri com o fungo crescido. As placas continham extrato de malte 2% (w/v), ágar-ágar 1,5% (w/v), Sulfato de Cobre 2mM, e guaiacol (indicador para fenol-oxidases). Os resultados (Figura 23) indicaram uma diminuição no crescimento fúngico na presença de CuSO_4 , bem como a formação do composto de coloração marrom (tetraguaiacoquinona) indicador da presença de fenol-oxidases em meio contendo guaiacol. No ensaio onde CuSO_4 estava ausente houve um maior crescimento fúngico e não houve formação da coloração marrom sob e ao redor do micélio fúngico. Os resultados sugerem que o fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 está adaptado à salinidade, e a produção de lacases está relacionada com a concentração salina e de sulfato de cobre.

Figura 23. Placas contendo o fungo crescido utilizando extrato de malte 2% (w/v) e ágar-ágar 1,5% (w/v) (a) Placa com o fungo controle (sem adição de cobre ou guaiacol). (b) Placa acrescida de guaiacol (indicador fenol-oxidases) (c) Placa acrescida de guaiacol e CuSO_4 (2mM).

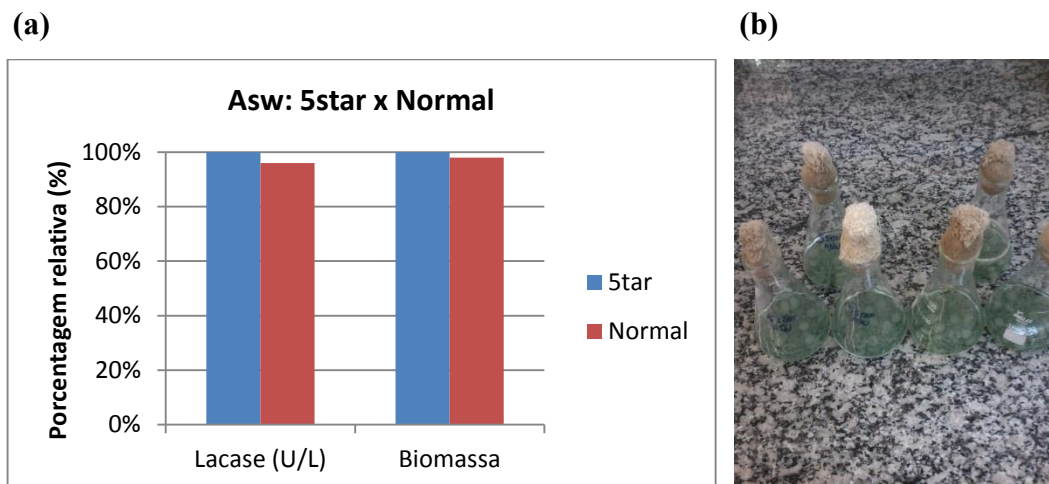


5.4.2. Estudos da composição da água do mar artificial

O meio de produção de lacases em escala de frascos agitados continha 65% (v/v) de água do mar artificial (ASW). A água do mar artificial contém 9 sais presentes nas respectivas concentrações: $10,83 \text{ g L}^{-1} \text{ MgCl}_2$, $1,51 \text{ g L}^{-1} \text{ CaCl}_2$, $0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ SrCl}_2$, $23,93 \text{ g L}^{-1} \text{ NaCl}$, $4,01 \text{ g L}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_4$, $0,68 \text{ g L}^{-1} \text{ KCl}$, $0,20 \text{ g L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$, $0,10 \text{ g L}^{-1} \text{ KBr}$ e $0,03 \text{ g L}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$. Com o intuito de diminuir o total de reagentes utilizados no bioprocesso, bem como a diminuição nos custos de produção, foi preparado um experimento utilizando 5 dos 9 sais encontrados na ASW, escolhidos por estarem em maior concentração: MgCl_2 , NaCl , KCl , CaCl_2 e Na_2SO_4 (ASW5TAR).

Os resultados indicaram que não houve alteração significativa na produção de lacase e na biomassa seca quando utilizado ASW ou ASW5TAR (Figura 24). Dessa forma, foi visto que para produção de lacases em frascos agitados, não é necessário a presença de todos os compostos presentes na ASW, podendo ter apenas cinco principais nas devidas concentrações descritas na otimização. Entretanto, o uso da ASW modificada para produção de lacases em biorreatores deve ser futuramente avaliada.

Figura 24. (a) Atividade relativa de lacases (U L⁻¹) e biomassa seca (g L⁻¹) do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 quando utilizado ASW padrão (vermelho) e ASW5star (azul). **(b)** O experimento foi feito em triplicata.



6. Conclusões

O fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063, quando cultivado em biorreator de bancada, apresentou atividades de lacases superiores às obtidas em frascos sob agitação. O tipo de biorreator que induziu a maior atividade foi o *air-lift*, porém, houve maior redução de atividade após atingir o ponto máximo, fato não observado nos experimentos em biorreatores STRs. O fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 indicou melhores atividades para lacases, bem como maiores índices de biomassa seca, na presença de salinidade (ASW 65% v/v) e sulfato de cobre (2mM), indicando que o isolado estudado é adaptado ao ambiente marinho.

Tendo em vista a ampla aplicação das lacases no setor industrial e ambiental e os resultados obtidos no presente projeto referentes à produção destas enzimas em biorreatores de bancada, o fungo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 (bem como suas lacases) pode ser considerado um recurso genético promissor para aplicação biotecnológicas.

8. Referências Bibliográficas

- Abdel-Hamid, A. M; Solbiati, J. O.; Cann, I. K. Insights into Lignin Degradation and its Potential Industrial Applications. *Advances in Applied Microbiology*. 82:1-28; 2013.
- Adler, E. Lignin chemistry, past, present and future. *Wood Science and Technology*. 11:169–218; 1977.
- Aghaie-Khouzani, M.; Forootanfar, H.; Moshfegh, M.; Khoshayand, M. R.; Faramarzi, M. A. Decolorization of some synthetic dyes using optimized culture broth of laccase producing ascomycete *Paraconiothyrium variabile*. *Biochemical Engineering. Journal*. 60:9-15; 2012.
- Aktas, N.; Tanyolaç, A. Kinetics of laccase-catalyzed oxidative polymerization of catechol. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 22:61-69; 2003.
- Aljawish, A.; Chevalot, I.; Jasniewski, J.; Paris, C.; Scher, J.; Muniglia, L. Laccase-catalysed oxidation of ferulic acid and ethyl ferulate in aqueous medium: A green procedure for the synthesis of new compounds. *Food Chemistry*. 145:1046-1054; 2014.
- Amitai, G.; Adani, R.; Sod-Moriah, G.; Rabinovitz, I.; Vincze, A.; Leader, H.; Chefetz, B.; Leibovitz-Persky, L.; Friesem, D.; Hadar, Y. Oxidative biodegradation of phosphorothiolates by fungal laccase. *FEBS letters*. 438:195-200; 1998.
- Arora, D.S.; Sharma, R.K. Ligninolytic Fungal Laccases and Their Biotechnological Applications. *Applied Biochemistry. Biotechnology*, 160, 1760–1788; 2010.
- Auriol, M.; Filali-Meknassi, Y.; Adams, C. D.; Tyagi, R. D.; Noguerol, T.-N.; Pina, B. Removal of estrogenic activity of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater: Efficiency of horseradish peroxidase and laccase from *Trametes versicolor*. *Chemosphere*. 70:445-452; 2008.
- Ba S.; Arsenault, A.; Hassani, T.; Jones, J. P.; Cabana, H. Laccase immobilization and insolubilization: from fundamentals to applications for the elimination of emerging contaminants in wastewater treatment. *Critical reviews in Biotechnology*. 33:404-418; 2013.
- Bailey M. J.; Adamitsh, B.; Rautio, J.; Weymarn, N.; Saloheimo, M. Use of a growth-associated control algorithm for efficient production of a heterologous laccase in *Trichoderma reesei* in fed-batch and continuous cultivation. *Enzyme and Microbial Technology*. 41:484-491; 2007.
- Baldrian, P. Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*. 30:215–242; 2005.
- Barham, D.; Trinder, P. An Improved Colour Reagent for the Determination of Blood Glucose by the Oxidase System. *Analyst*. 97:142-145; 1972.

Berlinck, R.G.S., Hajdu, E., Rocha, R.M., Oliveira, J.H.H.L., Hernández, I.L.C., Seleglim, M.H.R., Granato, A.C., Almeida, E.R.V.R., Nuñez, C.V., Muricy, G., Peixinho, S., Pessoa, C., Moraes, M.O., Cavalcante, B.Cc, Nascimento, G.G.F., Thiemann O.M., Silva M., Souza A.O., Silva C.L., Minarini P.R.R. Challenges and rewards of research in marine natural products chemistry in Brazil. *Journal of Natural Products*. 67: 510-522, 2004.

Bettin, F.; Rosa, L. O.; Montanari, Q.; Calloni, R.; Gaio, T. A.; Malvessi, E.; Silveira, M. M.; Dillon, A. J. P. Growth kinetics, production, and characterization of extracellular laccases from *Pleurotus sojour-caju* PS-2001. *Process Biochemistry*. 46:758-764; 2011.

Bhadury, P.; Mohammad, B. T.; Wright, P. C. The current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 33:325-337; 2006.

Bhatnagar, I.; Kim, S.-W. Pharmacologically prospective antibiotic agentes and their sources: A marine microbial perspective. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 34:631-643; 2012.

Bliem R.; Katinger, H. Scale-up engineering in animal cell technology: Part I. *Tibtech*. 6:190-195; 1988.

Bonugli-Santos, R.; Durrant, L. R.; Sette, L. D. The Production of Ligninolytic Enzymes by Marine-Derived Basidiomycetes and Their Biotechnological Potential in the Biodegradation of Recalcitrant Pollutants and the Treatment of Textile Effluents. *Water, Air, & Soil Pollution*. 223:2333-2345; 2012.

Bonugli-Santos, R.C.; Durrant, L.R.; da Silva, M.; Sette, L.D. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. *Enzyme Microbial Technology*. 46: 32-37; 2010a.

Bonugli-Santos, R.C.; Durrant, L.R.; Sette L.R. Laccase activity and putative laccase genes in marine-derived basidiomycetes. *Fungal Biology*. 114:863–872; 2010b.

Bourbonnais, R.; Paice, M. G.; Freirmuth, B.; Bodie, E.; Bonerman, S. Reactivities of Various Mediators and Laccases with Kraft Pulp and Lignin Model Compounds. *Appl. and Environmental Microbiology*. 63:4627-4632; 1997.

Bourbonnais, R.; Paice, M.G. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters*. 267:99-102; 1990.

Brenna, O.; Bianchi, E. Immobilised laccase for phenolic removal in must and wine. *Biotechnology Letters*. 16:35-40; 1994.

Bugni, T. S.; Ireland, C. M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *The Royal Society of Chemistry*. 21:143-163; 2004.

Buswell, J.K., Cai, Y.J., Chang, S.T. Effect of nutrient nitrogen on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMS Microbiology Letters*. 128:81-88; 1995.

Canas, A. I.; Camarero, S. Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnology Advances*. 694:705; 2010.

Caparrós-Ruiz, D.; Fornalé, S.; Civardi, L.; Puigdomènech, P.; Rigau, J. Isolation and characterisation of a Family of laccase in maize. *Plant Science*. 172:217-225; 2006.

Chi, Z.; Chi, Z.; Zhang, T.; Liu, G.; Li, J.; Wang, X. Production, characterization and gene cloning of the extracellular enzymes from the marine-derived yeasts and their potential applications. *Biotechnology Advances*. 27:236-255; 2009.

Chisti, Y.; Moo-Young, M. Bioreactors. *Encyclopedia of physical science and technology*. 2: 247-271; 2002.

Claus, H. Laccases: Structure, reactions, distribution. *Micron*. 35:93-96; 2004.

Colwell, R. R. Review: Fulfilling the promise of biotechnology. *US National Science Foundation*. 2012.

Couto, S. R.; Sanromán, M. A.; Hofer, D.; Gubitz, G. M. Stainless steel sponge: a novel carrier for the immobilization of the white-rot fungus *Trametes hirsuta* for decolourization of textile dyes. *Bioresource Technology*. 95:67-72; 2004.

Couto, S. R.; Toca-Herrera, J. L. Industrial and Biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances*. 24,:500-513; 2006.

Couto, S. R.; Toca-Herrera, J. L. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnology Advances*. 25:558-569; 2007.

Cui, J.; Goh, K.K.T.; Archer, R.; Harjinder, S. Characterisation and bioactivity of protein-bound polysaccharides from submerged-culture fermentation of *Coriolus versicolor* Wr-74 and ATCC-20545 strains. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*. 34:393-402; 2007.

da Silva, M.; Passarini, M.R.Z; Bonugli, R.C.; Sette, L.D. Cnidarian-derived filamentous fungi from Brazil: isolation, characterisation and RBBR decolourisation screening. *Environmental Technology*. 29: 1331-1339, 2008.

Dasa, P.; Barboraa, L.; Dasa, M.; Goswamib, P. Highly sensitive and stable laccase based amperometric biosensor developed on nano-composite matrix for detecting pyrocatechol in environmental samples. *Sensors and Actuators B*. 192:737-744; 2014.

Dashtban, M.; Schraft, H.; Syed, T.A.; Qin, W. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *Journal Biochemistry and. Molecular Biology*. 1:36-50; 2010

Di Fusco, M.; Tortolini, C.; Deriu, D.; Mazzeia, F. Laccase-based biosensor for the determination of polyphenol index in wine. *Talanta*. 81:235-240; 2010.

Dittmer, N.T.; Kanost, M.R. Insect multicopper oxidases: Diversity, properties, and physiological roles. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 40:179-188; 2010.

Dwivedi, U.N.; Singh, P.; Pandey, V.P.; Kumar, A. Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 68:117-128; 2011.

Dzyadevych, S.V.; Arkhypova, V.N.; Soldatkin, A.P.; El'skaya, A.V.; Martelet, C.; Jaffrezic-Renault, N. Amperometric enzyme biosensors: Past, present and future Biocapteurs enzymatiques à transduction ampérométrique :passé, présent, future. *ITBM-RBM*. 29:171-180; 2008.

Eggert, C.; Temp, U.; Eriksson, K.-E. Laccase is essential for lignin degradation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *FEBS letters*. 407:89-92; 1997.

Engasser, J-M. Bioreactor Engineering: The Design and Optimization of Reactors with Living Cells. *Chemical Engineering Science*. 43:1739-1748; 1988.

Erickson, L. E. Bioreactors for Commodity Products. *Comprehensive Biotechnology*. 3:653-658; 2011.

Eriksson, K-E. L.; Bermek, H. Lignin, Lignocellulose, Ligninase. *Applied Microbiology: Industrial*. 373-384; 2009.

Faure, D.; Bouillant, M.-L.; Bally, R. Comparative Study of Substrates and Inhibitors of *Azospirillum lipoferum* and *Pyricularia oryzae* Laccases. *Applied and Environmental Microbiology*. 61:1144-1146; 1995.

Fazenda, M.L.; Seviour, R.; McNeil, B.; Harvey, L.M. Submerged Culture Fermentation of "Higher Fungi": The Macrofungi. *Advances in Applied Microbiology*. 63:33-103; 2008.

Feng, Y.; Colosi, L. M.; Gao, S.; Huang, Q.; Mao, L. Transformation and removal of tetrabromobisphenol A from water in the presence of natural organic matter via laccase-catalyzed reactions: Reaction rate, products, and pathways. *Environmental Science and Technology*. 47:1001-1008; 2013.

Fenice, M.; Sermanni, G. G.; Federici, F.; D'Annibale, A. Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. *Journal of Biotechnology*. 100:77-85; 2003.

Fernández-Fernández, M.; Sanromán, M.; Moldes, D. Recent development and applications of immobilized laccase. *Biotechnology Advances*. 31:1808-1825; 2013.

Ferraroni M, Myasoedova NM, Schmatchenko V, Leontievsky AA, Golovleva LA, Scozzafava A and Briganti F. Crystal structure of a blue laccase from *Lentinus tigrinus*: evidences for intermediates in the molecular oxygen reductive splitting by multicopper oxidases. *BMC Struct Biol.* 7:60; 2007.

Flander, L.; Holopainen, U.; Kruus, K.; Buchert, J. Effects of Tyrosinase and Laccase on Oat Proteins and Quality Parameters of Gluten-free Oat Breads. *Journal of Agriculture and Food Chemistry.* 59:8385-8390; 2011.

Fu, J.; Qiao, H.; Li, D.; Luo, L.; Chen, K.; Wei, Q. Laccase biosensor based on electrospun Copper/Carbon composite nanofibers for catechol detection. *Sensors.* 14:3543-3556; 2014.

Fu, S.Y.; Yu, H.; Buswell, J. A.. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Pleurotus sajor-caju*. *FEMS Microbiology Letters.* 147:133-137; 1997.

Fukuda, T.; Uchida, H.; Suzuki, M.; Miyamoto, H.; Morinaga, H.; Nawata, H.; Uwajima, T. Transformation products of bisphenol A by a recombinant *Trametes villosa* laccase and their estrogenic activity. *Journal of Chemical and Technology and Biotechnology.* 79:1212-1218; 2004.

Galhaup, C.; Haltrich, D. Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *Applied Microbiology. Biotechnology.* 56:225-232; 2001

Galhaup, C.; Wagner, H.; Hinterstoisser, B.; Haltrich, D. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. *Enzyme and Microbial Technology.* 30:529-536; 2002.

Garcia-Ochoa, F.; Gomez, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances.* 27:153-176; 2009.

Gibbs, P. A.; Seviour, R. J.; Schmid, F. Growth of Filamentous Fungi in Submerged Culture: Problems and Possible Solutions. *Critical Reviews in Biotechnology.* 20:17-48; 2000.

Gill, E. S.; Rezende, S. G.; Ribeiro Júnior, E. J. M.; Barcelos, H. T.; Scalize, P. S.; Santiago, M.F.; Quintino, M. P.; Somerset, V. S. Development of a Laccase biosensor for determination of phenolic micropollutants in surface waters. *Sensing in Electroanalysis.* 8:227-240; 2014.

Habermüller, K.; Mosbach M.; Schuhmann, W. Electron-transfer mechanisms in amperometric biosensors. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry.* 366:560-568; 2000.

Haghighi, B.; Gorton, L.; Ruzgas, T.; Jonsson, L. J. Characterization of graphite electrodes modified with laccase from *Trametes versicolor* and their use for bioelectrochemical

monitoring of phenolic compounds in flow injection analysis. *Analytica Chimica Acta*. 487:3-14; 2003.

Haq, I. U.; Ali, S.; Qadeer, M. A.; Iqbal, J. Effect of copper ions on mould morphology and citric acid productivity by *Aspergillus niger* using molasses based media. *Process Biochemistry*. 37:1085-1090; 2002.

Harms, H.; Schlosser, D.; Wick, L. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Applied and Industrial Microbiology*. 9:177-192; 2011.

He, P.; Pan, L.; He, X.; Xu, C. Optimization of culture conditions for laccase production from *Abortiporus biennis* in a pilot-scale bioreactor. *Archives Biological Science Belgrade*. 66:1567-1574; 2014.

Hess, J.; Leitner, C.; Galhaup, C.; Kulbe, K. D.; Hintertoisser, B.; Steinwender, M.; Haltrich, D. Enhanced formation of extracellular laccase activity by the white-rot fungus *Trametes multicolor*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2002.

Hildén, K.; Hakala, T.K.; Lundell, T. Thermotolerant and thermostable laccases. *Biotechnology Letters* 31:1117-1128; 2009.

Hisano, H.; Nandakumar, R.; Wang, Z. Genetic modification of lignin biosynthesis for improved biofuel production. *In vitro cellular & Developmental Biology - Plant*. 45:306-313; 2009.

Hofrichter, M.; Ullrich, R.; Pecyna, M.J.; Liers, C.; Lundell, T. New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Applied Microbiology Biotechnology*. 87:871–897; 2010.

Holker, U.; Hofer, M.; Lenz, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology Biotechnology*. 64:175-186; 2004.

Hou, H.; Zhou, J.; Wang, J.; Du, C.; Yan, B. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochemistry*. 39:1415-1419; 2004.

Hou, Y.-H.; Wang, T.-H.; Long, H.; Zhu, H.-Y. Novel Cold-adaptive *Penicillium* Strain FS010 Secreting Thermo-labile Xylanase Isolated from Yellow Sea. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 38:142-149; 2006.

Hutterman, A.; Mai, C.; Kharazipour, A. Modification of lignin for the production of new compounded materials. *Applied Microbiology Biotechnology*. 55:387-394; 2001.

Ikeda, R.; Uyama, H.; Kobayashi, S. Novel Synthetic Pathway to a Poly(phenylene oxide). Laccase-Catalyzed Oxidative Polymerization of Syringic Acid. *Macromolecules*. 29:3053-3054; 1996.

Jacques, R. J. S.; Bento, F. M.; Antonioli, Z. I.; Camargo, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência Rural*. 37:1192-1201; 2007.

Jaszek, M.; Grzywnowicz, K.; Malarczyk, A.; Leonowicz, A. Enhanced extracellular laccase activity as a part of the response system of white rot fungi: *Trametes versicolor* and *Abortiporus biennis* to paraquat-caused oxidative stress conditions. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 85:147-154; 2006a.

Jaszek, M.; Zuchowski, J.; Dajczak, E.; Cimek, K.; Graz, M.; Grzywnowicz. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 58:168-175; 2006b.

Jeon, J.-R.; Kim, E.-J.; Murugesan, K.; Park, H.-K.; Kim, Y.-M.; Kwon, J.-H; Kim, W.-G.; Lee, J.-Y. Chang, Y.-S. . Laccase-catalysed polymeric dye synthesis from plant-derived phenols for potential application in hair dyeing: Enzymatic colourations driven by homo- or hetero-polymer synthesis. *Microbial Biotechnology*. 3:324-335; 2010.

Johannes, C.; Majcherczyk, A. Natural Mediators in the Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Laccase Mediator Systems. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:524-528; 2000.

Jung, J.; Wicker, L. Laccase mediated conjugation of sugar beet pectin and the effect on emulsion stability. *Food Hydrocolloids*. 28:168-173; 2012.

Karim, F.; Fakhruddin, A. N. M. Recent advances in the development of biosensor for phenol: a review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 11:261-274; 2012.

Kester, D. R., Duedall, I. W., Connors, D. N. and Pytkowicz, R. M. (1967). Preparation of Artificial Seawater. *Limnology & Oceanography* 12, 176—179

Kirk, T. K.; Farrell, R. L. Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology*. 41:465-505; 1987.

Kobayashi, S.; Uyama, H.; Ikeda, R. Artificial Urushi. *Chemistry - A European Journal*. 7:4754-4760; 2001.

Kohlmeyer J.; Kohlmeyer E. Marine Micology: The Higher Fungi. *Academic Press*, New York. 1979.

König G.M., Kehraus, S., Seiber, S.F.; Abdel-Lateff, A.; Muller, D. Natural products from marine organism and their associated microbes. *Chembiochem*. 7:229–238, 2006.

Kuuva T.; Lantto, R.; Reinikainen, T.; Buchert, J.; Autio, K. Rheological properties of laccase-induced sugar beet petin gels. *Food Hydrocolloids*. 17:679-684; 2003.

Leatham, G.; Stahmann, M. Studies on the Laccase of *Lentinus edodes*: Specificity, Localization and Association with the Development of Fruiting Bodies. *Journal of General Microbiology*. 125: 147-157; 1981.

Liu, J.; Cai, Y.; Liao, X.; Huang, Q.; Hao, Z.; Hu, M.; Zhang, D.; Li, Z. Efficiency of laccase production in a 65-L air-lift reactor for potential green industrial and environmental application. *Journal of Cleaner Production*. 39:154-160; 2013.

Lloret, L.; Eibes, G.; Feijoo, G.; Moreira, M. T.; Lema, J. M. Continuous Biotransformation of Estrogens by Laccase in an Enzymatic Membrane Reactor. *Chemical Engineering Transactions*. 27:31-36; 2012.

López, J.; Hernández-Alcántara, J. M.; Roquero, P.; Montiel, C.; Shiraid, K.; Gimeno, M.; Bárzana, E. *Trametes versicolor* laccase oxidation of gallic acid toward a polyconjugated semiconducting material. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 97:100-1005; 2013.

Machonkin, T. E.; Quintanar, L.; Palmer, A. E.; Hassett, R.; Severance, S.; Kosman, D. J.; Solomon, E. I. Spectroscopy and Reactivity of the Type 1 Copper Site in Fet3p from *Saccharomyces cerevisiae*: Correlation of Structure with Reactivity in the Multicopper Oxidases. *Journal of the American Chemical Society*. 123:5507-5517; 2001.

Maciel, M.J.; Silva, A.C.; Ribeiro, H.C.T. Industrial and biotechnological applications of ligninolytic enzymes of the basidiomycota: A review. *Electronic Journal of Biotechnology*. Vol. 13; 2010.

Madhavi, V.; Lele, S. S. Laccase: Properties and Applications. *BioResources*. 4:1694-1717; 2009.

Manda, K.; Gördes, D.; Mikolasch, A.; Hammer, E.; Schmidt, E.; Thürow, K.; Schauer, F. Carbon-oxygen bond formation by fungal laccases: cross-coupling of 2,5-dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamide with the solvents water, methanol, and other alcohols. *Applied Microbiology Biotechnology*. 76:407-416; 2007.

Martínez, A. T., Speranza, M., Ruiz-Duenas, F. J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillen, F., et al. Biodegradation of lignocelluloses: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*; 8:195–204; 2005.

Mayer, A. M.; Staples, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*: 60:551-565; 2002.

McNeil, B.; Harvey, L. Practical Fermentation Technology. *John Wiley & Sons*. 2008.

Menezes CB, Bonugli-Santos RC, Miqueletto PB, Passarini MRZ, Silva CHD, Justo MR, Leal RR, Fantinatti-Garboggini F, Oliveira VM, Berlinck RGS, Sette LD. Microbial diversity

associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. *Microbiology Research*, 165: 466-482, 2010.

Merchuk, J. C. Why use air-lift bioreactors? *TIBTECH*. 8:66-71; 1990.

Mikolasch, A.; Niedermeyer, T. H. J.; Lalk M.; Witt, S.; Seefeldt, S.; Hammer, E.; Schauer, A. F.; Gesell, M.; Hessel, S.; Jülich, W-D.; Lindequist, U. Novel Penicillins Synthesized by Biotransformation Using Laccase from *Trametes spec.* *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 54:632-638; 2006.

Mikolasch, A.; Schauer, F. Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. *Applied Microbiology Biotechnology*. 82:605-624; 2009.

Minussi, R.; Pastore, G.; Durán, N. Potential applications of laccase in foods industry. Trends in *Food Science & Technology*. 13:205-216; 2002.

Mitchell, D. A.; Krieger, N.; Berovic, M. Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamental of Design and Operation. *Springer Science & Business Media*. 2006

Moccelini, S. K.; Frazoi, A. C.; Vieira, I. C.; Dupont, J.; Scheeren, C. W. A novel support for laccase immobilization: Cellulose acetate modified with ionic liquid and application in biosensor for methyl dopa detection. *Biosensors and Bioelectronics*. 26:3549-3554; 2011.

Moilanen, U.; Winkvist, E.; Mattila, T.; Hatakka, A.; Eerikainen, T. Production of manganese peroxidase and laccase in a solid-state bioreactor and modeling of enzyme production kinetics. *Biprocess and Biosystems Engineering* 38:57-68; 2015.

Monteriali, M.R.; Della Seta, L.; Vastarella, W.; Pilloton, R. A disposable Laccase-Tyrosinase based biosensor for amperometric detection of phenolic compounds in must and wine. *J. of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 64:189-194; 2010.

Morozova, O. V.; Shumakovich, G. P.; Shleev, S. V.; Yaropolov, Y. I. Laccase-Mediator Systems and Their Applications: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 43:523-535; 2007.

Mukherjee, S.; Basak, B.; Bhunia, B.; Dey, A.; Mondal, B. Potential use of polyphenol oxidases (PPO) in the bioremediation of phenolic contaminants containing industrial wastewater. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 12:61-73; 2013.

Nakamura, T. Purification and Physico-Chemical Properties of Laccase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 30:44-52; 1958.

Norsker, M.; Jensen, M.; Adler-Nissen, J. Enzymatic gelation of sugar beet pectin in food products. *Food Hydrocolloids*. 14:237-243; 2000.

Oliveira, T. M. B. F.; Fátima Barroso, M.; Morais, S.; Araújo, M.; Freire, C.; Lima-Neto, P.; Correia, A. N.; Oliveira, M. B. P. P.; Deleureu-Matos, C. Laccase-Prussian blue filme-

graphene doped carbon paste modified electrode for carbamate pesticides quantification. *Biosensors and Bioelectronics* 47:292-299; 2013.

Osma J. F.; Toca-Herrera, J.; Rodríguez-Couto, S. Biodegradation of a simulated textile effluent by immobilised-coated laccase in laboratory-scale reactors. *Applied Catalysis A: General*. 373:147-153; 2010b.

Osma J. F.; Toca-Herrera, J.; Rodríguez-Couto, S. Uses of Laccases in the Food Industry. *Enzyme Research*. 2010a.

Osterhege, C. Isolation, Structure Determination and Biological Activity Assessment of Secondary Metabolites from Marine-derived Fungi. Tese (Doutorado) - *Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, Alemanha*; 2001.

Papagianni, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology advances*. 22:189-259; 2004.

Papagianni, M.; Matthey, M.; Kristiansen, B. Citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* as functions of the mixing intensity in a stirred tank and tubular loop bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*. 2:197-205; 1998.

Passarini, M.R.Z.; Rodrigues, M.V.N.; da Silva, M.; Sette, L.D. Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*. 62:364-370; 2011.

Passarini, M.R.Z.; Santos, C.; Lima, N.; Berlinck, R.G.S.; Sette, L.D. Filamentous fungi from the Atlantic marine sponge *Drummacidon reticulatum*. *Archives of Microbiology*, 195: 99-111, 2013.

Peck, V.; Daley, R. Toward a “Greener” Pulp and Paper Industry. *Environmental Science Technology*. 28; 1994.

Piontek, K.; Antorini, M.; Choinowski, T. Crystal Structure of a Laccase from the Fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å Resolution Containing a Full Complement of Coppers. *The Journal of Biological Chemistry*. 40:37663-37669; 2002.

Pointing, S.B.; Hyde, K.D. Lignocellulose-degrading marine fungi. *Biofouling*. 15:221- 229; 2000.

Portaccio, M.; Martino, S. D.; Maiuri, P.; Durante, D.; Luca, P.; Lepore, M.; Bencivenga, U.; Rossi, S.; Maio, A.; Mita, D.G. Biosensors for phenolic compounds. The catechol as a substrate model. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 41:97-102; 2006.

Pourcel, L.; Routaboul, J.-M.; Kerhoas, L.; Caboche, M.; Lepiniec, L.; Debeaujon, I. TRANSPARENT TESTA10. Encodes a Laccase-Like Enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* Seed Coat. *The Plant Cell*. 17:2966-2980; 2005.

Pozdnyakova, N. N.; Rodakiewicz, J.; Turkovskaya, O. V.; Haber, J. Oxidative degradation of polyaromatic hydrocarbons catalyzed by blue laccase from *Pleurotus ostreatus* D1 in the presence of synthetic mediators. *Enzyme and Microbial Technology*. 39:1242-1249; 2006.

Prasannarai, K.; Sridhar, K. R. Diversity and abundance of higher marine fungi on woody substrates along the west coast of India. *Current Science*. 81:304-311; 2001.

Raghukumar, C. Bioremediation of coloured pollutants by terrestrial versus facultative marine fungi. In: Fungi in Marine Environment. (ed. K.D. Hyde) *Fungal Diversity Research Series*. 7: 317-344; 2002.

Ramírez-Cavazos, L. I.; Junghanns, C.; Nair, R.; Cárdenas-Chávez, D. L.; Hernández-Luna, C.; Agathos, S. N.; Parra, R. Enhanced production of thermostable laccases from a native strain of *Pycnoporus sanguineus* using central composite design. *Biomedicine & Biotechnology*. 15:343-352; 2014.

Ribeiro, D. S.; Henrique, S. M. B.; Oliveira, L.S.; Macedo, G. A.; Fleuri, L.F. Enzymes in juice processing: a review. *International journal of Food Science and Technology*. 45:635-641; 2010.

Riet, K. V. Review of Measuring Methods and Results in nonviscous gas-liquid Mass Transfer in Stirred Vessels. *Industrial and Engineering Chemistry Process Design and Development*. 18:357-364; 1979.

Riva, S. Laccase: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology*. 24:219-226; 2006.

Rodgers, C.J.; Blanford, C.F.; Giddens, S.R.; Skamnioti, P.; Armstrong, F.A.; Gurr, S.J. Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes. *Trends in Biotechnology*. 28:63-72; 2009.

Saat, M. N.; Annuar, M. S. M.; Alias, Z.; Chuan, L. T.; Chisti, Y. Modeling of growth and laccase production by *Pycnoporus sanguineus*. *Bioprocess Biosystem Engineering*. 37:765-775; 2014.

Saito, T.; Kato, K.; Yokogawa, Y.; Nishida, M.; Yamashita, N. Detoxification of Bisphenol A and Nonylphenol by Purified extracellular Laccase from a Fungus isolated from Soil. *Journal of Biocience and Bioengineering*. 98:64-66; 2004.

Schimidell W.; Lima, U. A. L.; Aquarone, E.; Borzani, W. Biotecnologia Industrial. *Edgard Blucher*. 2001.

Schroeder, M.; Pereira, L. Couto, S. R., Erlacher, A.; Schoening, K.-U.; Cavaco-Paulo, A.; Guebitz, G. M. Enzymatic synthesis of Tinuvin. *Enzyme and Microbial Technology*. 40:1748-1752; 2007.

Schroeder, M.; Pöllinger-Zierler, B.; Aichernig, N.; Siegmund, B.; Guebitz, G. M. Enzymatic Removal of Off-flavors from Apple Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56:2485-2489; 2008.

Selinheimo, E.; Kruus, K.; Buchert, J.; Hopia, A.; Autio, K. Effects of laccase, xylanase and their combination on the rheological properties of wheat doughs. *Journal of Cereal Science*. 43:152-159; 2006.

Sharma, K. K.; Kuhad, R. C. Laccase: enzyme revisited and function redefined. *Indian Journal of Microbiology*. 48:309-316; 2008.

Sharma, P.; Goel, R.; Capalash, N. Bacterial laccases. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23:823-832; 2007.

Silvério, S. C.; Moreira, S.; Milagres, A. M. F.; Macedo, E. A.; Teixeira, J. A.; Mussatto, S. I. Laccase production by free and immobilized mycelia of *Peniophora cinerea* and *Trametes versicolor*: a comparative study. *Bioprocess Biosystems Engineering*. 36:365-373; 2013.

Singh, G.; Bhalla, A.; Kaur, P.; Capalash, N. Sharma, P. Laccase from prokaryotes: a new source for and old enzyme. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 10:309-326; 2011.

Songulashvili, G.; Spindler, D.; Jimenéz-Tobón, G. A.; Jaspers, C.; Kerns, G.; Penninckx, C. Production of a high level of laccase by submerged fermentation at 120-L scale of *Cerrena unicolor* C-139 grown on wheat bran. *Comptes Rendus Biologies*. 338:121-125; 2015.

Srinivasan, C.; D'Souza, T. M.; Boominathan, K.; Reddy, C. A. Demonstration of Laccase in the White Rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. *Applied and Environmental Microbiology*. 61:4274-4277; 1995.

Suzuki, T.; Endo, K.; Ito, M.; Tsujibo, H.; Miyamoto, Inamori, Y. A thermostable Laccase from *Streptomyces lavendulae* REN-7: Purification, Characterization, Nucleotide Sequence, and Expression. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 10:2167-2175; 2003.

Thurston, C. F. The Structure and function of fungal laccases. *Microbiology*. 140:19-26; 1994.

Tinoco-Valencia, R.; Gómez-Cruz, C.; Galindo, E.; Serrano-Carréon, L. Toward na understanding of the effects of agitation and aeration of growth and laccases production by *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Biotechnology* 177:67-73; 2014.

Trincone, A. Potential biocatalysts originating from sea environments. *Journal of Molecular Catalysis B. Enzymatic*. 66:241-256; 2010.

Tuomela, M.; Vikman, M.; Hatakka, A.; Itavaara, M. Biodegradation of Lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology*. 72:169-183; 2000.

Turlapati, P. V.; Kim, K.W.; Davin, L.; Lewis, N. G. The laccase multigene family in *Arabidopsis thaliana*: towards addressing the mystery of their gene function(s). *Planta*. 233:439-470; 2011.

Verbist, J.; Sallenave, C.; Pouchus, Y. Marine Fungal Substances. *Studies in Natural Products Chemistry*. 24:979-1092; 2000.

Wang, K.; Liu, P.; Ye, Y.; Li, J.; Zhao, W.; Huang, X. Fabrication of a novel laccase biosensor based on silica nanoparticles modified with phytic acid for sensitive detection of dopamine. *Sensors and Actuators B*. 197:292-299; 2014.

Wang, T.-N.; Lu, L.; Li, G.-F.; Xu, T.-F.; Zhao, M. Decolorization of the azo dye reactive black 5 using laccase mediator system. *African journal of Biotechnology*. 10:17186-17191; 2011.

Wesenberg, D.; Kyriakides, I.; Agathos, S. N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances*. 22:161-187; 2003.

Widsten, P.; Kandelbauer, A. Laccase applications in the forest products industry: A review. *Enzyme and Microbial Technology*. 42:293-307; 2008.

Williamson, P. R. Biochemical and Molecular Characterization of the Diphenol Oxidase of *Cryptococcus neoformans*: Identification as a Laccase. *Journal of Bacteriology*. 176:656-664; 1994.

Witayakran, S.; Ragauskas, A. J. Synthetic App. Of Laccase in Green Chemistry. *Advanced Synthesis & Catalysis*. 351:1187-1209; 2009.

Wong, D. W. S. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 157:174–209; 2009.

Wong, K. K. Y.; Richardson, J. D.; Mansfield, S. Enzymatic Treatment of Mechanical Pulp Fibers for Improving Papermaking Properties. *Biotechnology Progress*. 16:1025-1029; 2000.

Yoshida, H. Chemistry of lacquer (Urushi). Part 1. *Journal of Chemical Society*. 43:472–486; 1883.

Yoshitake, A.; Katayama, Y.; Nakamura, M.; Iimura, Y.; Kawai, S.; Morohoshi, N. N-linked carbohydrate chains protect laccase III from proteolysis in *Coriolus versicolor*. *Journal of General Microbiology*. 138:179-185; 1993.

Yu, C.-P.; Deeb, R. A.; Chu, K.-H. Microbial degradation of steroidal estrogens. *Chemosphere*. 91:1225-1235; 2013.

Zaidel, D. N. A.; Chronakis, I. S.; Meyer, A. S. Enzyme catalyzed oxidative gelation of sugar beet pectin: Kinetics and rheology. *Food Hydrocolloids*. 28:130-140; 2012.

Zapp, E.; Brondani, D.; Vieira, I. C.; Scheeren, C. W.; Dupont, J.; Barbosa, A. M. J.; Ferreira, V. S. Biomonitoring of methomyl pesticide by laccase inhibition on sensor containing platinum nanoparticles in ionic liquid phase supported in montmorillonite. *Sensors and Actuators B*. 155:331-339; 2011.

Zeng, X.; Cai, Y.; Liao, X.; Zeng, X.; Li, W.; Zhang, D. Decolorization of synthetic dyes by crude laccase from a newly isolated *Trametes trogii* strain cultivated on solid agro-industrial residue. *Journal of Hazardous Materials*. 187:517-525; 2011.

Zhang, C.; Kim, S.-K. Research and Application of Marine Microbial Enzymes: Status and Prospects. *Marine Drugs*. 8:1920-1934; 2010.

Zhao, Q.; Nakashima, J.; Chen, F.; Yin, Y.; Fu, C.; Yun, J.; Shao, H.; Wang, X.; Wang, Z.-Y.; Dixon, R. LACCASE Is necessary and nonredundant with PEROXIDASE for Lignin Polymerization during Vascular Development in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 25:3976-3987; 2013.

Zheng, M.; Chi, Y.; Yi, H.; Shao, S. Decolorization of Alizarin Red and other synthetic dyes by a recombinant laccase from *Pichia pastoris*. *Biotechnology Letters* 36:39-45; 2014.

Zheng, X.; Ng, I.; Ye, C.; Chen, B.-Y.; Lu, Y. Copper ion-stimulated McoA-laccase production and enzyme characterization in *Proteus hauseri* ZMd44. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 115:388-393; 2013.

Zhong, J. J. Bioreactor Engineering. *Comprehensive Biotechnology*. 3:653-658; 2011.