

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

ANDRÉ JOSÉ FERNANDES

Aumento de escala na produção de lacase por *Trametes versicolor* utilizando biorreator de
baixo cisalhamento

Lorena
2023

ANDRÉ JOSÉ FERNANDES

Aumento de escala na produção de lacase por *Trametes versicolor* utilizando biorreator de baixo cisalhamento

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de concentração de Biotecnologia Industrial.

Orientadora: Profa. Dra. Adriane Maria Ferreira Milagres

Versão Corrigida

Lorena

2023

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Fernandes, André José

Aumento de escala na produção de lacase por
Trametes versicolor utilizando biorreator de baixo
cisalhamento / André José Fernandes; orientadora
Adriane Maria Ferreira Milagres - Versão Corrigida.
Lorena, 2023.
60 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de
Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo. 2023

1. Basidiomiceto. 2. Trametes versicolor. 3.
Lacase. 4. Biorreator de baixo cisalhamento. 5.
Xilidina. I. Título. II. Milagres, Adriane Maria
Ferreira, orient.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela autoria da vida e pelo dom do conhecimento e da sabedoria, me guiando sempre pelo melhor caminho.

Agradeço a Professora Dra. Adriane Maria Ferreira Milagres, pela confiança em mim, dedicação em seus conhecimentos transmitidos e pela paciência, mesmo em momentos de discussão com os quais aprender algo e me direcionar dentro da pesquisa. E as companheiras de laboratório Verônica Távilla e Patrícia Quintero pelos momentos de descontração no laboratório.

Ao Professor Dr. Arnaldo Márcio Ramalho Prata, pelo tempo dedicado a mim no laboratório, em conversar e nos ensinamentos com os equipamentos do laboratório.

Agradeço a toda minha família pelo apoio e confiança depositada em mim, principalmente ao meu pai Vitor Fernandes, minha mãe Simone Conceição Fernandes, minha namorada Mariana Cassiano Alves e meus irmãos, por me manterem de pé nos momentos difíceis, por me darem força quando fraquejei e pelo incentivo para continuar estudando e procurando cada vez mais por conhecimento.

Agradeço todos meus amigos, principalmente os quais tenho na cidade de Lorena/SP e dentro do Departamento de Biotecnologia, que foram uma família para mim durante todo o período do mestrado, seja em momentos de descontração ou dificuldade dentro e fora da Universidade, podendo sempre ter o apoio deles, contribuindo dessa forma para o meu amadurecimento e desenvolvimento pessoal e profissional. Também agradeço a Rep. Cevada por me acolher na cidade de Lorena e servir como uma segunda família para mim e contribuírem para o desenvolvimento social.

Ao órgão de fomento CAPES pelo apoio financeiro que me contribuiu para minha estadia na cidade de Lorena/SP.

RESUMO

FERNANDES, A.F. **Aumento de escala na produção de lacase por *Trametes versicolor* utilizando biorreator de baixo cisalhamento.** 2023. 60 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2023.

As lacases são enzimas oxidativas de interesse para diversos processos industriais de transformação que envolvam lignina ou outros compostos fenólicos. Alguns fatores limitam a aplicação de enzimas em processos industriais, tais como, suas características físico-químicas, custo de produção e a quantidade requerida de enzima. Tendo em vista que as condições de cultivo influenciam na produção enzimática, é fundamental o desenvolvimento do estudo de bioprocessos em diferentes escalas. Muitos estudos de produção de lacases utilizam o fungo *Trametes versicolor*, por secretar lacases com alto potencial redox (785 mV). Neste estudo, a produção de lacase por *T. versicolor* foi conduzida em frascos agitados de 125 mL e 1 L para definição de algumas variáveis do processo (volume de meio, indutores de lacase e agitação), obtendo-se uma atividade máxima de lacase em torno de 11.000 U/L, em meio contendo 9 g/L de glicose e adição de 3 mM de xilidina no terceiro dia de cultivo. Na segunda etapa deste estudo, foi avaliada a ampliação de escala dos cultivos de *T. versicolor* de frascos agitados para biorreator, utilizando o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{LA}) como parâmetro de ampliação de escala (k_{LA} entre 76 e 79 h^{-1}). Com condições de meio e indutor estabelecidas para a produção de lacase em frascos, *T. versicolor* foi cultivado em um biorreator agitado e aerado de baixo cisalhamento (BAABC) com volumes de 5 e 10 L de meio, aeração de 0,4 vvm e agitação de 180 rpm e 200 rpm, respectivamente. No cultivo realizado no biorreator com 5 L de meio de cultivo obteve-se 12.546 U/L de lacase, no nono dia de cultivo. Quando o volume de meio foi aumentado para 10 L no reator, empregando uma agitação de 200 rpm e aeração de 0,4 vvm, a atividade de lacase foi superior ao apresentado em frascos agitados e no reator com 5 L de meio (23.495 U/L). Os cultivos foram monitorados quanto ao pH e ao teor de açúcar residual. A maior atividade de lacase obtida no reator com 10 L de meio pode estar relacionada às mudanças na morfologia do micélio e à maior disponibilidade de oxigênio, considerando a maior pressão nas bolhas de ar em razão de menos espaço vazio no reator. Nesta condição de processo foi identificada uma lacase com massa molar de 55 kDa, por SDS-PAGE, cuja identidade foi confirmada por espectrometria de massas. A lacase apresentou pH ótimo de 5,0, temperatura ótima de 60 °C e manteve 70% de sua atividade a 50 °C por 2 horas. A produção de lacase no reator BAABC de 14 L, com volume útil de 10 L, mostrou-se como uma alternativa para aumentar a produtividade de lacase e assim minimizar os custos de processos que se beneficiem do uso desta enzima.

Palavras-chave: Basidiomiceto. *Trametes versicolor*. Lacase. Biorreator de baixo cisalhamento. Xilidina.

ABSTRACT

FERNANDES, A.F. **Scale-up of laccase production by *Trametes versicolor* using low shear bioreactor**. 2023. 60 p. Dissertation (Master of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2023.

Laccases are oxidative enzymes of interest for several industrial transformation processes involving lignin or other phenolic compounds. One of the factors that hinders the application of enzymes in processes is the required amount of enzyme. Considering that the cultivation conditions influence the enzymatic production, it is fundamental to develop the study of bioprocesses in different scales. Many studies of laccase production use the fungus *Trametes versicolor*, as it secretes laccases with a high redox potential (785 mV). In this study, the production of laccase by *T. versicolor* was carried out in 125 mL and 1 L shaken flasks to define some process variables (medium volume, laccase inducers and agitation), obtaining a maximum laccase activity around 11000 U/L, in cultivation medium with 9 g/L glucose and with addition of xyloidine on the third day of growth. In the second stage of this study, the scale-up of *T. versicolor* cultivation from flasks to reactor was evaluated, using as parameter the volumetric oxygen transfer coefficient (kLa). The medium and inducer established for the production of laccase by *T. versicolor* in flasks was employed for fungal growth in low-shear air agitated bioreactor (LSAAB) with volumes of 5 and 10 L of medium, aeration of 0.4 vvm and agitation at 180 rpm and 200 rpm, respectively. The cultivation carried out in the bioreactor with 5 L of medium produced 12,546 U/L of laccase activity, at the 9th day. When the volume of the medium was increased to 10 L in the reactor, employing 200 rpm and 0.4 vvm, the laccase activity was higher than that produced in flasks and also in the reactor with 5 L of medium (23,495 U/L). The cultures were monitored for pH and residual sugar content. The highest laccase activity obtained in the reactor with 10 L of medium may be related to changes in the morphology of mycelium and to the greater availability of oxygen, considering the higher pressure in the air bubbles due to less empty space in the reactor. In this condition, a laccase with a molar mass of 55 kDa was identified by SDS-PAGE, whose identity was confirmed by mass spectrometry. The laccase presented an optimum pH of 5.0, and optimum temperature of 60 °C, maintaining 70% of its activity at 50 °C for 2 hours. The production of laccase in a 14 L LSAAB with 10 L medium is an alternative to increase laccase productivity and thus minimize the costs of processes that benefit from the use of this enzyme.

Keywords: Basidiomycete. *Trametes versicolor*. Laccase. Low-shear bioreactor. Xyloidine.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	11
2.1 Materiais lignocelulósicos.....	11
2.2 Basidiomicetos.....	12
2.2.1 <i>Trametes versicolor</i>	13
2.3 Enzimas lignocelulolíticas.....	14
2.3.1 Lacase	15
2.4 Fatores que influenciam a produção de lacase	18
2.5 Produção de lacase em biorreatores.....	20
3 OBJETIVOS	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 Ativação celular e inóculo.....	23
4.2 Estudo da produção de lacase em frasco agitado.....	24
4.2.1 Avaliação do volume de meio e do tipo de indutor na produção de lacase ..	24
4.2.2 Aumento de escala da produção de lacase em frascos	24
4.3 Estudo da produção de lacase em biorreator aerado e agitado de baixo cisalhamento (BAABC)	25
4.4 Métodos analíticos	26
4.4.1 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}).....	26
4.4.2 Determinação da atividade de lacase.....	27
4.4.3 Determinação da concentração de açúcares redutores.....	28
4.4.4 Determinação da concentração de proteínas.....	28
4.4.5 Determinação do pH.....	28
4.5 Concentração do extrato de cultivo.....	29
4.6 Eletroforese	29

4.7 pH e temperatura ótimos	30
4.8 Termoestabilidade	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 Seleção do indutor de lacase	31
5.2 Efeito da concentração de xilidina.....	33
5.3 Efeito da agitação e da aeração na produção de lacase.....	35
5.4 Aumento de escala em frascos Erlenmeyer e influência da agitação	37
5.5 Determinação do k_{La} em frascos e no reator de baixo cisalhamento.	39
5.6 Produção de lacase em biorreator de baixo cisalhamento	40
5.7 Caracterização bioquímica da lacase	42
5.7.1 Temperatura e pH ótimos e termoestabilidade	44
6 CONCLUSÕES	47
REFERÊNCIAS.....	48

1 INTRODUÇÃO

Lacases são enzimas oxidativas com uma ampla diversidade e interesse industrial, pela sua capacidade de degradar uma grande variedade de compostos xenobióticos e como produto, gera água a partir do oxigênio. Reações de oxidação são usadas em processos industriais, por exemplo, na indústria têxtil, de alimentos, processamento da madeira, farmacêutica e química. A oxidação enzimática é uma reação potencial para substituir os métodos químicos, dado que as enzimas são catalisadores muito específicos e ecologicamente sustentáveis (Morozova et al., 2007).

A lacase foi identificada pela primeira vez por Yoshida (1883) na árvore de *Rhus vernicifera* conhecida como laca japonesa, sendo identificada mais tarde em fungos (Bertrand, 1896). Lacases foram também identificadas em diversas plantas, fungos, insetos e em algumas bactérias. As lacases de fungos são de grande interesse por apresentarem potencial redox superior a outras espécies e muitos estudos tem focado em basidiomicetos decompositores de madeira. Alguns basidiomicetos degradam principalmente a celulose e a hemicelulose (degradação parda ou marrom) e outros degradam simultaneamente todos os componentes da madeira (degradação branca), os quais são estudados pela alta expressão de enzimas oxidativas que degradam a lignina. Entre os fungos de degradação branca, a espécie *T. versicolor* é amplamente utilizada por produzir uma gama de enzimas oxidativas (Madhavi et al., 2009).

Diferentes isoformas de lacase são produzidas pelos fungos com funções de pigmentação, formação do corpo frutífero, esporulação, defesa contra patógenos e com amplo espectro de ação em diferentes compostos. Apesar da lacase não ter uma grande ação em compostos muito recalcitrantes como a lignina, a enzima consegue agir utilizando mediadores químicos, os quais a enzima oxida e os mediadores com um maior potencial redox agem sobre o substrato alvo, tendo então uma maior cobertura de ação (Gronqvist et al., 2003; Madhavi et al., 2009).

O cultivo de fungos filamentosos pode ser conduzido em meios sólidos ou líquidos. O cultivo em estado sólido (SSF) ocorre em condições similares ao seu desenvolvimento na natureza, no entanto há limitações no controle de condições físicas do processo. O cultivo submerso (SmF), que apesar de não apresentar condições fisiológicas próprias para o

desenvolvimento do fungo, possibilita o controle das condições em que ele irá se desenvolver e as concentrações dos nutrientes disponíveis para o seu crescimento.

Como todo processo em fase de desenvolvimento, a produção de lacase em larga escala requer estudos visando o estabelecimento de condições adequadas, que possibilitem maximizar sua eficiência, assim como a ampliação de escala. O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{LA}) é um dos principais parâmetros que quantificam a eficiência de transferência de oxigênio em um biorreator. Por essa razão o k_{LA} é um dos principais parâmetros de escalonamento, dimensionamento e operação de biorreatores aeróbios. Neste contexto, e tendo o interesse em produzir lacase de *T. versicolor* devido a suas características, decidiu-se pelo estudo das condições de cultivo a partir de glicose, avaliando o tipo e a concentração de indutor e a influência da agitação em frascos, visando a ampliação de escala para um biorreator aerado e agitado de baixo cisalhamento.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Materiais lignocelulósicos

Materiais lignocelulósicos são formados majoritariamente por celulose, hemicelulose e lignina, que juntos representam mais de 90% da sua massa seca. A celulose é o polissacarídeo mais abundante na Terra, sendo um homopolímero linear de alta massa molar, formado por monômeros de D-glicose unidos por ligações glicosídicas β -1,4. As cadeias de celulose interagem entre si por meio de ligações de hidrogênio inter e intramoleculares, formando microfibrilas. A associação de microfibrilas de celulose forma as fibrilas e essas se organizam em regiões cristalinas e regiões menos ordenadas (regiões amorfas) (Milagres et al., 2011; Fengel e Wegener, 1989).

Na parede celular dos materiais lignocelulósicos, as fibrilas de celulose são recobertas com hemiceluloses e lignina. A composição das hemiceluloses varia dependendo da planta e de sua distribuição na parede celular. Em dicotiledôneas, como por exemplo, café, feijão, eucalipto e mogno, as xiloglucanas predominam em paredes primárias e as glucuronoxilanas estão presentes na parede secundária. Em gramíneas, como a cana-de-açúcar, bambu, cevada, trigo e milho, as glucanas mistas aparecem na parede primária e as glucuronoarabinoxilanas se distribuem tanto nas paredes primárias como nas paredes secundárias. Em coníferas, as xiloglucanas aparecem na parede primária e as glucomanas e arabinoxilanas estão presentes predominantemente na parede secundária (Scheller e Ulvskov, 2010; Chen, 2014).

A lignina é uma macromolécula amorfa e hidrofóbica de alta massa molar e sua composição varia entre as plantas, compondo de 15 a 40% da massa seca. A lignina é formada pela polimerização desidrogenativa de unidades aromáticas (álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico), unidas por ligações covalentes, do tipo C-O-C e C-C, sendo mais comum a ligação do tipo β -O-4. A lignina também pode fazer ligações com os ácidos glucurônico e ferúlico presentes na hemicelulose. Essas interações aumentam a resistência da parede celular contra ataques de microrganismos (Fengel e Wegener, 1989; Chen, 2014).

Em materiais lignocelulósicos também é possível encontrar uma pequena fração (em torno de 5%) de compostos orgânicos e inorgânicos, referidos como extrativos e cinzas, respectivamente, em sua composição (Fengel e Wegener, 1989).

2.2. Basidiomicetos

O Reino *Fungi* representa um grupo composto tradicionalmente por cinco principais Filos: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Glomeromycota*, *Ascomycota* e *Basidiomycota*. Estes podem ser agrupados pela presença de quitina na parede celular, pela nutrição absorptiva, glicogênio como substância de reserva e pela estrutura somática haploide ou dicariótica na maior parte do seu ciclo de vida. Os *Basidiomycota* apresentam hifas regularmente septadas e estruturas de reprodução típicas, os basídios. Os *Basidiomycota* são cosmopolitas, ou seja, ocorrem em todas as regiões do planeta e exercem um importante papel na manutenção dos ecossistemas, sendo sapróbios ao fazer a decomposição da matéria orgânica morta (He et al., 2019; Margulis, 2009). Dentre os sapróbios, estão os basidiomicetos decompositores de madeira, únicos organismos capazes de decompor a lignina. Por causa desta atividade biológica, os basidiomicetos são categorizados em dois grupos, fungos de podridão parda (BR) e fungos de podridão branca (WR) (Floudas et al., 2012).

Os fungos de podridão parda, degradam rapidamente a celulose e não possuem um sistema eficiente de enzimas oxidativas para a despolimerização da lignina, deixando a madeira com coloração amarronzada e aspecto quebradiço (Goodell et al., 2020). Os fungos de degradação branca, como exemplo, *Pycnoporus coccineus*, *Peniophora cinerea*, *T. versicolor* e *Pycnoporus sanguineus*, conseguem despolimerizar a celulose, a hemicelulose e a lignina usando principalmente o seu sistema enzimático secretado, deixando a madeira esbranquiçada (Floudas et al., 2012). Dentro desse grupo de fungos, a maioria despolimeriza todos os componentes da madeira. No entanto, há alguns fungos que são seletivos e degradam preferencialmente a hemicelulose e a lignina, deixando a celulose cristalina intacta (Goodell et al., 2020).

Muitas das enzimas secretadas pelos fungos de decomposição branca podem ser úteis na degradação de poluentes da indústria de corantes (Asgher et al., 2009). Este grupo de fungos têm alta capacidade de degradar compostos xenobióticos por meio de suas enzimas extracelulares, sendo de grande interesse na biorremediação de ambientes contaminados, agindo com êxito na remoção de contaminantes como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, corantes azo, herbicidas e outros compostos tóxicos (Goodell et al., 2020). Por terem a capacidade de degradar lignocelulósicos, há bastante estudos de aplicações biotecnológicas desses fungos e suas enzimas, principalmente na área de biopolpação,

biorefinaria, para produção de biocombustível, energia, produtos químicos e biorremediação (Schneider et al., 2020; Okamoto et al., 2010; Sharma et al., 2014).

Os cultivos de basidiomicetos *in vitro* são geralmente conduzidos em meio líquido, devido à possibilidade de maior controle das variáveis que interferem no crescimento e na produção de metabólitos. Entretanto, esse modo de cultivo difere bastante do ambiente natural do fungo, ou seja, o crescimento em substratos lenhosos, que apresentam características bem diferentes em relação ao cultivo submerso (Machuca et al., 2001).

2.2.1. *Trametes versicolor*

Trametes versicolor é uma espécie de fungo de degradação branca, pertencente ao filo dos *Basidiomycetes*, classe *Agaricomycetes*, ordem *Polyporales*, família *Polyporaceae*, sendo facilmente reconhecido pelo seu corpo frutífero em madeira, com aparência de uma cauda de peru (Figura 1), sendo chamado popularmente por esse nome (Tisma et al., 2021). *T. versicolor* é comumente encontrado na natureza em troncos de folhosas e coníferas.



Figura 1. Corpo de frutificação do fungo *Trametes versicolor*.

O ciclo de vida do *T. versicolor* se inicia pela liberação dos esporos que encontra um ambiente favorável para sua germinação e formação do micélio primário, monocariótico, que por plasmogamia formam os micélios secundários dicarióticos. Os micélios se desenvolvem formando o basidioma e gerando novos esporos (Coelho et al., 2017).

Entre os principais fungos de decomposição branca estudados, *T. versicolor* se destaca na produção de enzimas oxidativas, como a lacase, a manganês peroxidase e a lignina peroxidase, que são responsáveis pela diversidade de aplicações que o fungo é utilizado (Iqbal et al., 2011; Tisma et al., 2021; Brazkova et al., 2021).

Corpos frutíferos de *T. versicolor* podem ser consumidos assim como uma diversidade de outros cogumelos, apresentando um valor nutricional e com propriedades medicinais. Além de compostos de alta massa molar, os fungos acabam produzindo compostos de baixa massa molar pelo seu metabolismo secundário com potencial farmacológico, como flavonoides e ácidos hidroxicinâmicos que possuem atividades antioxidantes. Porém, os compostos que apresentam uma maior aplicabilidade são os chamados polissacaropeptídeos (PSPs) que são isolados dos fungos, e são aprovados para comercialização na China e no Japão para o tratamento de diversos tipos de câncer (Habtemariam, 2020).

2.3. Enzimas lignocelulolíticas

As enzimas que degradam celulose são classificadas como glicosil hidrolases e oxidases. Dentre essas enzimas, as endoglucanases (EC 3.2.1.4) clivam as ligações β -1,4-glicosídicas internas da celulose em regiões amorfas, as celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) atuam nas extremidades da cadeia de celulose liberando celobiose e as β -glicosidases (EC 3.2.1.21) hidrolisam celobiose em glicose. Enzimas oxidativas desempenham importante papel na degradação da celulose cristalina. A celobiose desidrogenase (E.C.1.1.99.18) é uma enzima que auxilia na despolimerização da celulose e gera peróxido de hidrogênio para ser utilizado por outras enzimas, com atividades auxiliares. As LPMOs (lytic polysaccharide monooxygenases) são enzimas oxidativas que agem nas regiões cristalinas da celulose e liberam como produtos oligômeros oxidados no C1 (E.C. 1.99.14.54) e/ou C4 (E.C. 1.99.14.56). Todas essas enzimas agem sinergicamente, a fim de clivar as ligações glicosídicas presentes na celulose, para se obter glicose (Ostby et al., 2020; Li et al., 2019).

As enzimas que degradam hemicelulose existem em maior número, dada a diversidade de estruturas de hemiceluloses nas plantas. Por exemplo, as endo- β -1,4-xilanases (EC 3.2.1.8) clivam a cadeia de xilana em oligossacarídeos mais curtos e as endo- β -1,4-mananases (EC 3.2.1.78) clivam a cadeia de glucomanana. β -xilosidases (EC 3.2.1.37) hidrolisam os oligossacarídeos em monômeros de xilose, enquanto a β -manosidase (EC 3.2.1.25) hidrolisa os oligossacarídeos a manose. As enzimas α -glucuronidase (EC 3.2.1.131); α -l-arabinofuronosidase (EC 3.2.1.55), acetil xilana esterase (EC 3.2.1.72), feruloil esterase (EC 3.1.1.73) e

α -galactosidase (EC 3.2.1.22) removem respectivamente os ácidos glucurônicos, arabinoses, grupos de acetil, ferulatos e galactose substituintes da cadeia principal da hemicelulose (Li et al., 2019; Ostby et al., 2020).

A biodegradação da lignina ocorre por processos oxidativos, e as enzimas são responsáveis por gerar radicais livres que agem nas ligações carbono-carbono e ligações éter da lignina. Dentre essas enzimas as principais envolvidas no processo são as lacases (EC 1.10.3.2), lignina peroxidases (EC 1.11.1.14) e manganês peroxidases (EC 1.11.1.13) (Li et al., 2019).

2.3.1. Lacase

Lacases são enzimas oxidativas também conhecidas como benzenodiol: oxigênio oxirredutase (EC 1.10.3.2). Essas enzimas agem oxidando vários compostos fenólicos como orto e para-difenóis, amino fenóis, polifenóis, poliaminas, lignina, além de alguns íons inorgânicos e aril-diaminas, transferindo os elétrons para o oxigênio que é reduzido a água (Baldrian et al., 2006; Yaropolov et al., 1994).

Lacases estão envolvidas principalmente na polimerização e biossíntese de lignina em plantas. Em fungos, a lacase está envolvida na despolimerização da lignina e remoção de fenóis tóxicos, pigmentação, formação do corpo frutífero, esporulação e defesa do fungo contra microrganismos patogênicos (Gronqvist et al., 2003; Madhavi et al., 2009).

Fungos produzem lacases intra e extracelularmente, no entanto a maioria dos trabalhos abordam as lacases extracelulares. Em diversos fungos já foram identificadas diferentes isoformas de lacase com sua posterior purificação e caracterização (Madhavi et al., 2009). A massa molar de lacases fúngicas variam entre 50 e 130 kDa, com atividade máxima em geral em valores de pH abaixo de 6. O pH ótimo de uma mesma lacase pode mudar com o tipo de substrato, sendo encontrado um pH 3 para o ABTS, pH 4 para o 2,6-dimetoxifenol, pH 4,5 para o guaiacol e pH 6 para a siringaldazina (Baldrian et al., 2006).

Estruturalmente lacases são glicoproteínas, possuem de 10 a 25% de carboidratos, podendo conter monossacarídeos como glicose, galactose, arabinose, fucose, hexoaminas e principalmente manose. Essas glicosilações representam de 10 a 50% da massa molar da enzima, sendo responsável pela atividade enzimática, estabilidade conformacional da estrutura globular, retenção das moléculas de cobre e ainda colabora para que a enzima tenha uma maior estabilidade térmica (Madhavi et al., 2009).

O sítio ativo das lacases apresentam 4 íons de cobre, separados em 3 tipos, tipo 1 (T1), tipo 2 (T2) e tipo 3 (T3) com dois íons, os quais são devidamente importantes para a atividade da enzima. O cobre T1 é o acceptor de elétrons durante a oxidação, cercado por ligações com duas histidinas e uma cisteína, formam uma coordenação trigonal, ainda faz uma ligação com um outro aminoácido que pode variar, podendo ser fenilalanina, metionina, glicina ou leucina, o qual confere à enzima uma maior ou menor capacidade oxidativa. O cobre do tipo 1 também é responsável por conferir a coloração azul à enzima, pois absorve ondas de luz no comprimento de 600 nm. Dois átomos de cobre estão situados no sítio tipo 3 e um outro no tipo 2, o qual capta o oxigênio. Esses átomos formam um centro trinuclear, todos ligados por histidinas, e estão relacionados à redução do oxigênio a água (Figura 2) (Morozova et al., 2007).

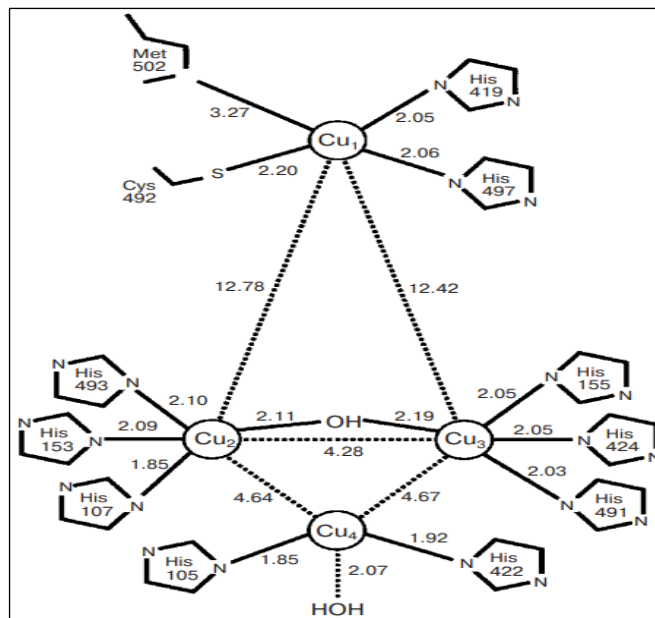


Figura 2. Esquema da distribuição dos átomos de cobre na lacase com suas distâncias atômicas (Å) representadas e seus aminoácidos ligantes. Cu₁ – cobre tipo 1, Cu₄ – cobre tipo 2 e Cu₂/Cu₃ – cobre tipo 3

Lacases fúngicas apresentam um potencial redox que varia de 450 a 800 mV para suas diferentes isoformas, sendo o potencial redox da lacase de *T. versicolor* um dos mais altos (785 mV) (Ivnitski e Atanassov, 2007). Quando comparado com outras enzimas oxidativas esse potencial redox é inferior, o que impede que a enzima possa agir diretamente sobre compostos aromáticos não fenólicos. A lacase consegue agir nesses compostos utilizando mediadores. A enzima oxida o mediador e o mediador com um maior potencial redox oxida uma gama maior de substratos (Figura 3) (Madhavi et al., 2009).

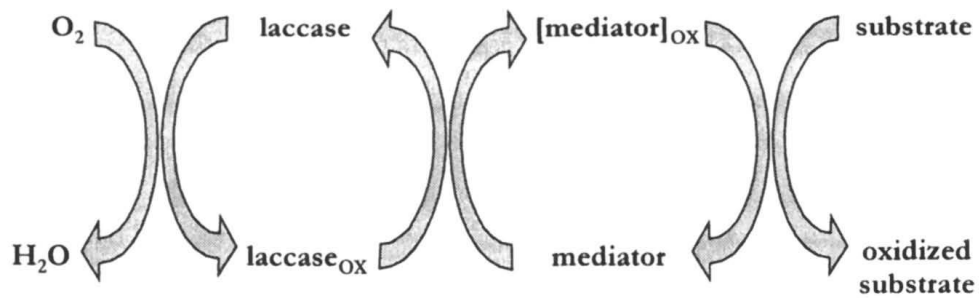


Figura 3. Esquema de ação da lacase em substratos por meio de mediador

Compostos sintéticos têm sido descritos como mediadores eficientes de lacase, como o 1-hidroxibenzotriazol (HBT), N-hidroxiftalimida (HPI), 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-iloxi (TEMPO) e 2,2'-azino-bis(3-ácido-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) (ABTS) (Munk et al., 2018). Como esses mediadores apresentam custo elevado e certa toxicidade, há estudos para o desenvolvimento de novos mediadores naturais. Esses mediadores normalmente são compostos aromáticos derivados da degradação da lignina, como por exemplo, ácido p-cumárico, vanilina, acetovanilina, siringaldeído e acetosiringona (Camarero et al., 2005). Há também mediadores naturais que são produzidos pelo próprio fungo, com função de auxiliar na despolimerização da lignina, como por exemplo, o ácido-3-hidroxi-antranílico, que aumenta o potencial de oxidação das lacases (Burton et al., 2003).

As lacases podem ser aplicadas em vários campos como: despolimerização de lignocelulósicos (Deng et al., 2019), polimerização de polissacarídeos e compostos aromáticos (Oinonen et al., 2015; Sun et al., 2013), branqueamento de polpa celulósica (Camarero et al., 2004), biorremediação de efluentes com corantes tóxicos (Abadulla et al., 2000) e contaminados por xenobióticos (Auriol et al., 2008) e, para produção de biossensores que detectam tais compostos xenobióticos (Rodríguez-Delgado et al., 2015; Sezginurk et al., 2010). Ainda na área alimentar as lacases podem ser aplicadas para produção de emulsões (Jung et al., 2012), estabilização e clarificação de bebidas (De Souza Bezerra et al., 2015). Na indústria farmacêutica, para modificação e síntese de compostos farmacêuticos (Wellington et al., 2012; Mogharabi et al., 2014) e na área medica para aplicação em materiais ortopédicos a fim de diminuir a infecção causada por bactérias (Diaz Blanco et al., 2014).

2.4. Fatores que influenciam a produção de lacase

Lacases são na maioria dos casos enzimas extracelulares produzidas por cultivo de fungos, sendo influenciado pelas fontes de carbono e de nitrogênio, disponibilidade de microelementos e também pelo pH, temperatura, agitação e aeração (Patel et al., 2019).

A produção da lacase por muitos fungos é expressa em maior quantidade quando a fonte de carbono foi consumida e o aumento da produção parece ser resultado do metabolismo secundário do fungo, que não é dependente do seu crescimento, mas sim de algum estímulo externo (Patel et al., 2019; Collins e Dobson, 1997). Em cultivos de *T. versicolor* feitos para avaliar a influência da concentração inicial de glicose na produção de lacase foi observado que a limitação de carbono estimulou a produção. Concentração de glicose acima 3 g/L inibiu a produção de lacase em mais de 50%, provavelmente porque o fungo tenha utilizado apenas seu metabolismo primário no cultivo (Tavares et al., 2005).

Tavares et al. (2006) cultivaram *T. versicolor* variando a concentração de glicose entre 0 e 9 g/L e adicionando o indutor xilidina ao meio. Foi observado que em 9 g/L de glicose houve maior produção de lacase (7.217 U/L). Nessa condição houve o melhor desenvolvimento do fungo, que fez com que ele suportasse melhor o efeito tóxico do indutor.

Quando utilizada uma fonte de carbono polimérica de origem natural, como derivados de lignocelulósicos, pode se ter um aumento da produção de lacase, agindo como um próprio indutor no meio (Kahraman et al., 2002). Segundo o trabalho realizado por Moldes et al. (2004), o tipo de substrato lignocelulósico utilizado no cultivo foi suficiente para que *T. versicolor* conseguisse expressar diferentes proporções de suas isoenzimas e aumentar a atividade de lacase. Quando cultivado em farelo de cevada, *T. versicolor* produziu 3200 U/L de lacase, uma atividade 53 vezes maior que em cultivos controle.

A produção de lacase, em geral, é induzida na presença de compostos aromáticos como a 2,5-xilidina, álcool veratrílico, ácido ferúlico, guaiacol, 2,6-dimethoxyphenol, ácido p-cumárico, lignosulfonato e o cobre. O cobre é um bom indutor de lacase, sozinho ou em combinação com outros indutores, também co-culturas são relatadas como formas de indução. Todos esses indutores estimulam a produção de várias isoformas de lacase, produto da transcrição de diferentes genes (Hailei et al., 2009; Palmieri et al., 2000).

No estudo feito por Terrón et al. (2004) foi avaliada a influência de diferentes indutores na produção de lacases por *Trametes sp.* Os autores concluíram que o tipo de indutor utilizado apresentou um efeito significativo no número e quantidade de isoenzimas

produzidas. Os indutores guaiacol e ácido p-cumárico induziram a expressão de dois genes (*lcc1* e *lcc2*), que codificam isoenzimas da lacase, alcançando uma atividade máxima de 512 U/L e 1.773 U/L para cada indutor, respectivamente. Na presença de ácido ferúlico, houve a expressão apenas de um gene (*lcc3*) que codifica a lacase, alcançando uma atividade máxima de 408 U/L.

Lacases de *T. versicolor* foram induzidas por íons metálicos (Cd^{2+} , Ag^+ , Mn^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+}). Foi observado que a indução de duas isoenzimas de lacase variavam de acordo com o indutor testado. Em cultivos na presença de cobre, a atividade máxima foi de 8.277 U/L, com proporção entre as duas isoenzimas de 0,20. Em cultivos induzidos por cádmio a atividade máxima foi 788 U/L, com proporção entre as duas isoenzimas de 0,43 (Lorenzo et al., 2006).

A indução de lacase por compostos aromáticos tóxicos e sulfato de cobre é aumentada até uma determinada concentração, que pode variar de espécie para espécie, pois em altas concentrações ocorre a formação de radicais de oxigênio, que causam um estresse oxidativo no fungo, inibindo a produção de lacase (Santana et al., 2018). Como mostrado por Revankar et al. (2006), no cultivo de *T. versicolor* variando a concentração de xilidina de 0 a 1 mM houve um aumento de atividade de 304 U/mL para 820 U/mL. No entanto, acima de 1 mM de xilidina houve redução da atividade de lacase, ficando menor que no cultivo sem adição de indutor, isso porque a xilidina é tóxica em altas concentrações, o que causa a redução do crescimento celular e produção enzimática.

O pH do meio de cultivo apresenta uma grande influência no crescimento de fungos e na produção enzimática, sendo que para cultivos de basidiomicetos a faixa ótima de pH é de 4,5 a 6 (Prasad et al., 2005). Basidiomicetos apresentam temperatura ótima para produção de enzimas ligninolíticas entre 25 e 30 °C (Lang et al., 2000).

Como os basidiomicetos são fungos aeróbios, o oxigênio é um nutriente muito importante, sendo utilizado para o crescimento e produção de metabólitos e sua baixa concentração pode afetar a performance do processo (Saat et al., 2014). À medida que a viscosidade do meio aumenta, devido ao crescimento celular, a transferência de oxigênio se torna um fator limitante para o crescimento do fungo, formação de pellets e para a produção de metabólitos (Mainardi et al., 2018). A agitação, juntamente com a aeração, atua aumentando a taxa de transferência de oxigênio no meio, que é representada pelo coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}). A taxa de transferência de oxigênio é dependente do k_{La} e da concentração de saturação de oxigênio no meio (Márquez et al.,

1994). Além da agitação e aeração, propriedades do meio de cultivo, como a viscosidade aparente, também afetam a transferência de oxigênio. No caso da viscosidade, seu aumento está relacionado a uma maior resistência à transferência de oxigênio, verificando-se queda do k_{LA} em cultivos de maior viscosidade (Couto et al., 2007).

2.5. Produção de lacase em biorreatores

O cultivo submerso de fungos filamentosos em biorreatores apresenta alguns desafios frente ao cultivo de outros microrganismos, pois apesar de depender do controle das mesmas condições, o fungo acaba por mudar sua fisiologia e a viscosidade do meio durante seu crescimento, gerando fatores indesejados em uma fermentação. Em cultivos submersos é necessário que se tenha uma agitação para que possa haver uma boa transferência de massa e calor dentro do sistema, no entanto, a agitação causa forças de cisalhamento do meio o que acaba causando danos as hifas, alterando assim a taxa de geração de produtos, aumento da viscosidade devido a fatores como mudanças morfológicas, crescimento celular e geração de produtos extracelulares. Ainda durante o seu crescimento a mudança da reologia do meio o que acaba dificultando a taxa de transferência de oxigênio, também o crescimento desordenado em partes fixas dentro do biorreator (Tang et al., 2007). Altas densidades celulares podem diminuir o coeficiente de transferência de oxigênio, o que pode ocasionar a falta de oxigênio no meio quando o k_{LA} inicial é muito baixo, além de que as células podem gerar superfícies de bloqueio do ar, impedindo a transferência de oxigênio no meio (Ju e Sundararajan, 1994). Por outro lado, há estudos que identificaram a diminuição do volume das bolhas de ar durante o cultivo e desse modo, o aumento da área interfacial gás-líquido específica e do k_{LA} . A produção de proteínas também pode diminuir a tensão superficial interfacial das bolhas de ar por sua ação surfactante, causando o aumento das bolhas levando a um aumento nos valores de k_{LA} (Ho et al., 1995).

Os principais biorreatores utilizados para cultivo em fase líquida são: biorreator tipo tanque agitado (STR), “airlift” e coluna de bolhas. A principal diferença entre os reatores é a forma de agitação do meio. Enquanto o STR é agitado mecanicamente por pás, os outros dois são agitados pelo próprio fluxo de ar. O mecanismo de agitação e aeração pode influenciar na morfologia do fungo e na produção de metabólitos (Couto et al., 2007).

Um tipo de reator de baixo cisalhamento foi desenvolvido por Domingos et al. (2017), para ser utilizado no crescimento do basidiomiceto *Ceriporiopsis subvermispora*. O

reator de baixo cisalhamento é basicamente um vaso cilíndrico com a razão entre sua altura e diâmetro (L/D) de 1,5. Possui um tubo em L, com movimento giratório e por onde o ar é injetado. O movimento do tubo em L promove certo nível de agitação da massa micelial crescida no biorreator (Figura 4).

Uma taxa de transferência de oxigênio adequada é um dos fatores mais importantes a se determinar no cultivo de microrganismos em biorreator (Márquez et al., 1994). A agitação e a aeração aumentam a difusão de oxigênio e dos nutrientes, entretanto aerações excessivas podem resultar em formação de espuma na superfície do meio, podendo levar à desativação enzimática (Birhanli e Yesilada, 2010).

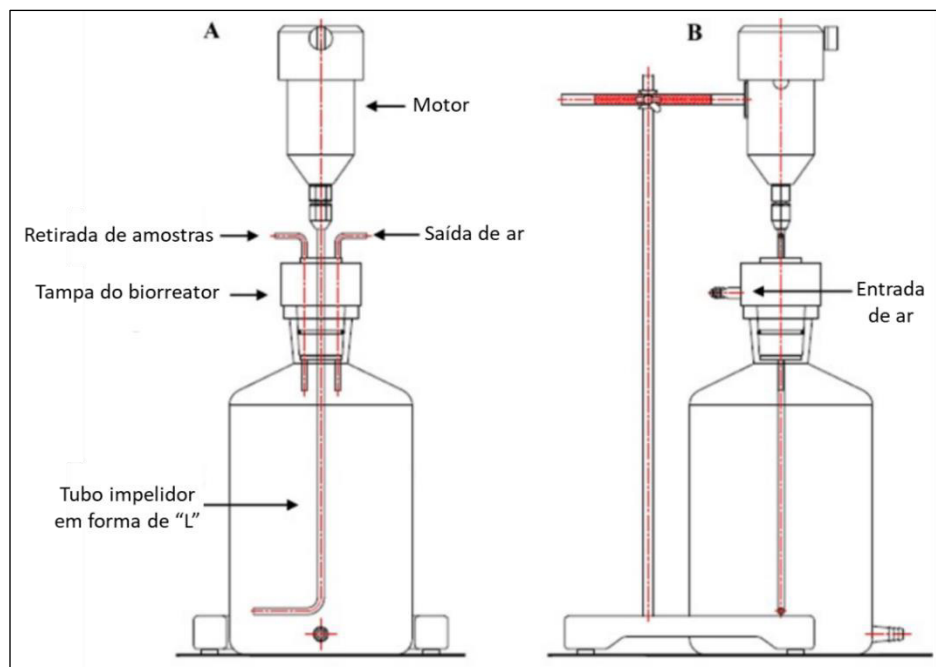


Figura 4. Diagrama traduzido do biorreator aerado e agitado de baixo cisalhamento. Vista frontal do biorreator (A), vista lateral do biorreator (B).

Pinheiro et al. (2020) realizaram o cultivo de *T. versicolor* para produção de lacase, utilizando vinhaça de cana de açúcar e resíduos do descaroçamento de algodão. O cultivo foi conduzido em frascos Erlenmeyer, reator de tanque agitado e cultivo em estado sólido em bandeja. O cultivo no biorreator de tanque agitado com aeração de 1 vvm proporcionou a maior atividade de lacase (5.005 U/L), comparado com os frascos Erlenmeyer (816 U/L) e em bandeja (235 U/L). Isso pode ser justificado pela melhor eficiência do sistema de aeração do biorreator que proporciona uma maior concentração de oxigênio dissolvido no meio, colaborando para o desenvolvimento de fungos aeróbios, como o *T. versicolor*.

Tavares et al. (2006) utilizaram um biorreator de agitação mecânica para cultivar *T. versicolor* e produzir lacase, induzida por xilidina. Os autores avaliaram o efeito da velocidade de agitação, pH inicial e concentração inicial de glicose, em um meio saturado de oxigênio. Com isso obtiveram uma atividade de lacase máxima de 7.217 U/L, empregando uma agitação de 180 rpm e 9 g/L de glicose, com um pH inicial de 5.

A produção de lacase por *Panus tigrinus* foi comparada em biorreator de tanque agitado, biorreator “air-lift” e em reator de tambor rotativo, com um meio constituído de águas residuárias da moagem da azeitona (Fenice et al., 2003). A máxima atividade de lacase no reator de tanque agitado, sob agitação de 250 rpm e aeração de 1 vvm foi de 4.600 U/L. Para o cultivo em tambor rotativo foram utilizados talos de milho como suporte para o crescimento fúngico, com uma taxa de rotação de 4 revoluções por dia, alcançando uma atividade máxima de 1.267 U/L. A produção de lacase em biorreator air-lift também alcançou uma alta atividade de lacase (4.300 U/L) com uma aeração de 1 vvm, mostrando que a oxigenação do meio é um fator de grande influência na produção de lacase.

Ensaio de produção de lacase de *T. versicolor* em reator “air-lift” com aeração de 0,5 vvm produziu 1.500 U/L de lacase, induzida por xilidina (Rancano et al., 2003). O cultivo de *Trametes pubescens* em um reator “air-lift” com aeração de 1 vvm, acrescentando ao cultivo um efluente de compostos fenólicos com o intuito de degradar esses compostos contaminantes, obteve-se 11.800 U/L de lacase, pelo efeito indutor dos compostos fenólicos (Ryan et al., 2005). Um estudo em larga escala para produção de lacase foi realizado com *Pycnoporus* sp. em um reator “air-lift” de 65 L com aeração de 0,66 vvm. Com essa metodologia os autores conseguiram atingir uma atividade de lacase de 72.000 U/L, sendo que a enzima apresenta entre 40 a 80% da sua atividade máxima em temperaturas de 0 a 100 °C (Liu et al., 2013).

Outra forma de cultivo submerso é por meio da imobilização de células, o que facilita o desenvolvimento principalmente de fungos filamentosos que tendem a se aderir às superfícies. Wang et al. (2013) cultivaram *T. versicolor* imobilizado em alginato em um reator de coluna de bolhas a fim de produzir lacase induzida fisicamente por sonicação. Com uma aeração de 0,1 vvm e dois tratamentos de sonicação em intervalo de 12 horas, o fungo alcançou uma atividade de lacase de 1.218 U/L, em 3 dias de cultivo.

Através destes estudos, percebe-se a importância do estudo das condições de cultivo e do kLa como variável para o controle da transferência de oxigênio em um cultivo e, por conseguinte para a condução da produção de lacase por fungo em biorreator.

3 OBJETIVOS

Com o objetivo principal de estudar a ampliação de escala da produção de lacase por *T. versicolor*, avaliando a influência da adição de indutor e do k_{LA} inicial, adotou-se como objetivos específicos:

- Estudar o efeito de diferentes indutores e da aeração na produção de lacase em frascos agitados.
- Estudar o efeito de diferentes velocidades de agitação na produção de lacase.
- Avaliar o efeito da ampliação de escala sobre a produção de lacase, em cultivos em biorreator de baixo cisalhamento.
- Avaliar o perfil das lacases obtidas nos cultivos realizados no biorreator, assim como as suas características físico-químicas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Ativação celular e inóculo

A cepa de *T. versicolor* é originária das coleções de cultura Argentinas (Laboratório de Biotecnología Molecular, Facultad de Ciencia Exactas Químicas y Naturales - Profa Laura Villalba). A cepa foi mantida em tubos de ensaio contendo meio sólido preparado com 2% (m/v) de extrato de malte, 0,25% (m/v) de extrato de levedura e 3% (m/v) de ágar e conservado em geladeira e reativada no mesmo meio a cada 2 meses até sua utilização.

O inóculo foi preparado por meio de transferência de uma alçada de células, recém repicadas, para Erlenmeyer de 250 mL contendo 20 mL de um meio definido para *Trametes* (MDT) contendo: glicose 50 mM, glutamina 5 mM, NaCl 5 mM, KH_2PO_4 5 mM, MgSO_4 1 mM, CaCl_2 0,1 mM, ácido succínico 10 mM e 1 mL de uma solução concentrada de sais. Os sais foram preparados em uma solução concentrada 5 vezes contendo $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20 μM , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2 μM , ZnSO_4 5 μM , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 20 μM , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 6 μM e $(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,5 μM (Roy e Archibald, 1993). O pH do meio foi ajustado para 5,0 com NaOH. Os meios foram autoclavados a 121 °C por 15 min.

Após inoculação dos meios, os frascos foram incubados por 8 dias, a 28 °C em condições estáticas. Após esse tempo, o líquido remanescente foi descartado e o micélio foi ressuspendido em 150 mL de água esterilizada. O micélio foi triturado em um liquidificador

industrial de aço inox estéril, por 5 ciclos de 15 s com intervalo de 30 s entre os ciclos. Desta suspensão, 5 mL foram utilizados, para determinação da massa seca de micélio, em balança de umidade (Ohaus, modelo MB25). A partir dos dados foi calculado o volume de suspensão necessário para inocular o meio a fim de se obter uma concentração inicial de micélio de 70 mg/L.

4.2. Estudo da produção de lacase em frasco agitado

4.2.1. Avaliação do volume de meio e do tipo de indutor na produção de lacase

Para os cultivos foram utilizados frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo o meio MDT, suplementado com 75 μ M de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e 0,05% de tween 80, em relação ao meio do crescimento do inóculo. O efeito da adição de indutores ao meio MDT sobre a produção de lacase de *T. versicolor* foi avaliado em três volumes de meio diferentes 25, 50 e 75 mL, sendo a correlação entre volume de frasco/volume de meio (V_f/V_m) igual a 5, 2,5 1,67, respectivamente.

Foram avaliados como indutores 2,5-xilidina (3 mM), lignosulfonato (Sigma-Aldrich 471011, 54 kDa) (450 mg/L) e a mistura destes compostos nestas mesmas concentrações. Também foram feitos ensaios com diferentes concentrações de 2,5-xilidina (1, 3, 9 mM). Os frascos foram inoculados com 70 mg/L de *T. versicolor* e incubados em “shaker” (Spencer Scientific, modelo refrigerador de piso H300) com agitação de 180 rpm, 28 °C por um período de 10 dias. Os indutores foram adicionados ao meio no terceiro dia de cultivo, após um curto desenvolvimento, para que o fungo pudesse suportar os efeitos tóxicos que esses indutores apresentam. A partir do segundo dia, em intervalos de 24 h, foram retiradas amostras de 1 mL dos frascos, para determinar a atividade de lacase, a concentração de açúcares redutores e o pH. Os ensaios foram feitos em triplicatas. Em todos os ensaios fez-se um controle, sem adição de indutor.

4.2.2. Aumento de escala da produção de lacase em frascos

Nesta etapa foram utilizados frascos Erlenmeyer de 1 L com tampas adaptadas para a retirada de amostras. Os ensaios foram realizados com 600 mL de meio MDT, com adição

de 3 mM de xilidina como indutor ao terceiro dia de cultivo. A temperatura foi mantida a 28 °C por 8 dias.

Foram avaliadas as agitações de 100, 130, 160, 190 e 220 rpm em um “shaker” (New Brunswick Scientific, modelo innova 4000). Amostras foram retiradas a cada 24 h durante 8 dias, para o acompanhamento da produção.

4.3. Estudo da produção de lacase em biorreator aerado e agitado de baixo cisalhamento (BAABC)

Os ensaios foram realizados em um reator de bancada com agitação e borbulhamento de ar, confeccionado em frasco Mariotte de 14 L, com impelidor em “L” por onde é inserido o ar (Figura 5) (Domingos et al., 2017). O biorreator foi fechado e autoclavado vazio a 121 °C durante 20 min.



Figura 5. Biorreator de bancada de baixo cisalhamento de 14 L. Controlador de temperatura e camisa de aquecimento (1 e 5), filtro de ar (2), rotâmetro para controlar a vazão de ar (3), motor do impelidor (4), saída de ar (6) e bomba peristáltica para reposição de água de evaporação (7).

Os cultivos foram realizados empregando-se volume de meio de 5 L e 10 L. A composição do meio de cultura e as condições do pH e concentração de inóculo foram estabelecidos na etapa da produção de lacase em frascos. A temperatura foi mantida a 28 °C por resistência e não houve controle do pH.

No cultivo em 5 L de volume de meio a agitação foi de 180 rpm e aeração de 0,4 vvm durante todo o cultivo. Amostras foram retiradas a cada 24 h para o acompanhamento do processo. O ensaio realizado no reator com 10 L de meio foi feito com a agitação de 200 rpm e a aeração foi mantida em 0,4 vvm durante todo o cultivo.

Com uma bomba peristáltica foi adicionado diariamente 120 mL de água por gotejamento, para compensar a evaporação. O nível de espuma dentro do reator foi controlado por adição manual de antiespumante (L-30, Sigma-Aldrich) sempre que necessário e, em pequenas quantidades (de 1 ou 2 gotas). Amostras foram retiradas a cada 24 h para o acompanhamento da produção de lacase, do consumo de açúcar e do pH.

Ao final do cultivo, o meio foi retirado do reator e centrifugado a 4.600 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi filtrado a vácuo através de papel de filtro e congelado para posterior concentração.

4.4. Métodos analíticos

4.4.1. Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{LA})

O k_{LA} foi analisado no frasco Erlenmeyer de 1 litro e no biorreator de baixo cisalhamento, sob condições abióticas. O k_{LA} foi determinado utilizando o método químico de oxidação de sulfito de sódio a sulfato de sódio na presença de oxigênio, sendo a reação catalisada por sulfato de cobalto (Deepa, 2022; Schultz e Gaden, 1956). A concentração de sulfito de sódio na reação deve estar na faixa de 0,02 a 0,4 M para que a reação independa da concentração no meio, sendo necessário também que o meio esteja neutro ou levemente alcalino (Deepa, 2022; Schultz e Gaden, 1956).

Os ensaios da determinação do k_{LA} foram feitos nos frascos Erlenmeyer de 1 L com 600 mL de meio e no reator com os volumes de 5 e 10 L (utilizando os volumes que se usou nos cultivos). O sulfito de sódio foi preparado na concentração de 0,4 M, com o pH ajustado para 7,6, e a esta solução adicionou-se 1 mL de solução de sulfato de cobalto 0,6 M como catalisador da reação entre o oxigênio e o sulfito de sódio.

As reações foram mantidas a 28 °C, com diferentes velocidades de agitação (100, 130, 160, 190 e 220 rpm) em “shaker” (New Brunswick Scientific, modelo innova 4000). Foram retirados 2 mL de amostra no tempo zero e juntou-se a 4 mL de lugol com pH ajustado em 8 e deixou-se reagindo por 10 min. Após a reação foram adicionados 2 mL de ácido acético glacial e titulado até o ponto de viragem com tiosulfato de sódio 0,02 M. O processo de retirada de amostras foi repetido a cada 20 minutos durante 100 minutos, para cada uma das velocidades de agitação estudadas.

Após os 10 minutos o iodo residual foi mensurado na titulação com o tiosulfato de sódio, gerando tetrionato de sódio. A variação do volume gasto de tiosulfato é usada para calcular o k_{La} segundo a equação 1.

O mesmo procedimento foi repedido no biorreator com 5 e 10 L de meio, variando a vazão de ar e a agitação.

$$k_{La} \text{ (h}^{-1}\text{)} = \frac{C_{tio} \times \Delta V_{tio} \times 1000 \times 60}{V_{amostra} \times \Delta t \times 4 \times 0,2} \quad (1)$$

Onde:

C_{tio} – concentração do tiosulfato de sódio (M)

ΔV_{tio} – Variação do volume de tiosulfato de sódio gasto (mL)

1000 – Correção da molaridade

60 – Correção de minuto para hora

$V_{amostra}$ – Volume de amostra usado (mL)

Δt – Variação do tempo entre a retirada das amostras (min)

4 – Proporção estequiométrica entre oxigênio e sulfito de sódio

0,2 – Solubilidade do oxigênio na faixa de 25 a 30 °C (mM)

4.4.2. Determinação da atividade de lacase

A atividade de lacase foi determinada pela oxidação de ABTS – ácido 2,2’-azinobis-(3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico) (Bourbonnais e Paice, 1990). O volume total de reação foi de 1,0 mL contendo 0,5 mL de água destilada, 0,3 mL de tampão acetato 50 mM (pH 5,0), 0,1 mL de extrato enzimático (diluído, se preciso) e 0,1 mL de ABTS 1 mM. A reação foi monitorada a 420 nm no espectrofotômetro Hitachi (modelo U-2900) por 5 minutos, em temperatura ambiente. Uma unidade internacional de lacase (U) foi definida como 1 μ mol de ABTS oxidado por minuto.

A atividade foi determinada de acordo com a equação 2.

$$\text{Atividade } \left(\frac{U}{L} \right) = \frac{\Delta \text{ Abs} \times 10^6 \times V_f}{\varepsilon \times V_e \times 1 \text{ cm}} \quad (2)$$

Onde:

$\Delta \text{ Abs}$ – Variação da absorbância com o tempo

V_f - Volume final de reação

V_e - Volume de extrato enzimático usado no ensaio

ε - Coeficiente de extinção molar ($\varepsilon = 36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

4.4.3. Determinação da concentração de açúcares redutores

As concentrações de glicose foram determinadas com 0,5 mL de amostra devidamente diluída e 3 mL do reagente DNS. A mistura foi fervida por 5 minutos, seguida pela adição de 20 mL de água destilada. A leitura da absorbância é feita em espectrofotômetro a 540 nm, zerando o aparelho com a solução em que a amostra foi substituída por água. Os valores de absorbância são convertidos em concentração de açúcar (g/L) empregando-se de uma curva de calibração, preparada com concentrações conhecidas de glicose (Miller, 1959).

4.4.4. Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas das amostras foi quantificada pelo método de Bradford (1976). Uma alíquota do extrato enzimático de 100 μl e 1 ml de solução do reagente de Bradford foram misturados. Após 5 min foi feita a leitura em espectrofotômetro em 595 nm. As concentrações de proteínas foram determinadas utilizando-se curva padrão de albumina sérica bovina (BSA).

4.4.5. Determinação do pH

Os valores de pH das amostras foram determinados por potenciometria, em um pHmetro digital (Quimis, modelo Q400A), com correção de temperatura.

4.5. Concentração do extrato de cultivo

Os sobrenadantes ao final dos cultivos foram filtrados em papel de filtro e concentrados utilizando-se frasco concentrador (Amicon-Stired cell - Merck- Millipore), com membrana de corte de 10 kDa, com pressão máxima de 3 Psi. No concentrado foi feita a atividade de lacase e determinação de proteína.

4.6. Eletroforese

O extrato concentrado de lacase foi avaliado por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE), 15% de poliacrilamida. Os géis foram montados em placa de vidro de 10 cm x 10 cm com 1 mm de espessura e utilizando o aparelho Electrophoresis Constant Power Supply ECPS 3000/150 (Pharmacia Fine Chemicals) para a corrida, mantendo uma corrente de 150 V e 30 mA. O tampão de corrida foi Tris/glicina pH 8,9, com SDS (Alfenas et al., 1991).

Os géis foram feitos pela copolimerização de acrilamida mix 30% (acrilamida e bis-acrilamida), usando persulfato de amônio e tetrametiletilenodiamina (TEMED) para solidificação dos géis. O gel de corrida consistiu em duas partes, gel concentrador a 5% e gel separador a 15%. A composição dos géis é apresentada nas Tabelas 1 e 2 (Laemmli, 1970).

Tabela 1. Reagentes utilizados na preparação do gel separador

Reagentes	Volumes (para gel 15%)
Água deionizada	2,3 mL
Acrilamida mix 30%	5,0 mL
Tris HCL 1,5M, pH 8,8	2,5 mL
SDS 10%	0,1 mL
Persulfato de amônio 10%	0,2 mL
TEMED	0,02 mL

Tabela 2. Reagentes utilizados na preparação do gel concentrador

Reagentes	Volumes (para gel 5%)
Água deionizada	2,1 mL
Acrilamida mix 30%	0,5 mL
Tris HCL 1 M, pH 6,8	0,38 mL
SDS 10%	0,03 mL
Persulfato de amônio 10%	0,1 mL
TEMED	0,02 mL

Foram aplicadas nas canaletas amostras de proteínas secretadas por *T. versicolor* como segue: a) 10 µL de tampão da amostra e 20 µL de amostra fervida por 5 min b) 20 µL de amostra sem ferver e 10 µL de tampão da amostra.

O tampão da amostra foi preparado de acordo com a Tabela a 3.

Após a corrida o gel foi corado com Comassie-Blue para revelação das bandas de proteínas.

Tabela 3. Reagentes utilizados na preparação do tampão da amostra

Reagentes	Volumes (para gel 5%)
Tris HCL 1 M, pH 6,8	0,66 mL
β-mercaptoetanol	0,66 mL
Glicerol	1,66 mL
SDS 10%	1,33 mL
Azul de Bromofenol	0,0033 mg

Para confirmar se as bandas mostradas no gel SDS-PAGE correspondem à lacase, a banda foi cortada e enviada para análise de espectrometria de massas (LC-MS/MS). A análise de espectrometria de massa foi realizada no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD), da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

4.7. pH e temperatura ótimos

A determinação do pH ótimo e temperatura ótima de atividade da lacase foi realizado seguindo a mesma metodologia da determinação da atividade enzimática (item 4.4.2.) por meio da oxidação do ABTS. Foi utilizado um espectrofotômetro Hitachi (modelo U-2900) com controlador de temperatura, variando a temperatura do ensaio no espectrofotômetro de 30 a 80 °C.

Para o pH ótimo foi utilizado o tampão citrato fosfato 50 mM nos pH de 3 a 5 e tampão fosfato de sódio 50 mM nos pH de 6 a 8. As atividades foram feitas em temperatura ambiente.

4.8. Termoestabilidade

A estabilidade térmica da lacase foi determinada incubando o concentrado enzimático em temperaturas de 30 a 70 °C por tempos de 15 minutos a 48 horas. A atividade de lacase foi determinada a temperatura ambiente e expressa como atividade residual.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Seleção do indutor de lacase

Foram feitos ensaios de produção de lacase por *T. versicolor* em meio MDT, variando o indutor de lacase. No terceiro dia de cultivo foi adicionado 2,5-xilidina, lignosulfonato ou a combinação desses dois indutores e acompanhou-se o comportamento pela variação do açúcar e do pH do meio.

A produção de lacase por *T. versicolor* na presença de diferentes indutores, revelou que no ensaio com 2,5-xilidina houve a maior atividade, chegando a 11.317 U/L no décimo dia. Este resultado foi 74 vezes maior que nos cultivos controle e com lignosulfonato. Quando o lignosulfonato e a xilidina foram adicionados juntos ao meio, observou-se uma maior atividade no sexto dia de cultivo (6.623 U/L), no entanto, após este dia houve um decréscimo na atividade de lacase, correspondendo a 5.642 U/L no décimo dia. A atividade de lacase nos cultivos induzidos apenas por xilidina continuou aumentando durante o cultivo, enquanto que nos cultivos na presença de ambos compostos, xilidina e lignosulfonato, observou-se uma redução na atividade de lacase (Figura 6).

O efeito da adição de xilidina ao meio pode ser observada alguns minutos após sua adição, pela mudança da cor do meio para vermelho escuro. Isso ocorre pela ação da lacase presente no meio, que age sobre a xilidina diminuindo a sua toxicidade e polimerizando-a (Collins e Dobson, 1997).

Comparando a produção de lacase por *T. versicolor* obtida nos cultivos controle e com adição de lignosulfonato, observou-se um perfil de atividade semelhante, alcançando uma atividade máxima de 150 U/L, no quinto dia de cultivo.

Collins e Dobson (1997) estudaram o efeito da adição de indutores no cultivo e observaram o aumento da transcrição dos genes de lacase quando a xilidina era adicionada ao meio. A indução de lacase na presença de compostos aromáticos é descrita como uma ação indireta, através de proteínas reguladoras que estimulam a transcrição do gene da lacase, indicando que essa é uma resposta de defesa do fungo a um estresse químico (Santana et al., 2018; Elisashvili et al., 2010).

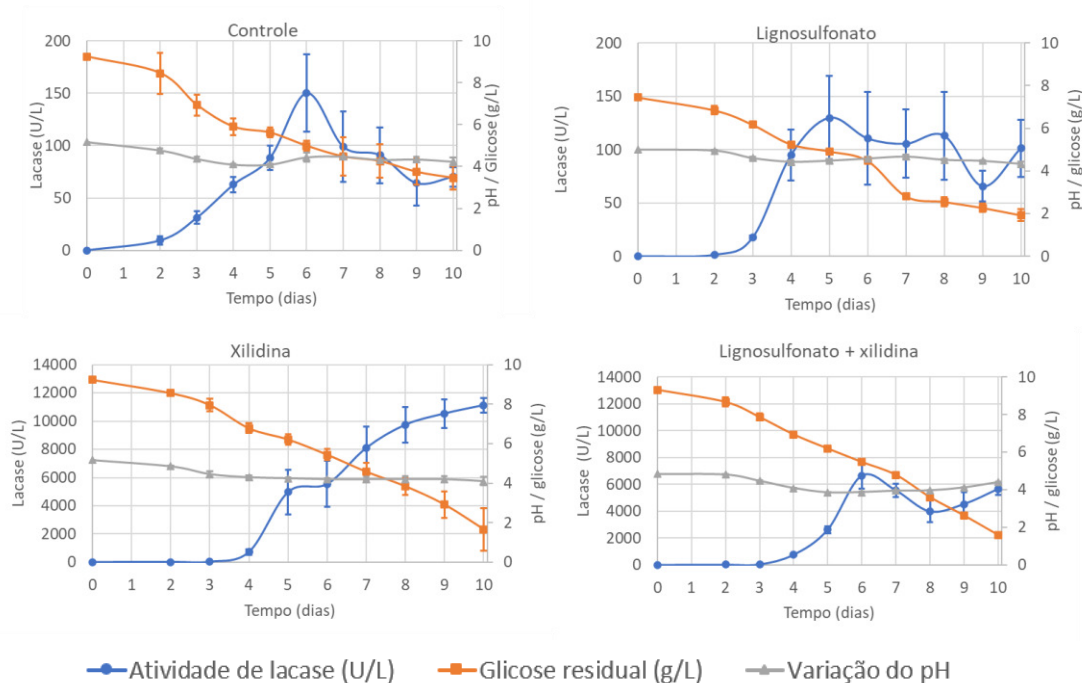


Figura 6. Produção de lacase por *T. versicolor* em meio MDT (controle) e em meio MDT com adição de indutor no terceiro dia de cultivo. Indutores: Xilidina (3 mM), lignosulfonato (450 mg/L) e a mistura dos compostos.

Santana et al. (2018), estudando a interação de cobre e compostos aromáticos na indução de lacase de *Lentinus crinitus*, observaram um efeito sinérgico entre cobre e guaiacol e também entre o cobre e álcool veratrílico, mas esse efeito não ocorreu entre cobre e xilidina. Por outro lado, Birhanli e Yesilada (2010) verificaram sinergismo na produção de lacase de *T. versicolor* combinando cobre (500 μ M) e xilidina (0,5 mM) resultando um aumento de mais de 60 vezes na atividade de lacase. O efeito positivo do cobre na indução de lacase está associado à presença de cobre em sua estrutura. Nestes ensaios observou-se

um efeito cumulativo da adição de cobre e xilidina na transcrição dos genes de lacase. Estes resultados sugerem que a melhor combinação de indutores para um aumento na produção de lacase é dependente do fungo e das condições do cultivo, estando sempre presente o cobre.

Em um experimento feito por Tavares et al. (2005), com o mesmo meio de cultivo com *T. versicolor* e uma concentração de xilidina de 30 μM , foi alcançada uma atividade máxima de 5.500 U/L, em 10 dias de cultivo. Quando *T. versicolor* foi cultivado em um biorreator “airlift”, com vazão de ar de 1 L/min, em 2 L de meio Kirk contendo 10 g/L de glicose e 1 mM de xilidina como indutor, foi atingida uma atividade máxima de 1.676 U/L no 13º dia de cultivo (Rancano et al., 2003).

O açúcar residual e o pH foram analisados durante o cultivo de *T. versicolor* no meio MDT, na presença de diferentes indutores (Figura 6). Observa-se uma redução gradual dos açúcares no meio, de 9 g/L para valores entre 1,50 e 2 g/L com 10 dias de cultivo para todas as condições, exceto no meio controle que apresentou um residual de 3,5 g/L. Segundo Tavares et al. (2005), cultivos com altas concentrações de glicose direcionam ao metabolismo primário do fungo, inibindo o metabolismo secundário, responsável pela maior secreção de lacase. Na ausência de um indutor não houve produção de níveis elevados de lacase, sendo necessário haver esse estímulo externo para ativar seu metabolismo secundário.

A variação do pH do cultivo foi pequena, no entanto pode-se observar uma diminuição mais acentuada até o quarto dia e após o que se manteve estável entre 4,1 e 4,7 (Figura 6). Uma exceção foi para o cultivo com xilidina e lignosulfonato, em que o pH continuou a diminuir para 3,85 após o quinto dia. Nesta condição, observou-se uma diminuição na atividade de lacase, pois lacases de origem fúngica são em geral estáveis entre os pH 4 e 5 (Birhanli e Yesilada, 2010).

5.2. Efeito da concentração de xilidina

Para verificar a capacidade de *T. versicolor* em produzir lacase em diferentes concentrações de xilidina, foi realizado um ensaio em meio MDT variando a concentração do indutor, adicionado ao terceiro dia de cultivo.

T. versicolor foi capaz de produzir lacase com 1 mM e 3 mM de xilidina, indicando que nestas condições este indutor não exerceu efeito inibitório sobre o microrganismo. Em cinco dias de cultivo observa-se que o fungo produziu aproximadamente 8.000 U/L de lacase

com 1 mM de xilidina e 5.000 U/L com 3 mM de xilidina. Em tempos mais prolongados, de até 10 dias, a produção de lacase foi maior com 3 mM de xilidina, chegando a 11.117 U/L (Figura 7). A concentração de 9 mM de xilidina teve um efeito negativo na produção de lacase, provavelmente pelo efeito tóxico que a xilidina apresenta. A adição de compostos aromáticos tóxicos e/ou quantidades elevadas de sulfato de cobre como indutores levam à formação de espécies radiculares do oxigênio, que causam um estresse oxidativo no fungo, inibindo assim a produção de lacase e o metabolismo primário do fungo (Santana et al., 2018).

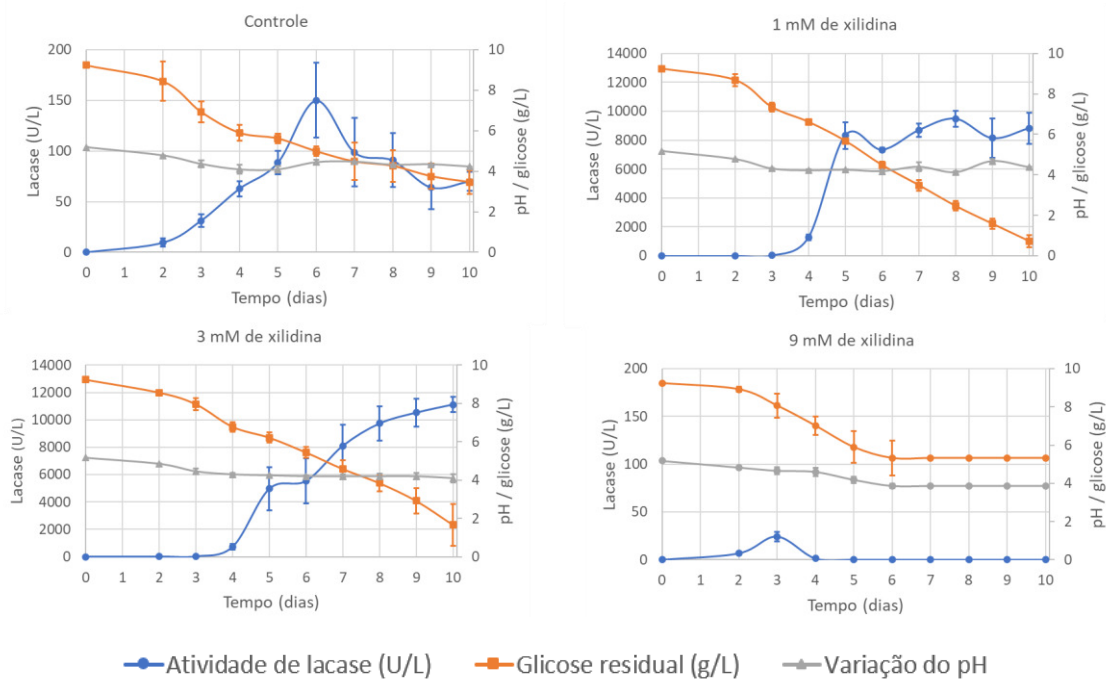


Figura 7. Produção de lacase por *T. versicolor* em meio MDT (controle) e em meio MDT com adição de xilidina no terceiro dia de cultivo.

Inicialmente o valor medido de glicose no meio de cultivo foi em média 9 g/L (Figura 7). Observa-se que o residual de glicose para os ensaios com 1 mM e 3 mM de xilidina foi de 0,72 g/L e 1,66 g/L, respectivamente. O consumo de glicose por *T. versicolor* na condição controle e com 9 mM de xilidina foi menor, deixando um residual de glicose de 3,46 g/L e 5,33 g/L, respectivamente. O consumo incompleto de glicose nestas condições pode ser devido a dois fatores: a) a lacase possui a função de oxidar compostos aromáticos tóxicos no meio em que fungo cresce, portanto na ausência de tais compostos não há um estímulo ao desenvolvimento fúngico. Por consequência não ocorre uma alta demanda de consumo de nutrientes (Collins e Dobson, 1997). b) compostos tóxicos como a xilidina adicionada em

concentrações altas acabam inibindo totalmente o crescimento do fungo. Alguns autores abordam o uso de xilidina como indutor de lacase para diversos basidiomicetos, utilizando concentrações que variam de 5 μM a 2 mM dependendo da capacidade da linhagem do fungo de suportar ambientes com alto índice de toxicidade, porém não verificam uma correlação entre o aumento da produção com o aumento da concentração do indutor (Tavares et al., 2006).

O pH dos cultivos manteve-se acima de 4,1, exceto o cultivo com 9 mM de xilidina que teve uma diminuição do pH para 3,86, após a adição do da xilidina que se manteve constante até o final do cultivo.

5.3. Efeito da agitação e da aeração na produção de lacase

Visando definir melhores condições de produção de lacase para *T. versicolor* foi estudado o efeito da agitação em combinação com o grau de aeração (relação volume de frasco/volume de meio de cultivo, V_f/V_m).

O perfil de produção da lacase de *T. versicolor* em meio MDT e meio MDT com adição de 3 mM de xilidina foi analisado sob as diferentes condições avaliadas (Figura 8). Dentro das condições estudadas, a maior produção de lacase foi aquela correspondente ao maior volume de meio, com uma razão de V_f/V_m de 1,67 (75 mL de meio com xilidina em um frasco de 125 mL). A produção de lacase aumentou até o sétimo dia de cultivo, alcançando 10.229 U/L, sendo que após este período o valor da atividade praticamente não mudou. No meio MDT (controle) a aeração influenciou menos a produção de lacase, sendo que no volume menor de meio (v_f/v_m de 5) obteve-se uma atividade levemente maior (563 U/L) no sétimo e se manteve constante até o décimo dia. A produção de lacase na presença do indutor xilidina foi cerca de vinte vezes maior do que no meio MDT controle.

Para todos os ensaios, a glicose disponível no meio foi consumida em diferentes níveis em 10 dias de cultivo. Uma comparação entre os ensaios com e sem xilidina mostram um maior consumo de glicose na presença do indutor. O residual de glicose foi de aproximadamente 2,5 g/L no cultivo em que a razão V_f/V_m é igual a 1,67 para o meio MDT com xilidina, enquanto no ensaio controle observou-se o menor consumo de glicose no $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$ igual a 5, com um residual de 4,68 g/L (Figura 8).

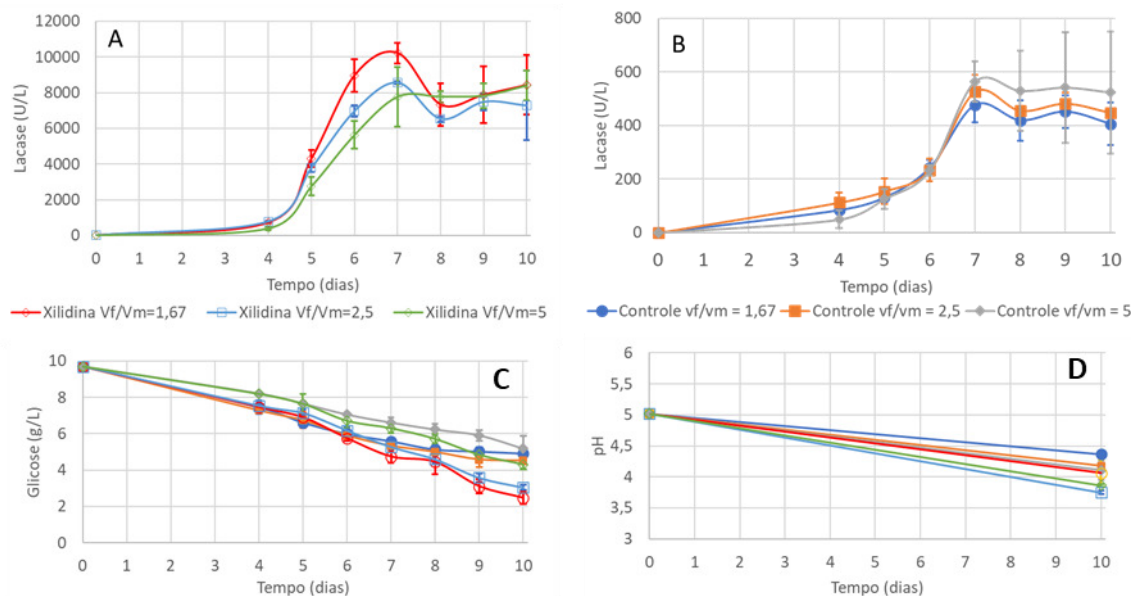


Figura 8. Perfil da produção de lacase por *T. versicolor* em diferentes condições de aeração em meio MDT com adição de xilidina no terceiro dia (A), meio MDT controle (B). Açúcar residual (C) e variação do pH (D) das culturas. Vf/Vm (Volume de frasco / Volume de meio).

Hailei et al. (2009) demonstraram que a produção de lacase a partir de glicose por *T. versicolor* foi induzida pelo rápido decréscimo no conteúdo de açúcar, ocorrido em co-cultivo com a levedura *Candida* sp. HSD07A. Pazarlioglu et al. (2005) estudando a produção de lacase usando fenol como indutor observaram que a formação de lacase começou apenas após a depleção de glicose do meio. Ambos estudos corroboram com o fato de que a maior produção de lacase em *T. versicolor* normalmente ocorre após a paralisação do crescimento do fungo.

A variação do pH dos cultivos foi acompanhada nas condições estudadas. Nos ensaios com xilidina, o pH alterou de 5 para 4,1 no ensaio com V_f/V_m de 1,67, enquanto que em V_f/V_m de 2,5 e 5 os valores de pH no final dos cultivos foram 3,7 e 3,8, respectivamente (Figura 8). Nos meios controles, os valores de pH se mantiveram acima de 4,2. Cultivos anteriores em frascos mostram que uma redução de pH dos cultivos abaixo de 4, ocasionam uma diminuição na atividade enzimática, sendo um parâmetro que precisa ser monitorado durante os experimentos. Como relatado por Birhanli e Yesilada (2010) em pH acima de 7 e pH e abaixo de 3, a produção de lacase por *T. versicolor* é reduzida sendo a melhor faixa de pH para o cultivo entre 4 e 5.

Observou-se diferenças no aspecto visual dos micélios nas condições de cultivo de *T. versicolor*, principalmente nos experimentos com menor volume de meio em que se observou que o micélio cresceu formando “pellets” maiores e menos homogêneos e também

houve menor consumo de açúcares do meio. Nesta condição de maior V_f/V_m houve um aumento na agitação e no grau de aeração interferindo negativamente na produção de lacase por *T. versicolor*. A síntese de lacase ocorre em condições bastante específicas de aeração, sendo o excesso quanto a ausência fatores limitantes. Altas taxas de aeração e agitação aumentam a taxa de cisalhamento, o que prejudica a produção de lacase por fungos filamentosos e o seu crescimento (Tinoco-Valencia et al., 2014). Por outro lado, Dekker et al., (2001) observaram que um aumento da taxa de aeração colaborou para a diminuição dos efeitos tóxicos que o indutor possui, influenciando também o aumento de massa micelial.

5.4. Aumento de escala em frascos erlenmeyer e influência da agitação

Com o intuito de aumentar a escala de produção de lacase, utilizou-se frascos Erlenmeyers de 1 L com 600 mL de meio MDT, com adição de xilidina ao terceiro dia de cultivo. Foi mantida a mesma relação definida como a melhor condição para a produção de lacase em frascos de 125 ml (V_f/V_m igual a 1,67). Os ensaios foram realizados variando a velocidade de agitação e a de produção de lacase foi acompanhada durante 8 dias (Figura 9).

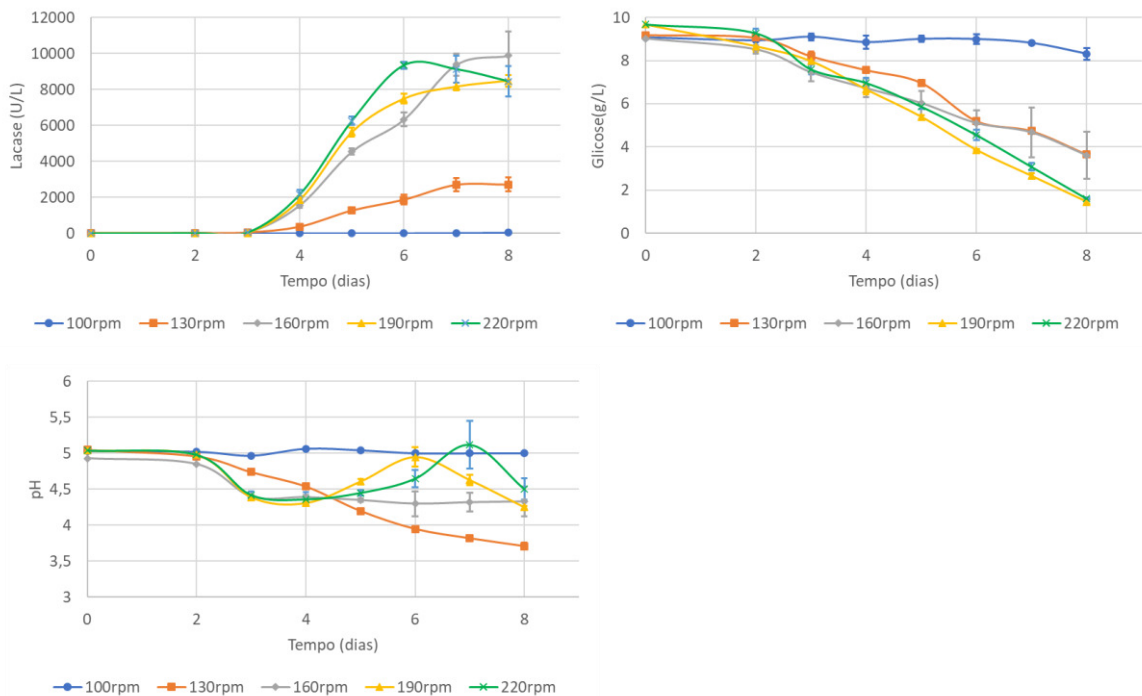


Figura 9. Produção de lacase em frascos de 1 L em diferentes velocidades de agitação e adição de 3 mM de xilidina ao terceiro dia.

Nestes ensaios, avaliou-se o aumento da agitação de 100 rpm a 220 rpm, o que resultou em aumento dos valores de lacase de 6 U/L a 9.300 U/L em seis dias de cultivo. No final do cultivo (8 dias), foi possível observar que a maior atividade de lacase foi obtida na agitação de 160 rpm, chegando a 9.875 U/L. O cultivo de *T. versicolor* em 100 rpm teve uma baixa produção de lacase (31 U/L), e o crescimento do fungo não foi homogêneo, formando grandes e poucos aglomerados de micélios, diferente da forma de pellet como cresceu nas outras velocidades de agitação (Figura 10). O cultivo a 130 rpm alcançou uma atividade de 2.707 U/L, enquanto os outros dois ensaios com velocidade de agitações de 190 e 220 rpm tiveram atividades máximas semelhantes (8.475 e 8.444 U/L, respectivamente). A produtividade de lacase aumentou até o sexto dia de cultivo para todas as velocidades de agitação, e o aumento foi proporcional à velocidade de agitação.

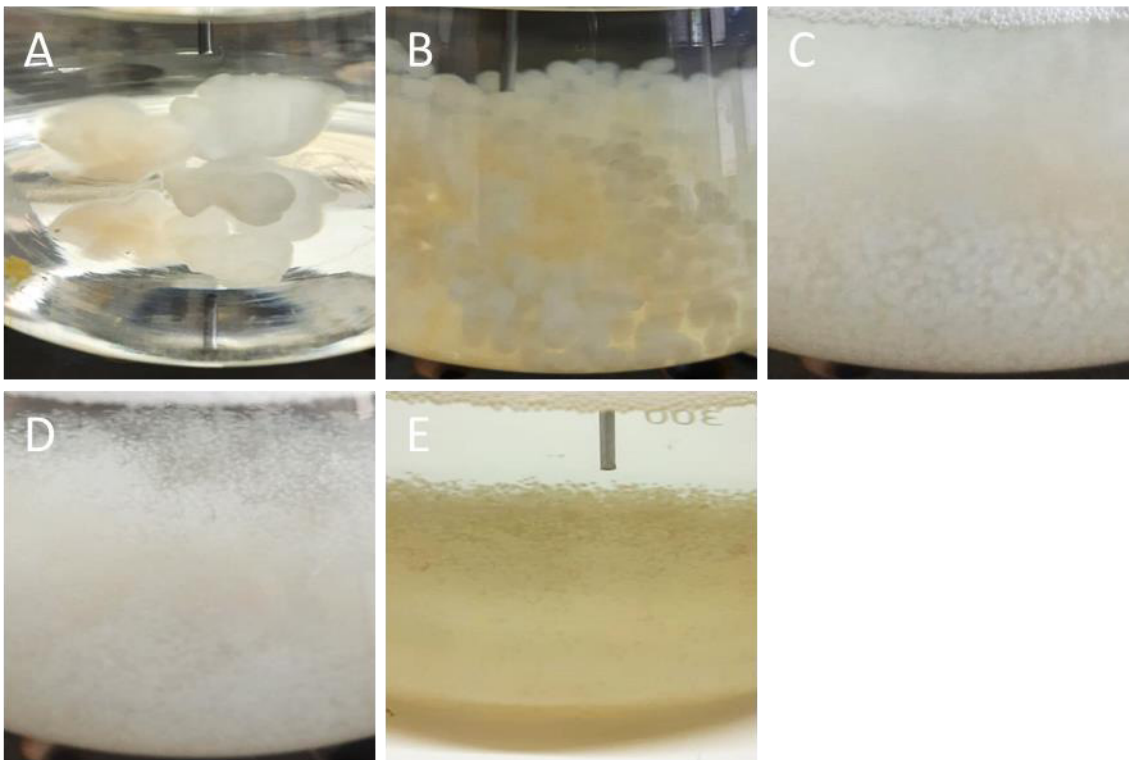


Figura 10. Diferenças morfológicas dos micélios de *T. versicolor* em cultivo em frascos Erlenmeyers em diferentes agitações no terceiro dia de cultivo. (A) 100 rpm, (B) 130 rpm, (C) 160 rpm, (D) 190 rpm, (E) 220 rpm.

Em relação a concentração de glicose inicial foi de aproximadamente 9 g/L, sendo essa reduzida durante o cultivo. Na menor velocidade de agitação (100 rpm) houve um baixo consumo de glicose, restando 8,31g/L no meio, assim como um baixo crescimento do fungo. Em velocidades de agitação intermediárias, 130 rpm e 160 rpm, o residual de glicose foi de aproximadamente 3,6 g/L. Em altas velocidades de agitação, 190 e 220 rpm, a glicose foi

quase toda consumida, restando cerca de 1,5 g/L ao final do cultivo. Como a agitação afeta diretamente a disponibilidade de oxigênio e a difusão de nutrientes, a baixa agitação acaba dificultando o acesso do fungo aos nutrientes, causando um baixo crescimento. Ao contrário, agitações muito altas podem causar a desativação de enzimas (Birhanli e Yesilada, 2010).

Quanto ao pH do cultivo a 100 rpm se manteve praticamente constante, porque o fungo apresentou baixo crescimento e conseqüentemente houve baixa secreção de compostos derivados do metabolismo que poderiam causar uma alteração no pH. À exceção do cultivo a 130 rpm, em que se observou uma intensa redução do pH, chegando a 3,71 no último dia de cultivo, nas demais agitações o pH apresentou uma redução em menos de uma unidade de pH. Conforme mencionado anteriormente, valores baixos de pH são prejudiciais tanto para o crescimento do fungo como para a estabilidade da lacase, podendo ser esse um motivo para a baixa produção de lacase em 130 rpm.

Muitos dos estudos realizados sobre cultivos usando basidiomicetos para produção de lacase mostram maiores títulos em agitação de 150 rpm (Birhanli e Yesilada, 2010; Zheng et al., 2017; Hailei et al., 2009; Lorenzo et al., 2006). Esses estudos mostram que a produção de lacase está diretamente associada com a velocidade de agitação do meio e que é possível otimizar a produção de lacase padronizando algumas variáveis físicas como agitação, pH e temperatura, agindo também na formação fisiológica dos pellets formados.

5.5. Determinação do k_{La} em frascos e no reator de baixo cisalhamento.

A determinação do k_{La} foi feita em condições abióticas no frasco Erlenmeyer de 1 L com 600 mL de solução, mantendo a proporção de volume de frasco / volume de meio (V_f/V_m) de 1,67 que foi utilizado nos cultivos, temperatura de 28 °C sob as diferentes agitações. A Figura 11 apresenta os resultados obtidos para o k_{La} . Foi observado que nas diferentes agitações estudadas houve uma correlação linear e positiva entre o k_{La} e a agitação do frasco. Nestes ensaios a agitação foi avaliada de 100 a 220 rpm, o que resultou em valores de k_{La} de 45 h⁻¹ a 105 h⁻¹.

A condição de agitação de 160 rpm (k_{La} igual a 70 h⁻¹) atende os interesses relacionados ao processo de produção de lacase, pois foi neste ensaio que se obteve a maior atividade enzimática. Na velocidade de 220 rpm, observou-se uma maior produtividade de lacase nos ensaios em frascos, porém, quando se pretende reproduzir essa condição no

biorreator há um maior consumo de energia e a necessidade de maior controle de formação de espuma.

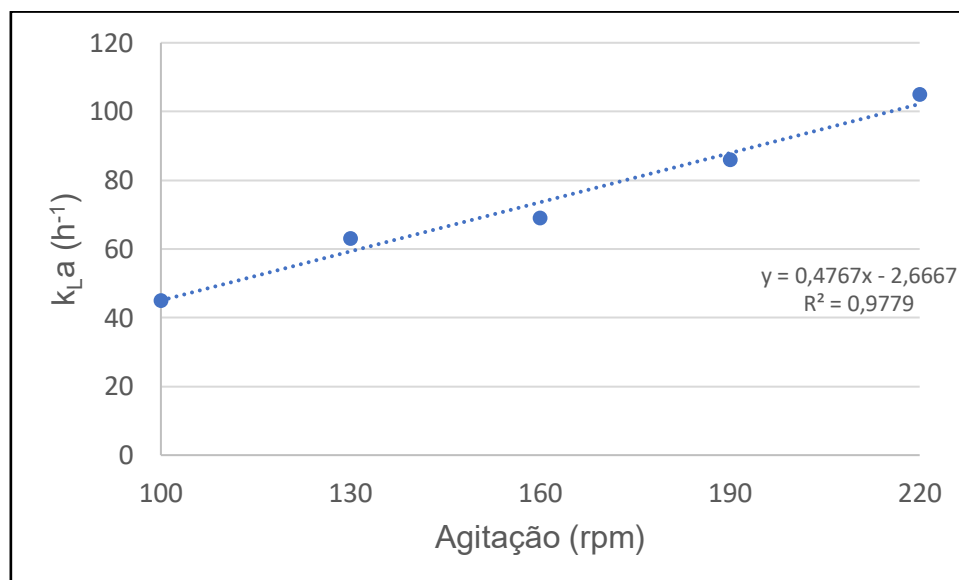


Figura 11. Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) em função da agitação para os frascos Erlenmeyer de 1 L com volume de líquido de 600 mL.

Baseado nisso, o k_{La} foi determinado no reator de baixo cisalhamento (BAABC) com 10 L de meio, mantendo constante as condições de temperatura (28 °C), pH do meio, taxa de aeração de 0,4 vvm e variando a agitação em 200, 250 e 300 rpm no intuito de obter a condição de k_{La} próxima de 70 h^{-1} . Os valores de k_{La} obtidos foram de 76 h^{-1} , 86 h^{-1} e 102 h^{-1} , respectivamente. Quando o volume de meio do reator foi reduzido para 5 L, o k_{La} de 79 h^{-1} foi obtido empregando uma aeração de 0,4 vvm e agitação de 180 rpm.

5.6. Produção de lacase em biorreator de baixo cisalhamento

Na figura 12 são apresentados os resultados de produção de lacase no biorreator com 5 L de meio, com uma agitação de 180 rpm e aeração de 0,4 vvm (k_{La} de 79 h^{-1}). Neste ensaio verificou-se que a atividade máxima de lacase de 12546 U/L foi obtida no nono dia de cultivo, similar à atingida nos frascos Erlenmeyer. Também foi visto que para esse cultivo a glicose foi praticamente consumida até o sétimo dia (0,3 g/L). O pH mostrou uma redução mais acentuada, em relação aos cultivos em frasco, ficando estável em aproximadamente 3,6 até o oitavo dia. Após o consumo completo da glicose observou-se aumento do pH para 7,21 ao final do cultivo.

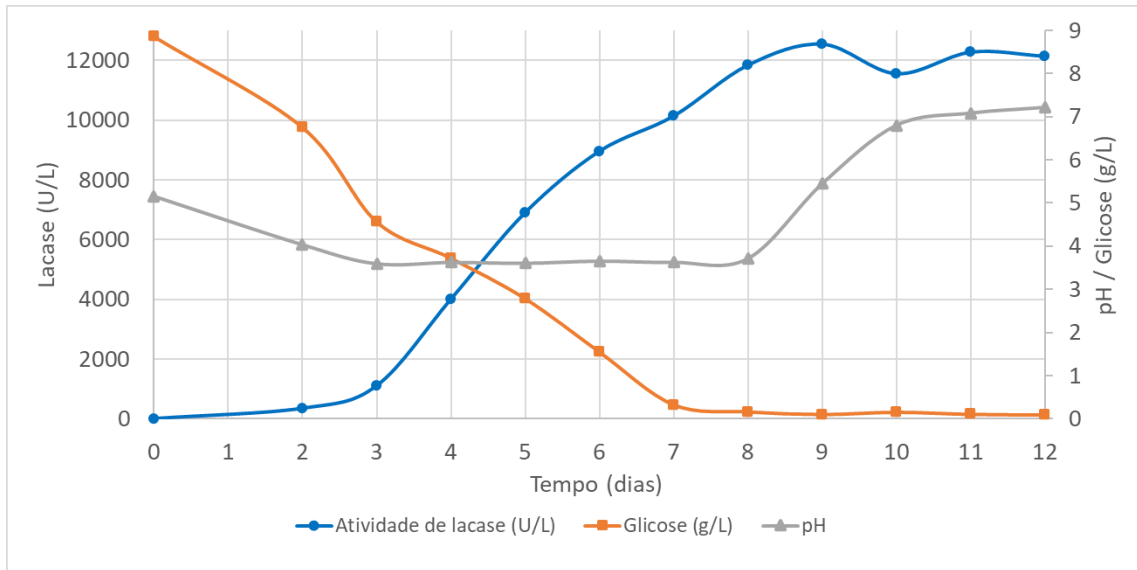


Figura 12. Cultivo *T. versicolor* em reator de 14 L com 5 L de meio MDT com adição de 3 mM de xilidina no terceiro dia de cultivo.

Para análise da ampliação de escala de produção de lacase por *T. versicolor* no reator de baixo cisalhamento, duplicou-se o volume de meio de 5L para 10 L, mantendo-se as mesmas condições de processo, com exceção da agitação que foi aumentada para 200 rpm, visando manter um k_{La} inicial semelhante. Os valores medidos do k_{La} para o biorreator sem células com 5 L e 10 L de meio foram de 79 h^{-1} e 76 h^{-1} , respectivamente.

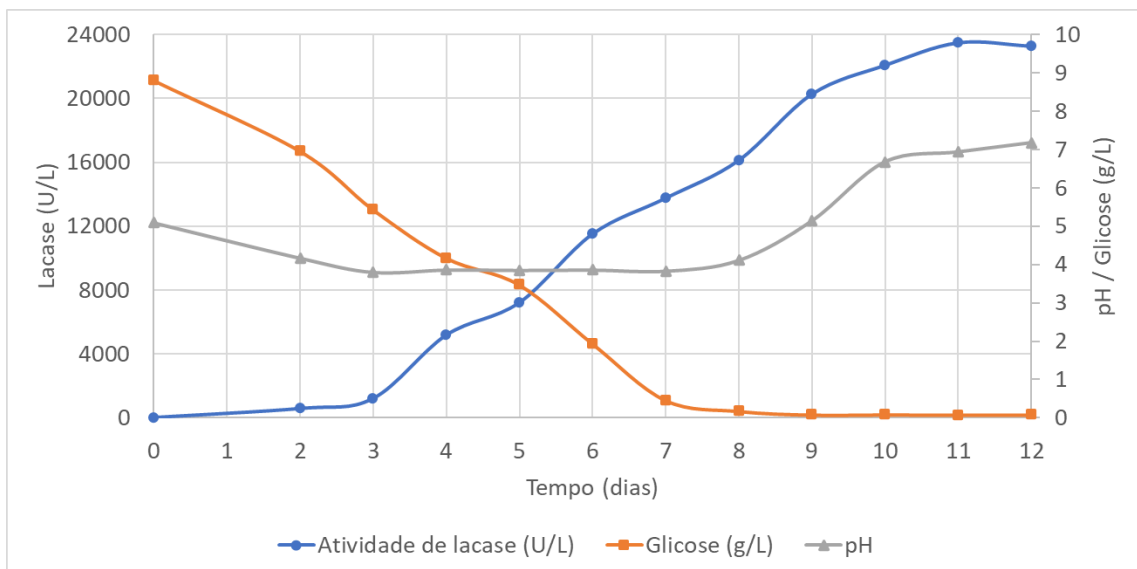


Figura 13. Cultivo *T. versicolor* em reator de 14 L com 10 L de meio MDT com adição de 3 mM de xilidina no terceiro dia de cultivo.

A Figura 13 apresenta os resultados obtidos do cultivo realizado no reator de baixo cisalhamento com 10 L de meio. A atividade máxima de lacase obtida foi de

23495 U/L \pm 357, ou seja, o dobro de lacase em comparação à obtida no reator com o volume de 5 L e nos frascos Erlenmeyer.

A produção de lacase por fungos em reatores é afetada por diversos fatores, entre os quais as características geométricas do biorreator, composição do meio, incluído propriedades como viscosidade e adição de substâncias como antiespumante, tipo de indutor e concentração e morfologia do microrganismo presente (Garcia-Ochoa e Gomez, 2009). O fato de o aumento de volume de meio no reator resultar em aumento da atividade de lacase por *T. versicolor* ainda não está claro, podendo ser afetado pela morfologia do fungo pelo efeito do volume de meio causando menos cisalhamento no meio, melhora na taxa de transferência de oxigênio pelo tempo de permanência das bolhas no meio ou ainda mudança na dinâmica do fluido (Grimm et al., 2005; Barker e Worgan, 1981)

O consumo de glicose seguiu o mesmo perfil de consumo que o cultivo com volume de 5 L, restando 0,4 g/L no sétimo dia, sendo que o aumento do pH se deu a partir do consumo completo da glicose.

5.7. Caracterização bioquímica da lacase

O sobrenadante de cultivo de *T. versicolor* no biorreator de baixo cisalhamento com 5 L de meio foi concentrado e o perfil proteico foi analisado por eletroforese. Foi detectada uma banda no gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) e nativa (Figura 14). As bandas das canaletas 1 e 2 coradas para proteína migraram para uma massa molar entre 66 e 45 kDa.

Foram calculadas a atividade específica da lacase comercial de *T. versicolor* e a produzida em biorreator, onde elas apresentaram respectivamente 17 U/mg e 88,9 U/mg. Mesmo a lacase produzida no biorreator não tendo sido purificada, ela apresentou uma atividade específica 5,2 vezes maior em relação a comercial. Tal resultado demonstra que as condições de cultivo utilizadas foram adequadas para a produção de uma lacase com alta atividade específica.

No resultado da espectrometria de massas foram identificados peptídeos que representam 18 lacases, as quais por meio de alinhamentos pelo software MEGA 11 e site National Center for Biotechnology Information (NCBI) foi possível separá-las em dois grupos de lacases distintas. Dentro desses dois grupos foi tomado como sendo a principal aquela que apresentou uma maior cobertura de peptídeos na análise da espectroscopia de

massas (Figura 14 B). Essas duas sequências foram comparadas com as sequências de lacases de *T. versicolor* registradas no site JGI (Mycocosm) e foram identificadas como sendo a sequência t20010 e sequência t10451, tendo cada uma 519 e 520 aminoácidos, respectivamente.

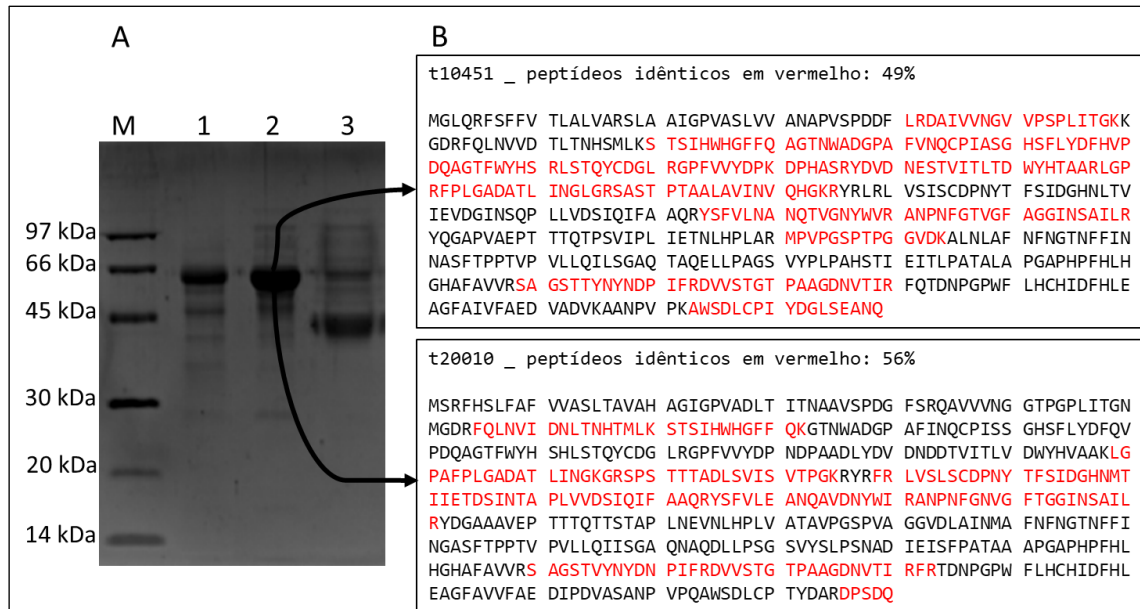


Figura 14. A. Gel de proteínas (SDS-PAGE) do extrato concentrado do cultivo de *T. versicolor* em meio MDT. Marcador de massa molecular (M), lacase comercial de *T. versicolor* (1), extrato concentrado (2), extrato concentrado sem ferver (3). B. A banda mais intensa de proteína produzida por *T. versicolor* foi analisada por espectrometria de massas. As sequências em vermelho se referem às sequências de peptídeos identificados pela espectrometria de massas.

A família de genes que codificam lacase em outros fungos foram isolados e identificados, estando presente de 2 a 5 cópias de genes diferentes que codificam a lacase, gerando diferentes isoformas. Apesar dessas isoformas serem intimamente ligadas por suas sequências de aminoácidos, elas podem apresentar uma pequena diferença em relação às suas atividades, substratos em que agem, regulação e função dentro da célula. Além disso, pode ser que muitas outras sequências gênicas de lacases estejam presentes no DNA fúngico na forma de pseudogenes, os quais só são expressos em condições fisiológicas diversificadas, sendo uma dessas condições a presença de xilidina como indutor no meio (Sharma e Kuhad, 2008; Fukushima e Kirk, 1995).

Tendo a sequência de aminoácidos identificados, essas foram utilizadas para prever a massa molar das lacases e seus pontos isoelétricos teóricos, através da ferramenta ProtParam do servidor ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>) (Tabela 4).

Tabela 4. Ponto isoelétrico e massa molar das isoenzimas de lacase calculadas pelo Protparam.

Proteína	Ponto isoelétrico teórico	Massa molar (kDa)
t10451	5,98	55,84
t20010	4,85	55,57

Diversos fungos já foram estudados em relação à produção de lacase, as quais foram também purificadas e caracterizadas. Tais fungos produzem diferentes isoenzimas de lacase dependendo das condições em que são cultivados. No geral, a massa molar das lacases fúngicas varia de 50 a 100 kDa, com pontos isoelétricos entre 4 e 6 (Baldrian et al., 2006). Duas isoformas de lacase com massas molares de 60 e 100 kDa foram produzidas por *T. versicolor* em meio semi-sólido preparado com serragem de carvalho (Martinez-Morales et al., 2015).

5.7.1. Temperatura e pH ótimos e termoestabilidade

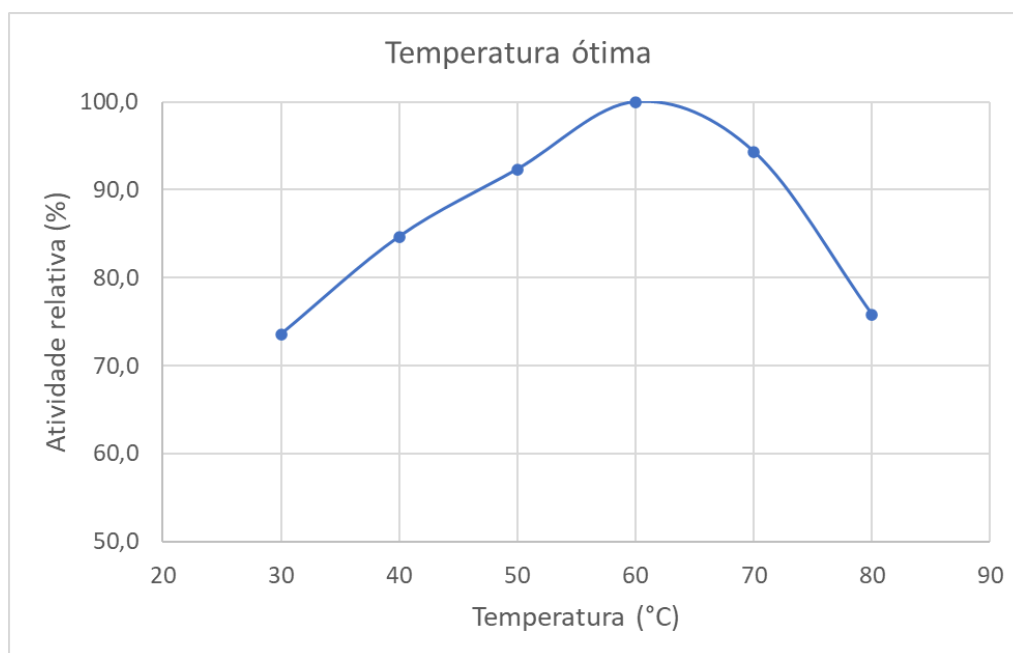


Figura 15. Atividade relativa da lacase em diferentes temperaturas.

Foram feitas atividades de lacase seguindo a mesma metodologia para atividade, variando a temperaturas de 30 a 80 °C (Figura 15). A temperatura ótima para a lacase foi de 60 °C, apresentando atividade acima de 70% de 30 a 80 °C. Lacases fúngicas normalmente apresentam uma faixa de temperatura ótima entre 40 e 70 °C, sendo que existem alguns casos de fungos que produzem lacases que possuem atividade ótima acima dessa temperatura,

como o fungo *Marasmius quercophilus* que produz lacase bastante termoestável, a qual possui atividade ótima em torno de 80 °C, sendo essa característica bastante atrativa para processos industriais (Dedeyan et al., 2000; Baldrian et al., 2006).

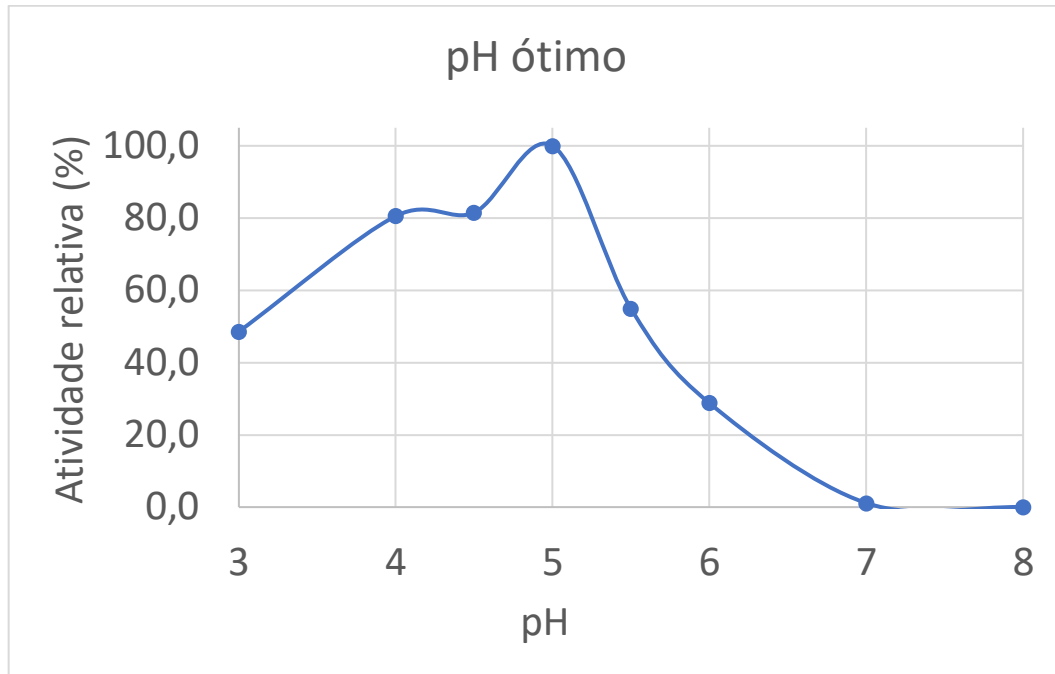


Figura 16. Atividade relativa da lacase em diferente pHs.

A lacase apresentou pH ótimo de 5 (Figura 16). Em pH 4,5 e 4 a atividade foi 81,5 e 80,5% respectivamente em relação ao pH ótimo, os demais pH acarretaram em atividades abaixo de 80%. Valores de pH acima de 5,5 foram os que promoveram uma maior redução na atividade. Lacases fúngicas normalmente apresentam pH ótimo na faixa de pH abaixo de 7, variando essa atividade de acordo com o substrato utilizado para uma mesma isoenzima estudada. Utilizando o ABTS como substrato, o pH de atividade ótima de lacases fúngicas varia de 2 a 5 (Baldrian et al., 2006).

O perfil da atividade da lacase em diferentes valores de pH foi explicado por Xu et al. (1997) com base na diferença do potencial redox entre o substrato fenólico e do cobre tipo 1, presente no sítio ativo da lacase. A região ascendente da curva de pH está relacionada à diminuição do potencial redox do substrato fenólico com o aumento do pH. No entanto, já a perda de atividade acima de pH ótimos é devido à ligação competitiva de hidroxilas à ligação do ânion hidroxila aos sítios T2/T3 pode levar à inibição da lacase T2/T3 em pHs elevados, diminuindo o potencial de redução do oxigênio, caracterizando a parte descendente da curva.

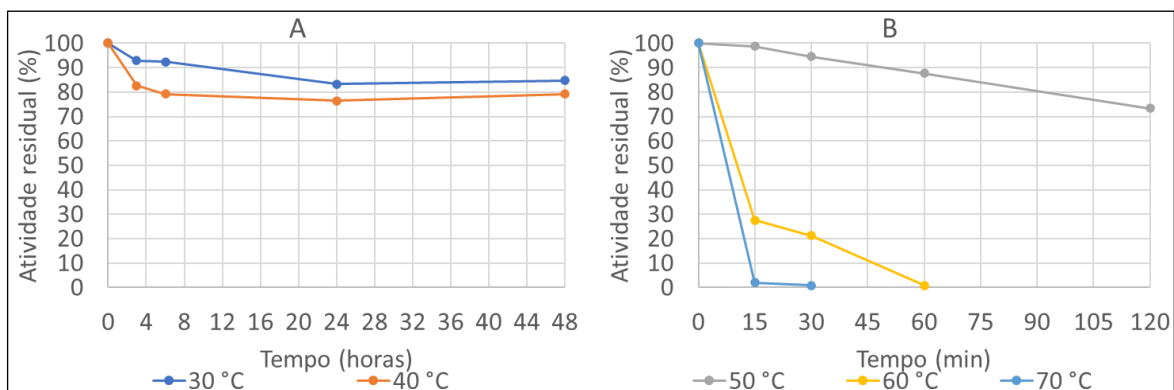


Figura 17. Estabilidade térmica da lacase de *T. versicolor*. Temperaturas menores (A), temperaturas maiores (B).

Foram feitas incubações do extrato concentrado em diferentes temperaturas e retiradas amostras em diferentes tempos para calcular a atividade residual (Figura 17). Quando a enzima foi incubada em temperaturas na faixa da sua temperatura ótima de atividade (50 a 70 °C) ela apresentou uma perda rápida da atividade (Figura 17 B). Em 70 °C a enzima perdeu 98% da sua atividade em apenas 15 minutos, em quanto que em temperaturas abaixo de 50 °C a enzima se mostrou muito estável, tendo uma atividade residual de mais de 80% com 48 horas de incubação (Figura 17 A).

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho, realizou-se o cultivo batelada de *T. versicolor* em frascos e em um reator de 14 L, de baixo cisalhamento. Foram determinados os valores do coeficiente volumétrico de oxigênio inicial com o objetivo de usar este parâmetro como fator de ampliação de escala da produção de lacase.

Foi obtida uma alta produção de lacase em cultivos de *T. versicolor* empregando uma relação de volume de frasco por volume de meio de 1,67 e a xilidina como indutor, na concentração de 3 mM. O aumento da velocidade de agitação afetou positivamente a produtividade de lacase.

A atividade de lacase obtida em cultivos em frasco agitado foi reproduzida em reator de baixo cisalhamento, com volume de 5 L. Comparativamente, no reator com 10 L de volume meio houve uma produção mais expressiva de lacase. Este resultado constitui um ponto positivo uma vez que permite obter mais produto utilizando o mesmo reator.

Foram produzidas duas isoformas de lacase com uma alta atividade específica para serem usadas diretamente em diversas aplicações, sem a necessidade de excessivas etapas de purificação.

REFERÊNCIAS

- Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K. H., Cavaco-Paulo, A., & Gübitz, G. M., 2000. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. *Applied and environmental microbiology*, 66(8), 3357-3362. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.8.3357-3362.2000>
- Alfenas, A. C., Peters, I., Brune, W., Passador, G. C., 1991. Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais (p. 242). Viçosa: UFV.
- Asgher, M., Azim, N., Bhatti, H. N., 2009. Decolorization of practical textile industry effluents by white rot fungus *Coriolus versicolor* IBL-04. *Biochemical Engineering Journal*, 47(1-3), 61-65. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.07.003>
- Auriol, M., Filali-Meknassi, Y., Adams, C. D., Tyagi, R. D., Noguerol, T. N., & Pina, B., 2008. Removal of estrogenic activity of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater: efficiency of horseradish peroxidase and laccase from *Trametes versicolor*. *Chemosphere*, 70(3), 445-452. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.06.064>
- Baldrian, P., 2006. Fungal laccases—occurrence and properties. *FEMS microbiology reviews*, 30(2), 215-242. <https://doi.org/10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x>
- Barker, T. W., Worgan, J. T., 1981. The application of air-lift fermenters to the cultivation of filamentous fungi. *European journal of applied microbiology and biotechnology*, 13, 77-83. <https://doi.org/10.1007/BF00499692>
- Bertrand, G., 1896. Sur la presence simultanee de la laccase et de la tyrosinase dans le suc de quelques champignons. *CR Hebd Seances Acad Sci*, 123, 463-465.
- Birhanli, E., Yesilada, O., 2010. Enhanced production of laccase in repeated-batch cultures of *Funalia trogii* and *Trametes versicolor*. *Biochemical Engineering Journal*, 52(1), 33-37. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.06.019>

- Bourbonnais, R., Paice, M. G., 1990. Oxidation of non-phenolic substrates: an expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS letters*, 267(1), 99-102. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80298-W](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80298-W)
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brazkova, M., Angelova, G., Krastanov, A., 2021. Biodegradation of Bisphenol a during submerged cultivation of *Trametes versicolor*. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2021, 204-207. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2019.9.2.204-207>
- Burton, S. G., 2003. Laccases and phenol oxidases in organic synthesis-a review. *Current Organic Chemistry*, 7(13), 1317-1331. <https://doi.org/10.2174/1385272033486477>
- Camarero, S., Garcia, O., Vidal, T., Colom, J., del Rio, J. C., Gutiérrez, A., Martínez, Á. T., et al., 2004. Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(2-3), 113-120. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.10.019>
- Camarero, S., Ibarra, D., Martínez, M. J., Martínez, Á. T., 2005. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Applied and environmental microbiology*, 71(4), 1775-1784. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.4.1775-1784.2005>
- Chen, H., Chen, H., 2014. Chemical composition and structure of natural lignocellulose. *Biotechnology of lignocellulose: Theory and practice*, 25-71. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6898-7_2
- Coelho, M. A., Bakkeren, G., Sun, S., Hood, M. E., Giraud, T., 2017. Fungal sex: the *Basidiomycota*. *Microbiology spectrum*, 5(3), 5-3. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0046-2016>

- Collins, P. J., Dobson, A. (1997). Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(9), 3444-3450. <https://doi.org/10.1128/aem.63.9.3444-3450.1997>
- Couto, S. R., Toca-Herrera, J. L., 2007. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnology advances*, 25(6), 558-569. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.07.002>
- de Souza Bezerra, T. M., Bassan, J. C., de Oliveira Santos, V. T., Ferraz, A., & Monti, R., 2015. Covalent immobilization of laccase in green coconut fiber and use in clarification of apple juice. *Process Biochemistry*, 50(3), 417-423. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.12.009>
- Dedeyan, B., Klonowska, A., Tagger, S., Tron, T., Iacazio, G., Gil, G., Le Petit, J., 2000. Biochemical and molecular characterization of a laccase from *Marasmius quercophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(3), 925-929. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.3.925-929.2000>
- Deepa, S. 2022. Assessment of KLa (Oxygen Transfer Coefficient) – 6 Methods. <https://www.biologydiscussion.com/cell-biology/assessment-of-kla-oxygen-transfer-coefficient-6-methods/7681> (acessado em 18 de outubro de 2022).
- Dekker, R. F., Barbosa, A. M., 2001. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria sp.* *Enzyme and Microbial Technology*, 28(1), 81-88. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00274-X](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00274-X)
- Deng, Z., Xia, A., Liao, Q., Zhu, X., Huang, Y., & Fu, Q, 2019. Laccase pretreatment of wheat straw: effects of the physicochemical characteristics and the kinetics of enzymatic hydrolysis. *Biotechnology for biofuels*, 12, 1-12. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1499-3>
- Diaz Blanco, C., Ortner, A., Dimitrov, R., Navarro, A., Mendoza, E., & Tzanov, T., 2014. Building an antifouling zwitterionic coating on urinary catheters using an enzymatically triggered bottom-up approach. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 6(14), 11385-11393. <https://doi.org/10.1021/am501961b>

- Domingos, M., de Souza-Cruz, P. B., Ferraz, A., Prata, A. M. R., 2017. A new bioreactor design for culturing *basidiomycetes*: Mycelial biomass production in submerged cultures of *Ceriporiopsis subvermispora*. *Chemical Engineering Science*, 170, 670-676. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2017.04.004>
- Elisashvili, V., Kachlishvili, E., Khardziani, T., Agathos, S. N., 2010. Effect of aromatic compounds on the production of laccase and manganese peroxidase by white-rot *basidiomycetes*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37(10), 1091-1096. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0757-y>
- Fengel, D., Wegener, G., 1989. *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter de Gruyter.
- Fenice, M., Sermanni, G. G., Federici, F., D'Annibale, A., 2003. Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. *Journal of biotechnology*, 100(1), 77-85. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(02\)00241-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(02)00241-9)
- Floudas, D., Binder, M., Riley, R., Barry, K., Blanchette, R. A., Henrissat, B., ... & Hibbett, D. S., 2012. The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science*, 336(6089), 1715-1719. <https://doi.org/10.1126/science.1221748>
- Fukushima, Y., Kirk, T. K., 1995. Laccase component of the *Ceriporiopsis subvermispora* lignin-degrading system. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(3), 872-876. <https://doi.org/10.1128/aem.61.3.872-876.1995>
- Garcia-Ochoa, F., Gomez, E., 2009. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. *Biotechnology advances*, 27(2), 153-176. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.10.006>
- Goodell, B., Winandy, J. E., Morrell, J. J., 2020. Fungal degradation of wood: Emerging data, new insights and changing perceptions. *Coatings*, 10(12), 1210. <https://doi.org/10.3390/coatings10121210>

- Grimm, L. H., Kelly, S., Krull, R., Hempel, D. C., 2005. Morphology and productivity of filamentous fungi. *Applied microbiology and biotechnology*, 69, 375-384. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0213-5>
- Gronqvist, S., Suurnäkki, A., Niku-Paavola, M. L., Kruus, K., Buchert, J., Viikari, L., 2003. Lignocellulose processing with oxidative enzymes, 855(3), 46-65. <https://doi.org/10.1021/bk-2003-0855.ch003>
- Habtemariam, S., 2020. *Trametes versicolor* (Synn. *Coriolus versicolor*) polysaccharides in cancer therapy: Targets and efficacy. *Biomedicines*, 8(5), 135. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8050135>
- Hailei, W., Guangli, Y., Ping, L., Yanchang, G., Jun, L., Guosheng, L., Jianming, Y., 2009. Overproduction of *Trametes versicolor* laccase by making glucose starvation using yeast. *Enzyme and microbial technology*, 45(2), 146-149. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.04.003>
- He, M. Q., Zhao, R. L., Hyde, K. D., Begerow, D., Kemler, M., Yurkov, A., ... & Kirk, P. M., 2019. Notes, outline and divergence times of *Basidiomycota*. *Fungal diversity*, 99, 105-367. <https://doi.org/10.1007/s13225-019-00435-4>
- Ho, C. H., Henderson, K. A., Rorrer, G. L., 1995. Cell damage and oxygen mass transfer during cultivation of *Nicotiana tabacum* in a stirred-tank bioreactor. *Biotechnology progress*, 11(2), 140-145. <https://doi.org/10.1021/bp00032a004>
- Iqbal, H. M. N., Asgher, M., Bhatti, H. N., 2011. Optimization of physical and nutritional factors for synthesis of lignin degrading enzymes by a novel strain of *Trametes versicolor*. *BioResources*, 6(2), 1273-1287.
- Ivnitski, D., Atanassov, P., 2007. Electrochemical studies of intramolecular electron transfer in laccase from *Trametes versicolor*. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to*

- Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis, 19(22), 2307-2313.
<https://doi.org/10.1002/elan.200703983>
- Ju, L. K., Sundararajan, A., 1994. The effects of cells on oxygen transfer in bioreactors: physical presence of cells as solid particles. *The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal*, 56(1), B15-B21. [https://doi.org/10.1016/0923-0467\(94\)87027-6](https://doi.org/10.1016/0923-0467(94)87027-6)
- Jung, J., & Wicker, L., 2012. Laccase mediated conjugation of sugar beet pectin and the effect on emulsion stability. *Food Hydrocolloids*, 28(1), 168-173.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.12.021>
- Kahraman, S. S., Gurdal, I. H., 2002. Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi. *Bioresource Technology*, 82(3), 215-217.
[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00193-6](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00193-6)
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lang, E., Gonser, A., Zadrazil, F., 2000. Influence of incubation temperature on activity of ligninolytic enzymes in sterile soil by *Pleurotus sp.* and *Dichomitus squalens*. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, 40(1), 33-39.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4028\(200002\)40:1<33::AID-JOBM33>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4028(200002)40:1<33::AID-JOBM33>3.0.CO;2-Q)
- Li, Y., Liu, J., Wang, G., Yang, M., Yang, X., Li, T., Chen, G., 2019. De novo transcriptome analysis of *Pleurotus djamor* to identify genes encoding CAZymes related to the decomposition of corn stalk lignocellulose. *Journal of bioscience and bioengineering*, 128(5), 529-536.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.04.011>
- Liu, J., Cai, Y., Liao, X., Huang, Q., Hao, Z., Hu, M., ... & Li, Z., 2013. 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.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2012.08.004>

Lorenzo, M., Moldes, D., Sanromán, M. Á., 2006. Effect of heavy metals on the production of several laccase isoenzymes by *Trametes versicolor* and on their ability to decolourise dyes. Chemosphere, 63(6), 912-917. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.09.046>

Machuca, A., Ferraz, A., 2001. Hydrolytic and oxidative enzymes produced by white-and brown-rot fungi during *Eucalyptus grandis* decay in solid medium. Enzyme and Microbial Technology, 29(6-7), 386-391. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00417-3](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00417-3)

Madhavi, V., Lele, S. S., 2009. Laccase: properties and applications. BioResources, 4(4).

Mainardi, P. H., Feitosa, V. A., de Paiva, L. B. B., Bonugli-Santos, R. C., Squina, F. M., Pessoa Jr, A., Sette, L. D., 2018. Laccase production in bioreactor scale under saline condition by the marine-derived *basidiomycete Peniophora sp.* CBMAI 1063. Fungal biology, 122(5), 302-309. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.01.009>

Margulis, L., Chapman, M. J., 2009. Kingdoms and domains: an illustrated guide to the phyla of life on Earth. Academic Press.

Márquez, A. L., Wild, G., Midoux, N., 1994. A review of recent chemical techniques for the determination of the volumetric mass-transfer coefficient kLa in gas—liquid reactors. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 33(4), 247-260. [https://doi.org/10.1016/0255-2701\(94\)01006-4](https://doi.org/10.1016/0255-2701(94)01006-4)

Martínez-Morales, F., Bertrand, B., Pasi3n Nava, A. A., Tinoco, R., Acosta-Urdapilleta, L., Trejo-Hernández, M. R., 2015. Production, purification and biochemical characterization of two laccase isoforms produced by *Trametes versicolor* grown on oak sawdust. Biotechnology letters, 37, 391-396. <https://doi.org/10.1007/s10529-014-1679-y>

- Milagres, A. M., Carvalho, W., Ferraz, A., 2011. Topochemistry, porosity and chemical composition affecting enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials. Routes to cellulosic ethanol, 53-72. https://doi.org/10.1007/978-0-387-92740-4_5
- Miller, G. L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
- Mogharabi, M., & Faramarzi, M. A., 2014. Laccase and laccase-mediated systems in the synthesis of organic compounds. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 356(5), 897-927. <https://doi.org/10.1002/adsc.201300960>
- Moldes, D., Lorenzo, M., Sanromán, M. A., 2004. Different proportions of laccase isoenzymes produced by submerged cultures of *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic wastes. *Biotechnology letters*, 26, 327-330. <https://doi.org/10.1023/B:BILE.0000015452.40213.bf>
- Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Gorbacheva, M. A., Shleev, S. V., Yaropolov, A. I., 2007. "Blue" laccases. *Biochemistry (Moscow)*, 72, 1136-1150. <https://doi.org/10.1134/S0006297907100112>
- Munk, L., Andersen, M. L., Meyer, A. S., 2018. Influence of mediators on laccase catalyzed radical formation in lignin. *Enzyme and microbial technology*, 116, 48-56. <https://doi.org/10.1016/j.enzmietec.2018.05.009>
- Oinonen, P., Zhang, L., Lawoko, M., & Henriksson, G., 2015. On the formation of lignin polysaccharide networks in Norway spruce. *Phytochemistry*, 111, 177-184. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.10.027>
- Okamoto, K., Imashiro, K., Akizawa, Y., Onimura, A., Yoneda, M., Nitta, Y., ... & Yanase, H., 2010. Production of ethanol by the white-rot *basidiomycetes Peniophora cinerea* and *Trametes suaveolens*. *Biotechnology letters*, 32, 909-913. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0243-7>

- Ostby, H., Hansen, L. D., Horn, S. J., Eijsink, V. G., Várnai, A., 2020. Enzymatic processing of lignocellulosic biomass: principles, recent advances and perspectives. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology: Official Journal of the Society for Industrial Microbiology and Biotechnology*, 47(9-10), 623-657. <https://doi.org/10.1007/s10295-020-02301-8>
- Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B., Sannia, G., 2000. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and environmental microbiology*, 66(3), 920-924. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.3.920-924.2000>
- Patel, N., Shahane, S., Majumdar, R., Mishra, U., 2019. Mode of action, properties, production, and application of laccase: a review. *Recent patents on biotechnology*, 13(1), 19-32. <https://doi.org/10.2174/1872208312666180821161015>
- Pazarlioglu, N. K., Sarişik, M., Telefoncu, A., 2005. Laccase: production by *Trametes versicolor* and application to denim washing. *Process biochemistry*, 40(5), 1673-1678. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.06.052>
- Pinheiro, V. E., Michelin, M., Vici, A. C., de Almeida, P. Z., Teixeira de Moraes Polizeli, M. D. L., 2020. *Trametes versicolor* laccase production using agricultural wastes: a comparative study in Erlenmeyer flasks, bioreactor and tray. *Bioprocess and biosystems engineering*, 43, 507-514. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02245-z>
- Prasad, K. K., Mohan, S. V., Rao, R. S., Pati, B. R., Sarma, P. N., 2005. Laccase production by *Pleurotus ostreatus* 1804: Optimization of submerged culture conditions by Taguchi DOE methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 24(1), 17-26. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.01.019>
- Prata, A. M. R., Ferraz, A. L., Domingos, M., Silva Junior, J. M., 2011. Biorreator com sistema de agitação e aeração específico para cultivo de células aderentes e/ou sensíveis ao cisalhamento. BR Patent PI. 1003119-7, INPI.

- Rancano, G., Lorenzo, M., Molares, N., Couto, S. R., Sanromán, M. Á., 2003. Production of laccase by *Trametes versicolor* in an airlift fermentor. *Process Biochemistry*, 39(4), 467-473. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(03\)00083-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(03)00083-9)
- Revankar, M. S., Lele, S. S., 2006. Increased production of extracellular laccase by the white rot fungus *Coriolus versicolor* MTCC 138. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 921-926. <https://doi.org/10.1007/s11274-006-9136-2>
- Rodríguez-Delgado, M. M., Alemán-Nava, G. S., Rodríguez-Delgado, J. M., Dieck-Assad, G., Martínez-Chapa, S. O., Barceló, D., & Parra, R., 2015. Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 74, 21-45. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.05.008>
- Roy, B. P., Archibald, F., 1993. Effects of kraft pulp and lignin on *Trametes versicolor* carbon metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(6), 1855-1863. <https://doi.org/10.1128/aem.59.6.1855-1863.1993>
- Ryan, D. R., Leukes, W. D., Burton, S. G., 2005. Fungal bioremediation of phenolic wastewaters in an airlift reactor. *Biotechnology progress*, 21(4), 1068-1074. <https://doi.org/10.1021/bp049558r>
- Saat, M. N., Annuar, M. S. M., Alias, Z., Chuan, L. T., Chisti, Y., 2014. Modeling of growth and laccase production by *Pycnoporus sanguineus*. *Bioprocess and biosystems engineering*, 37, 765-775. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-1046-8>
- Santana, T. T., Linde, G. A., Colauto, N. B., do Valle, J. S., 2018. Metallic-aromatic compounds synergistically induce *Lentinus crinitus* laccase production. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 16, 625-630. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.10.018>
- Scheller, H. V., Ulvskov, P., 2010. Hemicelluloses. *Annual review of plant biology*, 61, 263-289. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112315>
- Schneider, W. D. H., Fontana, R. C., Baudel, H. M., de Siqueira, F. G., Rencoret, J., Gutiérrez, A., ... & Camassola, M., 2020. Lignin degradation and detoxification of eucalyptus wastes by

on-site manufacturing fungal enzymes to enhance second-generation ethanol yield. *Applied Energy*, 262, 114493. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2020.114493>

Schultz, J. S., Gaden, E. L., 1956. Sulfite oxidation as a measure of aeration effectiveness. *Industrial & Engineering Chemistry*, 48(12), 2209-2212.

Sezgintürk, M. K., Odaci, D., Pazarlioğlu, N., Pilloton, R., Dinçkaya, E., Telefoncu, A., & Timur, S., 2010. Construction and comparison of *Trametes versicolor* laccase biosensors capable of detecting xenobiotics. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 38(4), 192-199. <https://doi.org/10.3109/10731191003776777>

Sharma, A., Thakur, V. V., Shrivastava, A., Jain, R. K., Mathur, R. M., Gupta, R., Kuhad, R. C., 2014. Xylanase and laccase based enzymatic kraft pulp bleaching reduces adsorbable organic halogen (AOX) in bleach effluents: a pilot scale study. *Bioresource Technology*, 169, 96-102. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.06.066>

Sharma, K. K., Kuhad, R. C., 2008. Laccase: enzyme revisited and function redefined. *Indian journal of microbiology*, 48, 309-316. <https://doi.org/10.1007/s12088-008-0028-z>

Tang, Y. J., Zhu, L. W., Li, H. M., Li, D. S., 2007. Submerged culture of mushrooms in bioreactors—challenges, current state-of-the-art, and future prospects. *Food Technology and Biotechnology*, 45(3), 221-229.

Tavares, A. P. M., Coelho, M. A. Z., Coutinho, J. A. P., Xavier, A. M. R. B., 2005. Laccase improvement in submerged cultivation: induced production and kinetic modelling. *Journal of chemical technology & biotechnology: international research in process, Environmental & clean technology*, 80(6), 669-676. <https://doi.org/10.1002/jctb.1246>

Tavares, A. P. M., Coelho, M. A. Z., Agapito, M. S. M., Coutinho, J. A. P., Xavier, A. M. R. B., 2006. Optimization and modeling of laccase production by *Trametes versicolor* in a bioreactor using statistical experimental design. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 134, 233-248. <https://doi.org/10.1385/ABAB:134:3:233>

- Terrón, M. C., González, T., Carbajo, J. M., Yagüe, S., Arana-Cuenca, A., Téllez, A., ... & González, A. E., 2004. Structural close-related aromatic compounds have different effects on laccase activity and on lcc gene expression in the ligninolytic fungus *Trametes sp.* I-62. *Fungal Genetics and Biology*, 41(10), 954-962. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2004.07.002>
- Tinoco-Valencia, R., Gómez-Cruz, C., Galindo, E., Serrano-Carreón, L., 2014. Toward an understanding of the effects of agitation and aeration on growth and laccases production by *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Biotechnology*, 177, 67-73. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.02.013>
- Tisma, M., Žnidaršič-Plazl, P., Šelo, G., Tolj, I., Šperanda, M., Bucić-Kojić, A., Planinić, M., 2021. *Trametes versicolor* in lignocellulose-based bioeconomy: State of the art, challenges and opportunities. *Bioresource technology*, 330, 124997. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124997>
- Wang, F., Guo, C., Liu, C. Z., 2013. Immobilization of *Trametes versicolor* cultures for improving laccase production in bubble column reactor intensified by sonication. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 40(1), 141-150. <https://doi.org/10.1007/s10295-012-1214-x>
- Wellington, K. W., & Kolesnikova, N. I., 2012. A laccase-catalysed one-pot synthesis of aminonaphthoquinones and their anticancer activity. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 20(14), 4472-4481. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.05.028>
- Xu, D., Tsai, C. J., Nussinov, R., 1997. Hydrogen bonds and salt bridges across protein-protein interfaces. *Protein engineering*, 10(9), 999-1012. <https://doi.org/10.1093/protein/10.9.999>
- Yaropolov, A. I., Skorobogat'Ko, O. V., Vartanov, S. S., Varfolomeyev, S. D., 1994. Laccase: properties, catalytic mechanism, and applicability. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 49, 257-280. <https://doi.org/10.1007/BF02783061>
- Yoshida, H., 1883. Chemistry of lacquer (urushi). *J. Chem. Soc.*, 43, 472-486. <https://doi.org/10.1039/CT8834300472>

Zheng, F., An, Q., Meng, G., Wu, X. J., Dai, Y. C., Si, J., Cui, B. K., 2017. A novel laccase from white rot fungus *Trametes orientalis*: Purification, characterization, and application. International journal of biological macromolecules, 102, 758-770. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.089>