



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CAMPUS ALTO PARAÓPEBA

**PRODUÇÃO DE ENZIMA LACASE EM BIORREATOR *AIRLIFT* POR
FUNGO LIGNINOLÍTICO *Chrysosporthe cubensis***

Vinícius Moreira Guimarães

Orientador: Prof. Dr. Edson Romano Nucci

Ouro Branco - MG

2018

**PRODUÇÃO DE ENZIMA LACASE EM BIORREATOR *AIRLIFT* POR
FUNGO LIGNINOLÍTICO *Chrysosporthe cubensis***

Vinícius Moreira Guimarães

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
em cumprimento às exigências do Curso de
Bacharelado em Engenharia de Bioprocessos
da Universidade Federal de São João del-Rei.

Orientador: Prof. Dr. Edson Romano Nucci

Ouro Branco - MG

2018

Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso do aluno **Vinícius Moreira Guimarães**, intitulado: “**Produção de Enzima Lacase em Biorreator *Airlift* por Fungo Ligninolítico *Chrysosporthe cubensis***”, orientado pelo **Prof. Dr. Edson Romano Nucci**, apresentado à banca examinadora em Engenharia de Bioprocessos da Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ), em 29 de junho de 2018.

APROVADO EM: _____

Banca Examinadora:

(Assinatura) _____
(Prof. Dr. Edson Romano Nucci)

(Assinatura) _____
(Ma. Katialaine Correa de Araújo)

(Assinatura) _____
(Ma. Paula Resende Vieira)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Ana Cláudia de Lima Moreira, Rogério Faria de Almeida (padrasto) e

Robert Santiago Guimarães (Pai)

À minha querida avó Wilma Maria de Lima Moreira

A meu irmão Vinícius de Paula Almeida

Aos familiares presentes em cada momento

*Aos irmãos cristãos, e amigos que, no decorrer desses anos me apoiaram de infinitas
formas*

*E a você, Sabrina Bertholdo, minha vida, mulher que no amor e amizade eu sempre
esperei, me moldando e me deixando forte hoje e, em breve, por toda a vida.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Jeová Deus por me auxiliar nos estudos seculares.

Agradeço aos professores e orientadores presentes na graduação, Prof.º Edson Romano Nucci, Prof.^a Daniela Leite Fabrino, Prof.^a Flávia Donária Reis, Prof.º Marcelo Perencin de Arruda Ribeiro, Prof.º José Carlos de Magalhães, Prof.^a Isabel Cristina Braga Rodrigues, Prof.^a Sandra de Cássia Dias, Prof.^a Katialaine Correa de Araújo, Prof.º Enio Nazaré De Oliveira Júnior, Prof.º Antônio Helvécio Tótola, Prof.º Bruno Meireles Xavier, e Prof.º Marcel Otávio Cerri por contribuírem no meu aprendizado, me proporcionando a busca pelo conhecimento. Meus sinceros agradecimentos.

Em especial, agradeço ao meu orientador Prof.º Edson Romano Nucci pelas inúmeras oportunidades de Iniciação Científica e aprendizados durante esses 3 anos, resultando na escrita desse, e outros trabalhos.

Aos meus amigos, Paula, Thaís, Leonardo, Raissa e Willer pelo companheirismo, me aguentando a cada dia da graduação. Em especial, a Paula pela troca de conhecimento, me ajudando a vencer vários desafios.

Aos Petianos do PET – Conexões de Saberes – DPCFC

Aos técnicos e companheiros dos Laboratórios da UFSJ/CAP por ajudarem em muitas situações e pela troca de conhecimento.

Em especial, aos técnicos Wesley e Priscila por me ensinarem diversos processos no laboratório.

Aos queridos colegas e funcionários do *Campus* Alto Paraopeba, em especial à Coordenadoria de Engenharia de Bioprocessos, funcionária Nathália que, de pequenas a grandes contribuições, me auxiliou nessa jornada difícil.

Ao Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa/UFV.

A todos que aqui eu não citei, mas que passaram na minha vida de graduando, meu enorme agradecimento.

Frases inspiradoras

“Eu posso, eu consigo, eu sou capaz” – Minha mãe.

*“A primeira etapa para o conhecimento é saber que somos ignorantes” – Sócrates
(470-399 AC).*

RESUMO

O fungo ligninolítico *Chrysosporthe cubensis* é produtor de enzima de interesse biotecnológico, chamada lacase, capaz de catabolizar a oxidação de compostos fenólicos. Visando aumentar a produção enzimática da lacase pelo fungo *Chrysosporthe cubensis* para posterior uso em processos biotecnológicos, neste trabalho propôs verificar a produção da enzima em fermentação submersa, utilizando um biorreator do tipo *Airlift*, e em paralelo, erlenmeyer. As condições ótimas do cultivo em meio mineral foram obtidas aplicando um planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com dois fatores independentes (glicose e farelo de trigo), tendo como resposta a atividade enzimática da lacase. A produção enzimática da lacase em 50,0 ml de meio de cultura em erlenmeyer atingiu 670,0 U/L, em pH 4,26, e 77,22 U/L em pH 4,29 em biorreator com 4,8 L de meio de cultura, utilizando 12,5 g/L de Glicose e 20,0 g/L de Farelo de Trigo como substrato. Resultados demonstraram que houve uma influência efetiva das variáveis na produção enzimática e que o fungo é um potencial produtor da enzima em fermentação submersa. Para promover uma melhor produtividade enzimática, surge a necessidade em alterar os níveis das variáveis estudadas e possíveis ajustes na agitação no cultivo em biorreator.

Palavras – chave: Podridão - branca, Superfície de resposta, *Airlift*, *Chrysosporthe cubensis*, Fermentação submersa.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	11
2.1	Objetivo geral	11
2.2	Objetivos específicos.....	11
3	REVISÃO DA LITERATURA	12
3.1	Fungos Ligninolíticos e o <i>Chrysosporthe cubensis</i>	12
3.2	Enzima Lacase e suas aplicações	13
3.3	Planejamento Experimental.....	14
3.4	Produção da enzima Lacase em Biorreator do tipo <i>Airlift</i>	15
4	METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	18
4.1	Obtenção e Manutenção do Fungo Ligninolítico <i>Chrysosporthe cubensis</i>	18
4.2	Meio de Cultura utilizados em Erlenmeyer e em Biorreator	18
4.3	Otimização da Produção da Enzima Lacase	19
4.3.1	<i>Delineamento de Composto Central Rotacional</i>	20
4.4	Cultivo em Biorreator do tipo <i>Airlif</i> e em Erlenmeyer com variáveis otimizadas	22
4.4.1	<i>Cultivo em Erlenmeyer</i>	23
4.4.2	<i>Cultivo em Biorreator do tipo Airlift</i>	23
4.5	Métodos Analíticos.....	26
4.5.1	<i>Lacase</i>	26
4.5.2	<i>Glicose</i>	27
4.5.3	<i>Potencial Hidrogeniônico</i>	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1	Otimização da variáveis independentes, glicose e farelo de trigo.....	28
5.2	Produção enzimática em Biorreator <i>Airlift</i> e em erlenmeyers com variáveis otimizadas	31
6	CONCLUSÃO	35
7	RECOMENDAÇÕES.....	36
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1 INTRODUÇÃO

O fungo ligninolítico *Chrysosporthe cubensis* é conhecido como um dos patógenos mais importantes de *Eucalyptus spp*, causando sérios danos nessa cultura (HODGES *et al.*, 1979; KIKOT *et al.*, 2009). Por ser um fungo ligninolítico, é capaz de degradar as paredes celulares de plantas através de seu completo enzimático extracelular composto principalmente por β -glicosidase, xilanase, algumas enzimas acessórias, e em destaque a enzima lacase (FALKOSKI *et al.*, 2013; MAITAN-ALFENAS *et al.*, 2015).

Segundo KUDANGA e LE ROES-HILL (2014) por atacar compostos fenólicos derivados da degradação da lignina, a enzima lacase é produzida dentro das células dos fungos ligninolíticos e excretada para o exterior dos filamentos das hifas. Essa característica tem motivado pesquisas de nível acadêmico e industrial na utilização de fungos ligninolíticos e seu complexo enzimático em diversos processos biotecnológicos (COUTO e HERRERA, 2006; RIVA, 2006).

As aplicações práticas da enzima lacase e dos fungos ligninolíticos (fungos de podridão branca) provém da habilidade, apresentada pelos fungos deste grupo, em metabolizar efluentes industriais ricos em compostos fenólicos (TORRES *et al.*, 2003), realizar descoloração de pigmentos utilizados nas indústrias têxteis (CLAUS *et al.*, 2002; COUTO *et al.*, 2004; YESILADA *et al.*, 2003), degradação de herbicidas (MOUGIN *et al.*, 2000) e desreguladores endócrinos (BLÁNQUEZ e GUIEYSSE, 2008) substância essa capaz de interferir no metabolismo de mamíferos (AURIOL *et al.*, 2006; JOBLING *et al.*, 1998)

Em diversos organismos, as lacase extracelulares são produzidas em pequenas quantidades sendo necessário o uso de cultivo submerso ou estado sólido, utilizando biorreatores juntamente com uma otimização das condições de cultivo, através de metodologias estatísticas avançadas para obter uma melhor produção da enzima (COUTO e TOCA-HERRERA, 2007; HESS *et al.*, 2002).

Segundo RODRIGUES e IEMMA (2009), os projetos estatísticos experimentais têm sido muito utilizados como uma estratégia de otimização ou pela busca de condições ideais para uma resposta específica. Por esse motivo, são aplicados na otimização de processos fermentativos para a seleção de variáveis pertinentes ao processo, pois é um sistema de modelagem empírica que avalia a relação entre um grupo de variáveis, que podem ser controlados experimentalmente, com a resposta observada (ABDEL-FATTAH *et al.*, 2005).

De acordo SCHMIDELL *et al.* (2001) os biorreatores são equipamentos usados para converter matéria-prima em produtos utilizando micro-organismos, enzimas, células animais ou vegetais proporcionando condições adequadas para produção dos metabólitos de interesse. Entre os diferentes modelos de biorreatores, existem o biorreator pneumático do tipo *Airlift*, onde a corrente de entrada gasosa é responsável não só pela transferência de massa entre as fases gás e líquido, mas também pela agitação e homogeneização do volume reacional. Por não haver partes móveis, os biorreatores pneumáticos são mais fáceis de projetar e construir em comparação aos fermentadores convencionais, tipo tanque agitado, principalmente em equipamentos de grande escala (CERRI, 2009).

Apesar da capacidade comprovada dos fungos ligninolíticos e suas enzimas lacase terem aplicações biotecnológicas, nenhum trabalho relata a produção da enzima lacase pelo fungo ligninolítico *Chrysosporthe cubensis* em fermentação submersa utilizando biorreator pneumático do tipo *Airlift* com meio de cultura otimizado.

Visando o interesse de utilizar a enzima lacase do fungo *Chrysosporthe cubensis* em processos biotecnológicos, neste trabalho propôs verificar a produção da enzima lacase em fermentação submersa, utilizando um biorreator do tipo *Airlift* em condições ótimas de um meio de cultura mineral com duas variáveis independente como substrato, Glicose e Farelo de Trigo, aplicando um planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Produzir a enzima lacase pelo fungo ligninolítico *Chrysosporthe cubensis* em fermentação submersa utilizando um biorreator pneumático do tipo *Airlift*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influência da Glicose e Farelo de Trigo na produção da enzima lacase;
- Avaliar a produção de lacase nas condições ótimas de cultivo em erlenmeyer e, em biorreator *Airlift*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Fungos Ligninolíticos e o *Chrysosporthe cubensis*

Os fungos degradadores de materiais ligninocelulósicos são responsáveis por contribuir de forma significativa no ciclo do carbono. Graças à ação desses organismos, as hemiceluloses, celulosas e ligninas, ou seja, todo o complexo polimérico existente nos materiais ligninocelulósicos pode ser despolimerizados e, em seus estágios finais de decomposição, convertidos a dióxido de carbono e água, fechando, assim, o ciclo que se iniciou na fotossíntese (FERRAZ, 2004).

O processo de degradação ocorre no exterior da célula fúngica até que metabólitos susceptíveis ao metabolismo intracelular sejam formados. Esse fato faz com que os mecanismos bioquímicos envolvidos em cada etapa sejam complexos. Os agentes causadores desse processo certamente incluem enzimas extracelulares cruciais nas etapas iniciais da biodegradação (KIRK e CULLEN, 1998).

Há dois grupos distintos de fungos que pertencentes à classe dos basidiomicetos, pelas características de seus metabolismos atuam de forma diferenciada sobre os compostos presentes nos materiais ligninocelulósicos: Os chamados “podridão branca” (*white-rot-fungi*) degradam todos os componentes dos lignocelulósicos. Já os fungos “podridão parda” (*soft-rot fungi*), degradam principalmente os polissacarídeos. Dentre o “podridão branca” há dois comportamentos distintos: alguns degradam todos os componentes da parede celular vegetal simultaneamente, enquanto outros atacam preferencialmente a lignina nos estágios iniciais de colonização (FENGEL e WEGENER, 1989; FERRAZ, 2004).

O fungo ligninolítico *Chrysosporthe cubensis* é conhecido como um dos patógenos mais importantes de *Eucalyptus spp*, causando sérios danos nessa cultura (HODGES *et al.*, 1979; KIKOT *et al.*, 2009). Por ser um fungo ligninolítico, é capaz de degradar as paredes celulares de plantas por meio de seu completo enzimático extracelular composto principalmente por β -glicosidase, xilanase, algumas enzimas acessórias, e em destaque a enzima lacase (FALKOSKI *et al.*, 2013; MAITAN-ALFENAS *et al.*, 2015).

Nesse interim, houve relatos na literatura do uso do *C.cubensis* na produção de extrato enzimático em fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo como indutor de enzimas ligninolíticas obtendo maior eficiência na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar do que coquetéis enzimáticos vendido comercialmente (DUTRA *et al.*, 2017). Segundo MAITAN-ALFENAS *et al.* (2015) o extrato enzimático de *C. cubensis*

apresentou maior eficiência na liberação de glicose e xilose do bagaço de cana pré-tratado e alta atividade específica, principalmente com β -glicosidase, endoglucanase, β -xilosidase, pectinase e lacase.

3.2 Enzima lacase e suas aplicações

Lacases (EC 1.10.3.2) são enzimas que pertencem ao grupo das polifenol-oxidases que catalisam a oxidação de monômeros ou compostos fenólicos e alguns não-fenólicos, reduzindo oxigênio molecular à água (BALDRIAN, 2006). Sua atividade foi detectada em diferentes espécies de organismos, como plantas, procariontes, insetos e em destaque fungos ligninolíticos (*Basidiomycetes*) conhecidos por sua eficiente decomposição de lignina, celulose e hemicelulose (CLAUS, 2004; CLAUS *et al.*, 2002; YOSHIDA, 1883).

Durante o processo catalítico da lacase, ocorre a oxidação de substratos fenólicos ou não-fenólicos acoplada à redução de oxigênio molecular, gerando duas moléculas de água. Para cada oxigênio reduzido, quatro moléculas de substrato são oxidadas sem a produção de peróxido de hidrogênio (SOLOMON *et al.*, 2008). Consequentemente, as lacases são consideradas catalisadores “verdes ideias” porque empregam O_2 como co-substrato e gerando H_2O como subproduto. Além disso, apresentam alta estabilidade e podem ser usados de forma imobilizada (LOERA CORRAL *et al.*, 2006).

Na natureza, as lacases estão envolvidas na quebra da lignina, um dos materiais naturais mais resistentes à degradação (EGGERT *et al.*, 1996). Portanto, lacases são capazes de degradar muitos contaminantes orgânicos tendo potencial no controle da poluição e na biorremediação (MAO *et al.*, 2010).

Estudos recentes também descobriram suas várias aplicações no branqueamento, descoloração, biossensor e síntese da celulose (COUTO e HERRERA, 2006). Segundo GONZÁLEZ-GARCÍA *et al.* (2009), a indústria de papel e celulose tem sido considerada uma fonte tradicional de geração de poluição com alto consumo de energia e produtos químicos. Para obter papel de alta qualidade, a biomassa de lignina é removida com o uso de agentes químicos, que geralmente geram vários derivados orgânicos, causando contaminação e toxicidade às condições de vida. A utilização de lacase pode efetivamente reduzir a quantidade de reagentes usados contendo cloro e outros produtos químicos com qualidade de papel simultaneamente melhorada (SADHASIVAM *et al.*, 2010).

A indústria têxtil, outra fonte de poluição ambiental, também pode ser melhorada usando tecnologia enzimática utilizando a lacase no tratamento dos seus efluentes contendo pigmentos (ÖNER E SAHINBASKAN, 2011; WANG *ET AL.*, 2012).

Degradação de herbicidas e desreguladores endócrinos, substância essa capaz de interferir no metabolismo de mamíferos, são outras aplicações da enzima lacase em processos biotecnológicos (AURIOL *et al.*, 2006; BLÁNQUEZ e GUIEYSSE, 2008; JOBLING *et al.*, 1998; MOUGIN *et al.*, 2000).

Todas as abordagens citadas exigiram uma grande quantidade de enzima lacase. Por isso, é necessário continuar com a produção de lacase em diferentes processos, fazendo esforços para reduzir o custo e aumentar a eficiência.

3.3 Planejamento Experimental

Devido às suas aplicações biotecnológicas, os estudos sobre organismos produtores de lacases foram intensificados nos últimos anos e a otimização da produção dessa enzima em diferentes micro-organismos está sendo realizada por vários grupos (BHATTACHARYA *et al.*, 2011; CHHAYA e GUPTE, 2010; QUARATINO *et al.*, 2008). A otimização das condições de cultivo geralmente envolve variação nos níveis de uma variável independente enquanto se fixam outras variáveis em um determinado nível. Essa abordagem de um fator por vez é trabalhosa, demorada e muitas vezes os efeitos de interação dos parâmetros são negligenciados (SIVAKUMAR *et al.*, 2010). Os métodos para determinar como aumentar a produtividade e melhorar a qualidade mudaram de buscas de tentativa e erro dispendiosas e demoradas para os métodos estatísticos poderosos, elegantes e de baixo custo sob a concepção da abordagem experimental (MYERS e MONTGOMERY, 2002).

Segundo RODRIGUES e IEMMA (2009) projetos estatísticos experimentais têm sido muito utilizados como uma estratégia de otimização ou de busca de condições ideais para uma resposta específica. Por se basear em um sistema de modelagem empírica que avalia a relação entre um grupo de variáveis, podem ser controlados experimentalmente, e a resposta observada, têm sido muito utilizados na otimização de processos fermentativos para a seleção de variáveis (JING *et al.*, 2007; RISDIANTO *et al.*, 2013; TIŠMA *et al.*, 2011).

O planejamento experimental associado à análise de superfícies de respostas é uma ferramenta fundamentada na teoria estatística, que fornece informações seguras sobre o

processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro. O planejamento experimental reduz o número de experimentos ou repetições e melhora a qualidade da informação obtida através dos resultados. Permite ainda analisar os fatores simultaneamente, calcular e avaliar o erro experimental, podendo especificar o nível de confiança estatística do experimento e a reprodutibilidade do resultado desejado (LUNDSTEDT *et al.*, 1998).

A seguir, destacam-se alguns benefícios da utilização das técnicas estatísticas de planejamento experimental relatadas por RODRIGUES e IEMMA (2009) :

- Redução do número de ensaios sem prejuízo da qualidade da informação;
- Estudo simultâneo de diversas variáveis, separando seus efeitos;
- Determinação da confiabilidade dos resultados;
- Realização da pesquisa em etapas, num processo iterativo de acréscimo de novos ensaios;
- Seleção das variáveis que influem num processo com número reduzido de ensaios;
- Representação do processo estudado através de expressões matemáticas;
- Elaboração de conclusões a partir de resultados qualitativos.

O planejamento experimental é uma ferramenta essencial no desenvolvimento e aprimoramento de processos, pois permite, além do aprimoramento, a redução da variabilidade de resultados, dos tempos de análise e dos custos envolvidos.

3.4 Produção da enzima lacase em Biorreator do tipo *Airlift*

A aplicação bem-sucedida da lacase requer a produção de altas quantidades de enzimas a baixo custo (BRIJWANI *et al.*, 2010). Segundo OSMA *et al.* (2011) o desenvolvimento de meio de cultura otimizado, uso de resíduos agroindustriais como fonte de carbono e expressão heteróloga de genes da lacase são estratégias usadas para obtenção de maiores produções da enzima. Para fins industriais, também é necessário o desenvolvimento de um sistema de produção eficiente em escala de biorreatores incluindo novos projetos e o uso de modelos matemáticos para controlar o cultivo dos fungos (SONGULASHVILI *et al.*, 2015).

O uso de um biorreator *Airlift* pode ser uma boa estratégia para uma alta taxa de produção da enzima lacase (BONNARME e JEFFRIES, 1990). Por não haver partes móveis e não possuírem agitadores mecânicos, diminuem o risco de contaminação,

demanda de energia e favorecem um ambiente de baixo cisalhamento para os micro-organismos, o que permite uma melhor produção enzimática (TRÄGER *et al.*, 1989).

Os biorreatores *Airlift* são mais fáceis de projetar e construir em comparação aos biorreatores convencionais, tipo tanque agitado, principalmente em equipamentos de grande escala (CERRI, 2005). Na Figura 1, é ilustrado um biorreator *Airlift*.

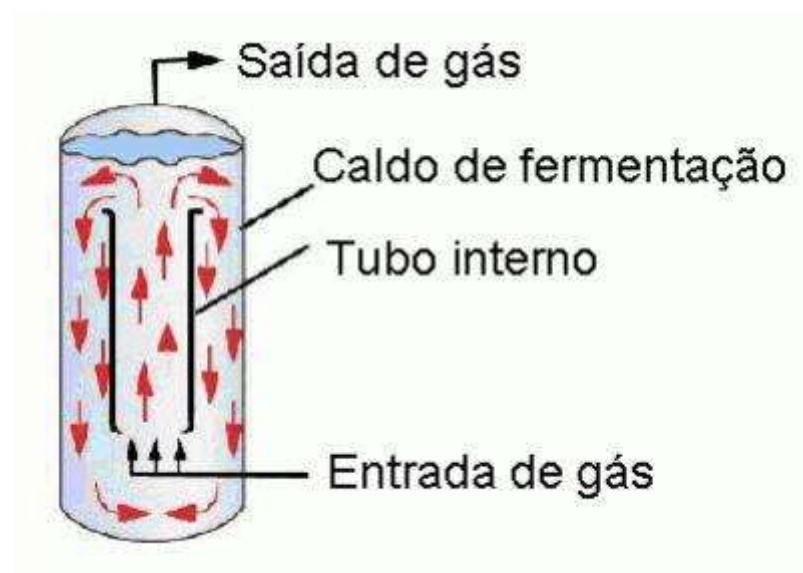


Figura 1 – Desenho esquemático de um Biorreator *Airlift* com circulação interna (CERRI, 2009).

A corrente de entrada gasosa é responsável não só pela transferência de massa entre as fases gás e líquido, mas também pela agitação e homogeneização do volume reacional. O gás é injetado pela base do equipamento através de um distribuidor formando uma dispersão gás-fluido. As bolhas de gás sobem através do líquido contido no tanque contatando-o e deslocando-o, provocando, assim, turbulência e uma auto circulação dirigida. O gás é retirado no topo do equipamento. A turbulência gerada e a grande distância que as bolhas de gás devem atravessar em contato com o líquido promovem altos níveis de transferência de oxigênio que podem operar processos de produção de microrganismos em grande escala sem limitação de oxigênio local (SIEGEL e ROBINSON, 1992).

A transferência de oxigênio em culturas submersas é um fator chave para o crescimento eficiente de fungos, e consequentemente a produção da enzima lacase (GARCIA-OCHOA e GOMEZ, 2009). No entanto, alguns biorreatores *Airlift* não são totalmente adequados para a cultura de fungos Ligninolíticos. Essas classes de fungos geralmente produzem exopolissacarídeos extracelulares que atuam como cola,

promovendo a adesão do micélio às partes proeminentes do biorreator e dos sensores, resultando em aglomeração de micélio, que limita a transferência de oxigênio no equipamento (KIM *et al.*, 2005). Nesse caso, surge a necessidade de se estudar melhores parâmetros e configurações envolvidas no cultivo de fungos ligninolíticos em biorreatores *Airlift* possibilitando uma melhor eficiência na produção da enzima lacase.

Na Tabela 1 é apresentado alguns cultivos de fungos filamentosos em biorreatores *Airlift* em diferentes volumes com o objetivo de se produzir a enzima lacase.

Tabela 1 – Cultivo de diferentes fungos ligninolíticos em biorreatores *Airlift* na produção de enzima lacase. Adaptado de COUTO e TOCA-HERRERA (2007).

Fungo	Volume do Biorreator	Máximo de atividade enzimática da lacase (U/L)	Referência
<i>P. tigrinus</i>	2,5 L	4300	(FENICE <i>et al.</i> , 2003)
<i>T. versicolor</i>	2,0 L	1670	(RANCAÑO <i>et al.</i> , 2003)
<i>T. hirsuta</i>	2,0 L	1043	(DOMÍNGUEZ <i>et al.</i> , 2005)
<i>T. hirsuta</i>	6,0 L	19400	(COUTO <i>et al.</i> , 2006)
<i>Pycnoporus sp</i>	65,0 L	72000	(LIU <i>et al.</i> , 2013)
<i>Peniophora sp</i>	3,5 L	2300	(MAINARDI <i>et al.</i> , 2018)

4 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.1 Obtenção e Manutenção do Fungo Ligninolítico *Chrysosporthe cubensis*

Fungo *Chrysosporthe cubensis*, pertencente à coleção micológica do Laboratório de Patologia Florestal da Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil foi cedido gentilmente para trabalhos realizados na Universidade Federal de São João Del Rei/ Campus Alto Paraopeba, Ouro Branco, MG, Brasil.

C. cubensis foi recebido liofilizado, e a cada 30 dias repicado em placas de petri em condições estéreis contendo meio Ágar Dextrose Batata (BDA) com 4g/L de Infusão de Batata, 20g/L de Dextrose e 15g/L de Ágar como observado na Figura 2. As placas foram incubadas a 28°C, durante 7 dias e, em seguida, armazenadas a 4°C durante 23 dias.



Figura 2 – *Chrysosporthe Cubensis* cultivado por 7 dias a 28°C em placa de petri contendo meio de cultura BDA (Fonte: Arquivo pessoal).

4.2 Meio de Cultura utilizados em Erlenmeyer e em Biorreator

Com o objetivo de produzir enzimas ligninolíticas, entre elas a enzima lacase, *C. cubensis* foi cultivado em fermentação em estado sólido contendo meio de cultura mineral g/L: NH_4NO_3 , 1,0; KH_2PO_4 , 1,5; MgSO_4 , 0,5; CuSO_4 , 0,25; extrato de levedura, 2,0; farelo de trigo, 666,67; além de traços em mg/L: MnCl_2 , 0,1; H_3BO_3 , 0,075; Na_2MoO_4 , 0,02; FeCl_3 , 1,0; ZnSO_4 , 3,5 (FALKOSKI *et al.*, 2013). A concentração de farelo de trigo

utilizada pelo autor foi característica para tornar o meio mais sólido, possibilitando um cultivo em estado sólido. Nesse trabalho, foi utilizado o mesmo meio de cultura para o cultivo do fungo, porém, foi realizado uma adaptação nas concentrações de farelo de trigo para obtenção de um meio de cultura líquido que favoreceria uma fermentação submersa. Também ao meio de cultura foi adicionado Glicose como fonte de carbono.

Como as concentrações de Glicose e Farelo de Trigo foram as variáveis pertinentes adotadas nesse experimento que influenciaria na produção da enzima de interesse, houve variação de suas concentrações de acordo com o planejamento experimental, de 1,93 a 23,04 g/L, e 8,72 a 31,28 g/L respectivamente.

4.3 Otimização da Produção da Enzima lacase

Uma vez comprovada por LADEIRA ÁZAR *et al.* (2018) e FALKOSKI *et al.* (2013) a produção da enzima lacase pelo fungo *C.cubensis* em fermentação em estado sólido, foi realizado um planejamento experimental com o objetivo de verificar a influência das concentrações de Glicose e do Farelo de Trigo na produção da enzima de interesse em fermentação submersa, utilizando erlenmeyers. Obtendo as melhores concentrações, foi realizado um cultivo do micro-organismo em um Biorreator do tipo *Airlift* e, em paralelo, cultivo em erlenmeyer.

O fluxograma da metodologia experimental está descrito na Figura 3, dividindo-a por etapas para simplificar sua visualização.

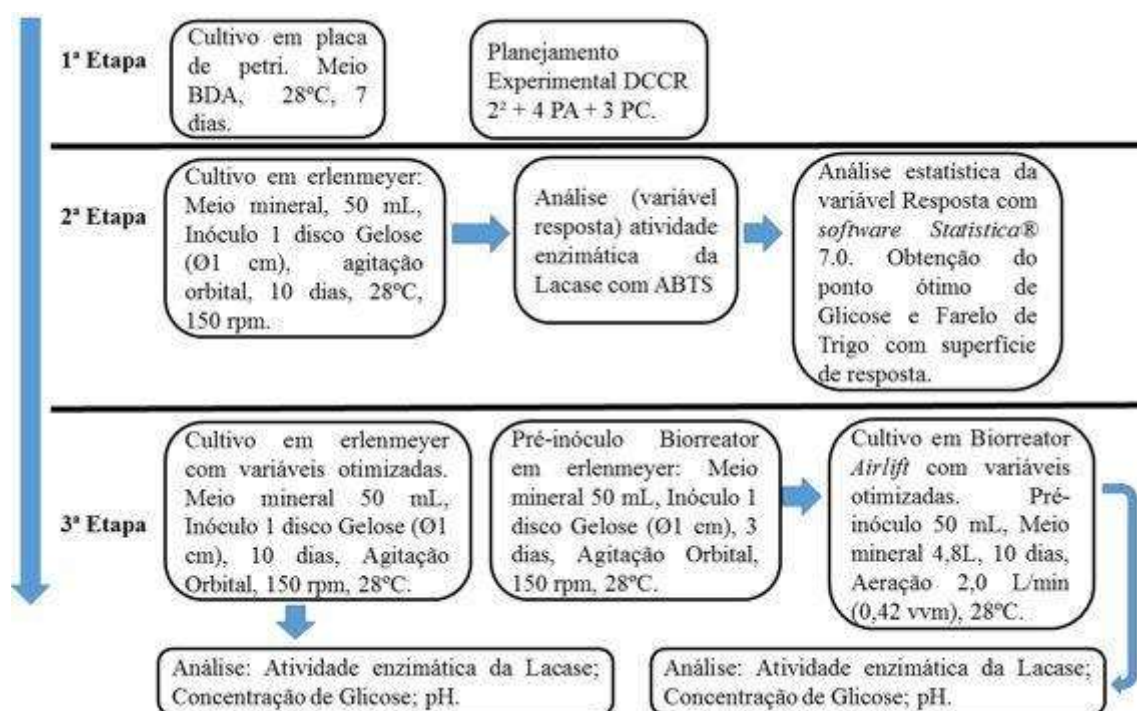


Figura 3 – Fluxograma da metodologia aplicada contendo o cultivo do fungo em placa de petri, planejamento experimental do tipo DCCR, cultivo em erlenmeyer, análise da variável resposta, e cultivo com ponto ótimo em erlenmeyer e em biorreator *Airlift* (Fonte: Arquivo pessoal).

4.3.1 Delineamento de Composto Central Rotacional

Para verificar a relação existente entre diferentes concentrações de Glicose e Farelo de Trigo na atividade enzimática da enzima lacase, foi realizado um planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), do inglês *Central Composite Rotational Design*, 2^2 mais 4 pontos Axiais (PA) e 3 Pontos Centrais (PC), totalizando 11 ensaios em erlenmeyers. Neste planejamento, as concentrações de cada variável independente são codificadas como $-\alpha$, -1 , 0 , $+1$, $+\alpha$ como mostrado na Tabela 2, sendo α dependentes do número de variáveis analisadas (AGHAIE-KHOUSANI *et al.*, 2012).

Tabela 2 - Variáveis utilizadas durante o planejamento experimental DCCR, juntamente com as concentrações relativas a cada nível.

Variáveis independentes	Níveis				
	- 1,41	-1,0	0	1,0	1,41
Glicose (g/L)	1,93	5	12,5	20	23,04
Farelo de trigo (g/L)	8,72	12	20	28	31,28

Em cada erlenmeyer de 250 ml com volume final de 50,0 ml de meio de cultura mineral foi adicionado suas diferentes concentrações de Farelo de Trigo e Glicose conforme os níveis definidos no planejamento obtido pelo *software Statistica® 7.0*, apresentado na Tabela 3. Os frascos foram esterilizados em autoclave a 121°C e 1,5 kgf/cm² por um período de 15 minutos. Em seguida, em cada frasco foi inoculado 1 disco de gelose (Ø1 cm) contendo o fungo cultivado em meio BDA a 28°C por 7 dias.

Tabela 3 - Planejamento experimental do tipo DCCR com 2² mais 4 axiais e 3 pontos centrais (PC) com variáveis independentes, Glicose e Farelo de trigo. Os ensaios foram obtidos com auxílio do *software Statistica® 7.0*.

Ensaio	Variáveis Independentes	
	Glicose	Farelo de Trigo
1	-1,0	-1,0
2	1,0	-1,0
3	-1,0	1,0
4	1,0	1,0
5	-1,41	0
6	1,41	0
7	0	-1,41
8	0	1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0

O cultivo foi realizado em condições assépticas à 28°C, 150 rpm e 10 dias em agitador orbital *shaker* da marca Nova Técnica® para produção da enzima lacase como mostrado na Figura 4.



Figura 4 –*Chrysosporite Cubensis* em erlenmeyers cultivado por 10 dias a 28°C, 150 rpm em agitador orbital (Fonte: Arquivo pessoal).

Ao término do cultivo foi retirado 1,5 ml de amostra de cada ensaio e centrifugado a 14.000 rpm ($14.461,97 \times g$), por 5 minutos, em centrífuga de microtubo (Sigma 1-14). O *pellet* foi descartado e o sobrenadante armazenado a 0°C para posterior análise da atividade enzimática da enzima lacase presente no extrato enzimático.

As análises estatísticas, assim como a superfície de resposta foram obtidas por meio do *software Statistica*® 7.0. A metodologia da superfície de resposta foi utilizada para determinar a influência das variáveis estudadas obtendo as concentrações ótimas de farelo de trigo e glicose para a produção enzimática em erlenmeyer e em Biorreator *Airlift*.

4.4 Cultivo em Biorreator do tipo *Airlif* e em Erlenmeyers com variáveis otimizadas

Conhecendo o ponto ótimo das concentrações de glicose e farelo de trigo analisadas pela metodologia de superfície de resposta obtida pelos resultados do planejamento experimental do tipo DCCR, foi verificado a produção da enzima lacase em fermentação submersa em biorreator e erlenmeyer.

4.4.1 Cultivo em Erlenmeyer

Foram realizados 10 ensaios em erlenmeyers de 250 ml. Em cada ensaio foram adicionados 50 ml de meio mineral acrescidos com as concentrações ótimas de glicose e farelo de trigo obtidas pelo DCCR, 12,5 g/L e 20,0 g/L respectivamente. Os frascos foram esterilizados em autoclave a 121°C e 1,5 kgf/cm² por um período de 15 minutos. Em seguida, em cada frasco foi inoculado 1 disco de gelose (Ø1 cm) contendo o fungo cultivado em meio BDA a 28°C por 7 dias. O cultivo foi realizado à 28°C, 150 rpm e 10 dias em agitador orbital *shaker* da marca Nova Técnica®.

A cada 24h, um frasco de ensaio foi retirado para análise do potencial hidrogeniônico. Deste frasco, 1,5 ml de amostra foi centrifugada a 14.000 rpm (14.461,97 x g), por 5 minutos em centrífuga de microtubo (Sigma 1-14). O *pellet* foi descartado e o sobrenadante armazenado a 0°C para posterior análise da atividade enzimática da enzima lacase presente no extrato enzimático e concentração de Glicose.

4.4.2 Cultivo em Biorreator do tipo Airlift

O aumento de escala da fermentação submersa foi proposto para analisar a produção de enzima lacase utilizando um Biorreator pneumático de 5L, modelo *Airlift*/coluna de bolha da marca TECNAL, com circulação interna proveniente do processo de aeração.

O meio de cultura utilizado foi o meio mineral acrescido com as concentrações ótimas de glicose e farelo de trigo obtidas pelo DCCR, 12,5 g/L e 20,0 g/L respectivamente, com volume final de 4,8 L. As condições operacionais básicas utilizadas no cultivo incluíram temperatura controlada em 28±1°C, e vazão de ar 2,0 L/min (0,42 vvm).

O Biorreator, meio de cultura, filtro de ar, e todo o sistema de tubulações de silicone utilizado para a retirada de amostras e aeração, foram autoclavados a 121°C e 1,5 kgf/cm² por um período de 15 minutos. Em seguida, assim que todos os componentes para a realização do cultivo, juntamente com o biorreator e meio de cultura atingiram temperatura ambiente, foram montados em uma cabine de fluxo laminar vertical. Na Figura 5 é apresentado o biorreator montado para o cultivo. O inóculo foi inserido logo após a adição do meio de cultura.



Figura 5 – Biorreator pneumático de 5L, modelo *Airlift*/coluna de bolha da marca TECNAL em cultivo de *Chrysoporte Cubensis* cultivado por 10 dias a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$, aeração 2,0 L/min (0,42 vvm) com meio mineral acrescido de glicose e farelo de trigo em condição otimizada, 12,5 g/L e 20,0 g/L respectivamente. (Fonte: Arquivo pessoal).

A inoculação foi realizada utilizando um pré-inóculo, apresentado na Figura 6, do fungo cultivado em agitador orbital a 28°C , a 150 rpm por 3 dias em meio mineral contendo com volume final de 50 ml e concentração de glicose 12,5 g/L e farelo de trigo 20,0 g/L.

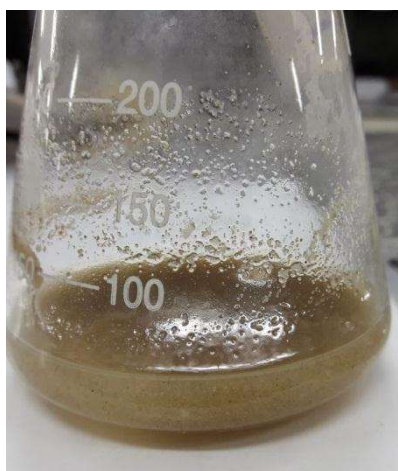


Figura 6 – Pré-inóculo de *Chrysoporte Cubensis* para o cultivo em Biorreator *Airlift* cultivado a 28°C , 150 rpm em agitação orbital por 3 dias, com 50 ml de meio mineral contendo glicose 12,5 g/L e farelo de trigo 20,0 g/L. (Fonte: Arquivo pessoal).

A aeração foi mantida em 2,0 L/min, 0,42 vvm (volume de ar por volume de efluente por minuto) por um sistema externo de aeração contendo uma bomba de vácuo/Compressor da marca Lima – Equipamentos de laboratório e um medidor de vazão/rotâmetro/fluxômetro da marca Unitec, Figura 7. O motivo da utilização desse sistema externo de aeração aconteceu porque o sistema de aeração próprio do biorreator estava com defeito.



Figura 7 – Medidor de vazão de fluxo de Ar com controle em 2,0 L/min (0,42 vvm), utilizado no cultivo do fungo *C. cubensis* em biorreator *Airlift*. (Fonte: Arquivo pessoal)

A temperatura utilizada em *set-point* foi de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ controlada automaticamente pelo programa *Tecbio Soft*, Figura 8, com sistema de troca térmica provida pelo banho termostatzado pertencente ao biorreator encamisado por aço inox.

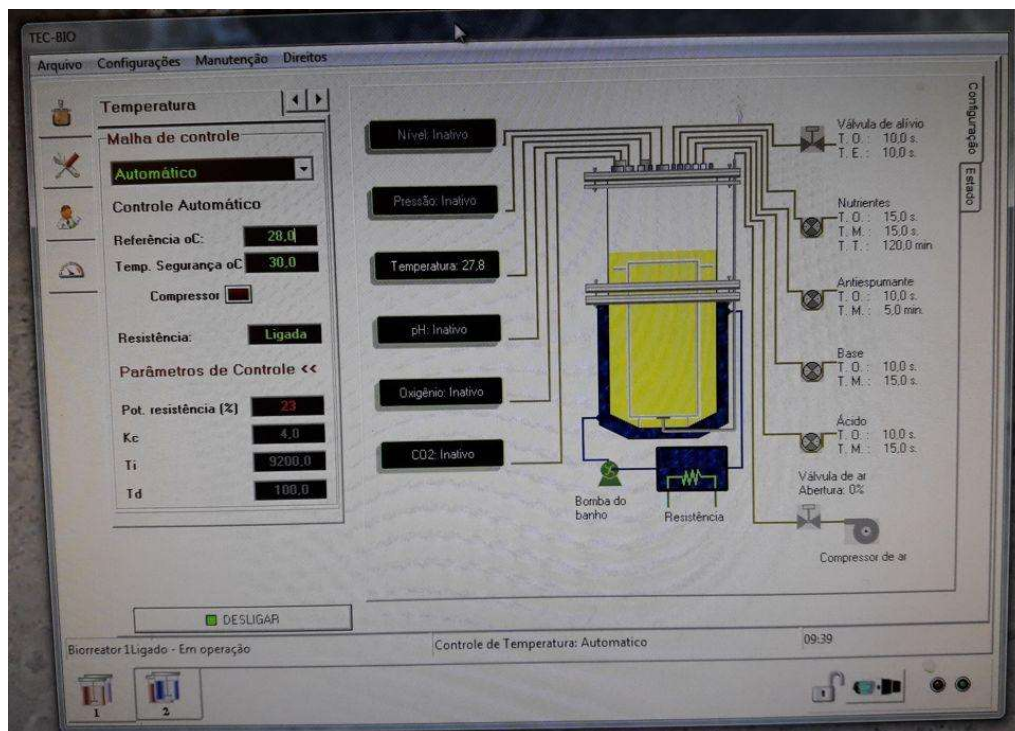


Figura 8 – Tela principal do programa *TecBIO Soft* do Biorreator pneumático de 5L, modelo *Airlift*/coluna de bolha da marca TECNAL com *set-point* a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura. (Fonte: Arquivo pessoal).

A cada 24h foram coletadas 60 ml de amostra utilizando seringa estéril para análise do potencial hidrogeniônico. Dos 60 ml, 1,5 ml de amostra foram centrifugados a 14.000 rpm ($14.461,97 \times g$), por 5 minutos em centrífuga de microtubo (Sigma 1-14). O *pellet* foi descartando e o sobrenadante armazenados a 0°C para posterior análise da atividade enzimática da enzima lacase presente no extrato enzimático e concentração de Glicose.

4.5 Métodos Analíticos

4.5.1 *Lacase*

A análise da atividade enzimática da enzima lacase foi verificada utilizando a metodologia descrita por BOURBONNAIS *et al.* (1998), baseada na oxidação do substrato sintético ABTS (2,2'- azino-bis-etilbentiazolina). Em uma cubeta de 1 ml foram adicionados 300 μL de tampão citrato-fosfato de sódio 50 mM (pH 5,0), 100 μL de água destilada, 100 μL de ABTS 1 mM e 500 μL do extrato enzimático. A leitura foi realizada no espectrofotômetro da marca Biochrom Libra S50 a 420 nm ($\epsilon_{420} = 3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) em intervalos de 10 segundos durante 5 minutos. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que oxida 1 μmol de ABTS por minuto ($U =$

μmol de ABTS oxidado por minuto). O branco foi obtido utilizando todos os reagentes, menos o extrato enzimático, substituído por água destilada.

4.5.2 *Glicose*

A análise de glicose foi realizada de acordo com o kit de Glicose Enzimática Líquida DOLES. O kit baseia-se em um método espectrofotométrico, em que através de um padrão e seus respectivos analitos consegue-se determinar a concentração de glicose presente no meio por absorbância. Ao adicionar glicose a uma solução tampão de fosfatos, contendo p-hidroxibenzoato, 4-aminoantipirina (4-AAP), glicose oxidase e peroxidase processam-se reações em que o produto formado pela oxidação de 4-aminoantipirina (4-antipirilquinonimina) é de coloração avermelhada e sua intensidade diretamente proporcional à concentração de glicose na solução. A cor avermelhada, formada pela reação é medida em espectrofotômetro ou fotocolorímetro, com absorção máxima em 510nm, ou filtro verde.

Para quantificar a glicose pipetou-se 10μL de solução padrão mais 1mL de reagente de cor provenientes do Kit, em um microtubo de 1,5 ml para obter o padrão de acordo com o protocolo. Em outro microtubo pipetou 1 ml de reagente de cor para obter o branco. Para cada amostra foi pipetado 10μL em microtubos mais 1mL de reagente de cor. Em seguida misturou por agitação e incubou os tubos por 5 minutos em banho maria, a 37°C. Procedeu-se à leitura das absorbâncias a 510nm em espectrofotômetro da marca Bioespectro® modelo SSP-220, zerando o aparelho com o branco. A cor final da reação permaneceu estável por 20 minutos, à temperatura ambiente (20 - 30° C). As concentrações de glicose foram obtidas de acordo com a equação:

$$Glicose \left(\frac{mg}{dL} \right) = \left(\frac{\text{Absorbância teste}}{\text{Absorbância padrão}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

4.5.3 *Potencial Hidrogeniônico*

Retirou o eletrodo do pHmetro da marca Digimed da solução de descanso, KCl 3,0M, lavando-o com água destilada. O eletrodo foi calibrado inserindo-o em tampão pH 7,0 e tampão pH 4,0. Em seguida, cada amostra obtida nos cultivos em erlenmeyers e biorreator foram analisadas submergindo o eletrodo na solução, e em cada amostra o eletrodo foi lavado com água destilada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização da variáveis independentes, glicose e farelo de trigo.

Segundo MIKIASHVILI *et al.* (2006) e PRASHER (2015) são muitos os fatores que influenciam a produção de lacase por fungos ligninolíticos em fermentação submersa destacando-se a composição do meio de cultivo, tempo de incubação, inóculo, agitação, aeração, regime de operação, temperatura e pH.

Os dados apresentados referentes a primeira e segunda etapa da metodologia experimental, utilizando um planejamento experimental do tipo DCCR se referem a ensaios conduzidos em diferentes concentrações de glicose e farelo como substrato para o fungo *C.cubensis*. O intuito desse planejamento foi buscar os valores ótimos de concentração das variáveis estudadas que influenciariam positivamente na melhor produção da enzima lacase em erlenmeyer e em biorreator.

Os resultados da atividade enzimática da lacase produzida pelo fungo *C. cubensis* em diferentes concentrações de Glicose e Farelo de Trigo, durante 10 dias de cultivo é apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Planejamento experimental do tipo DCCR com 2² mais 4 axiais e 3 pontos centrais (PC) variando concentração de Glicose (g/L) e Farelo de Trigo (g/L) obtendo resposta de atividade enzimática da lacase (U/L).

Ensaio	Glicose (g/L)	Farelo de Trigo (g/L)	Atividade Enzimática da lacase (U/L)
1	-1 (5,0)	-1 (12,0)	4,22
2	+1 (20,0)	-1 (12,0)	22,78
3	-1 (5,0)	+1 (28,0)	27,33
4	+1 (20,0)	+1 (28,0)	9,44
5	-1,41 (1,925)	0 (20,0)	25,67
6	1,41 (23,035)	0 (20,0)	8,56
7	0 (12,5)	-1,41 (8,72)	6,44
8	0 (12,5)	1,41 (31,28)	16,44
9	0 (12,5)	0 (20,0)	49,00
10	0 (12,5)	0 (20,0)	34,89
11	0 (12,5)	0 (20,0)	72,44

Observa-se que os melhores resultados de atividade enzimática, 49,0, 34,89 e 72,44 U/L foram obtidos com concentrações de glicose e farelo de trigo, 12,5 e 20,0 g/L respectivamente, valores estes presentes nos pontos centrais do planejamento.

Devido à grande variabilidade em processos enzimáticos, foram considerados significativos as variáveis com p menores que 5% ($p < 0,05$). Este valor está diretamente relacionado com a probabilidade do efeito das variáveis testadas ser devido a casualidade e não às variáveis propriamente ditas. Valores próximos a zero possuem probabilidade ínfima de terem sido ocasionados pelo acaso (RODRIGUES e IEMMA, 2009).

Pela análise do Diagrama de Pareto, apresentado na Figura 9, observou-se que as variáveis estudadas, glicose e farelo de trigo em termo quadrático, foram estatisticamente significativas quando a variável resposta for a produção da enzima lacase nos níveis adotados no planejamento experimental, pois obtiveram p menos que 5% ($p < 0,05$).

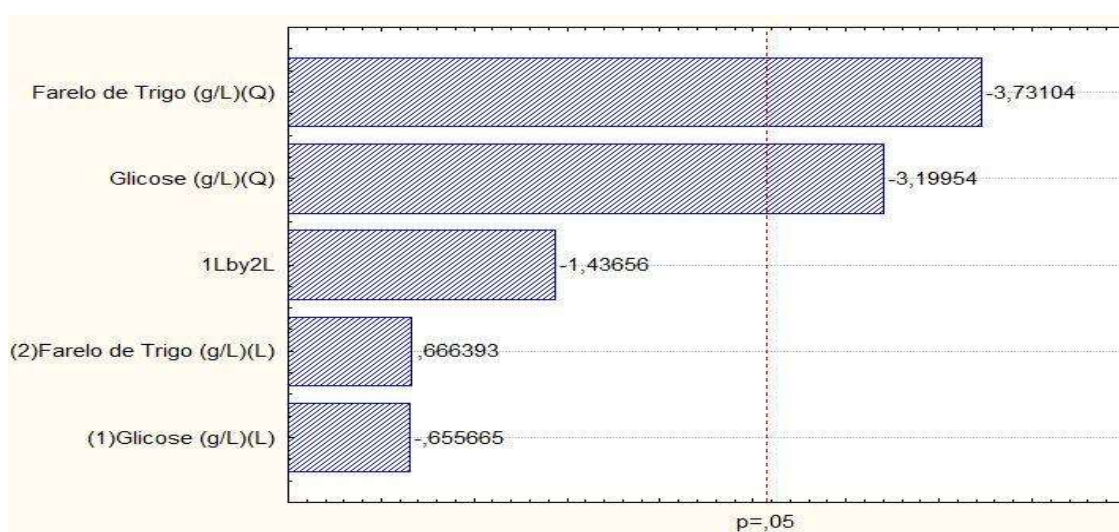


Figura 9 - Diagrama de Pareto com o comportamento da atividade enzimática da lacase (U/L) em relação à concentração de Glicose (g/L) e Farelo de Trigo (g/L) (Fonte: *software Statistica® 7.0*).

Não foram significativos o termo linear da glicose, farelo de trigo e a interação entre glicose e farelo de trigo, tendo sido incorporados aos resíduos para o cálculo da ANOVA apresentados na Tabela 5.

Tabela 5- Valores da ANOVA para a atividade enzimática da enzima lacase do fungo *C.ubensis* em relação à concentração de Glicose e Farelo de Trigo.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados Médios	Fcalculado
Regressão	3491,93	3	1163,97	10,12
Resíduo	804,74	7	114,96	
Total	4296,72	10		

$F_{tab(3;7;0,05)} = 4,35$ e $F_{calc} = 10,12$

O valor do F calculado foi 10,12 num limite de confiança de 95% sendo o modelo experimental altamente significativo.

Com o objetivo de verificar o ponto ótimo de produção da enzima lacase, foi gerado o gráfico de Superfície de Resposta ilustrado na Figura 10, onde pode-se visualizar que a tendência aos melhores valores para as concentrações das variáveis estudadas está em torno de 12,5 g/L de Glicose e 20,0 g/L de Farelo de Trigo (pontos centrais do planejamento de experimento), havendo uma relação direta no aumento de ambas as concentrações.

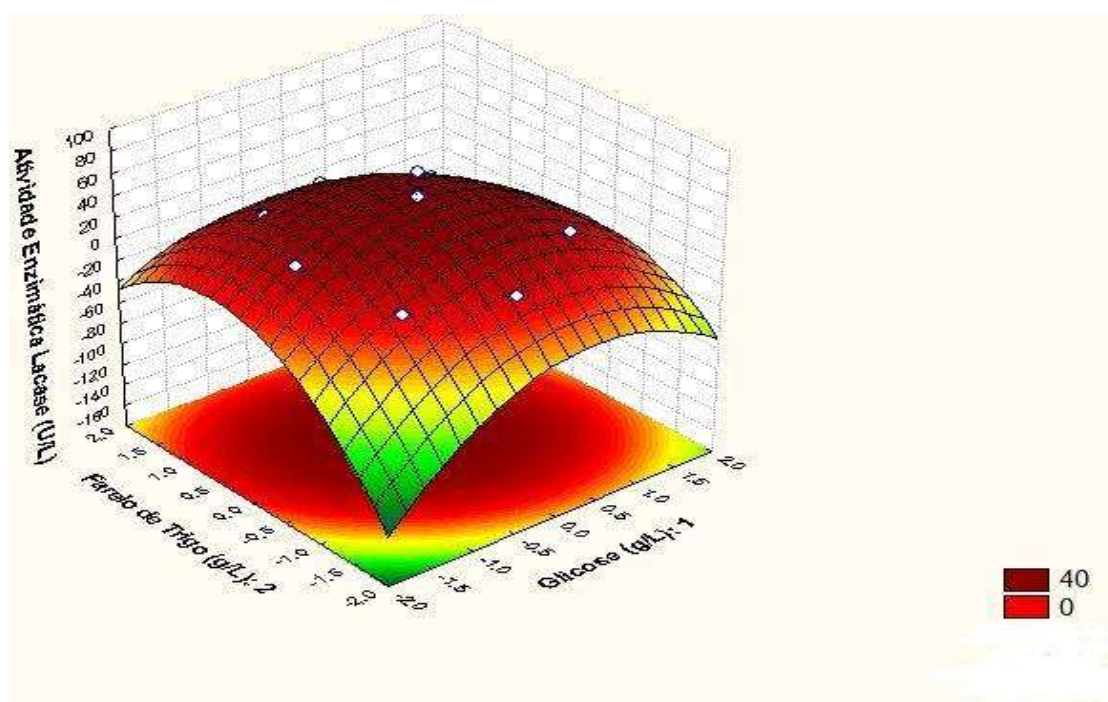


Figura 10 - Superfície de resposta com o comportamento da atividade enzimática da lacase (U/L) em relação à concentração de Glicose (g/L) e Farelo de Trigo (g/L) (Fonte: *software Statistica® 7.0*).

Para não haver a necessidade de se realizar vários cultivos em diferentes concentrações de glicose e farelo de trigo, os resultados obtidos na primeira e segunda fase desse trabalho, utilizando o DCCR foram cruciais para determinar os pontos ótimos das concentrações analisadas, possibilitando apenas um cultivo em erlenmeyer e em biorreator realizados na fase três.

5.2 Produção enzimática em Biorreator *Airlift* e em erlenmeyers com variáveis otimizadas

Nos ensaios conduzidos em erlenmeyer e em biorreatores *Airlift* utilizando valores ótimos de concentração de glicose e farelo de trigo buscou-se avaliar a síntese de lacases pelo fungo *C.cubensis*, assim como a mudança de pH do meio de cultura e os consumos de glicose durante 10 dias de cultivo.

Na Figura 11, os perfis de produção de lacases mostram que foi obtido atividade enzimática, tanto em erlenmeyer Figura (11A) como em biorreator *Airlift* Figura (11B), atingindo picos de 670,00 e 77,22 U/L, respectivamente.

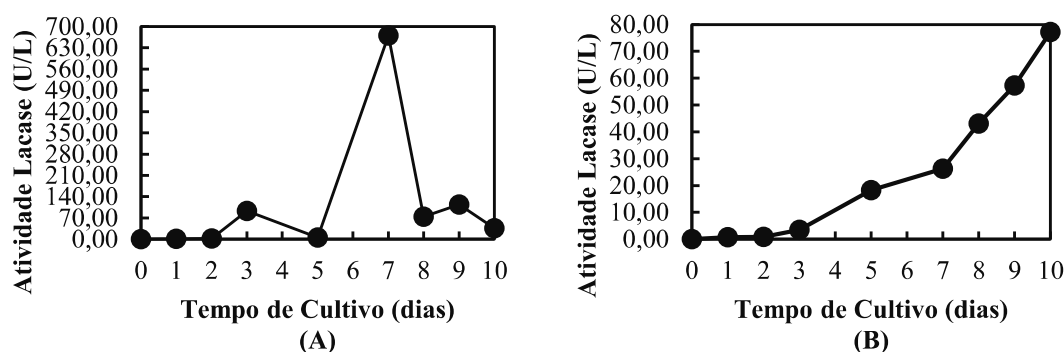


Figura 11 – Atividade enzimática da enzima lacase em 10 dias de cultivo, (A) em erlenmeyer; (B) em Biorreator *Airlift*.

O resultado apresentado mostra maior produção de enzima lacase em erlenmeyer do que em um biorreator. Esse fato pode ter ocorrido pela seguinte hipótese: Por causa da alta concentração de biomassa, começou a se formar aglomerados a partir do quinto dia de cultivo promovendo e alta viscosidade do meio. Como consequência, houve baixa movimentação do meio de cultura, vazão e concentração de oxigênio.

Segundo KIM *et al.* (2005) essa alta viscosidade é proveniente da alta concentração de biomassa e produção de exopolissacarídeos extracelulares por fungos ligninolíticos quando cultivados em biorreatores *Airlift*. Esses exopolissacarídeos extracelulares atuam como cola, promovendo a adesão do micélio às partes proeminentes do biorreator, no caso o canal que alimenta com oxigênio, e dos sensores, resultando em aglomeração de micélio, que limita transferência de oxigênio no equipamento. Esses efeitos são indesejados, pois desacelera e reduz a produtividade enzimática.

Na Figura 12 é possível verificar no início do cultivo uma menor biomassa fúngica, Figura (12A), comparada com o sexto dia de cultivo no biorreator *Airlift* Figura (12B).

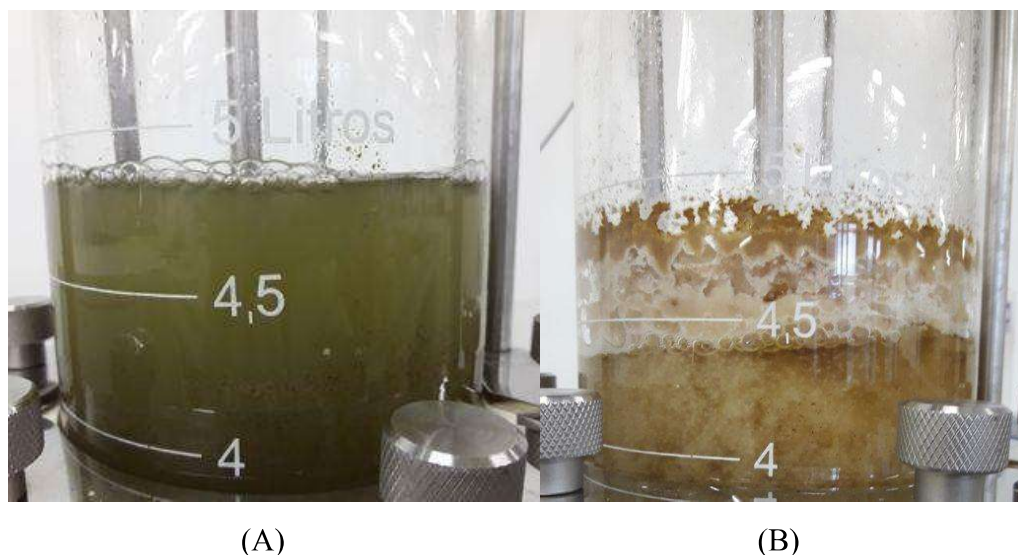


Figura 12 – Biomassa fúngica apresentada no início do cultivo (A), e no sexto dia de cultivo em biorreator *Airlit* (B) (Fonte: Arquivo Pessoal).

A produtividade da enzima lacase, mesmo em baixas concentrações, no cultivo do biorreator, mostrou que houve uma cinética de produção sem nenhum declínio, durante os 10 dias de cultivo, provando que se não fosse as condições de má agitação do meio, possivelmente atingiria picos de atividade enzimática próximos ou até superiores que os apresentados em erlenmeyer.

MAITAN-ALFENAS *et al.* (2015) relatou uma atividade enzimática da lacase de 2660 U/L pelo fungo *C.cubensis* cultivado em fermentação em estado sólido com farelo de trigo como substrato. Pelos resultados apresentados de atividade enzimática em erlenmeyer e em biorreator, 670,00 e 77,22 U/L, respectivamente, foi possível verificar uma melhor produção em fermentação em estado sólido do que em fermentação submersa pelo fungo *C.cubensis*. Esse fato não conclui que a fermentação em estado sólido é mais viável do que a fermentação submersa. Pelo contrário, segundo COUTO e TOCA-HERRERA (2007) a fermentação submersa promove melhores condições de controle dos parâmetros envolvidos no cultivo e menor tempo de produção de enzimas ligninolíticas.

Surge então a necessidade em melhorar o processo de produção da enzima lacase em biorreator *Airlift* pelo fungo *C.cubensis* através de mudanças nos parâmetros e configurações utilizados, como por exemplo, mudanças nos níveis de planejamento

experimental, e agitação do meio de cultura para então se obter melhor produção enzimática próximas ao cultivo em fermentação em estado sólido.

Na Figura 13 é apresentado o perfil de consumo de glicose no cultivo em erlenmeyer Figura (13A) e em biorreator Figura (12B).

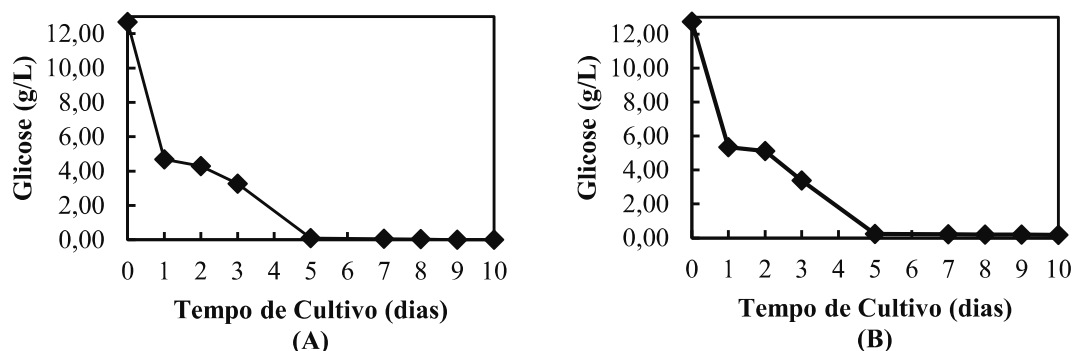


Figura 13 – Perfil do consumo de Glicose em 10 dias de cultivo, (A) em erlenmeyer; (B) em Biorreator *Airlift*.

Pelo perfil de decréscimo do substrato glicose do fungo *C.cubensis* em fermentação submersa, pode-se observar um consumo característico aos cultivos de fungos ligninolítico já realizados em fermentação submersa apresentados na literatura (LIU *et al.*, 2013; RANCAÑO *et al.*, 2003).

É notório também que a produção de lacase manteve-se após o consumo total de glicose, confirmando que o fungo ligninolítico passou a usar a fonte de substrato, farelo de trigo, para crescimento e produção enzimática (DUTRA *et al.*, 2017).

Em cultivos submersos realizados em biorreator *Airlift* de 65 L, LIU *et al.* (2013) mostraram que lacases foram as principais enzimas produzidas por *Pycnoporus sp.*, com decréscimo de pH nos primeiros dias de cultivo, assim como observado na Figura 14 para *C.cubensis* (pH de 6 a 4).

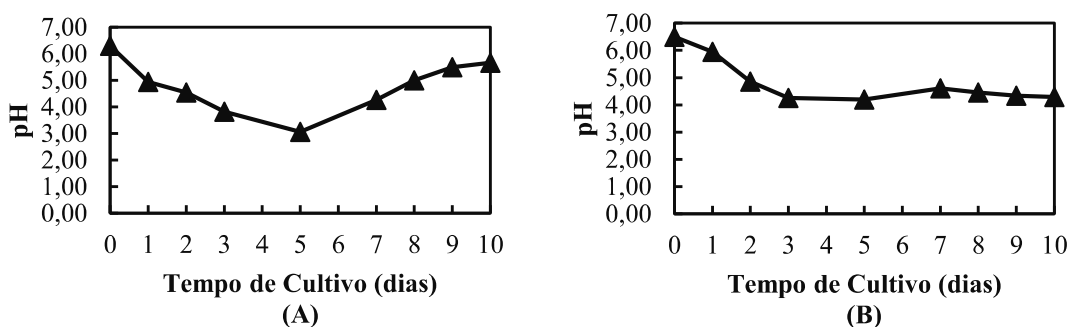


Figura 14 – Perfil do pH do meio de cultura em 10 dias de cultivo, (A) em erlenmeyer; (B) em Biorreator *Airlift*.

Observa-se também que a atividade enzimática nos cultivos em erlenmeyer e em biorreator, tiveram pico máximo em pH 4,26 e 4,29 respectivamente, indo de acordo com a atividade enzimática característica da lacase em pH ácido (RIVERA-HOYOS *et al.*, 2013).

6 CONCLUSÃO

Os valores obtidos de atividade enzimática da lacase pelo fungo *C.cubensis* em biorreator *Airlift*, 77,22 U/L demonstraram que é possível sua produção em volumes maiores que os utilizados em erlenmeyer, 670,0 U/L, mas necessitando melhores ajustes nos parâmetros e configurações utilizados no biorreator que promovam uma potencialidade na produção enzimática superiores ao cultivo em erlenmeyer e em fermentação em estado sólido mostrados por MAITAN-ALFENAS *et al.* (2015). Já os resultados apresentados pela metodologia de superfície de resposta, juntamente com o planejamento experimental do tipo DCCR, possibilitaram uma melhor verificação da influência efetiva das variáveis independentes, glicose e farelo de trigo na produção da enzima.

7 RECOMENDAÇÕES

Como o fungo é um potencial produtor da enzima lacase, pode-se verificar em trabalhos futuros uma melhor influência das variáveis adotadas nesse trabalho através da mudança dos níveis utilizados no DCCR, e ajustes que promovam uma fluidez do meio permitindo uma melhor agitação no cultivo do fungo em biorreator. Todas essas mudanças podem auxiliar em melhores valores de produtividade enzimática para posterior aplicações em processos industriais.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-FATTAH, Y. R.; SAEED, H. M.; GOHAR, Y. M.; EL-BAZ, M. A. Improved production of *Pseudomonas aeruginosa uricase* by optimization of process parameters through statistical experimental designs. **Process Biochemistry**. Issue 5, v.40, p.1707-1714, 2005.
- AGHAIE-KHOUSANI, M.; FOROOTANFAR, H.; MOSHFEGH, M.; KHOSHAYAND, M. R.; FARAMARZI, M. A. Decolorization of some synthetic dyes using optimized culture broth of laccase producing ascomycete *Paraconiothyrium variabile*. **Biochemical Engineering Journal**. v.60, p.9-15, 2012.
- AURIOL, M.; FILALI-MEKNASSI, Y.; TYAGI, R. D.; ADAMS, C. D.; SURAMPALLI, R. Y. Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge. **Process Biochemistry**. Issue 3, v.41, p.525-539, 2006.
- BALDRIAN, P. Fungal laccases - occurrence and properties. **FEMS Microbiol Rev**. Issue 2, v.30, p.215-42, 2006.
- BHATTACHARYA, S. S.; GARLAPATI, V. K.; BANERJEE, R. Optimization of laccase production using response surface methodology coupled with differential evolution. **New Biotechnology**. Issue 1, v.28, p.31-39, 2011.
- BLÁNQUEZ, P.; GUIEYSSE, B. Continuous biodegradation of 17 β -estradiol and 17 α -ethynylestradiol by *Trametes versicolor*. **Journal of Hazardous Materials**. Issue 2, v.150, p.459-462, 2008.
- BONNARME, P.; JEFFRIES, T. W. Mn(II) Regulation of Lignin Peroxidases and Manganese-Dependent Peroxidases from Lignin-Degrading White Rot Fungi. **Applied and Environmental Microbiology**. Issue 1, v.56, p.210-217, 1990.
- BOURBONNAIS, R.; LEECH, D.; PAICE, M. G. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**. Issue 3, v.1379, p.381-390, 1998.
- BRIJWANI, K.; RIGDON, A.; VADLANI, P. V. Fungal Laccases: Production, Function, and Applications in Food Processing. **Enzyme Research**. v.2010, p.10, 2010.
- CERRI, M. O. **Avaliação de Transferência de Calor e Massa de um Biorreator Airlift de circulação interna de bancada para a produção de Ácido Clavulânico**. Universidade Federal de São Carlos, 2005.
- CERRI, M. O. **Hidrodinâmica e transferência de oxigênio em três biorreatores airlift de circulação interna geometricamente semelhantes**. Universidade Federal de São Carlos, 2009.
- CHHAYA, U.; GUPTE, A. Optimization of media components for laccase production by litter dwelling fungal isolate *Fusarium incarnatum* LD-3. **J Basic Microbiol**. Issue 1, v.50, p.43-51, 2010.

CLAUS, H. Laccases: structure, reactions, distribution. **Micron**. Issue 1, v.35, p.93-96, 2004.

CLAUS, H.; FABER, G.; KÖNIG, H. **Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases**, 2002.

COUTO, S. R.; HERRERA, J. L. T. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. **Biotechnology Advances**. Issue 5, v.24, p.500-513, 2006.

COUTO, S. R.; RODRIGUEZ, A.; PATERSON, R. R.; LIMA, N.; TEIXEIRA, J. A. Laccase activity from the fungus *Trametes hirsuta* using an air-lift bioreactor. **Lett Appl Microbiol**. Issue 6, v.42, p.612-6, 2006.

COUTO, S. R.; TOCA-HERRERA, J. L. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. **Biotechnology Advances**. Issue 6, v.25, p.558-569, 2007.

COUTO, S. R. G.; SANROMÁN, M. A.; HOFER, D.; GÜBITZ, G. M. Stainless steel sponge: a novel carrier for the immobilisation of the white-rot fungus *Trametes hirsuta* for decolourization of textile dyes. **Bioresource Technology**. Issue 1, v.95, p.67-72, 2004.

DOMÍNGUEZ, A.; S., R. C.; SANROMÁN, M. A. Dye decolourization by *Trametes hirsuta* immobilised into alginate beads. **World J Microbiol Biotechnol**. 2005.

DUTRA, T. R.; GUIMARÃES, V. M.; VARELA, E. M.; FIALHO, L. D. S.; MILAGRES, A. M. F.; FALKOSKI, D. L.; ZANUNCIO, J. C.; REZENDE, S. T. D. A *Chrysosporthe cubensis* enzyme cocktail produced from a low-cost carbon source with high biomass hydrolysis efficiency. **Scientific Reports**. v.7, p.3893, 2017.

EGGERT, C.; TEMP, U.; ERIKSSON, K. E. The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. **Appl Environ Microbiol**. Issue 4, v.62, p.1151-8, 1996.

FALKOSKI, D. L.; GUIMARÃES, V. M.; DE ALMEIDA, M. N.; ALFENAS, A. C.; COLODETTE, J. L.; DE REZENDE, S. T. *Chrysosporthe cubensis*: A new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. **Bioresource Technology**. v.130, p.296-305, 2013.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood Chemistry, Ultrastructure and Reactions**: Walter de Gruyter. Berlin, 1989.

FENICE, M.; GIOVANNONZI SERMANI, G.; FEDERICI, F.; D'ANNIBALE, A. Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *Panus tigrinus* on olive mill wastewater-based media. **Journal of Biotechnology**. Issue 1, v.100, p.77-85, 2003.

FERRAZ, A. L. **Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos**. In: E. Esposito e J. L. Azevedo (Ed.). Fungos: uma introdução a biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: EDUSC, 2004. Fungos decompositores de materiais lignocelulósicos

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. **Biotechnology Advances**. Issue 2, v.27, p.153-176, 2009.

GONZÁLEZ-GARCÍA, S.; HOSPIDO, A.; MOREIRA, M. T.; ROMERO, J.; FEIJOO, G. Environmental impact assessment of total chlorine free pulp from *Eucalyptus globulus* in Spain. **Journal of Cleaner Production**. Issue 11, v.17, p.1010-1016, 2009.

HESS, J.; LEITNER, C.; GALHAUP, C.; D KULBE, K.; HINTERSTOISSER, B.; STEINWENDER, M.; HALTRICH, D. **Enhanced Formation of Extracellular Laccase Activity by the White-Rot Fungus *Trametes multicolor***, 2002.

HODGES, C. S.; GEARY, T. F.; CORDELL, C. E. The occurrence of *Diaporthe cubensis* on *Eucalyptus* in Florida, Hawaii, and Puerto Rico. **Plant Disease Reporter**. Issue 3, v.63, p.216-220, 1979.

JING, D.; LI, P.; STAGNITTI, F.; XIONG, X. Optimization of laccase production from *Trametes versicolor* by solid fermentation. **Canadian Journal of Microbiology**. Issue 2, v.53, p.245-251, 2007.

JOBLING, S.; NOLAN, M.; TYLER, C. R.; BRIGHTY, G.; SUMPTER, J. P. Widespread Sexual Disruption in Wild Fish. **Environmental Science & Technology**. Issue 17, v.32, p.2498-2506, 1998.

KIKOT, G. E.; HOURS, R. A.; ALCONADA, T. M. Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*: a review. **J Basic Microbiol**. Issue 3, v.49, p.231-41, 2009.

KIM, H. O.; LIM, J. M.; JOO, J. H.; KIM, S. W.; HWANG, H. J.; CHOI, J. W.; YUN, J. W. Optimization of submerged culture condition for the production of mycelial biomass and exopolysaccharides by *Agrocybe cylindracea*. **Bioresource Technology**. Issue 10, v.96, p.1175-1182, 2005.

KIRK, T. K.; CULLEN, D. **Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry**: John Wiley & Sons. New York, 1998.

KUDANGA, T.; LE ROES-HILL, M. Laccase applications in biofuels production: current status and future prospects. **Appl Microbiol Biotechnol**. Issue 15, v.98, p.6525-42, 2014.

LADEIRA ÁZAR, R. I. S.; MORGAN, T.; DOS SANTOS, A. C. F.; DE AQUINO XIMENES, E.; LADISCH, M. R.; GUIMARÃES, V. M. Deactivation and activation of lignocellulose degrading enzymes in the presence of laccase. **Enzyme and Microbial Technology**. v.109, p.25-30, 2018.

LIU, J.; CAI, Y.; LIAO, X.; HUANG, Q.; HAO, Z.; HU, M.; ZHANG, D.; LI, Z. Efficiency of laccase production in a 65-L air-lift reactor for potential green industrial and environmental application. **Journal of Cleaner Production**. v.39, p.154-160, 2013.

LOERA CORRAL, O.; PÉREZ PÉREZ, M. C. I.; BARBOSA RODRÍGUEZ, J. R.; VILLASEÑOR ORTEGA, F.; GUEVARA-GONZÁLEZ, R. G.; TORRES-PACHECO, I. Laccases. **Advances in Agricultural and Food Biotechnology**. p.323-340, 2006.

LUNDSTEDT, T.; SEIFERT, E.; ABRAMO, L.; THELIN, B.; NYSTRÖM, Å.; PETTERSEN, J.; BERGMAN, R. Experimental design and optimization. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**. Issue 1, v.42, p.3-40, 1998.

MAINARDI, P. H.; FEITOSA, V. A.; BRENELLI DE PAIVA, L. B.; BONUGLI-SANTOS, R. C.; SQUINA, F. M.; PESSOA, A.; SETTE, L. D. Laccase production in bioreactor scale under saline condition by the marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063. **Fungal Biology**. Issue 5, v.122, p.302-309, 2018.

MAITAN-ALFENAS, G. P.; VISSER, E. M.; ALFENAS, R. F.; NOGUEIRA, B. R. G.; DE CAMPOS, G. G.; MILAGRES, A. F.; DE VRIES, R. P.; GUIMARÃES, V. M. The influence of pretreatment methods on saccharification of sugarcane bagasse by an enzyme extract from *Chrysosporthe cubensis* and commercial cocktails: A comparative study. **Bioresource Technology**. v.192, p.670-676, 2015.

MAO, L.; LU, J.; HABTESELASSIE, M.; LUO, Q.; GAO, S.; CABRERA, M.; HUANG, Q. Ligninase-Mediated Removal of Natural and Synthetic Estrogens from Water: II. Reactions of 17 β -Estradiol. **Environmental Science & Technology**. Issue 7, v.44, p.2599-2604, 2010.

MIKIASHVILI, N.; P. WASSER, S.; NEVO, E.; ELISASHVILI, V. **Effect of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity**, 2006.

MOUGIN, C.; BOYER, F.-D.; CAMINADE, E.; RAMA, R. Cleavage of the Diketetonitrile Derivative of the Herbicide Isoxaflutole by Extracellular Fungal Oxidases. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Issue 10, v.48, p.4529-4534, 2000.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C. **Response Surface Methodology: Process and Product in Optimization Using Designed Experiments**: John Wiley & Sons. New York, 2002.

ÖNER, E.; SAHINBASKAN, B. Y. A new process of combined pretreatment and dyeing: REST. **Journal of Cleaner Production**. Issue 14, v.19, p.1668-1675, 2011.

OSMA, J. F.; TOCA-HERRERA, J. L.; RODRIGUEZ-COUTO, S. Cost analysis in laccase production. **J Environ Manage**. Issue 11, v.92, p.2907-12, 2011.

PRASHER, I. B. **Effect of Carbon and Nitrogen Sources on the Growth, Reproduction and Ligninolytic Enzymes Activity of *Dictyoarthrinium Synnematicum*** Somrith Prasher IB* , Chauhan R, 2015.

QUARATINO, D.; CIAFFI, M.; FEDERICI, E.; D'ANNIBALE, A. Response surface methodology study of laccase production in *Panus tigrinus* liquid cultures. **Biochemical Engineering Journal**. Issue 2, v.39, p.236-245, 2008.

RANCAÑO, G.; LORENZO, M.; MOLARES, N.; RODRÍGUEZ COUTO, S.; SANROMÁN, M. Á. Production of laccase by *Trametes versicolor* in an airlift fermentor. **Process Biochemistry**. Issue 4, v.39, p.467-473, 2003.

RISDIANTO, H.; SOFIANTI, E.; SUHARDI, S. H.; SETIADI, T. **Optimization of Laccase Production using White Rot Fungi and Agricultural Wastes in Solid-State Fermentation**, 2013.

RIVA, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. **Trends in Biotechnology**. Issue 5, v.24, p.219-226, 2006.

RIVERA-HOYOS, C. M.; MORALES-ÁLVAREZ, E. D.; POUTOU-PIÑALES, R. A.; PEDROZA-RODRÍGUEZ, A. M.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; DELGADO-BOADA, J. M. Fungal laccases. **Fungal Biology Reviews**. Issue 3, v.27, p.67-82, 2013.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos & Otimização de Processos**, 2009.

SADHASIVAM, S.; SAVITHA, S.; SWAMINATHAN, K. Deployment of *Trichoderma harzianum* WL1 laccase in pulp bleaching and paper industry effluent treatment. **Journal of Cleaner Production**. Issue 8, v.18, p.799-806, 2010.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AGUARONE, E.; BORZANI, W. **Biorreatores e Processos Fermentativos**. In: (Ed.). Biotecnologia Industrial. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, v.2, 2001. Biorreatores e Processos Fermentativos

SIEGEL, M. H.; ROBINSON, C. W. Application of airlift gas-liquid-solid reactors in biotechnology. **Chemical Engineering Science**. Issue 13, v.47, p.3215-3229, 1992.

SIVAKUMAR, R.; RAJENDRAN, R.; BALAKUMAR, C.; TAMILVENDAN, M. Isolation, screening and optimization of production medium for thermostable laccase production from *Ganoderma sp.* **Int J Eng Sci Technol**. Issue 12, v.2, p.7133-7141, 2010.

SOLOMON, E. I.; AUGUSTINE, A. J.; YOON, J. O₂ Reduction to H₂O by the multicopper oxidases. **Dalton Transactions**. 2008.

SONGULASHVILI, G.; SPINDLER, D.; JIMENÉZ-TOBÓN, G. A.; JASPERS, C.; KERNS, G.; PENNINCKX, M. J. Production of a high level of laccase by submerged fermentation at 120-L scale of *Cerrena unicolor* C-139 grown on wheat bran. **Comptes Rendus Biologies**. Issue 2, v.338, p.121-125, 2015.

TIŠMA, M.; ŽNIDARŠIČ-PLAZL, P.; VASIC-RACKI, D.; ZELIĆ, B. **Optimization of Laccase Production by *Trametes versicolor* Cultivated on Industrial Waste**, 2011.

TORRES, E.; BUSTOS-JAIME, I.; LE BORGNE, S. Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. **Applied Catalysis B: Environmental**. Issue 1, v.46, p.1-15, 2003.

TRÄGER, M.; QAZI, G. N.; ONKEN, U.; CHOPRA, C. L. Comparison of airlift and stirred reactors for fermentation with *Aspergillus niger*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. Issue 2, v.68, p.112-116, 1989.

WANG, W. M.; YU, B.; ZHONG, C. J. Use of ultrasonic energy in the enzymatic desizing of cotton fabric. **Journal of Cleaner Production**. v.33, p.179-182, 2012.

YESILADA, O.; ASMA, D.; CING, S. Decolorization of textile dyes by fungal pellets. **Process Biochemistry**. Issue 6, v.38, p.933-938, 2003.

YOSHIDA, H. Chemistry of lacquer (Urushi). **J Chem Soc** **43**. p.472 – 486, 1883.