

PRODUÇÃO DE FENOL-OXIDASES PELO FUNGO *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 EM BIORREATOR AIRLIFT DE CIRCULAÇÃO INTERNA

F. BETTIN¹, F. COUSSEAU¹, K. MARTINS¹, S. ZACCARIA¹,
G.G.S. CUNHA¹, M.M. da SILVEIRA¹ e A.J.P. DILLON¹

¹ Universidade de Caxias do Sul, Instituto de Biotecnologia
Laboratório de Enzimas e Biomassas - Laboratório de Bioprocessos
E-mail para contato: fbettin@ucs.br

RESUMO – Fenol-oxidases são enzimas com elevado potencial de aplicação industrial por serem não específicas com relação ao substrato e capazes de oxidar compostos com estruturas semelhantes à lignina. Neste estudo, avaliou-se a produção de fenol-oxidases de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 em biorreator airlift de circulação interna utilizando diferentes volumes de meio de cultivo (4, 4,5 e 5 L) e vazões de ar (1, 1,5 e 2 L.min⁻¹) em pH 6,5 a 28°C. Dentre as condições testadas, 4,5 L de meio com aeração de 1,5 L.min⁻¹ foi considerada a mais favorável à produção enzimática, visto que atividades de lacases (Lac), que representam as principais enzimas produzidas pelo fungo utilizado, atingiram 156 U.mL⁻¹ em 90 h de cultivo; neste ensaio, também foram detectados os títulos máximos de peroxidases totais (Per) e de manganês peroxidases (MnP), de 31 e 21 U.mL⁻¹, respectivamente. Em 5 L de meio com aeração de 1 L.min⁻¹, as atividades de Lac e Per atingiram níveis de 132 e 12 U.mL⁻¹, respectivamente, ambas em 90 h de cultivo. MnP mostraram títulos elevados também em 4 L de meio com aeração de 1 L.min⁻¹ (17 U.mL⁻¹ em 24 h). Lignina peroxidases e oxidases do álcool veratrílico praticamente não foram detectadas. Concentrações superiores de biomassa ocorreram em 4,5 L de meio com aeração de 2 L.min⁻¹ (4,6 g.L⁻¹ em 72 h) e em 4 L de meio com aeração de 1 L.min⁻¹ (3,6 g.L⁻¹ em 72 h). O comportamento cinético mostrou consumos de substrato e de oxigênio dissolvido em todos os ensaios realizados.

1. INTRODUÇÃO

As principais fenol-oxidases incluem manganês peroxidases (MnP), lignina peroxidases (LiP) e lacases (Lac), que são secretadas no meio extracelular de crescimento dos fungos ligninolíticos em resposta a baixos níveis de fontes de nutrientes, principalmente carbono e nitrogênio (Gill e Arora, 2003). Lac e MnP catalisam a oxidação dos componentes fenólicos da lignina, enquanto LiP é muito eficiente na oxidação de substâncias fenólicas e não fenólicas (Min *et al.*, 2001). Enzimas ligninolíticas são não específicas com relação ao substrato, permitindo aos microrganismos produtores a capacidade de degradar compostos com estruturas semelhantes à lignina, como fenóis, corantes, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, dioxinas e pesticidas. Suas potenciais aplicações incluem segmentos das indústrias de alimentos e bebidas, de petróleo, cosmética, química, farmacêutica e, especialmente, têxtil e de papel e celulose, (Canet *et al.*, 2001; Dhawan *et al.*, 2005; Couto e

Herrera, 2006; Munari *et al.*, 2007; Schmitt *et al.*, 2012). O mecanismo não específico de atuação das fenol-oxidases também possibilita a degradação de uma ampla variedade de poluentes até CO₂ e H₂O (Barr & Aust, 1994).

Atualmente, biorreatores *airlift* tem sido estudados como uma alternativa ao uso de sistemas com agitação mecânica, principalmente para o cultivo de microrganismos sensíveis ao cisalhamento. Entretanto, é possível que este problema também ocorra em *airlift* quando elevados fluxos de ar são aplicados (Fontana *et al.*, 2009). No biorreator *airlift*, a circulação do líquido é forçada pelo próprio ar; a diferença de gás entre a zona aerada (*riser*) e a zona não aerada (*downcomer*) resulta numa diferença de densidade do líquido entre essas regiões, causando a circulação do fluido no biorreator e sendo apropriado para vários tipos de bioprocessos (Chisti, 1989).

O uso de sistemas *airlift* apresenta algumas vantagens, como simplicidade na construção, boa capacidade de transferência de calor e de massa, eficiente mistura e homogeneização do meio de cultivo e baixo consumo de energia (Chisti, 1989; Vial *et al.*, 2002), sendo eficientes para aplicação em cultivos fúngicos que exigem razoáveis taxas de transferência de massa e baixas tensões de cisalhamento (Merchuk e Asenjo, 1995). Nos últimos anos, a configuração de biorreatores *airlift* tem sido estudada, principalmente, em termos de capacidade de transferência de oxigênio, visto que possibilita grandes vazões de ar e aumento da transferência de oxigênio gás-líquido, incluindo o uso deste sistema para o cultivo de microrganismos que formam *pellets* (Freitas e Teixeira, 2001; Lin *et al.*, 2004).

Em muitas linhagens de *Pleurotus*, um dos cinco gêneros de fungos comestíveis mais cultivados do mundo, a adaptação a culturas líquidas é relativamente rápida (Confortin *et al.*, 2008). *Pleurotus sajor-caju* apresenta excelente crescimento em processos submersos, sendo, também, um importante produtor de fenol-oxidases (Bettin *et al.*, 2009; Bettin *et al.*, 2011). Muitos fatores influenciam o crescimento fúngico e a produção de enzimas em biorreatores, como sua geometria e configuração, regimes de operação, agitação, aeração, temperatura, pH, composição do meio de cultivo, proporção do inóculo e tempo de incubação (Márquez-Rocha *et al.*, 1999; Mikiashvili *et al.*, 2006). Diante desse contexto, o objetivo do presente trabalho foi verificar a influência de diferentes volumes de meio de cultivo e de vazões específicas de ar sobre o crescimento e a produção de fenol-oxidases de *P. sajor-caju* PS-2001 em regime descontínuo, utilizando um biorreator *airlift* de circulação interna.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Linhagem - *Pleurotus sajor-caju* PS-2001, da coleção de microrganismos do IB-UCS, foi mantido em meio contendo serragem de *Pinus* spp., 20 g; farelo de trigo, 20 g; CaCO₃, 2 g; ágar-ágar, 20 g; H₂O destilada q.s.p. 1 L. As placas com a linhagem foram mantidas em estufa a 28°C até completo crescimento micelial e armazenadas a 4°C (Bettin *et al.*, 2009).

Composição da solução mineral - KH₂PO₄, 20 g; (NH₄)₂SO₄, 14 g; CaCl₂, 3 g; MgSO₄.7H₂O, 3 g; ureia, 3 g; MnSO₄.H₂O, 15,6 mg; FeSO₄, 50 mg; ZnSO₄, 14 mg; CoCl₂, 20 mg; H₂O destilada q.s.p. 1 L (Mandels e Reese, 1957).

Inóculos - Preparados em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio composto por: glicose, 5 g; caseína pura, 1,5 g; solução mineral de nutrientes e micronutrientes, 100 mL; H₂O destilada q.s.p. 1 L. Após autoclavagem, três discos de ágar de 1,5 cm de diâmetro foram raspados de placas com a linhagem e acrescentados ao meio (Bettin

et al., 2009). O crescimento ocorreu sob agitação recíproca por 6 dias, a 180 rpm e $28 \pm 2^\circ\text{C}$. A proporção dos inóculos para os cultivos em biorreator foi de 10% (v/v) (Bettin *et al.*, 2011).

Meio de cultivo fúngico em biorreator airlift – A composição dos meios foi baseada em glicose, 5 g; caseína pura, 1,5 g; ácido benzoico, 122 mg; CuSO_4 , 100 mg; solução mineral de nutrientes e micronutrientes, 100 mL; H_2O destilada q.s.p. 1 L. Os meios foram autoclavados por 20 minutos, juntamente com a cuba do biorreator. Em todas as condições, antiespumante à base de silicone foi adicionado, quando necessário (Bettin *et al.*, 2011).

Condições de cultivo em biorreator airlift de circulação interna - Utilizou-se um biorreator *airlift* de volume nominal de 6 L com dimensões de 75 cm de altura e 11 cm de diâmetro; o tubo interno (*riser*) possui 34 cm de altura e 7 cm de diâmetro. Diferentes volumes de meio de cultivo (4, 4,5 e 5 L) foram testados utilizando-se vazão de ar de $1,0 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$. Os ensaios em que foram testadas diferentes aerações ($1, 1,5$ e $2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$) foram realizados em volume de 4,5 L de meio de cultivo. As vazões específicas de ar foram fixadas no início dos cultivos, não sendo alteradas durante o processo, em todos os experimentos realizados, com percentual de saturação em oxigênio dissolvido flutuando livremente. Os ensaios foram conduzidos em regime descontínuo, pH 6,5 a $28 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 90 horas.

Atividades enzimáticas – Os substratos utilizados nas quantificações enzimáticas foram ABTS para lacases (Wolfenden e Willson, 1982); ABTS e H_2O_2 para peroxidases totais (Heinzkill *et al.*, 1998); vermelho de fenol, MnSO_4 e H_2O_2 para manganês peroxidases (Kuwahara *et al.*, 1984); álcool veratrílico para oxidases do álcool veratrílico (Bourbonnais e Paice, 1988); álcool veratrílico e H_2O_2 para lignina peroxidases (Tien e Kirk, 1984).

Determinação das concentrações de substrato e de biomassa fúngica – O consumo do substrato (glicose) utilizado nos cultivos foi quantificado com a utilização do reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) e curva padrão de glicose, de acordo com Miller (1959). A concentração celular foi mensurada por gravimetria, em cadinhos de porcelana.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados apresentados neste trabalho se referem a ensaios conduzidos em biorreator *airlift* de circulação interna utilizando diferentes volumes de meio de cultivo (4, 4,5 e 5 L com aeração de $1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$) e vazões de ar ($1, 1,5$ e $2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ em 4,5 L de meio). Em todas as condições testadas, buscou-se avaliar a síntese de fenol-oxidases de *P. sajor-caju* PS-2001, assim como o crescimento micelial e os consumos de substrato e de oxigênio dissolvido, durante 90 horas de processo.

Na Figura 1, são mostrados os perfis atividade de lacases, que representam as principais enzimas produzidas pelo fungo utilizado. Com relação à produção em diferentes volumes de meio de cultivo (Figura 1A), observa-se que níveis elevados de atividade enzimática foram detectados com 5 e 4,5 L de meio reacional, atingindo picos de 132 e $96 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente, ambos em 90 horas de incubação; a atividade observada com 4 L de meio de cultivo mostrou níveis inferiores a $20 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$. Sob diferentes vazões específicas de ar (Figura 1B), a maior atividade de lacases foi obtida com $1,5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ de ar, atingindo $156 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ também em 90 horas de cultivo; com aerações de 1 e $2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, as atividades máximas de lacases foram de 96 e $84 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente.

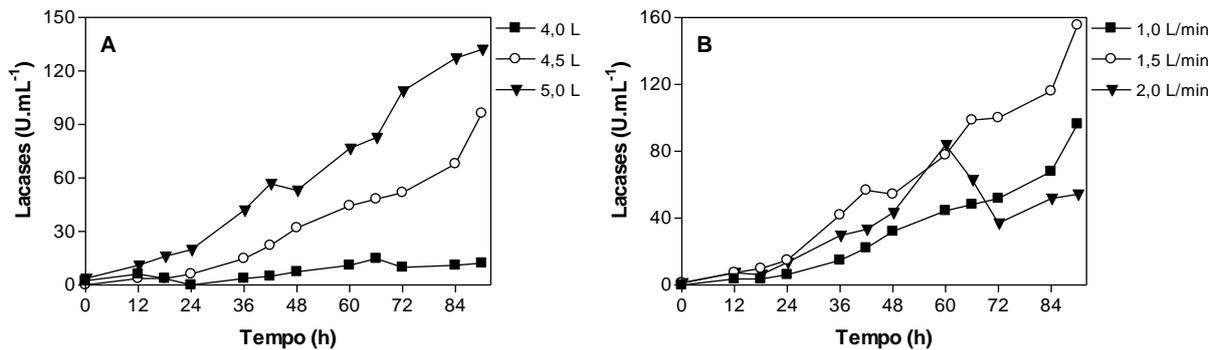


Figura 1 – Atividades de lacases em função do tempo obtidas durante cultivos submersos de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 realizados em biorreator *airlift* de circulação interna sob diferentes volumes de meio de cultivo (A) e vazões de ar (B) em pH 6,5 a 28°C.

A Tabela 1 mostra as máximas atividades enzimáticas das fenol-oxidases quantificadas durante os ensaios. No teste em que foi detectada a máxima produção de lacases (aeração de 1,5 L.min⁻¹ em 4,5 L de meio), também foram observados os títulos máximos de peroxidases totais e de manganês peroxidases (MnP), com picos de 31 e 21 U.mL⁻¹, respectivamente. Nesta condição, também foi detectada baixa atividade de oxidases do álcool veratrílico (OAV). Outra condição favorável à produção de MnP foi a utilização de 4 L de meio de cultivo com aeração de 1 L.min⁻¹, que proporcionou atividade máxima de 17 U.mL⁻¹.

Tabela 1 – Atividades enzimáticas máximas de fenol-oxidases obtidas durante cultivos submersos de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 realizados em biorreator *airlift* de circulação interna sob diferentes volumes de meio de cultivo e vazões de ar em pH 6,5 a 28°C

ENZIMAS	Volume de meio de cultivo (L)			Vazão de ar (L.min ⁻¹)		
	4,0	4,5	5,0	1,0	1,5	2,0
Lac_{máx} (U.mL⁻¹)	14,8	96,3	132,1	96,3	155,6	83,9
Tempo (h)	66	90	90	90	90	60
Per_{máx} (U.mL⁻¹)	2,47	9,88	12,3	9,88	30,9	11,1
Tempo (h)	90	66	90	66	90	36
MnP_{máx} (U.mL⁻¹)	17,4	9,79	7,68	9,79	21,2	3,51
Tempo (h)	24	90	36	90	84	72
LiP_{máx} (U.mL⁻¹)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tempo (h)	---	---	---	---	---	---
OAV_{máx} (U.mL⁻¹)	ND	ND	ND	ND	0,07	ND
Tempo (h)	---	---	---	---	12	---

Legenda: Lac_{máx} (atividade máxima de lacases), Per_{máx} (atividade máxima de peroxidases totais), MnP_{máx} (atividade máxima de manganês peroxidases), LiP_{máx} (atividade máxima de lignina peroxidases), OAV_{máx} (atividade máxima de oxidases do álcool veratrílico), ND (atividade enzimática não detectada).

Lignina peroxidases (LiP) não foram observadas em nenhuma das condições testadas (Tabela 1). Porém, a produção de LiP requer condições específicas, como limitação de nitrogênio e saturação de oxigênio (Saparrat *et al.*, 2002). Essa constatação pode explicar a ausência desta enzima nas condições testadas, uma vez que atividades de LiP e OAV já foram detectadas durante cultivos submersos de *P. sajor-caju* PS-2001 realizados em biorreator com

agitação mecânica (Bettin *et al.*, 2011). Bourbonnais e Paice (1988), em estudos realizados com *P. sajor-caju* 405, observaram atividade máxima de OAV de 1 U.mL^{-1} em 24 dias.

Utilizando o substrato dimetoxifenol para a detecção enzimática, Liu *et al.* (2013) verificaram atividades de lacases de 72 U.mL^{-1} no sexto dia de cultivo de *Pycnoporus* sp. em biorreator *airlift* de 65 L, operado com aeração de 30 L.min^{-1} em pH inicial de 5,0 a 30°C . Contudo, utilizando o mesmo substrato do presente trabalho (ABTS) em meio composto por glicerol, Rodríguez Couto *et al.* (2006) observaram atividades máximas de 19 U.mL^{-1} de lacases em 24 dias de cultivo de *Trametes hirsuta* em *airlift* com volume operacional de 6 L, pH controlado em 4,5 e suprimento de ar de 1 vvm. Essas comparações sugerem que *P. sajor-caju* PS-2001 possui elevado potencial de produção de lacases em biorreatores do tipo *airlift*, fato evidenciado pelas elevadas atividades enzimáticas obtidas neste trabalho (Figura 1).

Na Tabela 2, estão resumidos os principais resultados obtidos nos cultivos. Os dados referentes à enzima ($Y_{E/S}$ e P_E) correspondem ao tempo em que foi detectado o pico de atividade de lacases ($Lac_{\text{máx}}$), enquanto os dados referentes à biomassa ($Y_{X/S}$ e P_X) correspondem ao tempo em que foi observado o pico de concentração celular ($X_{\text{máx}}$); o fator de rendimento específico ($Y_{E/X}$) relaciona a máxima atividade de lacases com a máxima concentração celular. A produtividade volumétrica (P_E) foi superior a $1 \text{ U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em todos os testes realizados, com exceção de 4 L de meio com aeração de 1 L.min^{-1} . Com relação ao rendimento enzimático ($Y_{E/S}$), os melhores resultados foram obtidos também no teste em que foi detectada a mais elevada atividade de lacases (4,5 L de meio com aeração de $1,5 \text{ L.min}^{-1}$). A produtividade (P_X) foi superior nos testes que mostraram elevada biomassa micelial, sendo comparável nas demais condições. O rendimento celular ($Y_{X/S}$) também foi superior no teste de mais elevada atividade de lacases, devido à precocidade de detecção do pico de crescimento, combinado com baixo consumo de substrato em 36 horas. O fator de rendimento específico ($Y_{E/X}$) mostra que a relação entre síntese de lacases e formação de biomassa foi superior no ensaio de maior atividade de lacases, sugerindo que elevada síntese enzimática não está relacionada com intenso crescimento, nas condições testadas.

Tabela 2 – Resultados gerais obtidos durante cultivos submersos de *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 realizados em biorreator *airlift* de circulação interna sob diferentes volumes de meio de cultivo e vazões de ar em pH 6,5 a 28°C

PARÂMETROS	Volume de meio de cultivo (L)			Vazão de ar (L.min^{-1})		
	4,0	4,5	5,0	1,0	1,5	2,0
$Lac_{\text{máx}}$ (U.mL^{-1})	14,8	96,3	132,1	96,3	155,6	83,9
Tempo (h)	66	90	90	90	90	60
P_E ($\text{U.mL}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	0,187	1,070	1,427	1,070	1,715	1,379
$Y_{E/S}$ (U.g^{-1})	1849	49258	25210	49258	52789	26216
$X_{\text{máx}}$ (g.L^{-1})	3,62	1,24	1,87	1,24	1,26	4,59
Tempo (h)	72	60	90	60	36	72
P_X ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	0,048	0,018	0,018	0,018	0,029	0,061
$Y_{X/S}$ (g.g^{-1})	0,504	1,586	0,326	1,586	4,088	0,625
$Y_{E/X}$ (U.g^{-1})	4,088	77,661	70,642	77,661	123,492	18,279

Legenda: $Lac_{\text{máx}}$ (máxima atividade de lacases), P_E (produtividade volumétrica de lacases), $Y_{E/S}$ (fator de rendimento de substrato em atividade de lacases), $X_{\text{máx}}$ (máxima concentração celular), P_X (produtividade volumétrica de biomassa), $Y_{X/S}$ (fator de rendimento de substrato em células), $Y_{E/X}$ (fator de rendimento específico relacionando a máxima atividade de lacases com a máxima concentração celular).

Embora o perfil cinético não seja apresentado, em todos os experimentos foram observadas quedas graduais nos níveis de substrato (glicose) e de oxigênio dissolvido, o que é uma característica de microrganismos aeróbios em cultivos submersos. Liu *et al.* (2013) relataram que lacases são as principais enzimas produzidas por *Pycnoporus* sp. em cultivos realizados em biorreator *airlift*, observando aumento de biomassa e concomitante decréscimo nos níveis de pH e de oxigênio dissolvido.

A mistura e a circulação do meio, em todas as condições testadas, foram consideradas excelentes, não apresentando zonas estagnadas ou quaisquer outros problemas operacionais durante todo o período de incubação; além disso, a viscosidade aparente do caldo praticamente não foi alterada. Segundo Fontana *et al.* (2009), o aumento da viscosidade no meio de cultura representa uma dificuldade adicional para a operação de sistemas *airlift* em bioprocessos para a produção enzimática. Utilizando biorreatores semelhantes, estudos realizados com *Aspergillus oryzae* para a produção de poligalacturonases (Fontana e Silveira, 2012) e com *Penicillium echinulatum* para a produção de celulasas e xilanases (Ritter *et al.*, 2013), mostraram grande aumento da viscosidade do meio devido ao crescimento fúngico e à adição de indutores, necessitando de aumento na aeração para a manutenção da circulação e da mistura dos caldos enzimáticos, com conseqüente efeito sobre a transferência de oxigênio e a produtividade volumétrica. Entretanto, os resultados obtidos com *P. sajor-caju* PS-2001 em biorreator *airlift* corroboram as informações de Rancaño *et al.* (2003) e Domínguez *et al.* (2007), que estudaram a produção de lacases por *Trametes versicolor* em sistemas *airlift* de 2 L utilizando bateladas sucessivas, durante 40 dias e 44 dias, respectivamente, com aeração de 1 L.min⁻¹ a 30°C, sem problemas operacionais durante os processos. Os autores afirmaram que a configuração do biorreator foi apropriada para a obtenção de elevadas atividades enzimáticas e para a manutenção de *pellets* de tamanho regular (Rancaño *et al.*, 2003).

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a aplicação do sistema *airlift* para o cultivo de *P. sajor-caju* PS-2001 em processo submerso é eficiente tanto para a síntese enzimática quanto para o crescimento fúngico. Dentre as fenol-oxidases produzidas por este microrganismo, destacam-se as lacases, que podem alcançar elevadas atividades nesse tipo de biorreator, dependendo das condições operacionais adotadas. Outro fator relevante a ser ressaltado é a facilidade de operação, combinada com excelente mistura e homogeneização do meio reacional, sem alteração da viscosidade aparente durante o crescimento micelial. Para a continuidade dos estudos nessa linha de pesquisa, outros experimentos estão sendo desenvolvidos visando esclarecer a influência dos diversos fatores que afetam a atividade enzimática e o crescimento fúngico em biorreator *airlift*, incluindo variação nos parâmetros operacionais e na composição dos meios de cultivo.

5. REFERÊNCIAS

- BARR, D.P.; AUST, S.D. Mechanism white rot fungi use to degrade pollutants. *Environ. Sci. Technol.*, v. 28, p. 78-87, 1994.
- BETTIN, F.; MONTANARI, Q.; CALLONI, R.; GAIO, T.A.; SILVEIRA, M.M.; DILLON, A.J.P. Production of laccases in submerged process by *Pleurotus sajor-caju* PS-2001 in relation to carbon and organic nitrogen sources, antifoams and Tween 80. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 36, p. 1-9, 2009.

- BETTIN, F.; ROSA, L.O.; MONTANARI, Q.; CALLONI, R.; GAIO, T.A.; MALVESSI, E.; SILVEIRA, M.M.; DILLON, A.J.P. Growth, kinetics, production, and characterization of extracellular laccases from *Pleurotus sajor-caju* PS-2001. *Process Biochem.*, v. 46, p. 758-764, 2011.
- BOURBONNAIS, R.; PAICE, M.G. Veratryl alcohol oxidases from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. *Biochem. J.*, v. 255, p. 445-450, 1988.
- CANET, R.; BIRNSTINGL, J.G.; MALCOLM, D.G.; LOPEZ-REAL, J.M.; BECK, A.J. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by native microflora and combinations of white-rot fungi in a coal-tar combined soil. *Bioresour. Technol.*, v. 76, p. 113-117, 2001.
- CHISTI, Y. *Airlift bioreactors*. London: Elsevier Science Publishers, 1989.
- CONFORTIN, F.G.; MARCHETTO, R.; BETTIN, F.; CAMASSOLA, M.; SALVADOR, M.; DILLON, A.J.P. Production of *Pleurotus sajor-caju* strain PS-2001 biomass in submerged culture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 35, p. 1149-1155, 2008.
- COUTO, S.R.; HERRERA, J.L.T. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnol. Adv.*, v. 24, p. 500-513, 2006.
- DHAWAN, S.; LAL, R.; HANSPAL, M.; KUHAD, R.C. Effect of antibiotics on growth and laccase production from *Cyathus bulleri* and *Pycnoporus cinnabarinus*. *Bioresour. Technol.*, v. 96, p. 1415-1418, 2005.
- DOMÍNGUEZ, A.; GÓMEZ, J.; LORENZO, M.; SANROMÁN, A. Enhanced production of laccase activity by *Trametes versicolor* immobilized into alginate beads by the addition of different inducers. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 23, p. 367-373, 2007.
- FONTANA, R.C.; POLIDORO, T.A.; SILVEIRA, M.M. Comparison of stirred tank and airlift bioreactors in the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. *Bioresour. Technol.*, v. 100, p. 4493-4498, 2009.
- FONTANA, R.C.; SILVEIRA, M.M. Production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae* in stirred tank and internal- and external-loop airlift reactors. *Bioresour. Technol.*, v. 123, p. 157-163, 2012.
- FREITAS, C.; TEIXEIRA, J.A. Oxygen mass transfer in a high solids loading three-phase internal-loop airlift reactor. *Chem. Eng. J.* v. 84, p. 57-61, 2001.
- GILL, P.K.; ARORA, D.S. Effect of culture conditions on manganese peroxidase production and activity by some white rot fungi. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 30, p. 28-33, 2003.
- HEINZKILL, M.; BECH, L.; HALKIER, T.; SCHNEIDER, P.; ANKE, T. Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (Family Coprinaceae). *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 64, p. 1601-1606, 1998.
- KUWAHARA, M.; GLENN, J.K.; MORGAN, M.A.; GOLD, M.H. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.*, v. 169, p. 247-250, 1984.
- LIN, J.; HAN, M.; WANG, T.; ZHANG, T.; WANG, J.; JIN, Y. Influence of the gas distributor on the local hydrodynamic behavior of an external loop airlift reactor. *Chem. Eng. J.*, v. 102, p. 51-59, 2004.
- 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. *J. Cleaner Production*, v. 39, p. 154-160, 2013.

- MANDELS, M.; REESE, E.T. Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon source and metals. *J. Bacteriol.*, v. 73, p. 269-278, 1957.
- MÁRQUEZ-ROCHA, F.J.; GUILLÉN, G.K.; SÁNCHEZ, J.E.; VÁZQUEZ-DUHALT, R. Growth characteristics of *Pleurotus ostreatus* in bioreactors. *Biotechnol. Tech.*, v. 13, p. 29-32, 1999.
- MERCHUK, J.C.; ASENJO, J.A. Fundamentals of bioreactor design. *Bioprocess Technol.*, v. 21, p. 139-205, 1995.
- MIKIASHVILI, N.; WASSER, S.P.; NEVO, E.; ELISASHVILI, V. Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, v. 22, p. 999-1002, 2006.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, v. 31, p. 426-428, 1959.
- MIN, K.L.; KIM, Y.H.; KIM, Y.W.; JUNG, H.S.; HAH, Y.C. Characterization of a novel laccase produced by the wood-rotting fungus *Phellinus ribis*. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 392, p. 279-286, 2001.
- MUNARI, F.M.; GAIO, T.A.; DILLON, A.J.P. Phenol degradation and colour removal in submerged culture of *Pleurotus sajor-caju* with paper mill effluents. *Biocatal. Biotransform.*, v. 25, p. 24-28, 2007.
- RANCAÑO, G.; LORENZO, M.; MOLARES, N.; COUTO, S.R.; SANROMÁN, M.A. (2003). Production of laccase by *Trametes versicolor* in an airlift fermentor. *Process Biochem.*, v. 39, p. 467-473, 2003.
- RITTER, C.E.T.; FONTANA, R.C.; CAMASSOLA, M.; SILVEIRA, M.M.; DILLON, A.J.P. The influence of sorbitol on the production of cellulases and xylanases in an airlift bioreactor. *Bioresour. Technol.*, v. 148, p. 86-90, 2013.
- RODRÍGUEZ COUTO, S.; RODRÍGUEZ, A.; PATERSON, R.R.M.; LIMA, N.; TEIXEIRA, J.A. Laccase activity from the fungus *Trametes hirsuta* using an air-lift bioreactor. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 42, p. 612-616, 2006.
- SAPARRAT, M.C.N.; MARTÍNEZ, M.J.; CABELLO, M.N.; ARAMBARRI, A.M. Screening for ligninolytic enzymes in autochthonous fungal strains from Argentina isolated from different substrata. *Rev. Iberoam. Micol.*, v. 19, p. 181-185, 2002.
- SCHMITT, S.; SOUZA, R.; BETTIN, F.; DILLON, A.J.P.; VALLE, J.A.B.; ANDREAUS, J. Decolorization of aqueous solutions of disperse textile dyes by oxidoreductases. *Biocatal. Biotransform.*, v. 30, p. 48-56, 2012.
- TIEN, M.; KIRK, T.K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 81, p. 2280-2284, 1984.
- VIAL, C.; PONCIN, S.; WILD, G.; MIDOUX, N. Experimental and theoretical analysis of the hydrodynamics in the riser of an external loop airlift reactor. *Chem. Eng. Sci.*, v. 57, p. 4745-4762, 2002.
- WOLFENDEN, B.S.; WILLSON, R.L. Radical-cations as reference chromogens in the kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, v. 02, p. 805-812, 1982.

Apoio: FAPERGS, CAPES, CNPq e UCS.