

## PRODUÇÃO DE LACASE DE FUNGOS BASIDIOMICETOS POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA COM CASCAS DE CAFÉ

Josué José da Silva<sup>1</sup>  
 Thiago Teodoro Santana<sup>1</sup>  
 Ana Caroline Coronato de Oliveira<sup>1</sup>  
 Patrícia Hirose de Almeida<sup>2</sup>  
 Sílvia Graciele Hulse de Souza<sup>3</sup>  
 Giani Andrea Linde<sup>3</sup>  
 Nelson Barros Colauto<sup>3</sup>  
 Juliana Silveira do Valle<sup>3\*</sup>

SILVA, J. J. da; SANTANA, T. T.; OLIVEIRA, A. C. C.; ALMEIDA, P. H. de; SOUZA, S. G. H. de; LINDE, G. A.; COLAUTO, N. B.; VALLE, J. S. do. Produção de lacase de fungos basidiomicetos por fermentação submersa com casca de café. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR*, Umuarama, v. 15, n. 2, supl. 1, p. 191-196, jul./dez. 2012.

**RESUMO:** Cascas de café são fonte de carboidratos e nutrientes que podem ser bioconvertidos em produtos de interesse como enzimas. Lacases são cobre polifenol oxidases que oxidam compostos fenólicos, enquanto reduzem oxigênio molecular à água e; sua baixa especificidade a substratos permite sua aplicação em várias áreas como indústria têxtil, de alimentos e biorremediação. Os objetivos desse trabalho foram avaliar a capacidade de produção de lacase de três linhagens de fungos basidiomicetos (*Lentinula edodes* U6/1, *Pleurotus ostreatus* U6/9 e *Pleurotus florida* U6/10) por fermentação submersa com cascas de café e avaliar o uso de cobre como indutor dessa enzima. A casca de café mostrou ser um bom substrato para produção de lacases e das três linhagens testadas *Pleurotus ostreatus* (U6/9) foi a mais produtiva (22,5 U mL<sup>-1</sup>). A melhor fonte de nitrogênio para produção de lacases de *Pleurotus ostreatus* (U6/9) foi o extrato de levedura na concentração de 9 g/L (20 U mL<sup>-1</sup>). A adição de 150 µM de CuSO<sub>4</sub> resultou na indução significativa na produção de lacases nessa linhagem (21 U mL<sup>-1</sup>) no 12º dia de cultivo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Indução de lacase; *Lentinula edodes*; *Pleurotus ostreatus*; *Pleurotus florida*.

### LACCASE PRODUCTION FROM BASIDIOMYCETES BY SUBMERGED FERMENTATION WITH COFFEE HUSKS

**ABSTRACT:** Coffee husks are a source of carbohydrates and nutrients that may be bioconverted into products of interest, such as enzymes. Laccases are copper polyphenol oxidases that oxidize phenolic compounds while reducing molecular oxygen to water. Laccase's low specificity to substrates allows its application in several areas such as textiles, food processing and bioremediation industries. The aims of this study were to evaluate the potential to produce laccase from three strains of basidiomycetous fungi (*Lentinula edodes* U6/1, *Pleurotus ostreatus* U6/9, and *Pleurotus florida* U6/10) by submerged fermentation with coffee husks, and to evaluate the use of copper as an inducer of the enzyme. Coffee husk proved to be a good substrate for laccase production, with *Pleurotus ostreatus* (U6/9) being the most productive strain (22.5 U mL<sup>-1</sup>). The best source of nitrogen for laccase production of *Pleurotus ostreatus* (U6/9) was yeast extract 9 g/L (20 U mL<sup>-1</sup>). The addition of CuSO<sub>4</sub> (150 µM) resulted in significant induction of laccase (21 U mL<sup>-1</sup>) on the 12<sup>th</sup> day of cultivation.

**KEYWORDS:** Laccase induction; *Lentinula edodes*; *Pleurotus ostreatus*; *Pleurotus florida*.

### PRODUCCIÓN DE LACASE DE HONGOS BASIDIOMICETOS POR FERMENTACIÓN SUMERGIDA CON CÁSCARAS DE CAFÉ

**RESUMEN:** Cáscaras de café son fuente de carbohidratos y nutrientes que pueden ser bioconvertidos en productos de interés, tales como enzimas. Lacases son cobre polifenol oxidases que oxidan compuestos fenólicos, mientras reducen el oxígeno molecular a el agua y; su baja especificidad a sustratos permite su aplicación en diversas áreas, como la industria textil, de alimentos y de biorremediación. Los objetivos de este estudio fueron evaluar la capacidad de producción de lacase de tres linajes de hongos basidiomicetos (*Lentinula edodes* U6/1, *Pleurotus ostreatus* U6/9 y *Pleurotus florida* U6/10) por fermentación sumergida con cáscaras de café, y evaluar el uso del cobre como inductor de esta enzima. La cáscara de café resultó ser un buen sustrato para la producción de lacases y, de las tres linajes probadas, *Pleurotus ostreatus* (U6/9) fue la más productiva (22,5 U mL<sup>-1</sup>). La mejor fuente de nitrógeno para la producción de lacases de *Pleurotus ostreatus* (U6/9) fue el extracto de levadura a una concentración de 9 g L<sup>-1</sup> (20 U mL<sup>-1</sup>). La adición de 150 µM de CuSO<sub>4</sub> resultó en la inducción significativa de

<sup>1</sup>Acadêmico de Farmácia, Bolsista de Iniciação Científica, Laboratório de Biologia Molecular, Universidade Paranaense, Praça Mascarenhas de Moraes, 4282, CP 224, 87502-210, Umuarama, PR.

<sup>2</sup>Mestrandos em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Instituto de Ciências Exatas, Agrárias, Tecnológicas e Geociências - Universidade Paranaense.

<sup>3</sup>Docente do Programa de Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Laboratório de Biologia Molecular Universidade Paranaense, Praça Mascarenhas de Moraes, 4282, CP 224, 87502-210, Umuarama, PR.

\*Autor para correspondência: jsvalle@unipar.br

la producción de lacases en esa linaje (21 U mL<sup>-1</sup>), en el 12º día de cultivo.

**PALABRAS CLAVE:** Inducción de lacase; *Lentinula edodes*; *Pleurotus ostreatus*; *Pleurotus florida*.

## Introdução

Micro-organismos têm papel ecológico fundamental contribuindo para a estabilidade de diferentes ecossistemas, além de representarem importante fonte de recursos genéticos com grande potencial biotecnológico como na produção de antibióticos, enzimas e substâncias biologicamente ativas (KIRK et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2006).

A degradação da biomassa vegetal lignocelulósica está relacionada com a manutenção do ciclo do carbono em ecossistemas terrestres. A lignina é um heteropolímero aromático de alto peso molecular que confere rigidez aos tecidos vegetais e não possui ligações hidrolisáveis o que a torna um componente vegetal recalcitrante (CUNHA; BIANCHINI, 1998). A degradação da lignina ocorre pela ação concomitante de diferentes enzimas ligninolíticas, dentre as quais se pode destacar as enzimas extracelulares lignina peroxidase (ligninase, LiP), manganês peroxidase (MnP) e lacase (MARTÍNEZ et al., 2005).

Fungos basidiomicetos usam a celulose e a hemicelulose como substrato para seu crescimento e; a degradação da lignina ocorre durante o metabolismo secundário, quando há escassez de nutrientes ou situações de estresse. O ataque do fungo à lignina é um processo aeróbio oxidativo e acontece em grupos fenóis, alifáticos e metóxidos tendo como resultado a despolimerização da lignina (KARP, 2012).

Lacases (EC 1.10.3.2) são polifenol oxidases encontradas em plantas, insetos, bactérias e fungos, em especial, nos fungos da podridão branca da madeira (GARCIA, 2006). As lacases fúngicas são glicoproteínas de 520-550 aminoácidos que contêm quatro íons cobre (Cu) dispostos em três sítios de ligação. Cada íon desempenha um papel importante na reação catalítica que ocorre pela oxidação de um substrato fenólico, enquanto oxigênio molecular é reduzido à água (LEITNER et al., 2002). A lacase apresenta baixa especificidade por substratos, permitindo sua atuação sobre uma grande variedade de compostos o que a torna uma enzima versátil e com potencial para ser utilizada em várias aplicações biotecnológicas industriais. Podem ser empregadas em processos da indústria de papel e celulose, têxtil, cosmética, na detoxificação de esgoto, em síntese inorgânica, degradação de xenobióticos e biorremediação, produção de aglomerados de madeira sem agregantes tóxicos e produção de detergentes (COUTO; TOCA-HERRERA, 2007).

Reduzir custos de produção é uma forma de ampliar o uso de enzimas em processos industriais. A otimização da fermentação e do processo de produção é alvo de extensa pesquisa e, nesse sentido, o uso de resíduos agroindustriais como substratos alternativos em processos fermentativos vem sendo estudado por diversos pesquisadores (BONFÁ et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2007). Tais processos permitem agregar valor aos resíduos, diminuem os custos de produção, além de removerem do ambiente material potencialmente poluente (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003). A biotransformação de resíduos agroindustriais por fungos é uma alternativa biotecnológica para obtenção potencial de produtos com alto valor agregado e subprodutos de interesse econômico como as enzimas.

O café é uma das *commodities* agrícolas mais importantes no mundo e *Coffea arabica* e *Coffea robusta* são as principais variedades do gênero cultivadas para a produção comercial (PANDEY et al., 2000). O Brasil cultivou na safra 2010/2011 mais de 2 milhões de hectares de café, com produtividade superior a 23 sacas por hectare, gerando 48 milhões de sacas beneficiadas (CONAB, 2011). Cascas de café são um resíduo produzido após o beneficiamento do café por secagem; e contêm grande quantidade de nutrientes, cafeína, taninos e polifenóis (PANDEY et al., 2000). Esse material tem se mostrado viável para a aplicação em bioprocessos e para a produção de uma série de produtos como enzimas, compostos de aroma, cogumelos, processos que agregam grande valor a esse resíduo (PANDEY et al., 2000).

*Lentinula edodes*, conhecido como Shiitake, é um cogumelo comestível rico em nutrientes e com características farmacoterapêuticas (MIYAJI; COLUS, 2001). O consumo e a produção desse cogumelo vêm crescendo nos últimos anos alcançando alto valor no mercado internacional sendo a China seu maior produtor mundial e o Brasil entre os países latino-americanos (GAITAN-HERNANDEZL et al., 2011). Cogumelos do gênero *Pleurotus* apresentam alta rusticidade e capacidade de adaptação a uma grande variedade de meios de crescimento, possuem muitas espécies comestíveis como *Pleurotus ostreatus*, *P. eryngii* e *P. sajor-caju*, sendo ricos em proteínas, vitaminas, minerais e carboidratos e também conhecidas atividades biológicas (SALVI, 2011).

O objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade de produção de lacase de três linhagens de fungos basidiomicetos por fermentação submersa com cascas de café.

## Materiais e Métodos

### Micro-organismos e produção de inóculo

Foram selecionadas três linhagens de fungos da podridão branca da madeira pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Paranaense (UNIPAR): *Lentinula edodes* (U6/1), *Pleurotus ostreatus* (U6/9) e *Pleurotus florida* (U6/10).

As linhagens foram mantidas em meio ágar extrato de malte 1% (m/v) a 25 °C e posteriormente transferidas para meio ágar extrato de malte 2% (m/v) a 28 °C para recuperação do vigor micelial e produção de inóculo. Três discos de meio sólido com 6 mm de diâmetro contendo micélio foram utilizados para inocular os meios de produção de lacase.

### Efeito da fonte de nitrogênio na produção de lacase

Para avaliar a influência do nitrogênio (N) na produção de lacase foram testadas cinco diferentes fontes de N sendo três proteicas [ureia (UR), peptona (P) e extrato de levedura (YE)] e duas aprroteicas [sulfato de amônio (SA) e nitrato de sódio (NS)].

O cultivo foi realizado em frascos Erlenmeyer (250 mL), contendo 100 mL de meio de cultivo estéril composto por (g L<sup>-1</sup>) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1,5), KCl (0,5), MgSO<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>7</sub> (1,023), FeSO<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>3</sub> (0,008), ZnSO<sub>4</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>7</sub> (0,017) e 50 de cascas de

café (granulometria > 2 mm) como única fonte de carbono. As cascas de café foram gentilmente cedidas pelo senhor Pedro F. de Oliveira (Agricultor da região de Umuarama-PR).

Como controle utilizou-se o meio sem adição de nitrogênio. Os experimentos foram conduzidos em duplicata e mantidos por 15 dias a 28 °C em condição estática. A atividade de lacase foi determinada a cada três dias e os resultados foram avaliados empregando-se a análise de variância e as diferenças significativas entre as médias ( $p \leq 0,05$ ) determinadas pelo teste de Tukey, com auxílio do software Assistat (SILVA; AZEVEDO, 2009).

### Efeito da concentração de nitrogênio e da adição de cobre na produção de lacase

Com base nos resultados da etapa anterior foi realizado um estudo da influência de diferentes concentrações de extrato de levedura (YE) sobre a produção de lacase. Analisou-se também a influência da adição de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) sobre a produção da enzima. Ambos os estudos foram realizados com a linhagem mais produtiva *Pleurotus ostreatus* (U6/9).

O cultivo foi realizado em frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 100 mL de meio composto por ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,5), KCl (0,5),  $\text{MgSO}_4(\text{H}_2\text{O})_7$  (1,023),  $\text{FeSO}_4(\text{H}_2\text{O})_3$  (0,008),  $\text{ZnSO}_4(\text{H}_2\text{O})_7$  (0,017) e 50 de cascas de café (granulometria > 2 mm). O meio foi acrescido com diferentes concentrações de YE (1, 3, 5, 7 e 9  $\text{g L}^{-1}$ ) e autoclavado por 20 minutos a 121 °C. Ao terceiro dia de cultivo adicionou-se  $\text{CuSO}_4$  (150  $\mu\text{M}$ ) assepticamente (solução filtrada em membrana Millipore® 0,22  $\mu\text{M}$ ) em metade dos frascos. Os experimentos foram conduzidos em duplicata e mantidos por 12 dias a 28 °C. Como controle utilizou-se o meio sem adição de N ou cobre. A atividade de lacase foi determinada a cada três dias e os resultados foram avaliados empregando-se a análise de variância e as diferenças significativas entre as médias ( $p \leq 0,05$ ) determinadas pelo teste de Tukey, com auxílio do software Assistat (SILVA; AZEVEDO, 2009).

### Determinação da atividade de lacase

A atividade de lacase foi avaliada pela oxidação de solução 1 mM de ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato). 0,2 mL do meio de cultivo foram misturados com 0,7 mL de água, 0,45 mL de tampão acetato de sódio (0,1 M, pH 5,0) e 0,15 mL de ABTS (HAN et al., 2005). A mistura foi mantida a 30 °C por 10 min e a reação foi interrompida pela adição de 100  $\mu\text{L}$  de solução de ácido tricloroacético 5% (m/v). A oxidação do ABTS foi acompanhada pelo aumento da absorbância a 420 nm ( $\epsilon = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Uma mistura de meio de cultivo (0,2 mL), água (0,85 mL) e tampão acetato de sódio (0,45 mL) bem como a mistura de água (0,9 mL), tampão acetato de sódio (0,45 mL) e ABTS (0,15 mL) foram utilizadas como controles analíticos. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de ABTS por minuto.

### Resultados e Discussão

As três linhagens foram cultivadas em meio líquido, contendo cascas de café como única fonte de carbono,

suplementado com diferentes fontes de nitrogênio a 5  $\text{g L}^{-1}$  (P, UR, NS, SA e YE).

As fontes proteicas de nitrogênio (P, UR e YE) foram as que produziram efeitos mais expressivos na produção de lacase e todas as linhagens testadas mostraram ser excelentes produtoras de lacase (Tabela 1).

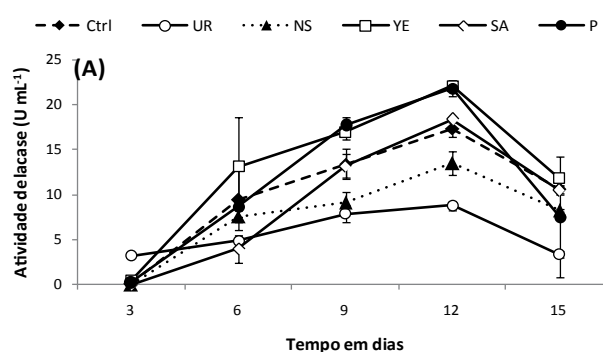
O pico de atividade enzimática de todas as linhagens ocorreu em torno do 12º dia em todos os tratamentos (Figura 1). Dentre as cinco fontes de N avaliadas, as maiores atividades de lacase foram observadas no meio contendo extrato de levedura (YE), que promoveu aumento em torno de 28% na atividade de lacase de *L. edodes* U6/1 e *P. ostreatus* U6/9 (Tabela 1). Apesar da menor produção de lacase, *P. florida* U6/10 também sofreu influência significativa da presença de YE e sua produção aumentou 167% nessa condição.

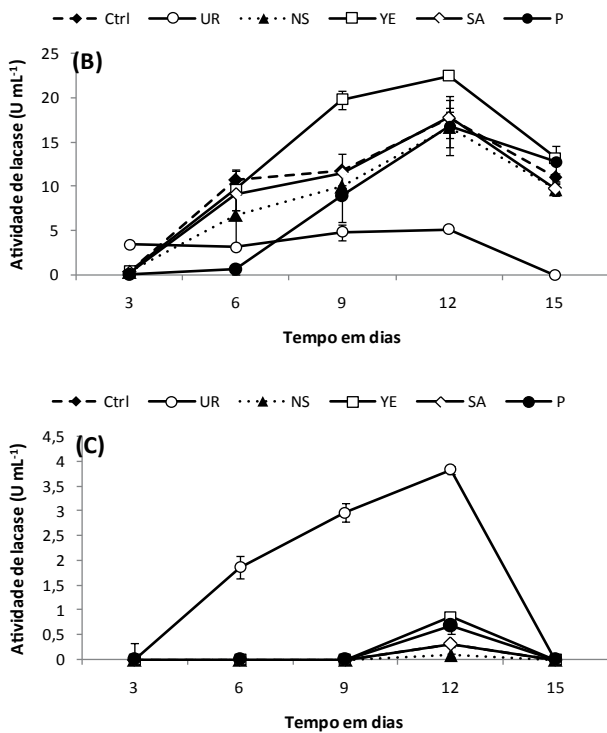
A presença de peptona também aumentou a produção de lacase de *L. edodes* (26%) e *P. florida* (133%), mas reduziu ligeiramente a produção de lacase de *P. ostreatus* (4%). Já a ureia reduziu fortemente a produção de lacase tanto de *P. ostreatus* (70%) quanto de *L. edodes* (49%). De forma contrária, *P. florida* produziu 12,5 vezes mais lacase na presença de ureia do que na presença de qualquer outra fonte de N (Figura 1).

**Tabela 1:** Atividade máxima de lacase ( $\text{U mL}^{-1}$ ) produzida por fermentação submersa com cascas de café e diferentes fontes de nitrogênio (N).

Fontes de N	Linhagens		
	<i>P. ostreatus</i> (U6/9)	<i>P. florida</i> (U6/10)	<i>L. edodes</i> (U6/1)
Controle	17,6	0,3	17,4
Extrato de levedura	22,5*	0,8*	22,2*
Peptona	16,9	0,7*	21,9*
Ureia	5,2	3,8*	8,8
Nitrato de sódio	16,7	0,1	13,6
Sulfato de amônio	17,8*	0,3	18,4*

\*Aumento significativo em relação ao controle ( $p < 0,001$ )





**Figura 1:** Atividade de lacase de (A) *L. edodes* U6/1, (B) *P. ostreatus* U6/9 e (C) *P. florida* U6/10 obtida na presença de diferentes fontes de nitrogênio (5 g L<sup>-1</sup>) por fermentação submersa com cascas de café. Onde Ctrl – sem nitrogênio, UR – ureia, NS – nitrito de sódio, YE – extrato de levedura, SA – sulfato de amônio, P – peptona.

O SA foi a única fonte aprotéica que afetou positivamente a produção de lacase de *L. edodes* e *P. ostreatus*, elevando a atividade em 1 e 5%, respectivamente.

Fontes de nitrogênio desempenham um importante papel na produção de lacases e seus efeitos dependem da natureza e concentração da fonte no meio de cultivo. De modo geral, nitrogênio inorgânico está associado à menor produção de lacases, enquanto fontes orgânicas desse nutriente favorecem a produção de níveis elevados dessa enzima (PISCITELLI et al., 2011).

Os resultados aqui apresentados são superiores aos obtidos por Tinoco et al. (2011), em que a maior atividade de lacase de *Pleurotus* sp foi de 1,4 U mL<sup>-1</sup> utilizando meio a base de extrato de malte contendo fontes de N proteicas como peptona e extrato de levedura. Karp et al. (2012) relataram atividade máxima de lacase de 11,6 U g<sup>-1</sup> trabalhando com *Pleurotus ostreatus*, em fermentação no estado sólido em meio a base de bagaço de cana acrescido de YE. D'Agostini et al. (2011) observaram maior atividade de lacase (80 U g<sup>-1</sup>) de *Pleurotus ostreatus*, utilizando sulfato de amônio como fonte de nitrogênio em fermentação no estado sólido com cascas de soja.

O nitrogênio afeta diretamente a expressão de genes de lacase, processo intermediado por proteínas similares à proteínas NIT2, envolvidas na regulação do metabolismo de N em *Neurospora crassa* (MARSLUF, 1997). Sequências consenso, correspondentes a sítios de ligação de proteínas NIT2, na região promotora de genes de lacase de *Pleurotus sajor-caju* sugerem o provável envolvimento desse tipo de proteína na expressão gênica (SODEN; DOBSON, 2001).

Com base nos resultados obtidos nos ensaios com

diferentes fontes de N, a linhagem melhor produtora (*P. ostreatus* U6/9) e a melhor fonte de N (extrato de levedura) foram utilizadas na avaliação do efeito de diferentes concentrações de N (1, 3, 5, 7 e 9 g L<sup>-1</sup>) e da adição de CuSO<sub>4</sub> (150 µM) ao meio de cultivo.

A maior atividade de lacase foi observada na presença de 9 g L<sup>-1</sup> de YE, um aumento significativo (18%) da produção de lacase em relação ao controle sem a adição de YE.

A influência do nitrogênio sobre a produção de lacase tem gerado certa polêmica, uma vez que o aumento da atividade enzimática pode ocorrer tanto em situações limitantes quanto não limitantes desse nutriente (GIARDINA et al., 2010). Estudos comprovam que o nitrogênio afeta a produção de lacase em nível transcricional (COLLINS; DOBSON, 1997; MANSUR; SUAREZ; GONZALES; 1998), porém a quantidade de nitrogênio no meio afeta de formas distintas a produção de lacase por diferentes espécies de fungos.

De forma similar ao observado nesse trabalho para *P. ostreatus*, Leatham e Kirk (1983) verificaram que maior concentração de nitrogênio aumentou a produção de lacase por *Pleurotus ostreatus* e *Lentinula edodes*. Contudo, Caltoni et al. (2006) relataram que *Pleurotus sajor-caju* produziu maior atividade de lacase na presença de níveis mais baixos de nitrogênio (0,5 g L<sup>-1</sup>), demonstrando diferenças importantes na resposta ao N de diferentes espécies do mesmo gênero.

A adição de cobre aos meios de cultivo produziu aumento significativo da atividade de lacase em praticamente todas as concentrações de nitrogênio testadas (Tabela 2). Os aumentos mais expressivos foram observados quando CuSO<sub>4</sub> foi adicionado ao meio com 5 g L<sup>-1</sup> de YE (9%), seguido meio contendo 9 g L<sup>-1</sup> YE (5%). Quando cobre foi acrescentado ao meio contendo a menor concentração de N (1 g L<sup>-1</sup> de YE) e no meio sem YE não houve aumento da atividade de lacase. Tais resultados são similares aos obtidos por Giardina et al. (1999) que verificaram que *Pleurotus ostreatus* produziu quantidade significativamente maior de lacase (30 U mL<sup>-1</sup>) em meio rico em nitrogênio e na presença de 150 µM de CuSO<sub>4</sub> em relação à condição de ausência de cobre. Já Baldrian e Gabriel (2002), ao cultivarem *P. ostreatus* em meio limitado em nitrogênio, verificaram que a adição de 1 mM de cobre aumentou a produção de lacase em oito vezes.

**Tabela 2:** Efeito da concentração de CuSO<sub>4</sub> sobre a atividade de lacase (U mL<sup>-1</sup>) de *Pleurotus ostreatus* U6/9 após doze dias de fermentação submersa com cascas de café e extrato de levedura (YE).

	Concentração de YE (g L <sup>-1</sup> )					
	Con- trole	1 g L-1	3 g L-1	5 g L-1	7 g L-1	9 g L-1
- CuSO <sub>4</sub>	16,8	17,4	18,9	14,6	19,4	20,0
+ CuSO <sub>4</sub>	16,1	17,6	19,0*	15,9*	20,0*	21,0*

\*Aumento significativo em relação ao meio sem CuSO<sub>4</sub> (p<0,001)

O cobre é considerado como um dos indutores de lacase mais eficientes já que é necessário para a síntese das cobre polifenoloxidasas (GALHAUP et al., 2001; DEKKER et al., 2007). Além disso, a influência do cobre sobre a regu-

lação da expressão gênica de lacase tem sido relatada para diversas espécies de fungos (PALMIERI et al., 2000; CAVALAZZI et al., 2005; NITHERANONT et al., 2011; KARP, 2012) e parece ocorrer via elementos sensíveis a metal (MRE – *metal responsive element*) presentes na região promotora de genes de lacase e que são indiretamente afetados pela presença de cobre no meio de cultivo (FARACO et al., 2003).

Giardina et al. (1999), ao analisarem a região promotora de um gene de lacase induzida por cobre (POXA1b) de *P. ostreatus*, identificaram um MRE. Mais tarde, Faraco et al. (2003) identificaram quatro MREs na região promotora de dois genes de lacase de *P. ostreatus* (poxc e pox1b). Tais achados sugerem que essa espécie expressa tanto lacases constitutivas quando lacases induzidas por cobre e que tais diferenças de expressão parecem ser determinadas pelo tipo e pela concentração de N no meio de cultivo. Nossos resultados indicam que *P. ostreatus* U6/9 respondeu de forma muito similar ao N e à presença de cobre, contudo, estudos sobre a expressão gênica de lacase dessa linhagem em diferentes condições de cultivo são necessários para maior compreensão dos mecanismos reguladores dessa enzima.

### Conclusões

A casca de café é um bom substrato para produção de lacases de todas as linhagens analisadas, sendo *Pleurotus ostreatus* U6/9 a linhagem mais produtiva (22,5 U mL<sup>-1</sup>) nas condições testadas.

A melhor fonte de nitrogênio para produção de lacases de *Pleurotus ostreatus* U6/9 foi o extrato de levedura na concentração de 9 g L<sup>-1</sup> (20 U mL<sup>-1</sup>). A adição de 150 µM de CuSO<sub>4</sub> no 3º dia de cultivo resultou na indução significativa na produção de lacases dessa linhagem (21 U mL<sup>-1</sup>) todavia, são necessários mais estudos para determinar a concentração ótima desse metal e a otimização das demais condições de cultivo.

### Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq pela bolsa PEBIC concedida, à Universidade Paranaense pela bolsa PIBIC concedida e a CAPES pela bolsa concedida.

### Referências

BALDRIAN, P.; GABRIEL, J. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*, **FEMS Microbiology Letters**, v. 20, n. 1, p. 69-74, 2002.

BONFÁ, M. R. L. et al. Produção de ligninases por fungos de degradação branca em resíduos agroindustriais. In: SINAIFERM (SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES), 14., 2003, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: SINAIFERM, 2003 p.

CALLONI, R. et al. Influencia das concentrações de fontes de carbono e nitrogênio sobre a produção de lacases em cultivo submerso de *Pleurotus sajor-caju* PS-2011. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 58., 2006, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: SBPC, 2006. p. 48.

CAVALAZZI, J. R. P.; KASUYA, C. M.; SOARES, M. A. Screening of inducers for laccase production by *Lentinula edodes* in liquid medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 36, p. 383-387, 2005.

COLLINS, P. J.; DOBSON, A. D. W. Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 344-3450, 1997.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. **Séries históricas relativas às safras 1976/77 a 2009/2010 de área plantada, produtividade e produção. Café**. Brasília: CONAB. 2011. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=>. Acesso em: 10 ago. 2012.

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

CUNHA, M. B.; BIANCHINI, J. I. Cinética de mineralização aeróbia de celulose e lignina durante a degradação de *Cabomba piauhyensis* e *Scirpus cubensis*. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 10, p. 59-69, 1998.

D'AGOSTINI, E. C. et al. Low carbon/nitrogen ratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 3, p. 295-300, May/June 2011.

DEKKER, R. F. H et al. Influence of nutrients on enhancing laccase production by “*Botryosphaeria rhodina*” MAMB-05. **Journal of the Spanish Society for Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 177-186, 2007.

FARACO, V.; GIARDINA, P.; SANNIA, G. Metal-responsive elements in *Pleurotus ostreatus* laccase gene promoters. **Great Britain Microbiology**, v. 149, p. 2155-2162, 2003.

GAITAN-HERNANDEZ, R. et al. Quantitative changes in the biochemical composition of lignocellulosic residues during the vegetative growth of *Lentinula edodes*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 1, 2011.

GALHAUP, C.; WAGNER, B. H.; HALTRICHA, D. Increased production of laccase by the wood-degrading basidiomycete *Trametes pubescens*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 529-536, 2001.

GARCIA, T. A. **Purificação e caracterização das lacases de *Pycnoporus sanguineus***. 2006. 126 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília - DF, Brasília, 2006.

GIARDINA, P. et al. Laccases: a never-ending story. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, p. 369-385, 2010.

GIARDINA, P. et al. Protein and gene structure of a blue

- laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Biochemical Journal**, v. 34, p. 655-663, 1999.
- HAN, M. J. et al. Purification and characterization of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*. **Journal of Biotechnology**, v. 43, p. 555-560, 2005.
- KARP, S. G. et al. Characterization of laccase isoforms produced by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 114, p. 735-739, 2012.
- KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzymes applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 345-351, 2002.
- LEATHAM, G. F.; KIRK, T. K. Regulation of lignolytic activity by nutrient nitrogen in white-rot basidiomycetes. **Microbiologist**, v. 16, p. 65-68, 1983.
- LEITNER, C. et al. Purification and characterization of a laccase from the white-rot fungus *Trametes multicolor*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98-100, p. 497-507, 2002.
- MANSUR, M.; SUÁREZ, T.; GONZÁLEZ, A. E. Differential gene expression in the laccase gene family from basidiomycete I-62 (CECT 20197). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 771-774, 1998.
- MARSLUF, G. A. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, p. 17-32, 1997.
- MARTÍNEZ, A. T. et al. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International Microbiology**, v. 8, p. 195-204, 2005.
- MIYAJI, C. K.; COLUS, I. M. S. Mushroom Shiitake, is it mutagenic or antimutagenic agent. **Semina: Ciências Biológicas Saúde**, v. 22, p. 11-17, 2001.
- NITHERANONT, T.; WATANABE, A.; ASADA, Y. Extracellular laccase produced by an edible basidiomycetous mushroom, *Grifola frondosa*: purification and characterization. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 75, n. 3, 100790/1-100790/6, 2011.
- OLIVEIRA, M. A. et al. Produção de inóculo do cogumelo comestível *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quélet - CCB19 a partir de resíduos da agroindústria. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 84-87, 2007.
- OLIVEIRA, V. M. et al. Preservação e prospecção de recursos microbianos. **Multiciência**, n. 7, 2006.
- PALMIERI, G. et al. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. **American Society for Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 920-924, 2000.
- PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, v. 6, p. 153-162, 2000.
- PISCITELLI, A. et al. Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. **Current Genomics**, v. 12, p. 104-112, 2011.
- SALVI, M. B. **Fungos Basidiomicetos em Biorremediação**. 2011. 23 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica de São Paulo – IBT, São Paulo, 2011.
- SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Principal components analysis in the software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 2009, Reno-NV-USA. **Anais...** Reno: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.
- SOCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**. v. 13, p. 205-218, 2003.
- SODEN, D. M.; DOBSON, A. D. W. Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*. **Microbiology**, v. 147, p. 1755-1763, 2001.
- TINOCO, R. et al. Increasing *Pleurotus ostreatus* laccase production by culture medium optimization and copper/lignin synergistic induction. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 531-540, 2011.