

PRODUÇÃO DE LACASE DE *Pycnoporus sanguineus* EM MEIO DE CULTIVO À BASE DE MELAÇO SOJA

Fabricia Flores Fabrini¹
 Katielle Vieira Avelino²
 Renan Alberto Marim²
 Bruna Karen Cardoso²
 Giani Andrea Linde Colauto²
 Nelson Barros Colauto²
 Juliana Silveira do Valle²

FABRINI, F. F.; AVELINO, K. V.; MARIM, R. A.; CARDOSO, B. K.; COLAUTO, G. A. L.; COLAUTO, N. B.; VALLE, J. S. do. Produção de lacase de *Pycnoporus sanguineus* em meio de cultivo a base de melaço soja. **Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR**, Umuarama, v. 19, n. 3, p. 159-164, jul./set. 2016.

RESUMO: Lacases são polifenol oxidases que utilizam a capacidade redox de íons cobre para reduzir oxigênio a água e oxidar um substrato fenólico. A síntese e secreção de lacases de basidiomicetos dependem de vários fatores como os nutrientes presentes no meio de cultura. Visando à produção de lacase, *Pycnoporus sanguineus* foi cultivado em meio contendo melaço de soja como única fonte de carbono, ureia como fonte de nitrogênio suplementar em diferentes concentrações (0,6; 1,2; 2,4; 4,8 e 9,6 g/L de nitrogênio) e diferentes concentrações de CuSO₄ (0, 150, 200, 250 e 300 µM). O extrato enzimático produzido nas melhores condições de cultivo foi utilizado para a descoloração dos corantes remazol azul brilhante R (antraquinona), amarelo 145, preto 5, vermelho 195 (azo) e verde malaquita (trifenilmetano). As concentrações de nitrogênio não afetaram a produção de lacase, exceto a maior concentração (9,6 g/L) que reduziu a atividade enzimática. A adição de cobre ao meio de cultivo (150 µM) aumentou a atividade de lacase em 112%. A maior atividade de lacase (~34300 U/L) promoveu a descoloração dos corantes remazol azul brilhante R (67,5%) e verde malaquita (28,3%) em 24h, sendo os corantes azo descoloridos apenas parcialmente. Concluiu-se que o melaço de soja é um resíduo agroindustrial adequado para produção de lacase de *P. sanguineus* com potencial para degradação de corantes.

PALAVRAS-CHAVE: Antraquinona. Corante azo. Ligninases. Poliporaceae. Resíduos agroindustriais.

LACCASE PRODUCTION BY *Pycnoporus sanguineus* IN CULTURE MEDIA WITH SOYBEAN MOLASSES

ABSTRACT: Laccases are multicopper oxidases using the redox ability from copper ions to reduce oxygen to water, while oxidizing a phenolic substrate. Laccase synthesis and secretion in basidiomycetes depend on the conditions provided and on the nutrients present in the culture medium. *Pycnoporus sanguineus* was cultivated in medium containing soybean molasses as the sole carbon source, with urea as the source of supplemental nitrogen at different concentrations (0.6, 1.2, 2.4, 4.8 and 9.6 g/L nitrogen), and different CuSO₄ concentrations (0, 150, 200, 250 and 300 µM). The enzymatic extract produced under the best cultivation conditions was used for the depigmentation of remazole brilliant blue R (anthraquinone), yellow 145, black 5, red 195 (azo) and malachite green (triphenylmethane). Nitrogen concentrations did not affect laccase production, except for the higher concentration (9.6 g/L) reducing enzymatic activity. The addition of copper to the culture medium (150 µM) increased laccase activity by 112%. The highest laccase activity (~34300 U/L) promoted the depigmentation of remazol brilliant blue R (67.5%) and malachite green (28.3%) dyes in 24 hours. Azo dyes were only partially discolored. Therefore, it can be considered that soybean molasses is an agro-industrial byproduct suitable for the production of *P. sanguineus* laccase with potential for dye degradation.

KEYWORDS: Agro-industrial byproduct. Anthraquinone. Azo dye. Ligninases. Poliporaceae.

PRODUCCIÓN DE LACASA DE *Pycnoporus sanguineus* EN MEDIO DE CULTIVO CON MELAZA DE SOJA

RESUMEN: Lacasas son polifenoles oxidadas que utilizan la capacidad redox de iones de cobre para reducir el oxígeno del agua y oxidar un sustrato fenólico. La síntesis y secreción de lacasas de basidiomicetos dependen de las condiciones como los nutrientes presentes en el medio de cultura. Buscando la producción de lacasa, se cultivó *Pycnoporus sanguineus* en medio que contenía melaza de soja como única fuente de carbono, urea como fuente de nitrógeno suplementar a diferentes concentraciones (0,6, 1,2, 2,4, 4,8 y 9,6 g/L de nitrógeno) y diferentes concentraciones de CuSO₄ (0, 150, 200, 250 y 300 µM). El extrato enzimático producido en mejores condiciones de cultivo ha sido utilizado para la decoloración de los colorantes remazol azul brillante R (antraquinona), amarillo 145, negro 5, rojo 195 (azoico) y verde malaquita (trifenilmetano). Las concentraciones de nitrógeno no afectaron la producción de lacasa, excepto la mayor concentración (9,6 g/L) que redujo la actividad enzimática. La adición de cobre al medio de cultivo (150 µM) aumentó la actividad de la lacasa en un 112%. La

DOI: <https://doi.org/10.25110/arqvet.v19i3.2016.6089>

¹Graduada em Farmácia, Universidade Paranaense, UNIPAR. Praça Mascarenhas de Moraes, 4282, Umuarama – PR. CEP 87502-210. (fabrini.fabricia@gmail.com)

²Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Universidade Paranaense, UNIPAR. Praça Mascarenhas de Moraes, 4282, Umuarama – PR. CEP 87502-210. (jsvalle@unipar.br)

mayor actividad de lacasa (~34300 U/L) promovió la decoloración de los colorantes remazol azul brillante R (67,5%) y verde malaquita (28,3%) en 24h, siendo que los colorantes azoicos fueran parcialmente decolorados. Se concluye que la melaza de soja es un desecho agroindustrial adecuado para la producción de lacasa de *P. sanguineus* con potencial para degradación de colorantes.

PALABRAS CLAVE: Antraquinona. Colorante azoico. Desechos agroindustriales. Ligninasas. Poliporaceae.

Introdução

Lacases (EC 1.10.3.2, *p*-difenoil: dioxigênio oxidoreductase) são ligninasas estáveis, capazes de degradar uma ampla variedade de substratos fenólicos e aromáticos e que requerem condições amenas para catálise. Essas enzimas catalisam a oxidação de seus substratos ao radical livre correspondente enquanto reduzem oxigênio à água (MARTÍNKOVÁ et al., 2016). Lacases têm sido propostas para várias aplicações biotecnológicas como nas indústrias de alimentos, papel e celulose, biocombustíveis, têxtil e em biorremediação (MATE; ALCALDE, 2016).

Os segmentos industriais têxteis podem ser beneficiados por aplicações das lacases, particularmente na biorremediação de seus efluentes têxteis altamente poluidores (PEZZELLA; GUARINO; PISCITELLI, 2015). Efluentes têxteis são recalcitrantes e apresentam misturas complexas de corantes, sais, ácidos, bases, surfactantes, dispersantes, umectantes, oxidantes e detergentes que tornam estas águas inutilizáveis e representam riscos para vários ecossistemas (KHANDARE; GOVINDWAR, 2015). Milhares de tipos de corantes sintéticos são utilizados pela indústria correspondendo a 700 mil toneladas de corantes por ano (ANNUAR et al., 2009), sendo que as classes químicas mais utilizadas são os corantes azo, antraquinona, nitro, nitroso, indigo, trifenilmetano e ftaleína (ALI, 2010). Apesar do grande número de sistemas físico-químicos desenvolvidos para remover corantes de efluentes industriais (JOO et al., 2007), essas abordagens são muitas vezes ineficientes para remoção da cor, gerando grande quantidade de resíduos adicionais e requerem tratamentos complementares de custo elevado (RODRIGUEZ-COUTO, 2013). Lacases são capazes de degradar diferentes classes de corantes e representam uma alternativa ambientalmente mais adequada quando comparada aos tratamentos convencionais de efluentes coloridos (NIEBISCH et al., 2010).

Fungos da podridão branca da madeira (FPM) são basidiomicetos produtores de lacases e outras ligninasas, com capacidade de degradar de forma eficiente a lignina conferindo coloração esbranquiçada à madeira. *Pycnoporus sanguineus* (L.) Murrill (Polyporaceae) é um fungo de ocorrência tropical e subtropical comum em todo o Brasil. Considerado um FPM, apresenta elevado potencial ligninolítico e produz lacase como a principal enzima degradadora de lignina (HERNÁNDEZ et al., 2016).

A capacidade de *P. sanguineus* em degradar diferentes classes de corantes industriais já foi descrita (MOREIRA-NETO et al., 2013; MARIM et al., 2016). Entretanto, a produção de lacase por fungos depende das condições de cultivo e está relacionada com a presença de nutrientes e indutores no meio de cultivo (VALLE et al., 2015). Isoformas distintas de lacases podem apresentar diferentes papéis na fisiologia do fungo e poderiam ser utilizadas em grande variedade de aplicações (MARIM et al., 2016).

O melaço de soja, uma fonte de carbono de baixo

custo, foi utilizado na produção de lacase de *P. sanguineus*. O melaço de soja é um subproduto da cadeia produtiva da soja, obtido a partir do processamento dos grãos para produção de concentrado protéico de soja e proteína isolada de soja. Os processos de extração e concentração geram um xarope marrom escuro, rico em carboidratos solúveis e proteína (AL LOMAN; JU, 2016). É considerado um subproduto com grande potencial de mercado, usado para produção de ração animal, biocombustíveis e enzimas (SIQUEIRA et al., 2008).

O objetivo desse estudo foi cultivar *P. sanguineus* utilizando o melaço de soja como fonte de carbono com diferentes concentrações de nitrogênio e cobre para avaliar a produção de lacase e sua capacidade de reduzir a cor de corantes sintéticos.

Material e Métodos

Micro-organismo

P. sanguineus linhagem U13-4 pertencente à coleção de culturas do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura da Universidade Paranaense. O basidiomiceto foi cultivado em ágar extrato de malte (AEM, 20 g/L) a 28 °C por sete dias para a produção de inóculo. Três discos de 6 mm de diâmetro contendo o micélio foram utilizados para inocular os meios de cultivo para a produção de lacase.

Produção de lacase

A produção de lacase foi conduzida em frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 100 mL de meio de cultivo composto por ureia (2,4 g/L de nitrogênio), fosfato de potássio monobásico (1 g/L); sulfato de magnésio heptahidratado (0,5 g/L); sulfato ferroso heptahidratado (0,01 g/L) (VALLE et al., 2014) suplementado com melaço de soja (MS) como única fonte de carbono. O MS foi diluído em água destilada e incorporado ao meio em quantidade suficiente para obter-se concentração final de açúcares totais de 10 g/L. O meio foi autoclavado a 121 °C por 20 minutos, exceto a solução de ureia que foi filtrada em membrana de 0,22 µm e adicionada ao meio posteriormente. Após inoculação, os frascos foram mantidos em BOD a 28 ± 1 °C por 12 dias, na ausência de luz. Ao final do período de cultivo a atividade de lacase foi determinada.

Produção de lacase com diferentes concentrações de ureia e cobre

Avaliou-se a produção de lacase em diferentes concentrações de nitrogênio fornecido como ureia: 0,6 g/L; 1,2 g/L; 2,4 g/L; 4,8 g/L; 9,6 g/L. O meio de cultivo contendo a concentração de nitrogênio que promoveu a maior atividade de lacase foi suplementado com CuSO₄ em diferentes concentrações. Uma solução de cobre (30 mM) foi adicionada

asépticamente ao meio no terceiro dia de cultivo e em volume suficiente para obter concentração final de 0, 150 μM ; 200 μM ; 250 μM e 300 μM . A concentração de cobre que favoreceu a produção de lacase foi utilizada nos testes subsequentes.

Teste de descoloração de corantes

Avaliou-se a descoloração de diferentes corantes pelo extrato bruto de *P. sanguineus* U13-4. O extrato foi obtido pela separação do micélio do meio de cultivo por centrifugação a 8000 g, por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi recuperado, esterilizado por filtração (membrana de 0,22 μm) e utilizado nos ensaios de descoloração. Foram utilizados os seguintes corantes: antraquinônico remazol azul brilhante R (RBBR); azo amarelo 145 (RY45), preto 5 (RB5) e vermelho 195 (RR195) e trifenilmetano verde malaquita (VM). O corante RBBR foi adquirido da Sigma-Aldrich e os demais foram gentilmente cedidos pela Araquímica Indústria de Comércio de Corantes Ltda., Recife, Pernambuco.

As soluções de corante foram preparadas a 0,1% em água ultrapura. As reações de descoloração continham a mistura de extrato (3,2 mL), tampão acetato de sódio (0,4 mL - 0,1 M, pH 5,0) e solução de corante 0,4 mL. A mistura foi mantida a 28 °C por 24 horas em BOD e o percentual de descoloração foi determinado por espectrofotometria no pico de absorção de cada corante (NIEBISCH et al., 2010): RBBR (595 nm), RB5 (597 nm), RR195 (540 nm), RY145 (416 nm) e VM (620 nm).

Quantificação da atividade de lacase

A atividade da lacase foi avaliada pela oxidação de solução (1 mM) de ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)) segundo Valle et al. (2014). Uma alíquota de 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. A mistura foi mantida a 30 °C por 10 min e a reação foi interrompida pela adição de 100 μL de solução de ácido tricloroacético 5% (m/v). A oxidação do ABTS foi acompanhada pelo aumento da absorbância a 420 nm ($\epsilon = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Misturas 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 μmol de ABTS por minuto.

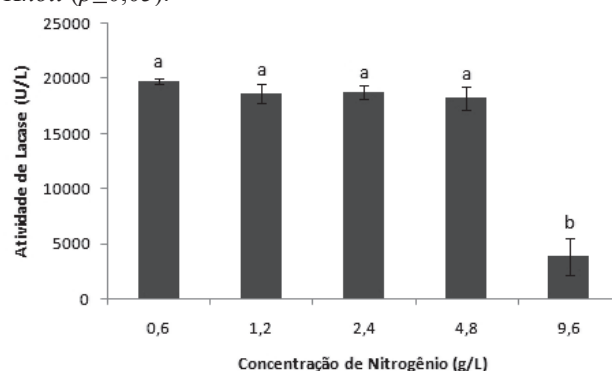
Análise estatística

Os experimentos seguiram o delineamento inteiramente casualizado conduzidos em três repetições. Os resultados foram avaliados empregando-se análise de variância (ANOVA) e as diferenças significativas entre as médias determinadas pelo teste de *Scott-Knott* a 5% de probabilidade com auxílio do programa Assistat 7.6 beta (DEAG -CTRB-UFCG, Campina Grande-PB, Brasil).

Resultados

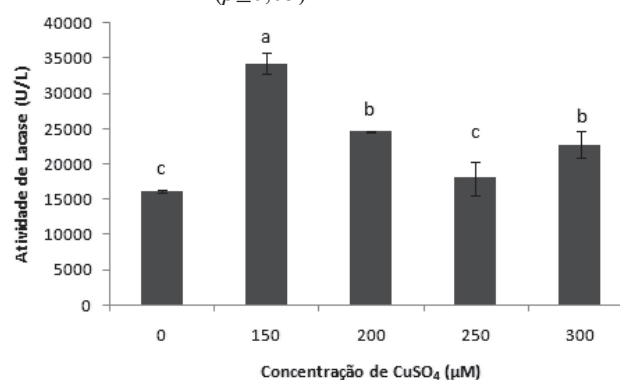
A suplementação do meio de cultivo com o melaço de soja em diferentes concentrações de nitrogênio não afetou a produção de lacase de *P. sanguineus* U13-4, exceto para a maior concentração de nitrogênio (9,6 g/L) que reduziu a produção em 81% (Figura 1). A maior atividade de lacase ($p \leq 0,05$) foi observada na presença da menor (0,6 g/L) concentração de N (19749 U/L e 68,5 U/L h). Contudo, não houve diferença ($p \leq 0,05$) na atividade enzimática entre as concentrações de nitrogênio de 0,6 e 4,8 g/L. Dessa forma, 0,6 g/L foi a concentração de nitrogênio escolhida para os testes com diferentes concentrações de CuSO_4 .

Figura 1: Atividade de lacase (média \pm desvio padrão) de *Pycnoporus sanguineus* em meio de cultivo contendo melaço de soja como única fonte de carbono e diferentes concentrações de nitrogênio (ureia). Médias indicadas pela mesma letra não apresentam diferença estatística pelo teste de *Scott-Knott* ($p \leq 0,05$).



A adição de cobre aumentou a produção de lacase ($p \leq 0,05$). A produção mais expressiva ocorreu na presença de 150 μM de CuSO_4 (34306 U/L) que elevou a produção em 112% quando comparada ao controle sem cobre (Figura 2). As demais concentrações de cobre avaliadas também afetaram positivamente a produção de lacase de *P. sanguineus* U13-4 com aumentos de produção que variaram entre 53% (200 μM) a 41% (300 μM). Somente a produção com 250 μM não diferiu estatisticamente da produção sem cobre.

Figura 2: Atividade de lacase (média \pm desvio padrão) de *Pycnoporus sanguineus* em meio de cultivo contendo melaço de soja como única fonte de carbono, 0,6 g/L de nitrogênio (ureia) e diferentes concentrações de CuSO_4 . Médias indicadas por letras diferentes apresentam diferença estatística pelo teste de *Scott-Knott* ($p \leq 0,05$).



O extrato bruto enzimático produzido com 150 μM de CuSO_4 foi usado nos testes de descoloração que resultaram na descoloração parcial de todos os corantes (Tabela 1). O corante antraquinônico RBBR foi o que sofreu a maior

descoloração, com 67,5% seguido pelo corante trifenilmetano VM, 28,3%. Os corantes azo sofreram as menores taxas de descoloração (Tabela 1).

Tabela 1: Descoloração em 24 horas de diferentes classes de corantes sintéticos pelo extrato bruto enzimático de *Pycnoporus sanguineus* obtido do cultivo em meio contendo melaço de soja como única fonte de carbono, 0,6 g/L de nitrogênio (ureia) e 150 μM de CuSO_4 . RBBR - remazol azul brilhante R, RY145 - amarelo 145, RB5 - preto 5, RR195 - vermelho 195 e VM - verde malaquita.

Descoloração (%)	Antraquinona	Azo			Trifenilmetano
	RBBR	RY145	RB5	RR195	VM
	67,5	3,4	10,0	3,8	28,3

Discussão

A capacidade de produção de lacase por fungos do gênero *Pycnoporus* é conhecida (TROSVALET et al., 2007; FONSECA et al., 2010). Entretanto, a produção dessa enzima em meios contendo fontes alternativas e mais baratas de nutrientes ainda é pouco conhecida e explorada. Poucos são os estudos que avaliaram o cultivo de *P. sanguineus* em diferentes subprodutos agroindustriais para produção de lacase (MARIM et al., 2016; ZIMBARDI et al., 2016). A produção com melaço de soja após a otimização do cultivo foi 1,5 menor do que a produção relatada por Marim et al. (2016) com essa mesma linhagem, mas cultivada com melaço de cana-de-açúcar 3,4 g/L de nitrogênio (ureia) e sem cobre como indutor. Entretanto, a produção nesse estudo foi seis vezes maior que a obtida por Zimbardi et al. (2016) para a linhagem de *P. sanguineus* RP15 em cultivo no estado sólido com farelo de trigo (5900 U/L). O melaço de soja possui entre 50 e 60% carboidratos com uma mistura de diferentes sacarídeos como sacarose (17-28%), estaquiase (17-19%), rafinose (9-10%), frutose (0,5-1,5%) e glicose (0,2-0,5%), além de quantidade significativa de proteína (9,5%) e lipídeos (20%) (SIQUEIRA et al., 2008). Essa composição torna o melaço de soja um substrato com potencial para o desenvolvimento de processos biotecnológicos, incluindo a produção de enzimas como lacases e outros insumos de interesse (SOCCOL et al., 2010).

A produção de lacase depende de vários fatores, como a disponibilidade de carbono e nitrogênio, as fontes desses nutrientes e suas concentrações no meio de cultivo. O efeito da concentração de nitrogênio sobre a produção de lacase por fungos tem se mostrado variável. Autores relatam aumento na produção com o aumento da concentração de nitrogênio e outros relatam o oposto. Os resultados demonstraram que a maior concentração de nitrogênio reduziu a produção de lacase de *P. sanguineus* U13-4 em meio com melaço de soja, o oposto do relatado por Marim et al. (2016) que observaram maior produção de lacase de *P. sanguineus* U13-4 na presença da maior concentração de nitrogênio (3,4 g/L) quando cultivado com melaço de cana-de-açúcar. O melaço de soja é rico em proteínas, 9,5% (SIQUEIRA et al., 2008) ao contrário do melaço de cana-de-açúcar utilizado por Marim et al. (2016) que tem em torno de 0,5% de nitrogênio. Essa diferença no teor de proteínas e nitrogênio dos melaços pode ter influenciado a resposta de *P. sanguineus* U13-4 à suplementação dos meios com fonte adicional de nitrogênio. Os resultados são similares aos de Pointing, Jones e Vrijmo-

ed, (2000) que também relataram redução da lacase de *P. sanguineus* na presença de maiores concentrações de nitrogênio. Porém, os autores usaram fontes diferentes de nitrogênio (tartarato de amônio) o que dificulta a comparação de resultados. A variedade de resultados sugere que diferentes linhagens de fungo respondem à concentração de nitrogênio de forma distinta.

O cobre é conhecido como um indutor da atividade de lacase para muitas espécies de fungos (VALLE et al., 2014) e parece influenciar linhagens de *P. sanguineus* de forma distinta. A adição de 150 μM de cobre aumentou a atividade de lacase de forma significativa ($p \leq 0,05$) (~34300 U/L), resultados similares aos descritos por Fonseca et al. (2010) que relataram aumento na atividade de lacase de *P. sanguineus* BAFC 2126 na presença de 500 μM de cobre. Contudo, os resultados desse estudo diferem dos relatados por Marim et al. (2016) que não observaram efeitos do cobre sobre a atividade de lacase de *P. sanguineus* U13-4 cultivado em melaço de cana-de-açúcar.

A indução de lacase por cobre é resultado da influência direta desse metal sobre a expressão gênica da enzima (FARACO; GIARDINA; SANNIA, 2003). Não há até o momento, dados sobre a regulação gênica de lacase em *P. sanguineus*, porém, observações feitas para outras espécies do gênero *Pycnoporus* sugerem que a regulação da expressão difere entre linhagens. Para *P. coccineus* a adição de cobre (200 μM) aumentou a produção de lacase de cinco dentre sete linhagens analisadas (PARK et al., 2015). Todavia, os autores verificaram que, mesmo todas as linhagens apresentando ao menos um gene de lacase (*lcc1*), duas linhagens não responderam à indução com cobre. Isso permite sugerir que a resposta de *P. sanguineus* ao cobre também possa estar relacionada com a capacidade de diferentes linhagens adaptarem-se às condições ambientais exigindo que possíveis indutores sejam avaliados em cada situação específica de cultivo e para cada linhagem (PARK et al., 2015; MARIM et al., 2016).

O extrato bruto enzimático de *P. sanguineus* U13-4 cultivado em condições otimizadas (~34300 U/L de lacase) promoveu a descoloração parcial de todos os corantes avaliados (24 horas, pH 5). As maiores taxas de descoloração em 24 horas foram observadas para o corante antraquinônico RBBR (67,5%) e para o corante trifenilmetano verde malaquita (28,3%). Os corantes azo sofreram apenas descoloração moderada (10% - preto 5) ou pequena (< 5% - amarelo 145 e vermelho 195). Dentre os FPM o mesmo mecanismo que torna esses fungos capazes de degradarem a lignina, per-

mite que eles degradem uma ampla variedade de moléculas similares à lignina em estrutura como é o caso dos corantes sintéticos (RODRIGUEZ-COUTO, 2013). Esses fungos produzem um conjunto de enzimas extracelulares como a lacase e peroxidases que atuam sinergicamente na degradação da lignina. *P. sanguineus*, contudo, produz somente lacase (ANNUAR et al., 2009; HERNANDEZ et al., 2016) o que nos permite afirmar que a descoloração de corantes observadas nesse estudo pode ser atribuída à ação dessa enzima.

Resultados similares foram observados por Marim et al. (2016) quando o extrato enzimático de *P. sanguineus* U13-4 produziu 80% de descoloração do RBBR (24 horas, pH 5); por Iracheta-Cárdenas et al. (2016) que reataram que *P. sanguineus* reduziu a cor do RBBR em 90% (quatro horas; pH 5) e por Zimbardi et al. (2016) que usou o extrato de *P. sanguineus* RP15 descolorindo 80% do RBBR (duas horas).

P. sanguineus U13/4 também foi capaz de descolorir parcialmente (28,3%) o corante verde malaquita. O trifenilmetano verde malaquita é utilizado para a coloração de uma variedade de materiais e como biocida, contra fungos e ectoparasitas em aquicultura (YANG et al., 2015). Resultados similares foram observados por Jasińska et al. (2015) que verificaram descoloração de oito a 11% de VM com a lacase de *Myrothecium roridum*.

Segundo Ali (2010) a biodegradação de um corante pela lacase depende da estrutura do corante. Os azo corantes possuem o grupo cromóforo -N=N- e são considerados os mais resistentes à degradação requerendo ação de enzimas mais específicas. O corante preto 5 (diazó) foi o que sofreu maior redução da cor (10%), resultados similares aos observados por Forootanfar et al. (2016) que também relataram descoloração (34%) d corante diazo amarelo 107 pelo extrato de *Paraconiothyrium variabile*.

Conclusão

O melão de soja mostrou ser um substrato adequado para a produção enzimática, proporcionando uma alternativa de custo menor para a produção da enzima lacase. Nas condições avaliadas, diferentes concentrações de nitrogênio não afetaram a produção de lacase. A suplementação do meio com 150 µM de cobre induziu a produção de lacase de *P. sanguineus* com produção máxima após 12 dias de aproximadamente 34300 U/L. O extrato enzimático mostrou-se capaz de reduzir a cor de diferentes classes de corantes, particularmente antraquinona e trifenilmetano. Os resultados desse estudo são preliminares, porém sugerem que *P. sanguineus* U13-4 tem grande potencial para aplicações biotecnológicas, especialmente em biorremediação de efluentes industriais têxteis. Contudo novas análises são necessárias para otimizar os processos de descoloração.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Universidade Paranaense, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura da Universidade Paranaense, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e bolsas.

Referências

- AL LOMAN, A.; JU, L-K. Soybean carbohydrate as fermentation feedstock for production of biofuels and value-added chemicals. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 1046–1057, 2016.
- ALI, H. Biodegradation of synthetic dyes - a review. **Water Air and Soil Pollution**, v. 213, p. 251-273, 2010.
- ANNUAR, M.S.M. et al. Kinetics and energetics of azo dye decolorization by *Pycnoporus sanguineus*. **Water Air and Soil Pollution**, v. 202, p. 179-188, 2009.
- FARACO, V.; GIARDINA, P; SANNIA, G. Metal-responsive elements in *Pleurotus ostreatus* laccase gene promoters. **Microbiology**, v. 149, p. 2155-2162, 2003.
- FONSECA, M. I. et al. Copper inducing effect on laccase production of white rot fungi native from Misiones (Argentina). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 534-539, 2010.
- FOROOTANFAR, H. et al. Studies on the laccase-mediated decolorization, kinetic, and microtoxicity of some synthetic azo dyes. **Journal of Environmental Health Science & Engineering**, v. 14, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4866392/>>. Acesso em 10 set. 2016.
- HERNÁNDEZ, C. A. et al. Light-induced inhibition of laccase in *Pycnoporus sanguineus*. **Folia Microbiologica**, v. 61, p. 137-142, 2016.
- IRACHETA-CÁRDENAS, M. M. et al. A *Pycnoporus sanguineus* laccase for denim bleaching and its comparison with an enzymatic commercial formulation. **Journal of Environmental Management**, v. 177, p. 93-100, 2016.
- JASIŃSKA, A. et al. Malachite green decolorization by the filamentous fungus *Myrothecium roridum* – Mechanistic study and process optimization. **Bioresource Technology**, v. 194, p. 43-48, 2015.
- JOO, J. D. et al. Decolorization of reactive dyes using inorganic coagulants and synthetic polymer. **Dyes and Pigments**, v. 73, p. 59-64, 2007.
- KHANDARE, R.V.; GOVINDWAR, S.P. Phytoremediation of textile dyes and effluents: Current scenario and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 1697-1714, 2015.
- MARIM, R.A. et al. Use of sugarcane molasses by *Pycnoporus sanguineus* for the production of laccase for dye decolorization. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, 2016. Disponível em: < <http://www.geneticsmr.com/articles/8036>>. Acesso em 1 nov. 2016.
- MARTÍNKOVÁ, L. et al. Biodegradation of phenolic compounds by Basidiomycota and its phenol oxidases: A

review. **Chemosphere**, v. 149, p. 373-382, 2016.

MATE, D. M.; ALCALDE, M. Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. **Microbial Biotechnology**, 2016. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/1751-7915.12422/epdf>>. Acesso em 10 out. 2016.

MOREIRA-NETO, S. L. et al. Decolorization of salt-alkaline effluent with industrial reactive dyes by laccase-producing basidiomycetes strains. **Letters in Applied Microbiology**, v. 56, p. 283-290, 2013.

NIEBISCH, C.H. et al. Decolorization and biodegradation of reactive blue 220 textile dye by *Lentinus crinitus* extracellular extract. **Journal of Hazardous Materials**, v. 180, p. 316-322, 2010.

PARK, J. W. et al. Strain-dependent response to Cu²⁺ in the expression of laccase in *Pycnoporus coccineus*. **Archives of Microbiology**, v. 197, p. 589-596, 2015.

PEZZELLA, C.; GUARINO, L; PISCITELLI, A. How to enjoy laccases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, p.923-940, 2015.

POINTING, S. B.; JONES, E. B. G.; VRIJMOED, L. L. P. Optimization of laccase production by *Pycnoporus sanguineus* in submerged liquid culture. **Mycologia**, v. 92, p. 139-144, 2000.

RODRIGUEZ-COUTO, S. Treatment of textile wastewater by white-rot fungi: still a far away reality? **Textiles and Light Industrial Science and Technology**, v. 2, p. 113-119, 2013.

SIQUEIRA, P. F. et al. Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8156-8163, 2008.

SOCCOL, C. R. et al. **Comprehensive food fermentation and biotechnology**. v. 2. New Delhi: Asiatech Publishers Inc., 2010.

TROSVALET, M. et al. Potential of a *Pycnoporus sanguineus* laccase in bioremediation of wastewater and kinetic activation in the presence of an anthraquinonic acid dye. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 368-376, 2007.

VALLE, J. S. et al. Effect of different compounds on the induction of laccase production by *Agaricus blazei*. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, p. 15882-15891, 2015.

VALLE, J. S. et al. Optimization of *Agaricus blazei* laccase production by submerged cultivation with sugarcane molasses. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, p. 939-946, 2014.

YANG, J. et al. Laccase-catalyzed decolorization of malachite green: performance optimization and degradation mechanism. **PLoS ONE**, v. 10, 2015. Disponível em: < <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0127714>>. Acesso em 10 out. 2016.

ZIMBARDI, A. L. R. L. et al. A high redox potential laccase from *Pycnoporus sanguineus* RP15: Potential application for dye decolorization. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4881498/>>. Acesso em 10 out. 2016.

Recebido em: 20.11.2016

Aceito em: 27.12.2016