



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL DO SEMIÁRIDO
UNIDADE ACADÊMICA DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOTECNOLOGIA E BIOPROCESSOS**

EDSON SALVADOR DA SILVA BESERRA

**EFEITO DO INÓCULO SOBRE A EXPRESSÃO DE LACASE POR
Lentinus crinitus CCIBt 2611**

**SUMÉ - PB
2023**

EDSON SALVADOR DA SILVA BESERRA

EFEITO DO INÓCULO SOBRE A EXPRESSÃO DE LACASE POR
Lentinus crinitus CCIBt 2611

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

Orientadora: Professora Dra. Glauciane Danusa Coelho.

SUMÉ - PB
2023



B554e Beserra, Edson Salvador da Silva.

Efeito do inóculo sobre a expressão de lacase por *Lentinus crinitus* CCIBt2611. / Edson Salvador da Silva Beserra. - 2023.

43 f.

Orientadora: Profa. Dra. Glauciane Danusa Coelho.

Monografia - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido; Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

1. *Lentinus crinitus* CCIBt2611. 2. Micologia. 3. Enzima ligninolítica. 4. Fungo de podridão branca. 5. Expressão de lacase. 6. Inóculo. 7. Basidiomiceto. 8. Fungos basidiomicetos. 9. Cultivo estacionário - fungos. 10. Água residuária. I. Coelho, Glauciane Danusa. II. Título.

CDU: 60 (043.1)

Elaboração da Ficha Catalográfica:

Johnny Rodrigues Barbosa
Bibliotecário-Documentalista
CRB-15/626

EDSON SALVADOR DA SILVA BESERRA

EFEITO DO INÓCULO SOBRE A EXPRESSÃO DE LACASE POR

***Lentinus crinitus* CCIBt 2611**

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos do Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos.

BANCA EXAMINADORA:

**Professora Dra. Glauciane Danusa Coelho.
Orientadora – UAEB/CDSA/UFCG**

**Professora Dra. Vera Maria Vale Vitalli.
Examinadora Externa – Instituto de Botânica de São Paulo**

**Professor Dr. José George Ferreira Medeiros.
Examinador Interno - UATEC /CDSA/UFCG**

Trabalho Aprovado em: 04 de dezembro de 2023.

SUMÉ - PB

Em primeiro lugar à Deus, e a todos os meus guias, que
nunca me deixam está sozinho,

A minha família, a minha amada mãe, Luzinete, e ao
meu querido pai Edilson.

A todas as pessoas que estiveram ao meu lado e tive o
prazer de as conhecer durante esta trajetória.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Quero expressar minha profunda gratidão a Deus e aos meus guias espirituais, que sempre me conduziram ao longo da minha jornada. Cada passo foi marcado por desafios, obstáculos superados e realizações que moldaram a pessoa que sou hoje. É uma caminhada desafiadora, mas incrivelmente gratificante.

À minha querida e amada mãe, Luzinete, agradeço por seu apoio incondicional e incentivo ao longo de toda a trajetória. Ao meu pai, Edilson, por estar ao meu lado. À minha segunda mãe e madrinha, Luzia, pelo constante estímulo e apoio. À minha irmã, Luana, e meu sobrinho, Enzo. À toda minha família, que não apenas apoiou, mas incentivou-me a seguir adiante.

Minha eterna gratidão à minha orientadora, que não foi apenas uma mentora acadêmica, mas também uma figura materna. Agradeço a oportunidade de desenvolver este projeto e pelos conselhos valiosos que transcenderam a esfera acadêmica, guiando-me na jornada da vida. Sua paciência, luz e prontidão em me orientar são inestimáveis.

Aos professores do CDSA que marcaram presença em minha trajetória acadêmica, Janduy Guerra, Ana Verônica, Lenilde Mergia, Bruno Nunes, Franklin Nóbrega, Jean Gueiroz, Alex Albuquerque, Adriano Trindade, Rafael Maia, e a todos envolvidos na manutenção do campus do CDSA.

À Banca Examinadora, o Prof. Dr. José George Ferreira Medeiros, a Prof^a Dr.^a Vera Maria Valle Vitali.

Ao técnico do laboratório de microbiologia do CDSA, Cicero Anthonyelson, minha gratidão pela contribuição, paciência e companheirismo no laboratório e na amizade.

Aos amigos que se tornaram parte integrante desta jornada, como Miguel Barros e Maria Queiroz, agradeço pelos conselhos e pela companhia preciosa. A José Cordeiro, Isadora Guedes, Otto Kevin (Kalvin), Bárbara Vitória (Preta), Maria Eduarda (Dudes) e Caroline Cosman, Ariadne Guerra, Marina Paiva, Marília Vitória que tornaram os últimos anos mais leves e tranquilos, suportando os desafios com solidariedade.

À minha grande amiga, Andeza Larissa, fundamental em minha jornada acadêmica. A Alisson Clementino, Isac Queiroz, Antenor Linhares, pelos conselhos e desenvolvimento de projetos acadêmicos no laboratório de microbiologia do CDSA.

Aos colegas de turma, Júlio Gabriel, Adela Beatriz, Yasmine Valdares, Anderson Felipe (*in memoriam*), Marina Brito, Marília Luciana, Yalle Pereira, Danielle Ferreira, por compartilharem risadas, angústias e conquistas juntos.

Aos amigos do laboratório de microbiologia, Anna Maria, Caio, Davi, Kamila, Taliana, André, Isabela, Amanda, Carol, Joyce, e a todos que conheci durante minha passagem pelo CDSA, minha sincera gratidão. Vocês tornaram esta jornada ainda mais enriquecedora.

“A perfeição de ser imperfeito”
(Edson Salvador)

RESUMO

O fungo basidiomiceto *Lentinus crinitus* (*L. crinitus*), encontrado em abundância no Brasil, é conhecido por sua capacidade de degradar celulose, hemicelulose e lignina, sendo classificado como um fungo de podridão branca. No entanto, experimentos laboratoriais mostraram que culturas armazenadas por longos períodos, como as usadas nesta pesquisa, tendem a diminuir a produção de enzimas ligninolíticas. Nesse contexto, o estudo buscou avaliar se a exposição controlada a compostos tóxicos e recalcitrantes durante a fase de produção do inóculo poderia estimular a expressão da lacase, uma enzima ligninolítica. Utilizando o isolado fúngico *L. crinitus* CCIBt 2611, que foi mantido por repiques sucessivos em meio de batata, dextrose e agar (BDA), o inóculo foi produzido em meio BDA, bem como em meio BDA suplementado com águas residuais da produção de café solúvel (ARCS) e da liquefação hidrotérmica de algas (PLHT). Dez discos de crescimento micelial (7mm de diâmetro) foram inoculados em meio líquido de Kirk, incubados estacionariamente e sob agitação (100 rpm) por 16 dias. A cada três dias, foram retiradas amostras (5mL) para a determinação da atividade de lacase, utilizando a oxidação do ABTS, além da medição do pH. Nos inóculos de BDA, BDA suplementado com ARCS e BDA suplementado com PLHT, observou-se um pico de produção de lacase aos 9 dias, com valores de 18,53 U/L, 18,39 U/L e 31,91 U/L, respectivamente, em cultivo estacionário. Os extratos enzimáticos brutos apresentaram pH e temperatura ótimas de 3,0 e 60 °C, respectivamente. Os resultados indicaram que o uso de água residuária tóxica, PLHT, como inóculo, ativou a expressão da lacase de *Lentinus crinitus* CCIBt 2611.

Palavras-chave: Água residuária; Enzima; Condições de cultivo; Cultura.

ABSTRACT

The basidiomycete fungus *Lentinus crinitus* (*L. crinitus*), abundantly found in Brazil, is recognized for its ability to degrade cellulose, hemicellulose, and lignin, classifying it as a white-rot fungus. However, laboratory experiments have revealed that cultures stored for extended periods, such as those used in this study, tend to diminish the production of ligninolytic enzymes. In this context, the study aimed to assess whether the addition of toxic and recalcitrant compounds during inoculum production could stimulate the expression of laccase, a ligninolytic enzyme. Using the fungal isolate *L. crinitus* CCIBt 2611, which was maintained through successive subcultures in potato, dextrose and agar (PDA) medium, the inoculum was produced in PDA medium, as well as in PDA medium supplemented with wastewater from soluble coffee production (WSCP) and hydrothermal liquefaction of algae (HLA). Ten mycelial growth discs (7mm in diameter) were inoculated into Kirk liquid medium, incubated stationary and agitated (100 rpm) for 16 days. Every three days, samples (5mL) were taken for laccase activity determination, using ABTS oxidation, along with pH measurement. In the PDA, ARCS-supplemented PDA, and HLA-supplemented PDA inocula, a peak of laccase production was observed at day 9, with values of 18.53 U/L, 18.39 U/L, and 31.91 U/L, respectively, in stationary cultivation. Crude enzymatic extracts exhibited optimal pH and temperature of 3.0 and 60 °C, respectively. The results indicated that the use of toxic wastewater, HLA, as an inoculum, activated the expression of laccase in *L. crinitus* CCIBt 2611, displaying similar characteristics.

Keywords: Wastewater; Enzyme; Cultivation conditions; Culture.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Perfil do crescimento micelial de <i>Lentinus crinitus</i> em meio sólido BDA (▲), BDA adicionado de PLHT () e BDA adicionado de ARCS (□). Os limites inferior e superior indicam desvio padrão.....	26
Gráfico 2 -	Perfil produção de lacase por <i>L. crinitus</i> , a partir dos diferentes inóculos, BDA, BDA adicionado de ARCS e BDA adicionado de PLHT, em meio Kirk modificado com agitação (100 rpm) e em modo estacionário. Os limites inferior e superior indicam desvio padrão.....	27
Gráfico 3 -	Perfil de pH e produção de lacase por <i>L. crinitus</i> , a partir dos diferentes inóculos, BDA (A), BDA adicionado de ARCS (B) e BDA adicionado de PLHT (C), em meio Kirk modificado com agitação (100 rpm) e em modo estacionário. Os limites inferior e superior indicam desvio padrão.....	29
Gráfico 4 -	Perfil de produção de lacase por <i>L. crinitus</i> em condição estacionária. Os limites inferior e superior indicam desvio padrão.....	30
Gráfico 5 -	Biomassa seca nos cultivos de <i>L. crinitus</i> produzida em meio líquido den Kirk modificado com meio BDA, BDA adicionado de ARCS e BDA adicionado de PLHT em cultivo estacionário e com agitação de 100 rpm. Os limites inferior e superior indicam desvio padrão.....	31
Gráfico 6 -	Temperatura (A) e pH (B) ótimos das atividades de lacase dos extratos enzimáticos obtidos a partir dos diferentes inóculos.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição do meio de cultivo BDA.....	22
Tabela 2 -	Composição do Meio Kirk Modificado.....	23
Tabela 3 -	Concentração da mistura de reação para determinação da atividade enzimática.....	24

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	OBJETIVO.....	13
2.1	OBJETIVO GERAL.....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
3.1	FUNGOS BASIDIOMICETOS E ENZIMAS DO COMPLEXO LIGNINOLÍTICO.....	14
3.2	ESTRESSE AMBIENTAL NA ATIVAÇÃO DE GENES ENZIMÁTICOS DE BASIDIOMICETOS.....	15
3.3	MANUTENÇÃO DA EXPRESSÃO DE ENZIMAS POR FUNGOS.....	16
3.4	<i>LENTINUS CRINITUS</i>	18
4	METODOLOGIA.....	20
4.1	LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS.....	20
4.2	BASIDIOMICETO – INÓCULO.....	20
4.3	AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL EM MEIO SÓLIDO.....	20
4.4	PRODUÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO DE <i>LENTINUS CRINITUS</i> EM MEIO LÍQUIDO.....	21
4.5	MEIOS DE CULTURA.....	22
4.5.1	Meio BDA.....	22
4.5.2	Meios BDA suplementados com 10% de PLHT ou ARCS.....	22
4.5.3	Meio de Kirk modificado.....	22
4.6	OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO.....	23
4.7	QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA.....	23
4.8	ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LACASE.....	23
4.9	DETERMINAÇÃO DO PH.....	24
4.10	CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DE LACASE DO EXTRATO BRUTO.....	24
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5.1	CRESCIMENTO MICELIAL.....	25
5.2	EXTRATO ENZIMÁTICO DO MEIO DE CULTIVO LÍQUIDO.....	27
6	CONCLUSÕES.....	33
	REFERÊNCIAS.....	34

1 INTRODUÇÃO

O fungo basidiomiceto *Lentinus crinitus*, amplamente distribuído no Brasil, é um fungo causador da podridão branca na madeira, que caracteriza-se pela produção de um complexo enzimático ligninolítico constituído por lacases, peroxidases, redutases de ferro e manganês, e outras moléculas catalíticas que desempenham um papel fundamental na degradação de componentes complexos da parede celular, como celulose, hemicelulose e lignina (Matheus; Bononi; Machado, 2000; Ballaminut *et al*, 2014; Leonowicz, 1999).

Entre as enzimas do complexo ligninolítico, destaca-se a lacase, uma enzima relevante do ponto de vista ambiental pois pode ser utilizada no tratamento de substâncias tóxicas e recalcitrantes. A lacase tem a capacidade de degradar ou transformar poluentes encontrados em efluentes industriais, como corantes, compostos fenólicos, pesticidas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) (Yadav *et al.*, 2023; Silva *et al.*, 2015; Melo *et al.*, 2014; Varga *et al.*, 2023).

A cultura de *L. crinitus* utilizada nessa pesquisa, vinha demonstrando diminuição na capacidade de produção de lacase após repiques sucessivos, o que chamou atenção para a necessidade de avaliar metodologias capazes de induzir a expressão dessa enzima. Estudos apontam que a exposição de basidiomicetos ao estresse, simulando condições ambientais adversas, pode ativar a expressão gênica, desencadeando respostas metabólicas que ampliam a produção de enzimas, inclusive ligninolíticas (Maciel, 2010).

Na tentativa de minimizar o efeito da idade das culturas sobre a produção de enzimas ligninolíticas, esta pesquisa investigou se a exposição controlada de *Lentinus crinitus* a compostos tóxicos e recalcitrantes durante a fase de produção do estimular a expressão da lacase, uma enzima ligninolítica, de maneira que este estudo contribuirá não apenas para um entendimento mais aprofundado dos processos fisiológicos do *Lentinus crinitus*, mas também para o desenvolvimento de estratégias inovadoras destinadas a otimizar a produção dessas enzimas em laboratório e para tratamentos de ambientes contaminados.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito da exposição controlada de *L. crinitus* a compostos tóxicos e recalcitrantes durante a fase de produção do inóculo sobre a estimulação da expressão da lacase, uma enzima ligninolítica em meio Kirk modificado.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a velocidade de crescimento micelial de *Lentinus crinitus* nos diferentes meios sólidos utilizados como inóculo (BDA, BDA suplementado com PLHT e BDA suplementado com ARCS);
- Avaliar o efeito dos diferentes meios sólidos sobre a produção de lacase e pH em meio líquido de Kirk em condição estacionária e com agitação;
- Avaliar a produção da biomassa a partir dos diferentes inóculos;
- Caracterizar a atividade de lacase obtida a partir dos diferentes inóculos.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 FUNGOS BASIDIOMICETOS E ENZIMAS DO COMPLEXO LIGNINOLÍTICO

Os fungos basidiomicetos causadores da podridão branca apresentam um aparato enzimático ligninolítico que tem recebido muita atenção por encontrar aplicação na degradação de diversos compostos orgânicos, tóxicos e recalcitrantes. As principais enzimas do complexo ligninolítico de basidiomicetos são a Lignina Peroxidase (LiP, EC 1.11.1.14), Peroxidase dependente do Manganês (MnP, EC 1.11.1.13) e Lacase (EC 1.10.3.2), além das enzimas acessórias como a Peroxidase versátil (EC 1.11.1.16), glioxal oxidase (EC 1.2.3.5), aril álcool oxidase (EC 1.1.3.7), oxalato descarboxilase (EC 4.1.1.2) e citocromo P-450 monooxygenase (EC 1.14.14.1) (Bilal *et al.*, 2017) além dos compostos de baixa massa molecular, que atuam na transferência de elétrons do substrato para a lacase intensificando o processo de degradação dos compostos de interesse (Moreira; Milagres; Mussatto, 2014).

Entre as enzimas ligninolíticas destaca-se a lacase (EC 1.10.3.2, p-difenol: dioxigênio oxidoreductase) que é responsável pela oxidação de estruturas fenólicas presentes na lignina. A lacase é uma enzima que catalisa a oxidação de diversos substratos realizando a oxidação de substratos ao radical livre correspondente ao passo que reduz oxigênio à água (Silva, 2022; Janusz *et al.*, 2020; Martínková *et al.*, 2016; Singh; Gupta, 2020).

A inespecificidade da lacase possibilita a metabolização de diversos contaminantes orgânicos (Schlosser, 2020), entretanto, devido ao potencial redox relativamente baixo ($\leq 0,8$ V), em comparação com outras enzimas ligninolíticas, podem ter a ação limitada a somente oxidação de compostos fenólicos (Saldarriaga-Hernández *et al.* 2020). A inespecificidade da enzima lacase possibilita a metabolização de diversos contaminantes orgânicos em águas residuárias (Silva, 2022). Por outra via, a adição de mediadores redox tem possibilitado a ampliação da atividade catalítica da lacase para compostos de estrutura não fenólicas (Barreca *et al.*, 2003; Barrios-Estrada *et al.*, 2018; Parra Guardado *et al.*, 2019).

A produção de enzimas ligninolíticas pelos basidiomicetos pode ser influenciada por fatores como a relação C/N, fontes de carbono de fácil metabolização, ação de indutores enzimáticos como o sulfato de cobre e ação de surfactantes como o tween 80, que combinado com lacase, pode aumentar a oxidação e despolimerização da lignina (Huang *et al.*, 2022). Entre os mediadores destaca-se o tween 80, que é um surfactante que possui ácidos graxos insaturados de fácil degradação oxidativa que favorecem a ocorrência de peroxidação lipídica e que podem levar a maior biotransformação dos poluentes (Hofrichter, 2002; Polak; Jarosz-Wilkolazka,

2012). Outras moléculas como o ABTS, o corante azul de remazol brilhante (RBBR) e sulfato de cobre são reconhecidos como agentes mediadores das atividades de lacases, conhecidos como mediadores, auxiliam na oxidação de substratos pelas lacases. Mediadores são pequenas moléculas que facilitam a transferência de elétrons entre a enzima e o substrato, aumentando a eficiência da reação. Vários mediadores foram identificados e utilizados em processos mediados por lacase (Silva, 2022; Bettin *et al.*, 2014; Cunha, 2014; Coelho *et al.*, 2023; Wesenberg; Kyriakides; Agathos, 2003).

As lacases têm recebido o título de enzima “eco-friendly” (Rodriguez-Couto, 2012; Senthivelan; Kanagaraj; Panda, 2016) devido ao potencial de aplicação em tratamento ambiental de organoclorados (Coelho *et al.*, 2019), micropoluentes (Mathur; Sanyal; Dey, 2021), efluente papeleiro (Patel *et al.*, 2019; Sharma *et al.*, 2019), efluentes contendo corantes (Almeida; Oliveira; Souza, 2018; Coelho *et al.*, 2020; Morales-Álvarez *et al.*, 2016).

As lacases são oxidases multi-cobre que catalisam a oxidação de uma ampla gama de substratos orgânicos, tornando-as valiosas em vários processos industriais, como branqueamento de papel de celulose, descoloração de têxteis e biorremediação (Sondhi *et al.*, 2023; Bueno Nieto, 2023). Essas enzimas têm sido extensivamente estudadas pelo seu potencial para biocatálise e biorremediação (Cascelli *et al.*, 2023).

Culturas de basidiomicetos armazenadas por longos períodos tem demonstrado uma redução na produção de enzimas ligninolíticas, o que pode representar desafios para aplicação desses organismos em processos de biorremediação, em que a eficácia da enzima é crucial, conforme descrito por Ijoma e Tekere (2017). Essa problemática desperta a atenção para a necessidade de se explorar variados substrato, como águas residuárias, na fase de produção de inóculo para a indução da expressão de lacase por esses organismos.

3.2 ESTRESSE AMBIENTAL NA ATIVAÇÃO DE GENES ENZIMÁTICOS DE BASIDIOMICETOS

Os fungos demonstram notável adaptabilidade, prosperando em uma ampla diversidade de condições ambientais, inclusive em ambientes extremos. Sua relevância nos ecossistemas é inegável, uma vez que desempenham funções essenciais na decomposição da matéria orgânica e na reciclagem de nutrientes (Santello, 2023).

Quando os fungos são submetidos a condições de estresse podem iniciar um intrincado conjunto de respostas fisiológicas, bioquímicas e genéticas para garantir sua sobrevivência e crescimento que é regulado por uma rede complexa de sinalização intracelular, que coordena a

ativação de genes específicos e a expressão de proteínas adaptativas (Fernández-López; Batista-García; Aréchiga-Carvajal, 2023), podendo ter efeitos significativos nos processos metabólicos dos fungos que podem incluir redução da taxa de crescimento, fase de latência prolongada, mecanismos regulatórios da biossíntese de metabólitos secundários, cessação metabólica e até morte, dependendo da magnitude da mudança ambiental (Ren *et al.*, 2019; Gressler *et al.*, 2021; Watson, 2021), são influenciados, desenvolvendo assim diversas características genéticas e fisiológicas para se adaptarem às diversas condições ambientais, incluindo temperatura, seca, medicamentos antifúngicos, salinidade e defesas do hospedeiro, o que destaca a importância de compreender o impacto das mudanças ambientais no metabolismo e adaptação dos fungos (Jones; Zhang; Tsai, 2023; Bazzicalupo, 2022; Rafiq *et al.*, 2019; Bazzicalupo, 2020).

Entre os mecanismos desenvolvidos pelos fungos para resistir ao estresse ambiental estão as mudanças na morfologia, que emprega uma rede de sinalização complexa, incluindo estímulos mecânicos e respostas físicas na interface hospedeiro-fúngico (Jones; Zhang; Tsai, 2022), a regulação de atividades fisiológicas e metabólicas, a inibição de certos processos metabólicos para conservar energia e o fortalecimento de outros processos para combater os danos induzidos pelo estresse, sendo que genes específicos são frequentemente induzidos como parte da resposta ao estresse, desempenhando papéis cruciais na adaptação dos microrganismos (Yi *et al.*, 2021; Wangsanut; Pongpom, 2022). Em adição, a plasticidade genômica como poliploidia, aneuploidia e variação do número de cópias, em resposta ao estresse, também podem afetar a aptidão e a resistência ao estresse (Vande Zande; Zhou; Selmecki, 2023).

Podendo assim ativar genes específicos que codificam enzimas adaptativas, como aquelas envolvidas na produção de solutos orgânicos compatíveis que ajudam a manter a pressão osmótica da célula, o que evita a desidratação da célula em ambientes secos ou salinos. Além disso, os fungos podem reprimir genes não essenciais e redirecionar recursos para a produção de moléculas que conferem vantagens adaptativas (Probst *et al.*, 2023; Lin *et al.*, 2021).

3.3 MANUTENÇÃO DA EXPRESSÃO DE ENZIMAS POR FUNGOS

Para manter a integridade estrutural das células microbianas sob condições estressantes, uma estratégia comum é a adaptação da composição e das propriedades da membrana celular, sendo crucial para a sua sobrevivência, sendo que a exposição a estresses moderados pode induzir tolerância ao estresse, melhorando a resistência dos microrganismos a distúrbios futuros. (O'neal *et al.*, 2022; Dhiman; Gnimpieba; Gadhamshetty, 2023).

A manutenção da homeostase celular é crucial para a sobrevivência dos fungos basidiomicetos em ambientes desafiadores. Este processo inerente engloba a sutil regulação dos níveis iônicos, do pH intracelular e da concentração de solutos, a fim de proteger a célula contra os riscos de desidratação ou até mesmo lise celular. Os fungos basidiomicetos ativamente ajustam as concentrações de íons, como cálcio, potássio e sódio, para preservar o equilíbrio eletrolítico e garantir a funcionalidade celular diante de desafios extremos. Esse esforço bioquímico reflete a habilidade da célula em manter a ordem, independentemente das condições adversas do ambiente circundante (Fernando *et al.*, 2023).

Os fungos basidiomicetos apresentam uma notável capacidade de ajustar a composição de ácidos graxos em suas membranas celulares em resposta a condições ambientais extremas. Esse mecanismo adaptativo é crucial para manter a fluidez e estabilidade da membrana, conferindo resistência a temperaturas extremas e pressões osmóticas. A flexibilidade na composição de ácidos graxos permite a preservação da funcionalidade celular, evitando rigidez em baixas temperaturas e reforçando a estabilidade em altas temperaturas, assegurando, assim, a homeostase e a integridade celular em ambientes desafiadores (Barisch; Holthuis; Cosentino, 2023).

As restrições de nutrientes desempenham um papel na promoção de variações genéticas em fungos, uma vez que as condições nutricionalmente limitantes submetem as cepas a pressões seletivas recorrentes, resultando em rearranjos genômicos, como as variações no número de cópias (CNVs) (Vakirlis *et al.*, 2016).

Fungos extremofílicos são recursos genéticos promissores para a biotecnologia devido à sua capacidade de prosperar em ambientes extremos (Orosz, 2018) devido a ocorrência de genes que conferem resistência ao estresse abiótico, tornando-os valiosos para melhorar a tolerância das culturas (Lv *et al.*, 2020).

O sistema de reparo do DNA em fungos basidiomicetos desempenha um papel crucial na manutenção da estabilidade genômica e na prevenção de mutações danosas em ambientes extremos. Ele reconhece e corrige diversos danos no DNA causados por fatores como radiação, variações de temperatura, agentes químicos e espécies reativas de oxigênio. Os procedimentos de reparo envolvem a remoção e substituição das regiões danificadas do DNA, garantindo a integridade da informação genética e impedindo modificações indesejadas. Essa capacidade é essencial para a sobrevivência dos fungos em condições desafiadoras (Haser *et al.*, 2023; Durut *et al.*, 2023).

Os fungos basidiomicetos têm a capacidade de se adaptar a condições extremas, o que é importante tanto para a compreensão biológica quanto para aplicações biotecnológicas. Este

conhecimento pode ser utilizado para otimizar processos industriais, como produção de enzimas em larga escala, biodegradação de poluentes ambientais e tratamento de resíduos orgânicos. Esses fungos sobrevivem em ambientes agressivos, incluindo solo contaminado com elementos radioativos. Por exemplo, observou-se que o basidiomiceto *Schizophyllum commune* sobrevive no solo sob condições ambientais hostis na Zona de Exclusão de Chernobyl. A compreensão dos mecanismos subjacentes à adaptação dos fungos basidiomicetos a condições extremas pode fornecer informações valiosas para estas aplicações biotecnológicas e contribuir para o desenvolvimento de processos mais eficientes e sustentáveis (Traxler *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2023).

3.4 *LENTINUS CRINITUS*

Lentinus crinitus é um cogumelo que se insere na classificação taxonômica do reino Fungi, divisão Basidiomycota, classe Agaricomycetes, ordem Polyporales, família Polyporaceae. A família Polyporaceae inclui uma grande variedade de fungos que desempenham um importante papel ecológico na decomposição da madeira e na reciclagem de nutrientes (Silva Neto, 2019; Dos Santos Filho, 2023).

Lentinus crinitus é um fungo basidiomiceto saprofítico de ocorrência pantropical. Produz corpos frutíferos comestíveis com aplicações medicinais, nutricionais e biotecnológicas, cujos corpos frutíferos possuem atividades antioxidantes, antifúngicas, antibacterianas, antivirais e anticancerígenas (Dos Santos Filho, 2023). Essa espécie ocorre abundantemente no Brasil e é frequentemente encontrada em associação com troncos em estado de decomposição, sendo essencial na reciclagem de matéria orgânica em ambientes naturais. No entanto, o que o torna ainda mais interessante é sua notável versatilidade na degradação de diferentes tipos de substratos como; hidrocarbonetos aromáticos, compostos bifenílicos e resíduos oriundos de indústrias têxteis, papel e celulose, o que o torna um candidato valioso para em processos de restauração ambiental e tratamento de resíduos industriais (Putzke, 2002; Aust, 1990; Barr *et al.*, 1994).

O potencial de *L. crinitus* CCIBT 2611 em degradar corantes azóicos vermelho congo foi indicado por estudos *in silico* e *in vivo*, confirmando-se a relevância da lacase nesse processo (Coelho *et al.*, 2020; Coelho *et al.*, 2023). A biomassa micelial de *L. crinitus* U9-1, cultivada sob diferentes condições de luz apresentou alterações na composição química, atividade antioxidante e atividade antimicrobiana (Halabura, 2023) e tem sido utilizado para a síntese biológica de nanopartículas de prata, que demonstraram atividade antimicrobiana contra

Staphylococcus aureus, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Candida tropicalis* (Da Silva Magalhães, 2022).

Lentinus crinitus CCMB 553, e U9-1 produzem enzimas como lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase (De Araújo Conceição *et al.*, 2017; Marim *et al.*, 2020) e tem capacidade de degradar lignina, com indicação de bioconversão de resíduos agroindustriais (Valle, 2014). Segundo Santana (2018), *L. crinitus* é capaz de detectar luz e utilizá-la como fonte de informação sobre o meio ambiente, o que pode levar a novos processos de obtenção de enzimas de interesse biotecnológico. Estudo realizado por Machri Colla (2020) identificou condições ideais para induzir a produção de lacase em *L. crinitus*, incluindo concentrações variadas de nitrogênio e adição de cobre e compostos fenólicos.

4 METODOLOGIA

4.1 LOCAL DE REALIZAÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Todos os experimentos foram realizados no laboratório de microbiologia do centro de desenvolvimento sustentável do semiárido – CDSA, da UFCG.

4.2 BASIDIOMICETO – INÓCULO

Lentinus crinitus está depositado na Coleção de Cultura de Algas, Cianobactérias e Fungos (CCIBt) do Instituto de Pesquisas Ambientais (IPA), da Secretaria de Meio Ambiente, Infraestrutura e Lógica do Estado de São Paulo, sob a numeração 2611. O isolado foi mantido por repiques sucessivos em BDA (batata, dextrose e ágar, cuja composição está apresentada na Tabela 1) a $28^{\circ} \pm 2$ C durante 7 dias. Um (1) disco (0,7 mm de diâmetro) de crescimento micelial foi utilizado como inóculo.

4.3 AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL EM MEIO SÓLIDO

O crescimento radial de *Lentinus crinitus* foi avaliado em meios BDA e BDA suplementado com água residuária do café solúvel (ARCS) (10%) (v:v) e água residuária pós liquefação hidrotérmica de algas (PLHT) (10%) (v:v) esterilizados por via úmida a 1 atm, 121 °C por 20 min. A velocidade média micelial foi determinada pela razão entre o raio de uma placa de Petri e o tempo (dias). A PLHT foi cedida pela Profa. Dra. Giovana Tommaso (FZEA / USP) essa água residuária é gerada como subproduto do processo de liquefação hidrotermal e contém uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos, bem como nutrientes, como nitrogênio e fósforo. A composição da água residuária pode variar dependendo das condições de operação do processo de liquefação hidrotermal e das características da biomassa de algas utilizada segundo (Quispe-Arpasi, 2018) apresenta alumínio (3,9 mg/L), cobre (0,6 mg/L), selênio (11,7 mg/L) e zinco (1,3 mg/L), sódio (2254 mg/L) e potássio (3400 mg/L) e compostos N-heterocíclicos (3-dimetilamino-fenol; 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona; 2,6-dimetil-3-piridinol; 2-picolina; piridina; 1-metil-2-pirrolidinona; σ -valerolactama; 2-pirrolidinona; ϵ -caprolactama). A ARCS foi cedida pela empresa Cocam a Cocam Cia – Catanduva, SP. Sendo um subproduto de operações como lavagem, descasque e remoção de

mucilagem, que envolvem o uso de água e a adição de vários resíduos, a ARCS são caracterizadas por sólidos suspensos e altas concentrações de matéria orgânica solúvel, Demanda Biológica de Oxigênio (DBO) e Demanda Química de Oxigênio (DQO). As águas residuais contêm misturas complexas de macromoléculas orgânicas. Além disso, as águas residuais da produção de café solúvel contêm compostos orgânicos voláteis, lignina, polissacarídeos, taninos e polifenóis, melanoidinas, alcaloides, bem como ácidos clorogênicos, ácido 5-cafeilquímico, um isômero do ácido clorogênico, cafeína, ácido clorogênico e ácido caféico. É importante salientar que a presença dessas substâncias na ARCS, quando descartada no meio ambiente, pode representar um desafio significativo para a degradação natural da matéria orgânica associada (Silva, 2022; Vignoli; Bassoli; Benassi, 2011; Novita, 2016; Vignoli *et al.* 2014; Manchón *et al.*, 2013; Magalhães *et al.*, 2016).

A velocidade do crescimento micelial foi realizada pelo cálculo de velocidade de crescimento, sendo que, o diâmetro da colônia está em cm, e o tempo em dias.

$$V = \frac{Df - Di}{Tf - Ti} \quad \text{Eq. (01)}$$

Em que: V = velocidade de crescimento

Df = diâmetro final da colônia

Di = diâmetro inicial da colônia

Tf = tempo final

Ti = tempo inicial

4.4 PRODUÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO DE *LENTINUS CRINITUS* EM MEIO LÍQUIDO

Foi realizada em meio de Kirk modificado (Moreira; Milagres; Mussatto, 2014), descrito na Tabela 2. Frascos com capacidade de 600mL, contendo 200 mL de meio de cultura de Kirk modificado previamente esterilizado, e inoculado, conforme descrito no item 3.4.2, foram incubados por 16 dias a 28°C em condição estacionária e em mesa agitadora a 100 rpm. A cada 3 dias foram retiradas alíquotas de 5mL para avaliação.

4.5 MEIOS DE CULTURA

Todos os meios de cultura foram esterilizados por via úmida por 20 min a 121°C e 1 atm.

4.5.1 Meio BDA

A composição do meio BDA (batata 200 g.L⁻¹, dextrose e ágar) está descrita na Tabela 1. Para preparar o meio de cultura, as batatas foram descascadas, cortadas, cozidas em água destilada e filtradas. Ao caldo filtrado foram adicionados o ágar, a dextrose e a água destilada até completar 1000 mL. O meio foi esterilizado por via úmida, e em ambiente asséptico, sendo vertido em placas de Petri, previamente esterilizada e após solidificação realizou-se a inoculação de um disco (7 mm) de crescimento do fungo *Lentinus crinitus* CCIBt 2611, no centro da placa.

4.5.2 Meios BDA suplementados com 10% de PLHT ou ARCS

Foram preparados conforme indicado para o meio BDA substituindo-se 10% do volume de água por PLHT ou ARCS.

Tabela 1 - Composição do meio de cultivo BDA.

Componente	Quantidade
Batata	200,0g
Dextrose	20,0g
Ágar	20,0g
Água destilada	1,0L (q.s.p)

Fonte: Fahim (1966).

4.5.3 Meio de Kirk modificado

A composição do meio de cultura está apresentada na Tabela 2. Os componentes do meio de foram adicionados em Erlenmeyer, o pH foi ajustado para 6,0. Frações de 200 mL que foram adicionadas a erlenmeyers com capacidade de 600 mL, tampados com tampão de algodão e esterilizados por via úmida. Para o cultivo do *Lentinus citrinus* em meio líquido, foram adicionados 5 discos (7 mm de diâmetro) a cada 100 mL de meio líquido, para os diferentes tipos de cultivo do fungo, os ensaios foram realizados em triplicatas.

Tabela 2 - Composição do Meio Kirk Modificado.

Componente	Concentração
Glicose	5 g
Extrato de levedura	2 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,05 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,013 g
MnSO ₄ H ₂ O	0,016 g
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,2 mM
Água destilada	1,0L (q.s.p)

Fonte: Moreira (2021).

4.6 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO

Após 16 dias de cultivo em meio líquido de Kirk modificado, a biomassa (fase sólida) foi separada da fase líquida por meio de filtração, em papel de filtro, previamente seco até a massa constante. A fase sólida foi utilizada para determinação da biomassa e a fase líquida será utilizada para determinação da atividade de lacase, e pH.

4.7 QUANTIFICAÇÃO DA BIOMASSA

Biomassa (g) retida no papel de filtro foi realizada pela medida de biomassa seca após secagem a 105 °C, por 24 horas.

4.8 ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE LACASE

Foi determinada pela oxidação do 2,2-azinobis-(3- etilbenzotiazolino-6-sulfonato) (ABTS) a 420nm ($\epsilon = 36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,8 por 8 minutos., na ausência de H₂O₂, de acordo com Ballaminut *et al.*, (2014) (Tabela 3). Uma unidade enzimática correspondeu à quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μMol de substrato por minuto.

Tabela 3 - Concentração da mistura de reação para determinação da atividade enzimática

Meio Reacional	Volume
Tampão acetato de sódio (100)	450 μ L
ABTS (5)	150 μ L
Extrato Enzimático	900 μ L

Fonte: Ballaminut (2014).

4.9 DETERMINAÇÃO DO PH

Foi realizada por meio de pHmetro digital.

4.10 CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DE LACASE DO EXTRATO BRUTO

O extrato bruto obtido no pico de produção foi caracterizado **i. *Determinação do pH ótimo***: foi feita por meio da incubação de 1mL de extrato enzimático em presença de 1mL de solução tamponante McIlvaine (McIlvaine, 1921), na faixa de pH de 2,2 a 7,0; **ii. *Determinação da temperatura ótima***: foi determinada pela incubação do extrato em banho-maria nas temperaturas de 30° a 90°C por 5 min, seguido de determinação da atividade residual.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CRESCIMENTO MICELIAL

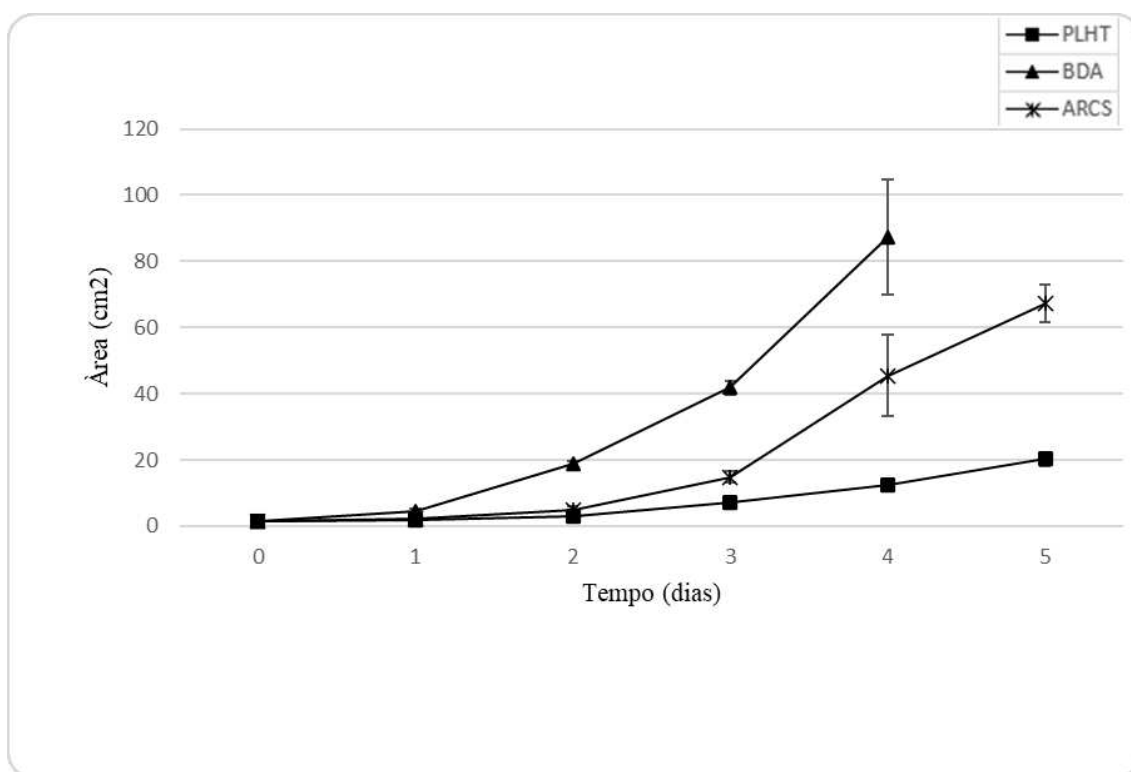
A cultura de *L. crinitus* utilizada nessa pesquisa, vinha demonstrando diminuição na capacidade de produção de lacase após repiques sucessivos, o que chamou atenção para a necessidade de avaliar metodologias capazes de induzir a expressão dessa enzima. Diante disso, o perfil do crescimento micelial de *Lentinus crinitus* em meio sólido BDA, BDA adicionado de ARCS e BDA adicionado de PLHT foi estudado (Figura 1).

No escopo do presente estudo, os ensaios que incorporaram águas residuais (ARCS e PLHT) em uma concentração de 10% resultaram em um crescimento mais moderado, porém acompanhado de uma maior densidade micelial. Os valores médios de crescimento após 4 dias foi de 21,8, cm², 14,8 cm², e 3,1 cm², para BDA, ARCS e PLHT, respectivamente, obtendo assim uma velocidade de crescimento micelial de 1,1 cm/ dia, 0,78 cm/dia e 0,40 cm/dia dia para os ensaios com BDA, ARCS e PLHT. Apesar da velocidade de crescimento micelial ter sido menor na presença de águas residuárias tóxicas, nota-se que *L. crinitus* foi capaz de ocupar toda a placa (5 dias para ARCS e 10 dias para PLHT) (Figura 2), provavelmente pelo uso de suas capacidades adaptativas para detoxificar ambientes, conforme descrito por Coelho *et al.*, (2023) para a degradação do corante vermelho congo.

É digno de nota que o crescimento micelial foi concomitantemente associado a uma descoloração das águas residuárias presentes nos meios de cultura das placas de Petri.

No estudo de Silva (2022), foi observado um notável aumento da densidade micelial do *Pleurotus ostreatus* em BDA suplementado com 10% de ARCS ao longo de 5 dias de cultivo. Linhares Neto (2023), ao realizar testes de tolerância com o mesmo basidiomiceto, constatou um crescimento total em placas de Petri após 12 dias de cultivo em BDA suplementado com 10% de PLHT.

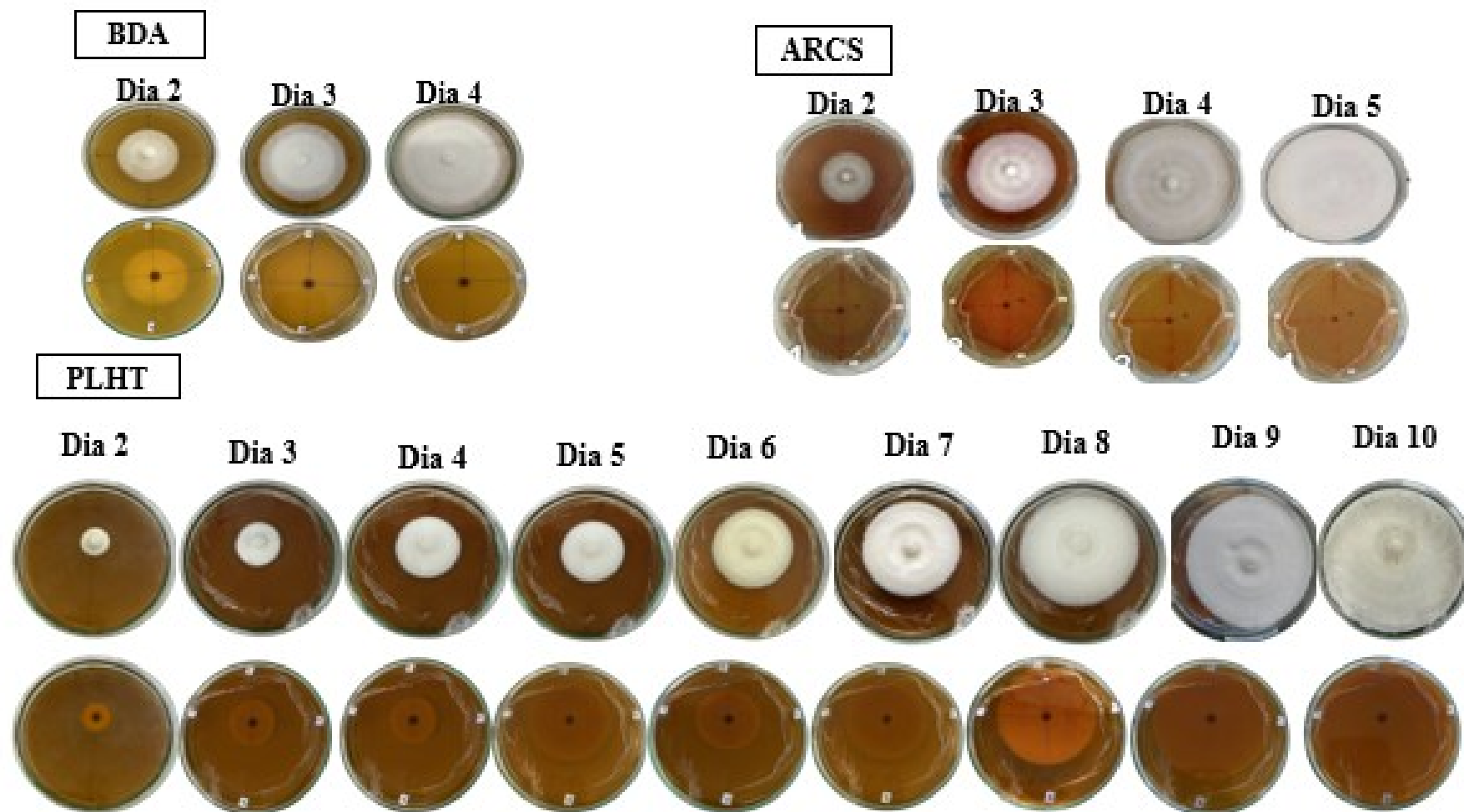
Gráfico 1 - Perfil do crescimento micelial de *Lentinus crinitus* em meio sólido BDA (▲), BDA adicionado de PLHT (■) e BDA adicionado de ARCS (*). Os limites inferior e superior indicam desvio padrão.



Fonte: Autor (2023).

Silva (2022) sugere que concentrações baixas de ARCS podem servir como um suplemento nutricional benéfico para o crescimento do basidiomiceto, enquanto concentrações mais elevadas podem resultar na inibição do crescimento micelial. Linhares Neto (2023) corrobora essas observações ao relatar que a concentração de 20% de PLHT retardou o crescimento micelial do *P. ostreatus*. Essas descobertas ressaltam a importância da dosagem adequada de águas residuais como um fator crítico no cultivo bem-sucedido do *Pleurotus ostreatus*.

Figura 1 - Análise visual do crescimento micelial da inoculação do *L. crinitus* em BDA e BDA suplementado de água residuária (ARCS e PLHT).

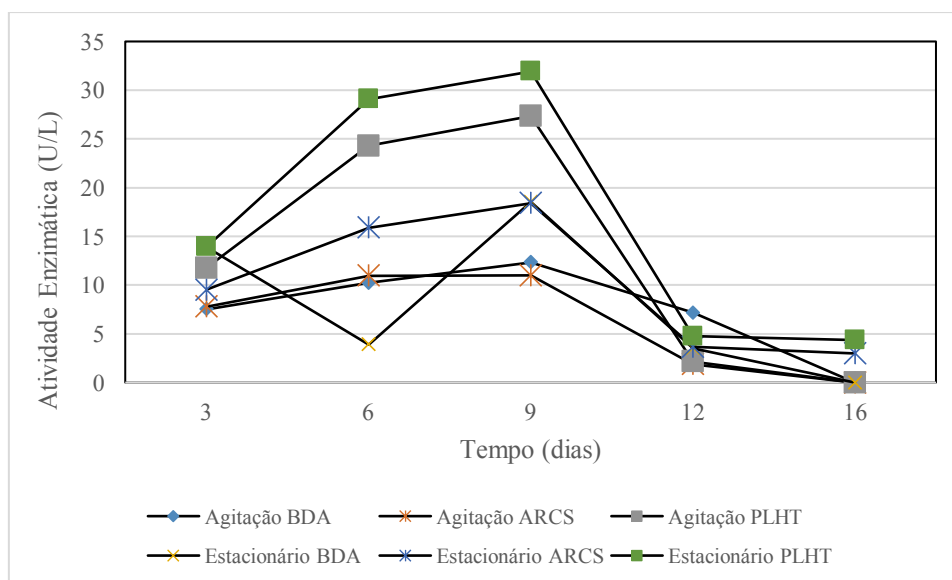


Fonte: Autor (2023).

5.2 EXTRATO ENZIMÁTICO DO MEIO DE CULTIVO LÍQUIDO

Independentemente da forma de cultivo (agitado e/ou estacionária), *L. crinitus* apresentou produção de lacase com os três diferentes inóculos, atingindo o pico de atividade enzimática aos 9 dias de cultivo. Em condições de agitação, registrou-se uma produção de atividade de lacase de 12,3 U//L, 11,0 U/L e 27,3 U/L em BDA e suplementado com ARCS, PLHT, respectivamente. Em condição estacionária, observou-se a mais expressiva produção enzimática para todos os inóculos avaliados alcançando valores de 18,5, 18,3 e 31,9 (U/L) em BDA e suplementado com ARCS, PLHT, respectivamente (Figura 3).

Gráfico 2 - Perfil produção de lacase por *L. crinitus*, a partir dos diferentes inóculos, BDA, BDA adicionado de ARCS e BDA adicionado de PLHT, em meio Kirk modificado com agitação (100 rpm) e em modo estacionário. Os limites inferior e superior indicam desvio padrão.



Fonte: Autor (2023).

O perfil de pH (Figura 4) foi semelhante entre todos os inóculos analisados, sendo que conforme a atividade de lacase aumenta, observou-se um decréscimo dos valores de pH, até o décimo segundo dia, quando o pH passa a aumentar, observou-se aumento de pH a partir do decimo segundo dia d cultivo, como relatado por Moreira (2021), que utilizou o basidominceto *P. ostatrus* em seu estudo.

Os valores de pH do extrato enzimático, neste estudo, exibiram variações durante o período estudado, na condição estacionária, oscilando de pH 6 para cerca de 4,0 em todos os ensaios após 12 dias de cultivo, e com agitação, a oscilação do pH foi de 6 para 4,8, 5,3 e 4,4

no BDA, PLHT e ARCS, respectivamente (Figura 3). A observação desta redução no pH alinha-se com achados em diversas espécies de fungos, como *Mortierella elasson* (Lisov *et al.*, 2021), *Myrothecium roridum* (Renfeld *et al.*, 2023), *Lentinus crinitus* (Marim *et al.*, 2018) e *Penicillium pinophilum* (Dhakar *et al.*, 2014). Esses estudos sublinham a marcante influência do pH na produção de lacase.

A decrescente acidez durante a produção de lacase por fungos pode ser atribuída à clivagem de compostos alicíclicos e aromáticos, resultando na formação de ácidos orgânicos por meio do metabolismo fúngico, enquanto a elevação do pH sugere a possibilidade de produção de substâncias alcalinas ou a utilização de nutrientes que impactam no equilíbrio ácido-base (Renfeld *et al* 2022; Unuofin, Okoh, Nwodo, 2019)).

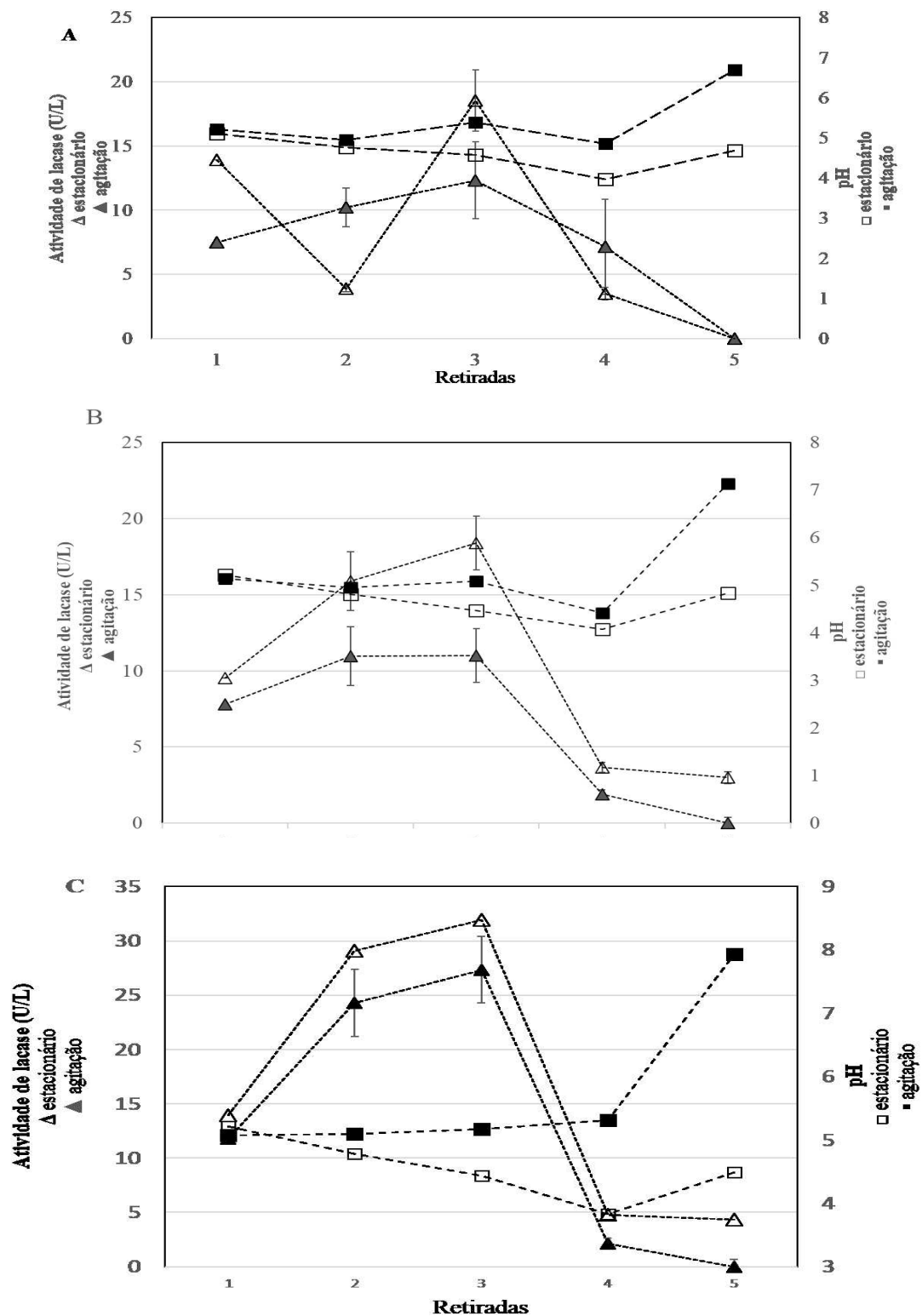
De acordo com Tinoco-Valencia *et al.*, (2014), é possível concluir que altas taxas de cisalhamento são prejudiciais para a produção de lacase por fungos filamentosos. Em seu estudo, a atividade máxima da lacase foi observada quando a cultura foi realizada com baixa taxa de agitação.

A variação da produção de lacase a partir dos três inóculos utilizados pode ser interpretada como uma resposta adaptativa às fontes de nutrientes presentes nos inóculos, demonstrando a complexidade das relações metabólicas subjacentes à produção de lacase.

A análise das condições de cultivo, especialmente quando se compara o cultivo agitado com o cultivo estacionário, revela uma resposta diferente do fungo às diferentes condições. O aumento na produção de lacase em condições estacionárias, notadamente no inóculo com PLHT (Figura 4), sugere uma adaptação eficaz a ambientes de baixa agitação, em que a transferência de massa e a disponibilidade de oxigênio desempenham papéis diferenciados na regulação da produção enzimática.

Esses achados, contextualizados dentro do vasto campo de estudos sobre produção de enzimas por fungos basidiomicetos, fornecem *insights* valiosos para a otimização de processos de produção de lacase. A compreensão aprofundada desses fenômenos é essencial para aplicações industriais sustentáveis, como a biodegradação de poluentes e a produção de biocatalisadores.

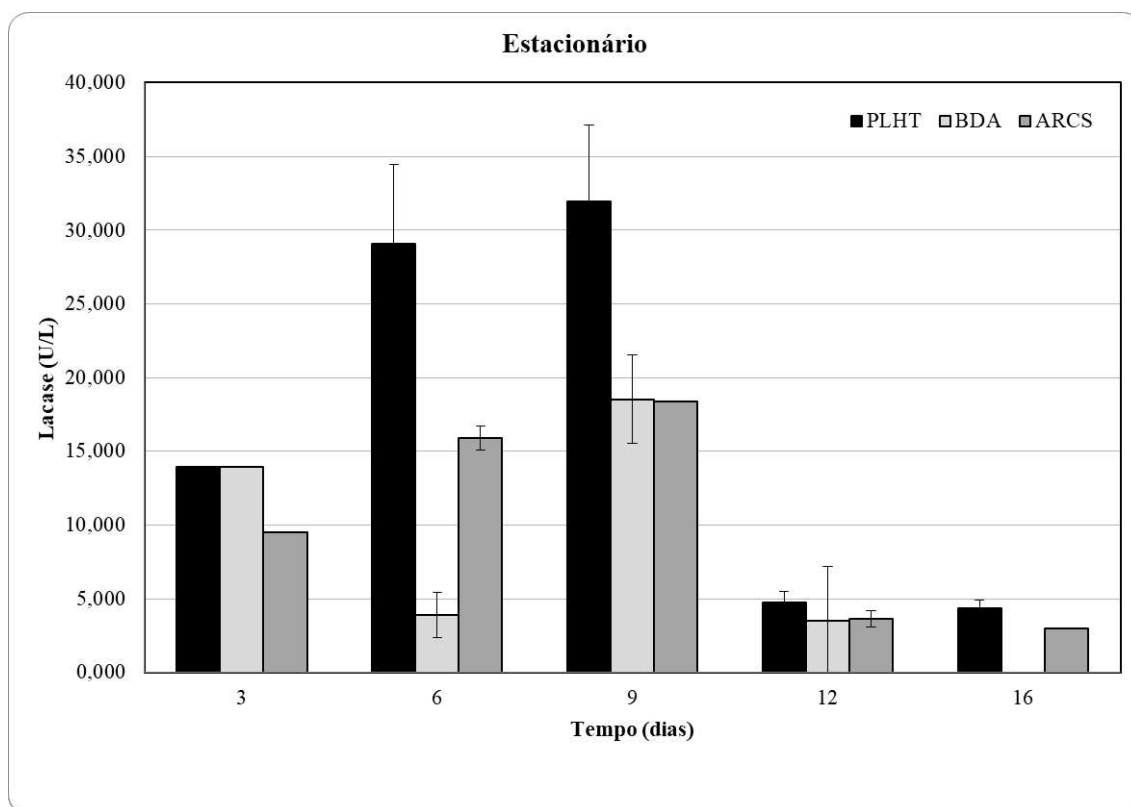
Gráfico 3 - Perfil de pH e produção de lacase por *L. crinitus*, a partir dos diferentes inóculos, BDA (A), BDA adicionado de ARCS (B) e BDA adicionado de PLHT (C), em meio Kirk modificado com agitação (100 rpm) e em modo estacionário. Os limites inferior e superior indicam desvio padrão.



Fonte: Autor (2023).

Para os três inóculos avaliados a maior produção de lacase ocorreu em condição estacionária (**Figura 5**), sendo a melhor produção obtidas com inóculo de PLHT, com valores médios de 31,91 (U/L). Para os inóculos em BDA e em ARCS os picos de produção foram de 18,53 e de 18,39 (U/L) respectivamente. A maior produção em meio cotendo inóculo de PLHT, pode ter sido enduzida pelos componentes residuais presentes no inóculo.

Gráfico 4 - Perfil de produção de lacase por *L. crinitus* em condição estacionária. Os limites inferior e superior indicam desvio padrão.



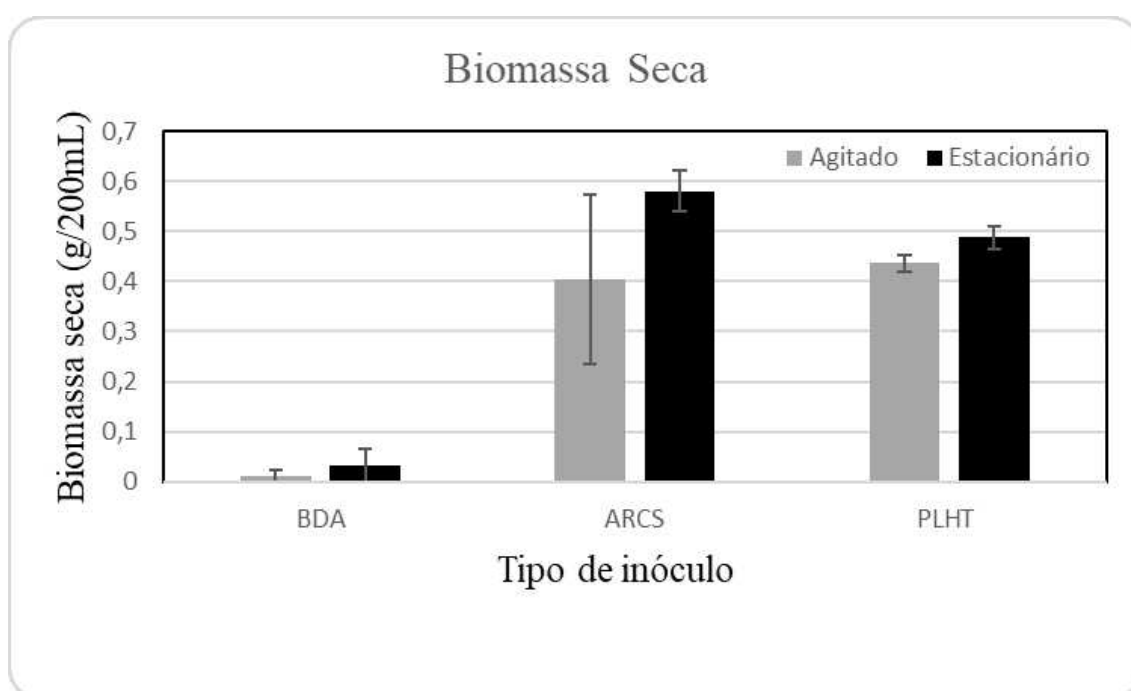
Fonte: Autor (2023).

A quantificação da biomassa seca determinada após 16 dias de cultivo (Figura 6) mostra que o fungo produziu mais biomassa com inóculos preparados com águas residuárias, com valores mais altos em condição estacionária. Para o inóculo de meio BDA verificou-se valores de biomassa de 0,01 g/200 mL e 0,03g/200 mL com agitação e em condição estacionária, respectivamente. Para o inóculo como ARCS os valores de biomassa seca foram de 0,4 g/200 mL e 0,58 g/200 mL com agitação e em condição estacionária, respectivamente. Para o inóculo com PLHT a biomassa seca foi de 0,43 g/200 mL e 0,48 g/200 mL com agitação e em condição estacionária, respectivamente (Figura 6). Nesse sentido, nota-se que as águas residuárias surgem como valiosas fontes nutricionais para o crescimento fúngico, conforme destacado por Silva (2022), quando avaliou o crescimento de *P. ostreatus* em ARCS (10 %) em meio sólido.

A eficiência na produção de biomassa de basidiomicetos *P. ostreatus* M2140, *T. harzianum* CBS 226.95 e *T. versicolor* M9912 na presença de água residuária de cervejaria também foi relatada Hultberg e Bodin (2017).

Como destacado por Linhares Neto (2023), este estudo também ressalta a importância de valorar-se a PLHT para a produção de biomassa e enzimas ligninolíticas, como a lacase.

Gráfico 5 - Biomassa seca nos cultivos de *L. crinitus* produzida em meio líquido den Kirk modificado com meio BDA, BDA adicionado de ARCS e BDA adicionado de PLHT em cultivo estacionário e com agitação de 100 rpm. Os limites inferior e superior indicam desvio padrão.



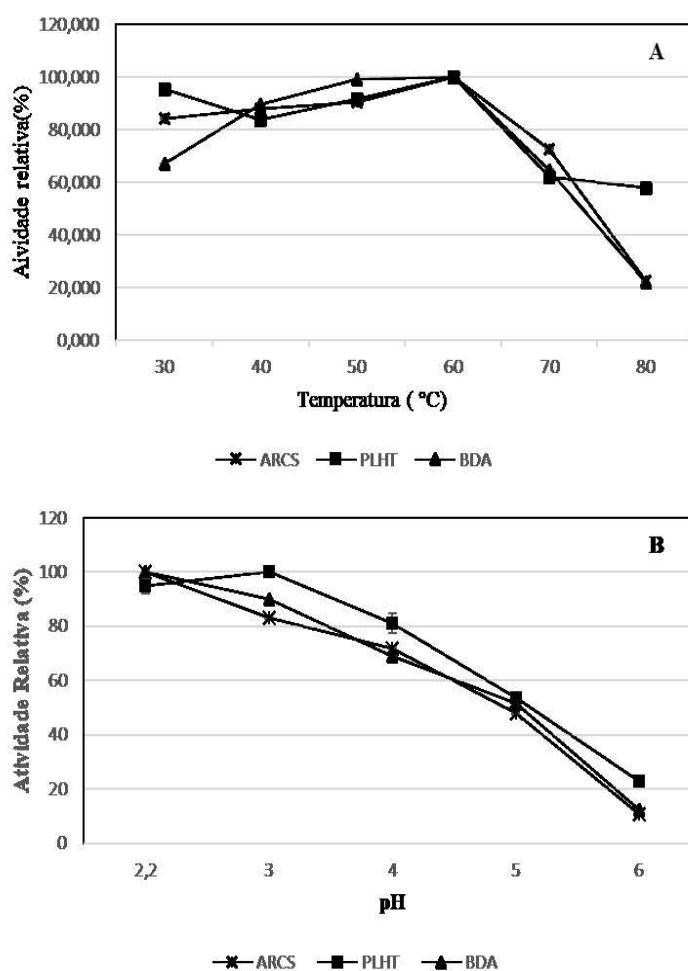
Fonte: Autor (2023).

A análise dos extratos enzimáticos provenientes de diferentes inóculos obtidos em cultivo estacionário (Figura 7) revela perfis de temperatura e pH ótimos semelhantes para todos os inóculos, com temperatura ótima de 60°C, enquanto observa-se uma ligeira variação nos pH ótimos, sendo 2,2 para os inóculos BDA e ARCS, enquanto para o inóculo PLHT o pH ótimo situa-se entre 2,2 e 3,0. Essa pequena variação nos valores de pH ótimo não são suficientes para caracterizar a ocorrência de produção de isoenzimas diante do uso de diferentes inóculos.

Coelho *et al.* (2023) discutem em sua pesquisa que os extratos de lacase obtidos a partir da mesma cultura utilizada nest pesquisa, apresentaram temperatura e pH ótimos de 50°C e 3,0, respectivamente, quando produzida em fermentação semisólida constituída de casca de amendoim.

Para a lacase do basidiomiceto *Oudemansiella canarii*, conforme relatado por Buzzo (2018), os resultados indicam um pH ótimo de 4,0 e uma temperatura ótima de 50°C. Dessa forma, a comparação desses dados destaca a diversidade nos parâmetros ótimos de temperatura e pH entre diferentes fungos produtores de lacase. Sun *et al.*, destaca que O pH ideal para a lacase é 2,2 e a faixa de temperatura ideal é 55-65 °C para lacase produzida pelo fungo *Gymnopus luxuriant*. Portanto, os valores de temperatura e pH ótimos verificados nesta pesquisa estão de acordo com o esperado para lacases de fungos basidiomicetos.

Gráfico 6 - Temperatura (A) e pH (B) ótimos das atividades de lacase dos extratos enzimáticos obtidos a partir dos diferentes inóculos.



Fonte: Autor (2023).

6 CONCLUSÕES

- A adição de águas residuais na fase de produção de inóculo diminuiu a velocidade de crescimento de *L. crinitus*, com aumento da densidade micelial.
- A presença das águas residuais no inóculo funcionaram como fonte de nutrientes para a produção de biomassa.
- A maior produção de enzima, ocorreu em condição estacionária, utilizando o inóculo contendo PLHT, indicando que esta água residual altamente tóxica ativou a expressão da lacase de *Lentinus crinitus* CCIBt 2611.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, P. H.; OLIVEIRA, A. N. A. C. C. D. E.; SOUZA, G. P. N. D. E. **Decolorization of remazol brilliant blue R with laccase from *Lentinus crinitus* grown in agro-industrial by-products**. v. 90, p. 1–11, 2018.
- AUST, S. D. Biodegradation of polymeric lignin by white rot fungi. In: Microbial Degradation of Xenobiotics and Recalcitrant Compounds. **American Society for Microbiology**, 1990. p. 124-135.
- BALLAMINUT, Nara et al. Physiological characterization of fungal inoculum for biotechnological remediation of soils. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, p. 561-570, 2014.
- BARISCH, Caroline; HOLTHUIS, Joost CM; COSENTINO, Katia. Membrane damage and repair: a thin line between life and death. **Biological Chemistry**, v. 404, n. 5, p. 467-490, 2023.
- BARR, D. P. *et al.* Transformation of chlorobiphenyls by selected basidiomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 116-121, 1994.
- BARRECA, A. M. *et al.* Laccase/mediated oxidation of a lignin model for improved delignification procedures. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 26, n. 1–2, p. 105–110, 2003.
- BARRIOS-ESTRADA, C. *et al.* Emergent contaminants: Endocrine disruptors and their laccase-assisted degradation – A review. **Science of the Total Environment**, v. 612, p. 1516–1531, 2018.
- BAZZICALUPO, Anna L. *et al.* Fungal heavy metal adaptation through single nucleotide polymorphisms and copy- number variation. **Molecular Ecology**, v. 29, n. 21, p. 4157-4169, 2020.
- BAZZICALUPO, Anna. Local adaptation in fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 46, n. 6, p. fuac026, 2022.
- BETTIN, F. *et al.* Aplicação de mediadores redox na descoloração de corantes utilizando caldo enzimático bruto de pleurotus sajor-caju ps-2001. In: **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Anais**. 2014. p. 1-8.
- BUENO-NIETO, Constanza *et al.* Biochemical and Spectroscopic Characterization of a Recombinant Laccase from Thermoalkaliphilic Bacillus sp. FNT with Potential for Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). **Catalysts**, v. 13, n. 4, p. 763, 2023.
- Buzzo, Ana Julia dos Reis. **Lacases de *Oudemansiella canarii*: Produção, Caracterização e Aplicação na Descoloração do Corante Antraquinônico Azul Brilhante de Remazol**. Mazinga, PR, 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - área de concentração: Biologia Celular e Molecular) - Universidade Estadual de Maringá.
- CASCELLI, Nicoletta *et al.* Laccases from *Pleurotus ostreatus* Applied to the Oxidation of Furfuryl Alcohol for the Synthesis of Key Compounds for Polymer Industry. **ChemSusChem**, p. e202300226, 2023.

COELHO, G. D. et al. Biodegradation of synthetic effluent containing CI Direct Red 28 (Congo Red) by *Lentinus crinitus* Laccase leads to low ecotoxicity. **Current Biotechnology**, v. 09, p. 1–7, 2020.

COELHO, G. D. et al. Characterization of a thermostable *Deconica castanella* Laccase and application toward pentachlorophenol degradation. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 49, n. 9, p. 908–915, 2019.

COELHO, G. D.; BALLAMINUT, N.; THOMAZ, DOUGLAS VIEIRA, MACHADO, K. M. G. Characterization of a thermostable *Deconica castanella* Laccase and application toward pentachlorophenol degradation. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 0, n. 0, p. 1–8, 2019.

COELHO, Glauciane Danusa *et al.* In silico and in vitro assays suggests Congo red dye degradation by a *Lentinus* sp. laccase enzyme. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, p. 1-12, 2023.

CUNHA, Lahyana Rafaella de Freitas. **Avaliação da biodegradação de copos descartáveis de polipropileno e produção de enzimas celulolíticas e ligninolíticas por *Psilocybe castanella* (CCIB:2781) na fermentação semissólida.** 2014. 122 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, Campina Grande, 2014.

DA SILVA MAGALHÃES, Alessandra Alves *et al.* Biosynthesis of silver nanoparticles by *Lentinus crinitus*: characterization and antimicrobial activity. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 14, p. e429111436261-e429111436261, 2022.

DE ARAÚJO CONCEIÇÃO, Taiana *et al.* Study of the production of *Lentinus crinitus* (L.) Fr. lignolytic enzymes grown on agro-industrial waste. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 8, n. 08, p. 259-272, 2017.

DHAKAR, Kusum *et al.* Prolonged laccase production by a cold and pH tolerant strain of *Penicillium pinophilum* (MCC 1049) isolated from a low temperature environment. **Enzyme research**, v. 2014, 2014.

DHIMAN, Saurabh Sudha; GNIMPIEBA, Etienne Z.; GADHAMSHETTY, Venkataramana (Ed.). Microbial Stress Response: Mechanisms and Data Science. **American Chemical Society**, 2023.

DOS SANTOS FILHO, José Rivaldo *et al.* *Lentinus crinitus*: traditional use, phytochemical and pharmacological activities, and industrial and biotechnological applications. **Food Research International**, p. 113179, 2023.

DOS SANTOS, Leonardo Guerreiro Borges *et al.* Produção e Caracterização de Lacase de *Pleurotus ostreatus* cultivado em Casca de Arroz. **Blucher Biochemistry Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 397-397, 2015.

DURUT, Nathalie *et al.* Long noncoding RNAs contribute to DNA damage resistance in *Arabidopsis thaliana*. **Genetics**, v. 225, n. 1, p. iyad135, 2023.

FAHIM, B. M. M. THE EFFECT OF LIGHT AND OTHER FACTORS ON THE SPORULATION OF. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 49, n. 1, p. 73–78, 1966.

FERNANDO, Liyanage D. *et al.* Structural Adaptation of Fungal Cell Wall in Hypersaline Environment. **bioRxiv**, p. 2023.04. 15.537024, 2023.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, Maikel Gilberto; BATISTA-GARCÍA, Ramón Alberto; ARÉCHIGA-CARVAJAL, Elva Teresa. Alkaliphilic/Alkali-Tolerant Fungi: Molecular, Biochemical, and Biotechnological Aspects. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 6, p. 652, 2023.

GRESSLER, Markus *et al.* Mind the mushroom: natural product biosynthetic genes and enzymes of Basidiomycota. **Natural product reports**, v. 38, n. 4, p. 702-722, 2021.

HALABURA, Marisangela Isabel Wietzikoski *et al.* Light conditions affect the growth, chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of the white-rot fungus *Lentinus crinitus* mycelial biomass. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 22, n. 3, p. 669-686, 2023.

Haser *et al.* Decline of DNA damage response along with myogenic differentiation. **bioRxiv**, p. 2023.06. 27.546688, 2023.

HOFRICHTER, M. Review: Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 4, p. 454–466, 2002.

HUANG, Caoxing *et al.* Lignin-enzyme interaction: A roadblock for efficient enzymatic hydrolysis of lignocellulosics. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 154, p. 111822, 2022.

HULTBERG, M.; BODIN, Hristina. Fungi-based treatment of brewery wastewater—biomass production and nutrient reduction. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 101, p. 4791-4798, 2017.

IJOMA, G. N.; TEKERE, M. Potential microbial applications of co-cultures involving ligninolytic fungi in the bioremediation of recalcitrant xenobiotic compounds. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 14, p. 1787-1806, 2017.

JANUSZ, G. *et al.* Laccase properties, physiological functions, and evolution. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, 2020.

JONES, Christopher R.; ZHANG, Zhenyu Jason; TSAI, Hung-Ji. Quantifying the mechanical properties of yeast *Candida albicans* using atomic force microscopy-based force spectroscopy. In: **Antifungal Immunity: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer US, 2023. p. 1-13.

Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtas-Wasilewska, M., Cho, N.S., Hofrichter, M. & Rogalski, J. 1999. Biodegradation of lignin by white-rot fungi. **Fungal Genetics and Biology**. 27: 175-185.

LIN, Juan *et al.* Interaction between the cell walls of microalgal host and fungal carbohydrate-activate enzymes is essential for the pathogenic parasitism process. **Environmental Microbiology**, v. 23, n. 9, p. 5114-5130, 2021.

LINHARES NETO, A. **Valoração da água residuária da liquefação hidrotérmica de algas para produção de lacase por *Pleurotus ostreatus***. Orientadora: Glauciane Danusa Coelho, 2023. 57 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia de biotecnologia e bioprocessos, Centro de desenvolvimento sustentável do semiárido, Universidade Federal de Campina Grande, Sumé, 2023.

LISOV, Alexander *et al.* The role of laccase from zygomycetous fungus *Mortierella elasson* in humic acids degradation. **Agronomy**, v. 11, n. 11, p. 2169, 2021.

LV, Ziyao *et al.* Techniques for enhancing the tolerance of industrial microbes to abiotic stresses: a review. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 67, n. 1, p. 73-81, 2020.

MACHRI COLLA, Itaruã *et al.* Mycelial biomass cultivation of *Lentinus crinitus*. **Bioscience Journal**, v. 36, n. 6, 2020.

Maciel, Carla do Couto Soares. **Produção de enzimas do sistema lignolítico e biossurfactante por *Curvularia lunata* (UFPEDA885), usando óleo diesel como substrato**. 2010. 142 folhas. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Recife, 2010.

MARIM, R. A. *et al.* *Lentinus crinitus* strains respond differently to cultivation pH and temperature. **Genet Mol Res**, v. 17, n. 10.4238, 2018.

MARIM, Renan Alberto *et al.* *Lentinus crinitus* response to blue light on carbohydrate-active enzymes. **Biosci. j.**(Online), p. 924-931, 2020.

MAGALHÃES, L. M. *et al.* Rapid assessment of bioactive phenolics and methylxanthines in spent coffee grounds by FT-NIR spectroscopy. **Talanta**, v. 147, p. 460–467, 15 jan. 2016.

MANCHÓN, N. *et al.* Distribution patterns of polyphenols and alkaloids in instant coffee, soft and energy drinks, and tea. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 31, n. 5, p. 483–500, 2013.

MARTÍNKOVÁ, L. *et al.* Biodegradation of phenolic compounds by Basidiomycota and its phenol oxidases: A review. **Chemosphere**, v. 149, p. 373–382, 2016.

Matheus, D. R., Bononi, V. L. R. & Machado, K. M. G. 2000. Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soil contaminated with industrial residues. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 16 (5): 415-421.

MATHUR, P.; SANYAL, D.; DEY, P. Optimization of growth conditions for enhancing the production of microbial laccase and its application in treating antibiotic contamination in wastewater. **Biotechnology**, v. 81, n. 11, 2021.

MCILVAINE, T. C. A buffer solution for colorimetric comparison. **Journal of Biological Chemistry**, v. 49, n. 1, p. 183-186, 1921.

MELO, Gércia Gonçalves de et al. Estudos preliminares sobre atividade adsorptiva do corante vermelho congo pelo fungo *Lentinus crinitus*. **Revista Saúde e Ciência Online**, v. 3, n. 3, p. 312-320, set.-dez. 2014.

MORALES-ÁLVAREZ, E. D. et al. Partial removal and detoxification of malachite green and crystal violet from laboratory artificially contaminated water by *Pleurotus ostreatus*. **Universitas Scientiarum**, v. 21, n. 3, p. 259–285, 2016.

MOREIRA, F.S. **VALORIZAÇÃO DA ÁGUA RESIDUÁRIA DA PRODUÇÃO DE CAFÉ SOLÚVEL PARA A PRODUÇÃO DE LACASE**. Orientadora: Glauciane Danusa Coelho, 2023. 47 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia de biotecnologia e bioprocessos, Centro de desenvolvimento sustentável do semiárido, Universidade Federal de Campina Grande, Sumé, 2021.

MOREIRA, S.; MILAGRES, A. M. F.; MUSSATTO, S. I. Reactive dyes and textile effluent decolorization by a mediator system of salt-tolerant laccase from *Peniophora cinerea*. **Separation and Purification Technology**, v. 135, n. 1, p. 183–189, 2014.

NOVITA, E. Biodegradability Simulation of Coffee Wastewater Using Instant Coffee. **Agriculture and Agricultural Science Procedia**, v. 9, p. 217–229, 1 jan. 2016.

O'NEAL, Lindsey *et al.* The Wsp system of *Pseudomonas aeruginosa* links surface sensing and cell envelope stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 119, n. 18, p. e2117633119, 2022.

OROSZ, Erzsebet *et al.* Fungal Stress Database (FSD)—a repository of fungal stress physiological data. **Database**, v. 2018, p. bay009, 2018.

PARRA GUARDADO, A. L. et al. Effect of redox mediators in pharmaceuticals degradation by laccase: A comparative study. **Process Biochemistry**, v. 78, n. October 2018, p. 123–131, 2019.

PATEL, N. et al. Mode of Action, Properties, Production, and Application of Laccase: A Review. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 13, n. 1, 2019.

POLAK, J.; JAROSZ-WILKOLAZKA, A. Fungal laccases as green catalysts for dye synthesis. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 9, p. 1295–1307, 2012.

PROBST, Corinna *et al.* A fungal lytic polysaccharide monooxygenase is required for cell wall integrity, thermotolerance, and virulence of the fungal human pathogen *Cryptococcus neoformans*. **PLoS Pathogens**, v. 19, n. 4, p. e1010946, 2023.

PUTZKE, J. **Influência da exploração florestal sobre a microbiota de florestas com araucária (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze)**. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Santa Maria, 2002.

QUISPE-ARPASI, Diana *et al.* Anaerobic and photocatalytic treatments of post-hydrothermal liquefaction wastewater using H₂O₂. **Bioresource Technology Reports**, v. 3, p. 247-255, 2018.

RAFIQ, Muhammad *et al.* Adaptation mechanisms and applications of psychrophilic fungi. **Fungi in extreme environments: ecological role and biotechnological significance**, p. 157-174, 2019.

REN, Dajun *et al.* Recent environmental applications of and development prospects for immobilized laccase: a review. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 36, n. 2, p. 81-131, 2020.

RENFELD, Zhanna V. *et al.* The Laccase of *Myrothecium roridum* VKM F- 3565: A New Look at Fungal Laccase Tolerance to Neutral and Alkaline Conditions. **ChemBioChem**, v. 24, n. 4, p. e202200600, 2023.

RODRIGUEZ-COUTO, S. Laccases for Denim Bleaching: An Eco-Friendly Alternative. **The Open Textile Journal**, v. 5, n. 1, p. 1–7, 2012.

SALDARRIAGA-HERNÁNDEZ, S. *et al.* Biotransformation of lignocellulosic biomass into industrially relevant products with the aid of fungi-derived lignocellulolytic enzymes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 1099–1116, 2020.

SANTANA, Thiago Teodoro *et al.* Metallic-aromatic compounds synergistically induce *Lentinus crinitus* laccase production. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 16, p. 625-630, 2018.

Santello, Lara Cavalari. **Biodegradação e destoxificação do corante têxtil preto reativo 5 pelo basidiomiceto de origem marinha *Peniophora* sp.** CBMAI 1063. 2023. 83 f. Dissertação (Mestrado em Biociências)] - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro.

SCHLOSSER, Dietmar (Ed.). **Laccases in bioremediation and waste valorisation**. Springer, 2020.

SENTHIVELAN, T.; KANAGARAJ, J.; PANDA, R. C. Recent trends in fungal laccase for various industrial applications: An eco-friendly approach - A review. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 21, n. 1, p. 19–38, 2016.

SHARMA, A. *et al.* Potential of in situ SSF laccase produced from *Ganoderma lucidum* RCK 2011 in biobleaching of paper pulp. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, n. 3, p. 367–377, 2019.

SILVA NETO, Carlos de Melo *et al.* Bromatological aspects of *Lentinus crinitus* mushroom (Basidiomycota: Polyporaceae) in agroforestry in the Cerrado. **Food Science and Technology**, v. 40, p. 659-664, 2019.

SILVA, Dayse Pereira Dias. **Efeito da concentração do corante vermelho congo na degradação/absorção pelo fungo *Lentinus crinitus* CCIbt 2611**. 2015. 55 f. Monografia (Curso de Engenharia de Biotecnologia e Bioprocessos) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Desenvolvimento Sustentável do Semiárido, Sumé - PB.

SILVA, Gabriel Rufino da. **Otimização da deslignificação de bagaço de cana utilizando extrato enzimático enriquecido em laccase obtida a partir de *Xylaria* sp. visando a produção de bioetanol de segunda geração**. 2022. 85 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química - Centro Universitário FEI, São Bernardo do Campo, 2022.

SILVA, Marco Antônio. **Pré-tratamento fúngico para a melhoria da biodegradabilidade anaeróbia de água residuária da produção de café solúvel (ARCS)**. Orientadora Giovana Tommaso. São Carlos, 2022. 148 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Ciências da Engenharia Ambiental, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2022.

SINGH, D.; GUPTA, N. Microbial Laccase: a robust enzyme and its industrial applications. **Biologia**, 2020.

SONDHI, Sonica *et al.* Laccase: A Green Solution for Environmental Problems. **Advances in Environmental and Engineering Research**, v. 4, n. 2, p. 1-32, 2023.

SONDHI, Sonica *et al.* Laccase: A Green Solution for Environmental Problems. **Advances in Environmental and Engineering Research**, v. 4, n. 2, p. 1-32, 2023.

SUN, Yue *et al.* Purification and characterization of a thermo-and pH-stable laccase from the litter-decomposing fungus *Gymnopus luxurians* and laccase mediator systems for dye decolorization. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 672620, 2021.

TINOCO-VALENCIA, Raunel *et al.* Toward an understanding of the effects of agitation and aeration on growth and laccases production by *Pleurotus ostreatus*. **Journal of Biotechnology**, v. 177, p. 67-73, 2014.

TRAXLER, Lea *et al.* Survival of the basidiomycete *Schizophyllum commune* in soil under hostile environmental conditions in the Chernobyl Exclusion Zone. *Journal of Hazardous Materials*, v. 403, p. 124002, 2021.

UNUOFIN, John O.; OKOH, Anthony I.; NWODO, Uchechukwu U. Aptitude of oxidative enzymes for treatment of wastewater pollutants: a laccase perspective. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 2064, 2019.

VAKIRLIS, N. *et al.* A molecular portrait of de novo genes in yeast. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, 2016.

VALLE, J. S. *et al.* Optimum conditions for inducing laccase production in *Lentinus crinitus*. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 4, p. 8544-8551, 2014.

VANDE ZANDE, Pétra; ZHOU, Xin; SELMECKI, Anna. The Dynamic Fungal Genome: Polyploidy, Aneuploidy and Copy Number Variation in Response to Stress. **Annual Review of Microbiology**, v. 77, 2023.

VARGA, Béla *et al.* Design and optimization of laccase immobilization in cellulose acetate microfiltration membrane for micropollutant remediation. **Catalysts**, v. 13, n. 2, p. 222, 2023.

VIGNOLI, J. A. *et al.* Roasting process affects differently the bioactive compounds and the antioxidant activity of arabica and robusta coffees. **Food Research International**, v. 61, p. 279–285, 1 jul. 2014.

VIGNOLI, J. A.; BASSOLI, D. G.; BENASSI, M. T. Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 863–868, 2011.

WANGSANUT, Tanaporn; PONGPOM, Monsicha. The role of the glutathione system in stress adaptation, morphogenesis and virulence of pathogenic Fungi. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 18, p. 10645, 2022.

WATSON, Monica *et al.* Response of fungal endophyte communities within *Andropogon gerardii* (Big bluestem) to nutrient addition and herbivore exclusion. **Fungal Ecology**, v. 51, p. 101043, 2021.

WESENBERG, D; KYRIAKIDES, I; AGATHOS, S. N. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. **Biotechnology Advances**, v. 2003, n. 22, p. 161–187, 2003.

YADAV, P. *et al.* Recombinant Laccase: A Promising Tool for Industrial Effluent Bioremediation. **Journal of Earth & Environmental Waste Management**, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2023.

YI, Wei *et al.* Molecular Basis of Stress-Tolerant Genes in Extreme Microorganisms. In: Beneficial Microorganisms in Agriculture. Singapore: **Springer Nature Singapore**, 2021. p. 293-306.

ZHANG, Qi *et al.* **Global multi-omics profiling reveals evolutionary drivers of phylogeographic diversity of fungal specialized metabolism.** 2023.

ZHANG, Yongjie; XU, Jianping. Molecular mechanisms of fungal adaptive evolution. **Molecular Mechanisms of Microbial Evolution**, p. 409-435, 2018.