

**Lacase de *Agaricus subrufescens* cultivado em meio com melaço de cana-de-açúcar
promove a descoloração de corantes sintéticos**

**Laccase of *Agaricus subrufescens* cultivated with sugarcane molasses promotes the
decolorization of synthetic dyes**

**La lacasa de *Agaricus subrufescens* cultivada en medio con melaza de caña de azúcar
promueve la decoloración de tintes sintéticos**

Recebido: 05/12/2020 | Revisado: 12/12/2020 | Aceito: 13/12/2020 | Publicado: 15/12/2020

Genyfer Poline Neri de Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8475-0436>

Universidade Paranaense, Brasil

E-mail: genyferpoline@gmail.com

Marisangela Isabel Wietzikoski Halabura

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6422-911X>

Universidade Paranaense, Brasil

E-mail: marisangela.halabura@edu.unipar.br

Katielle Vieira Avelino

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9826-8029>

Universidade Paranaense, Brasil

E-mail: katielle.avelino@edu.unipar.br

Marcella Ribeiro da Costa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7108-9936>

Universidade Paranaense, Brasil

E-mail: marcella.costa@edu.unipar.br

Thiago Teodoro Santana

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8523-4639>

Universidade Paranaense, Brasil

E-mail: thiago.san@edu.unipar.br

Adma Soraia Serea Kassem

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4564-1181>

Universidade Paranaense, Brasil

E-mail: adma.kassem@edu.unipar.br

Renan Alberto Marim

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3855-6971>

Universidade Paranaense, Brasil

E-mail: renan.marim@edu.unipar.br

Maria Graciela Iecher Faria Nunes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5363-2894>

Universidade Paranaense, Brasil

E-mail: gracielaiecher@prof.unipar.br

Giani Andrea Linde Colauto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1220-2032>

Universidade Paranaense, Brasil

E-mail: gianilindecolauto@gmail.com

Nelson Barros Colauto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4390-8302>

Universidade Paranaense, Brasil

E-mail: nelson.c@edu.unipar.br

Juliana Silveira do Valle

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9463-5378>

Universidade Paranaense, Brasil

E-mail: jsvalle@prof.unipar.br

Resumo

Agaricus subrufescens é um cogumelo que produz lacases, oxirredutases que degradam corantes. As condições de cultivo como concentração de nitrogênio, fonte de carbono e indutores podem aumentar a produção de lacase. O objetivo deste estudo foi cultivar *A. subrufescens* com ureia, subprodutos agroindustriais e indutores para produzir lacase para descoloração de corantes. *Agaricus subrufescens* U7-1 e U7-3 foram cultivadas em meio líquido com ureia (0, 2, 4, 6 e 8 g L⁻¹), fontes de carbono (glicose, melão de cana-de-açúcar – MC e de soja - MS) e indutores (álcool veratrílico, etanol, guaiacol e vanilina). O extrato enzimático do cultivo foi usado na descoloração de remazol azul brilhante R (RBBR), preto reativo 5 (PR5) e verde malaquita (VM). A produção de lacase de *A. subrufescens* foi maior com menores concentrações de ureia e a maior atividade de lacase de U7-1 ocorreu com 2 g L⁻¹ de ureia e U7-3 sem ureia. MC aumentou a atividade e antecipou o pico de lacase de U7-1 em cinco dias e de U7-3 em 15 dias. MS reduziu a atividade de lacase. Vanilina aumentou a

atividade de lacase de U7-1 em 29% (44380 U L⁻¹) e antecipou o pico de atividade; e vanilina e álcool veratrílico aumentaram a atividade de lacase (44770 U L⁻¹) de U7-3, mas atrasaram o pico de atividade. Os extratos de U7-1 e U7-3 do cultivo com vanilina descoloriram o RBBR em 24 horas (65% e 75%) e VM (70%, 24 e 72 horas), mas não reduziram a cor de PR5.

Palavras-chave: *Agaricus blazei*; Basidiomycota; Biodegradação; Corantes têxteis; Resíduos agroindustriais.

Abstract

Agaricus subrufescens is a mushroom that produces laccase oxidoreductases that degrade dyes. Cultivation conditions such as nitrogen concentration, carbon source, and inducers can increase laccase production. This study aimed to cultivate *A. subrufescens* with urea, agro-industrial by-products, and inducers to produce laccase for dyes decolorization. *Agaricus subrufescens* U7-1 and U7-3 were grown in liquid medium with urea (0, 2, 4, 6, and 8 g L⁻¹), carbon sources (glucose, sugarcane molasses - SuM and soybean molasses - SoM), and inducers (ethanol, guaiacol, vanillin, and veratryl alcohol). The enzymatic extract of the culture was used in the decolorization of remazol brilliant blue R (RBBR), reactive black 5 (RB5), and malachite green (MG). The laccase production of *A. subrufescens* was inversely proportional to the urea concentration and the greater U7-1 laccase activity occurred with 2 g L⁻¹ urea and U7-3 produced more laccase without urea. SuM increased the laccase activity and anticipated the laccase peak of U7-1 in five days and U7-3 in 15 days. SoM reduced laccase activity. Vanillin increased the laccase activity of U7-1 by 29% (44380 U L⁻¹) and anticipated activity peak; and vanillin and veratryl alcohol increased the laccase activity (44770 U L⁻¹) of U7-3, but delayed activity peak. The extracts of U7-1 and U7-3 obtained from the vanillin culture discolored the RBBR in 24 h (65% and 75%), and VM (70%, 24 and 72 h), but did not reduce the color of PR5.

Keywords: *Agaricus blazei*; Agro-industrial waste; Basidiomycota; Biodegradation; Textile dyes.

Resumen

Agaricus subrufescens es un hongo que produce lacasas, oxidorreductasas que degradan los colorantes. Las condiciones de cultivo como la concentración de nitrógeno, la fuente de carbono y los inductores pueden aumentar la producción de lacasa. El objetivo de este estudio fue cultivar *A. subrufescens* con urea, subproductos agroindustriales e inductores para producir lacasas para la decoloración de colorantes. *Agaricus subrufescens* U7-1 y U7-3 se

cultivaron en medio líquido con urea (0, 2, 4, 6 y 8 g L⁻¹), fuentes de carbono (glucosa, melaza de caña de azúcar - MC y melaza de soja - MS) e inductores (alcohol veratril, etanol, guayacol y vainillina). El extracto enzimático del cultivo se utilizó en la decoloración de remazol azul brillante R (RBBR), negro reactivo 5 (PR5) y verde malaquita (VM). La producción de lacasa de *A. subrufescens* fue inversamente proporcional a la concentración de urea y la mayor actividad lacasa de U7-1 ocurrió con 2 g L⁻¹ de urea y U7-3 sin urea. MC aumentó la actividad y anticipó el pico de lacasa de U7-1 en cinco días y U7-3 en 15 días. MS redujo la actividad de lacasa. La vainillina aumentó la actividad lacasa de U7-1 en un 29% (44380 U L⁻¹) y anticipó la actividad máxima; y la vainillina y el alcohol veratrílico aumentaron la actividad de lacasa de U7-3 (44770 U L⁻¹), pero retrasaron la actividad máxima. Los extractos de U7-1 y U7-3 del cultivo de vainillina decoloraron el RBBR en 24 horas (65% y 75%) y VM (70%, 24 y 72 horas), pero no decoloraron PR5.

Palabras clave: *Agaricus blazei*; Basidiomycota; Biodegradación; Colorantes textiles; Residuos agroindustriales.

1. Introdução

Agaricus subrufescens Peck (ou seus sinônimos *Agaricus blazei* Murrill ss. Heinemann e *Agaricus brasiliensis* Wasser et al.) cresce naturalmente sobre matéria orgânica vegetal (Colauto et al., 2010) e é cultivado em todo o mundo (Largeteau et al., 2011). Conhecido por sua riqueza de compostos bioativos (Wisitrassameewong et al., 2012) e suas atividades biológicas como antitumoral (Bertéli et al., 2014; Bertéli et al., 2016), antioxidante (Umeo et al., 2015), antimutagênica, fotoprotetora (Costa et al., 2015) e imunomoduladora (Rubel et al., 2018), também é capaz de bioacumular metais como ferro e zinco (Umeo et al., 2019, Meniqueti et al., 2020; Scheid et al., 2020) e de produzir lacase (D'Agostini et al., 2011; Valle et al., 2015). Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa tem conduzido a bioprospecção de linhagens de fungos e de condições de cultivo que aumentem a produção de lacase com propriedades que permitam a degradação de corantes.

Lacases (EC 1.10.3.2) são multicobre oxirredutases que oxidam substratos fenólicos utilizando o potencial redox de cobre presentes em seu sítio catalítico enquanto reduzem oxigênio à água (Martínková et al., 2016). A diversidade de substratos em potencial das lacases tornam esta enzima particularmente atrativa para aplicações nas indústrias de alimentos, farmacêutica, química, têxtil e em biorremediação (Upadhyay et al., 2016). Lacases são encontradas em diferentes organismos, de bactérias a eucariotos superiores,

entretanto, as lacases usadas industrialmente, na sua maioria, derivam de fungos (Wu et al., 2020). Em fungos basidiomicetos as lacases podem ser constitutivas ou induzíveis e vários compostos diferentes como íons metálicos (Rodrigues et al., 2019) e compostos aromáticos ou fenólicos (Santana et al., 2018) podem aumentar a produção de lacase (Yang et al., 2013).

A produção de lacase por basidiomicetos também depende da fonte de carbono e da fonte de nitrogênio, necessárias para criar condições nutricionais favoráveis (Martani et al., 2017). Contudo, estudos indicam que estes fungos possuem uma ampla variedade de respostas a fontes de carbono e nitrogênio e à sua concentração no meio de cultivo (Mikiashvili et al., 2006; Almeida et al., 2018; Elisashvili et al., 2018). A substituição de fontes de carbono sintéticas por subprodutos agroindustriais já demonstrou ser eficiente para a produção de lacase (Elisashvili et al., 2008; Songulashvili et al., 2015; Aragão et al., 2019) uma vez que esse material é rico em nutrientes e em substâncias que podem atuar induzindo a atividade desta enzima (Vijayalaxmi et al., 2015). Entretanto, ao avaliarem-se as condições de cultivo, é importante considerar que a resposta do fungo a estas condições varia entre as espécies e entre linhagens da mesma espécie (Valle et al., 2015).

Corantes são amplamente empregados em diversos setores industriais, particularmente, na indústria têxtil onde grande volume de efluentes coloridos é gerado anualmente (Morsy et al., 2020). Estima-se que entre 10% e 30% dos corantes usados na indústria alcancem os efluentes por não se fixarem adequadamente (Sen et al., 2016; Vikrant et al., 2018). O tratamento de efluentes para degradação de corantes é tradicionalmente feito por métodos físicos e químicos que nem sempre são eficientes e podem gerar resíduos adicionais e tóxicos (Rodríguez-Couto, 2013). Estudos têm se concentrado em métodos biológicos como uma alternativa ecológica para a remediação de corantes (Sen et al., 2016) e enzimas oxirredutoras produzidas por fungos, como a lacase, podem ser utilizadas em processos de descoloração e são uma alternativa aos tratamentos convencionais.

O melaço de cana-de-açúcar é um subproduto da indústria sucroalcooleira resultante da fase final da cristalização de açúcar (Arakaki et al., 2011). No Brasil, 642,7 milhões de toneladas de cana-de-açúcar foram produzidas na safra 2019-2020 gerando até 40 milhões de toneladas de melaço (CONAB, 2020). Devido a sua composição rica em açúcares fermentescíveis, aminoácidos, vitaminas, proteínas e minerais (Feltrin et al., 2000), o melaço de cana pode ser empregado na suplementação da dieta animal e na produção de etanol de segunda geração (Fernández-López et al., 2012). O melaço de soja é um subproduto da indústria de processamento de soja e é gerado durante a produção de proteína de soja concentrada e de proteína de soja isolada (Al Loman & Ju 2016). Este subproduto

agroindustrial é rico em oligossacarídeos solúveis, aminoácidos, lipídios e minerais (Romão et al., 2012) e pode ser usado para a produção de bioetanol (Siqueira et al., 2008), ácidos orgânicos (Cheng et al., 2017) e biopolímeros (Oliveira et al., 2020). As características químicas dos melaços de cana-de-açúcar e de soja, sua grande disponibilidade e baixo custo, tornam estes subprodutos agroindustriais candidatos a substratos para cultivo de fungos visando aplicações biotecnológicas (Valle et al., 2014).

A indução de lacases de *A. subrufescens* por álcool veratrílico, etanol, guaiacol, pirogalol, vanilina e xilidina foi estudada (Valle et al., 2015), entretanto, a combinação de indutores e de outros componentes do meio de cultivo como fonte de nitrogênio e carbono ainda é pouco compreendida. Até o momento, não há relatos sobre uso de lacases de *A. subrufescens* produzidas em meio líquido para descoloração de corantes. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar como diferentes concentrações de ureia, fontes de carbono alternativas e de baixo custo e presença de indutores no meio de cultivo podem interferir na produção de lacase por linhagens de *A. subrufescens* e na capacidade de descoloração de corantes têxteis.

2. Material e Métodos

2.1 Microrganismo

Agaricus subrufescens linhagens U7-1 (CNP72, EMBRAPA) e U7-3 (CNP135, EMBRAPA) foram depositadas na coleção de culturas do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura da Universidade Paranaense e analisadas neste estudo. O micélio utilizado como inóculo foi cultivado em meio ágar-extrato-de-malte (AEM) 2% (m v⁻¹) a 28 ± 1 °C, por 15 dias. Em todas as etapas experimentais três discos de AEM (6 mm de diâmetro) contendo micélio foram utilizados para inocular o meio de cultivo líquido.

2.2 Condições de cultivo

A produção de lacase ocorreu se acordo com Valle et al. (2015), com poucas modificações, por meio do cultivo submerso de micélio em frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 100 mL de meio de cultivo líquido autoclavado (121 °C por 20 min) e composto por KH₂PO₄ (1,5 g L⁻¹), MgSO₄ (0,5 g L⁻¹), KCl (0,5 g L⁻¹), FeSO₄.H₂O (0,036 g L⁻¹), ZnSO₄.H₂O (0,035 g L⁻¹) e glicose (10 g L⁻¹). Na primeira etapa experimental o meio de cultivo foi

suplementado com diferentes concentrações de ureia para avaliar-se o efeito da variação da concentração de nitrogênio na produção de lacase. A suplementação ocorreu pela adição de solução de ureia (300 g L^{-1}) previamente filtrada (filtro com poros de $0,22 \mu\text{m}$) em volume suficiente para obter concentrações finais de $0, 2 \text{ g L}^{-1}, 4 \text{ g L}^{-1}, 6 \text{ g L}^{-1}$ e 8 g L^{-1} . A concentração de ureia que promoveu a maior produção de lacase foi selecionada para a etapa experimental subsequente destinada a avaliar o efeito de fontes alternativas de carbono na produção da enzima. Para tanto, a glicose do meio de cultivo foi substituída por fontes alternativas de carbono melaço de cana-de-açúcar (MC) ou melaço de soja (MS) (Valle et al., 2014). Todas as fontes de carbono foram empregadas em quantidade suficiente para a obtenção de 10 g L^{-1} de açúcares totais no meio de cultivo. Em ambas as etapas os cultivos foram mantidos por 45 dias a $28 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, na ausência de luz e sob agitação (90 rpm). Alíquotas do meio foram retiradas a cada cinco dias e utilizadas para determinação da atividade de lacase.

A fonte de carbono que proporcionou maior atividade de lacase foi selecionada para a terceira etapa experimental onde avaliou-se o efeito da suplementação do meio de cultivo com compostos químicos com potencial para indução de lacase. O meio de cultivo foi suplementado com um dos indutores: álcool veratrílico (álcool 3,4-dimetoxibenzílico), etanol (álcool etílico), guaiacol (2-metoxifenol) ou vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído) (Santana et al., 2018). Foram preparadas soluções (1 M) que, após filtração (filtro com poros de $0,22 \mu\text{m}$), foram adicionadas ao meio no 5º dia de cultivo em volume suficiente para obter concentração final de 1 mM . Os cultivos foram mantidos por 30 dias a $28 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, na ausência de luz e sob agitação (90 rpm). Alíquotas do meio de cultivo foram retiradas a cada cinco dias e utilizadas para determinação da atividade de lacase. O extrato enzimático com a máxima atividade de lacase foi filtrado (filtro com poros de $0,22 \mu\text{m}$) e misturado a soluções de corantes de diferentes classes para verificação da capacidade de descoloração.

2.3 Descoloração de corantes pelo extrato enzimático

Os ensaios para avaliação da capacidade do extrato enzimático em descolorir diferentes classes químicas de corantes têxteis foram conduzidos segundo Marim et al., 2016. A descoloração foi realizada com a antraquinona remazol azul brilhante R (RBBR), o azo corante preto reativo 5 (PR5) e o trifenilmetano verde malaquita (VM). Todos os corantes foram previamente diluídos em tampão acetato de sódio (100 mM , $\text{pH } 5$), filtrados (filtro com poros de $0,22 \mu\text{m}$) e misturados ao extrato enzimático sem micélio em volume suficiente para

obtenção de concentração final de 1 mg mL^{-1} de corante em todos os ensaios. As reações de descoloração permaneceram a $28 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, na ausência de luz, por 72 h. Alíquotas ($300 \text{ }\mu\text{L}$) foram coletadas em condições assépticas a cada 24 h e a taxa de descoloração foi avaliada por espectrofotometria (SpectraMax Plus 384) na máxima absorvância do PR5 (597 nm), RBBR (595 nm) e VM (620 nm). Todas as reações foram conduzidas na ausência de peróxido de hidrogênio para evitar-se a ação de peroxidases. A reação de descoloração contendo água ultrapura ao invés de extrato enzimático foi usada como controle analítico. O percentual de descoloração foi calculado em relação à absorvância inicial das reações.

2.4 Determinação da atividade de lacase

A atividade de lacase foi determinada usando ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)) como substrato enzimático (Santana et al., 2018). Solução de ABTS (1 mM) em tampão acetato de sódio (0,1 M, pH 5.0) foi misturado com meio de cultivo líquido e a oxidação do ABTS foi acompanhada a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e 420 nm ($\epsilon = 36,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) em espectrofotômetro (SpectraMax Plus 384). Misturas contendo os mesmos componentes da reação, exceto o meio de cultivo; e mistura contendo os mesmos componentes, exceto o ABTS, 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.

2.5 Análise estatística

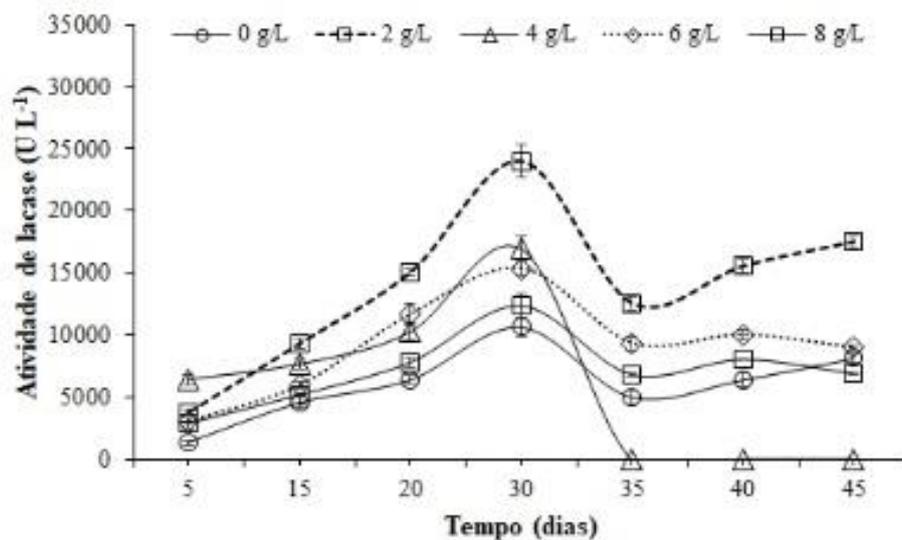
Todas as etapas experimentais basearam-se em metodologia quantitativa (Pereira et al., 2018). Todos os ensaios foram conduzidos em três repetições e seguiram o delineamento inteiramente casualizado. Os resultados foram avaliados por análise de variância e as diferenças entre as médias determinadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

3. Resultados e Discussão

As atividades de lacase das linhagens de *A. subrufescens* em meio de cultivo com diferentes concentrações de ureia encontram-se nas figuras 1 e 2. As concentrações de ureia afetaram a atividade de lacase de ambas as linhagens de *A. subrufescens*, contudo, cada linhagem reagiu de forma distinta às concentrações de nitrogênio. Para *A. subrufescens* U7-1

(Figura 1) as maiores atividades de lacase foram observadas na presença de 2 g L⁻¹ de ureia com pico de atividade de 24000 U L⁻¹ no 30º dia de cultivo, um aumento de 124% comparado com o pico de atividade no meio sem ureia. Quando maiores concentrações de ureia foram avaliadas (4 e 6 g L⁻¹), o pico de atividade de lacase foi menor, em média, de 16000 U L⁻¹ e também no 30º dia, porém, não se detectou atividade de lacase do 35º dia em diante no meio com 4 g L⁻¹ de ureia.

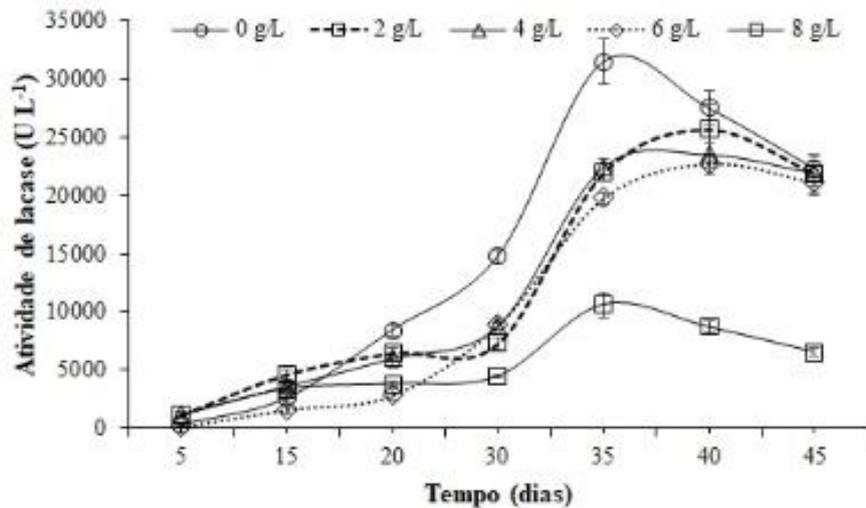
Figura 1. Atividade de lacase (média ± desvio padrão) de *Agaricus subrufescens* U7-1 crescido em meio líquido contendo glicose (10 g L⁻¹) como fonte de carbono e suplementado com diferentes concentrações de ureia ao longo de 45 dias de cultivo.



Fonte: Autores.

Para *A. subrufescens* U7-3 (Figura 2) o pico de máxima atividade de lacase ocorreu no 35º ou no 40º dia de cultivo, dependendo da concentração de nitrogênio. As maiores atividades de lacase foram observadas na ausência de ureia com pico de atividade de 31500 U L⁻¹ no 35º dia de cultivo. Todas as demais concentrações de nitrogênio reduziram a atividade de lacase e atrasaram o pico de máxima atividade em cinco dias, exceto 8 g L⁻¹ cujo pico de atividade (10630 U L⁻¹) também ocorreu no 35º dia. Na concentração de ureia de 2 g L⁻¹ o pico ocorreu no 40º dia e foi de 25670 U L⁻¹, valor 18% menor que a atividade máxima na ausência de ureia (35º dia). Com 4 ou 6 g L⁻¹ de ureia a atividade máxima foi de, em média, 23100 U L⁻¹ no 40º dia. Dessa forma, nas etapas experimentais subsequentes *A. subrufescens* U7-1 foi cultivado em meio com adição de ureia 2 g L⁻¹ e *A. subrufescens* U7-3 foi cultivado sem ureia.

Figura 2. Atividade de lacase (média \pm desvio padrão) de *Agaricus subrufescens* U7-3 crescido em meio líquido contendo glicose (10 g L^{-1}) como fonte de carbono e suplementado com diferentes concentrações de ureia ao longo de 45 dias de cultivo.

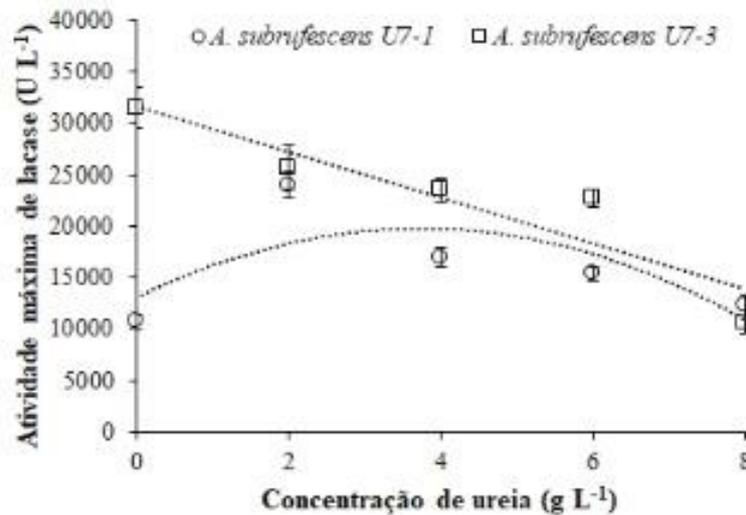


Fonte: Autores.

A produção de lacase por fungos tem sido descrita como altamente dependente das condições de cultivo, variando de acordo com a fonte e concentração de nitrogênio e carbono, cultivo estático ou agitado e com a presença de indutores (Martani et al., 2017). O efeito da concentração de nitrogênio na produção desta enzima também varia de acordo com a espécie e cepa avaliada (Giardina et al., 2010). Ullrich et al. (2005), em cultivo submerso de *A. subrufescens* com suco de tomate relataram a produção de 5000 U L^{-1} de lacase, atividade 4,8 vezes menor que a observada neste estudo para *A. subrufescens* U7-1 com 2 g L^{-1} de ureia; e 6,3 vezes menor que a de *A. subrufescens* U7-3 na ausência de ureia. Valle et al. (2015), por outro lado, reportaram níveis maiores de atividade de lacase (45000 U L^{-1}) quando outra linhagem de *A. subrufescens* (U2-4) foi cultivada em meio líquido com 10 g L^{-1} de glicose e 6 g L^{-1} de ureia, maior que as observadas neste estudo para as linhagens U7-1 e U7-3.

Entretanto, também corroborados pelos resultados de Valle et al. (2015), nossos resultados demonstram que menores concentrações de ureia no meio de cultivo favorecem a atividade de lacase de *A. subrufescens* cultivado em meio líquido. Ao compararmos apenas as máximas atividades observadas neste estudo (Figura 3) fica evidente a redução da atividade de lacase com o aumento da concentração de ureia para ambas as linhagens.

Figura 3. Atividade máxima de lacase (média \pm desvio padrão) de *Agaricus subrufescens* U7-1 e *A. subrufescens* U7-3 crescidos em meio líquido contendo glicose (10 g L^{-1}) como fonte de carbono e suplementado com diferentes concentrações de ureia.



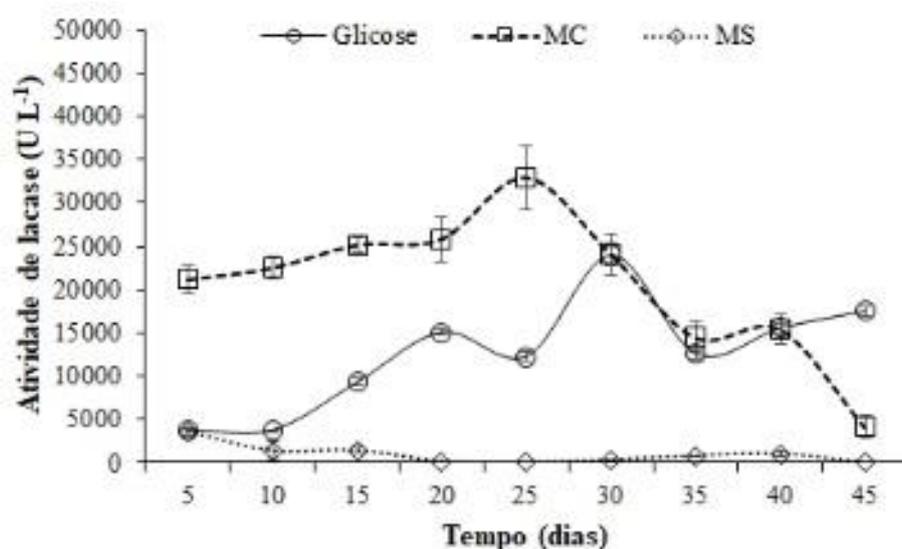
Fonte: Autores.

A atividade de lacase de outras espécies de basidiomicetos também foi maior em condições limitantes de nitrogênio. Eggert et al. (1995), ao avaliarem a influência da concentração de nitrogênio na atividade de lacase de *Pycnoporus cinnabarinus*, observaram maior produção de lacase nas menores concentrações de sulfato de amônio (2,4 mM). Hou et al. (2004), observaram que *Pleurotus ostreatus* crescido em meio contendo ureia produziu mais lacase com menor concentração de nitrogênio ($0,5 \text{ g L}^{-1}$). O aumento da atividade de lacase relacionado a alterações na concentração de nitrogênio pode ser explicado pelo envolvimento direto deste nutriente na expressão gênica da enzima, uma vez que a regulação da expressão gênica de lacase em nível transcricional foi demonstrada (Collins & Dobson, 1997). A presença de sequências conservadas que correspondem a sítios de ligação de proteínas NIT2, envolvidas na regulação do metabolismo de nitrogênio, foram descritas em promotores de genes de lacase (Giardina et al., 2010) sugerindo papel importante do nitrogênio diretamente na regulação da expressão gênica.

As atividades de lacase das linhagens de *A. subrufescens* em meio de cultivo com fontes alternativas de carbono estão nas figuras 4 e 5. Nos meios de cultivo com adição de melaço de soja (MS) a atividade de lacase foi drasticamente reduzida. A atividade média de lacase de *A. subrufescens* U7-1 (Figura 4) na presença de MS foi de apenas 1240 U L^{-1} sendo indetectável em alguns dias do cultivo. Para *A. subrufescens* U7-3 (Figura 5) a atividade média de lacase no meio com MS como fonte de carbono foi de 4620 U L^{-1} . Fabrini et al. (2016) relataram que

a adição de melão de soja, apesar da elevada concentração de açúcares fermentescíveis, não alterou a atividade de lacase de *Pycnoporus sanguineus* resultados que estão de acordo com os observados no presente estudo. Apesar de rico em açúcares, o que para algumas espécies de fungos pode favorecer a atividade de lacase, outros componentes do MS podem afetar negativamente o micélio e a atividade enzimática (Elisashvili et al., 2017).

Figura 4. Atividade de lacase (média \pm desvio padrão) de *Agaricus subrufescens* U7-1 crescido em meio líquido contendo 2 g L⁻¹ de ureia e diferentes fontes de carbono (10 g L⁻¹ de açúcares totais) fornecidas com glicose, melão de cana-de-açúcar (MC) e melão de soja (MS).



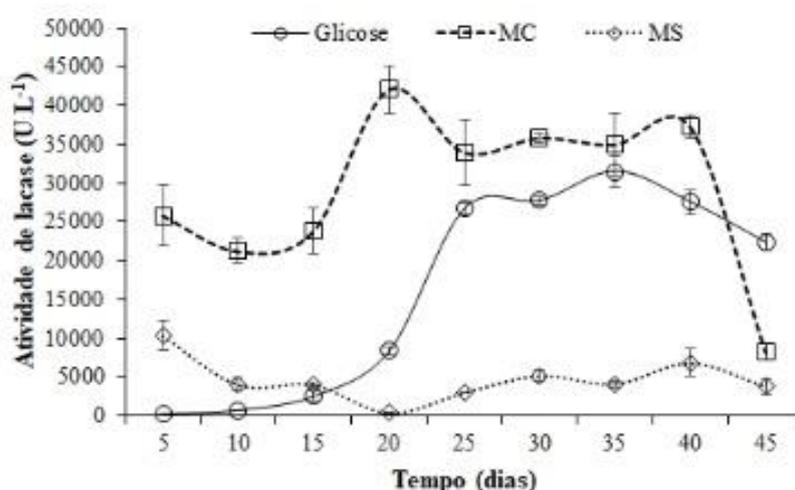
Fonte: Autores.

Dentre as fontes de carbono alternativas avaliadas para substituição da glicose no meio de cultivo, o melão de cana-de-açúcar (MC) aumentou ($p \leq 0,05$) a atividade de lacase de ambas as linhagens. Para *A. subrufescens* U7-1 (Figura 4) a atividade máxima de lacase foi de 34300 U L⁻¹ no meio com MC no 25º dia de cultivo. Atividade enzimática 44% maior que a observada para o controle com glicose. Ademais, o meio com MC antecipou em 5 dias o pico de atividade, do 30º para o 25º dia de cultivo. Para *A. subrufescens* U7-3 (Figura 5) a atividade máxima de lacase foi de 40250 U L⁻¹, 25% maior que a atividade de lacase no meio com glicose.

O meio com MC também antecipou o pico de atividade de *A. subrufescens* U7-3 do 35º para o 20º dia de cultivo. Ao comparar-se a produtividade, relativa ao pico de lacase, das linhagens de *A. subrufescens* nos meios com glicose e MC ficou evidente a maior produção de

lacase pela espécie no meio com a fonte alternativa de carbono. No meio com glicose a produtividade do micélio de *A. subrufescens* U7-1 foi de 800 U dia⁻¹ enquanto no meio com MC a produtividade foi de 1370 U dia⁻¹, um aumento de mais de 71% na produtividade do micélio. Para o micélio de *A. subrufescens* U7-3 a produtividade passou de 900 U dia⁻¹ no meio com glicose para mais de 2000 U dia⁻¹ no meio com MC, mais de 120% de aumento.

Figura 5. Atividade de lacase (média ± desvio padrão) de *Agaricus subrufescens* U7-3 crescido em meio líquido sem adição de ureia e com diferentes fontes de carbono (10 g L⁻¹ de açúcares totais) fornecidas com glicose, melação de cana-de-açúcar (MC) e melação de soja (MS).



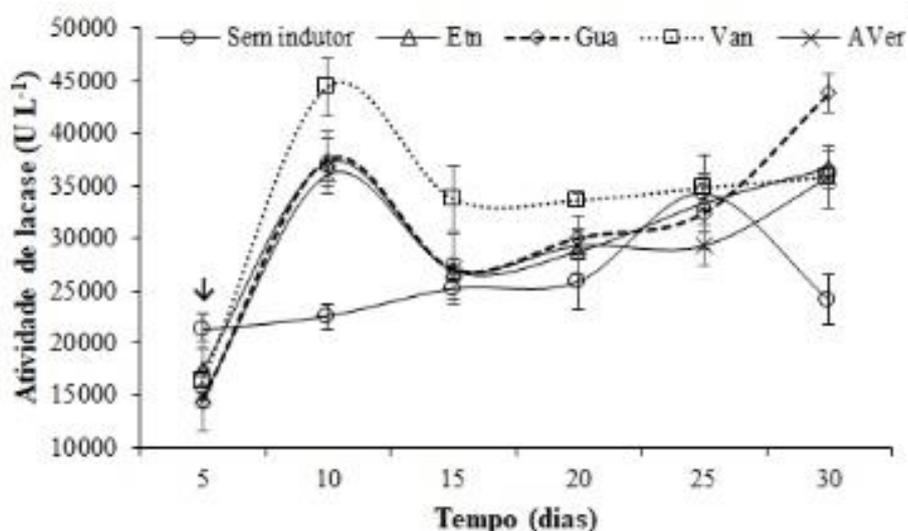
Fonte: Autores.

Valle et al. (2014), analisando a produção de lacase *A. subrufescens* em meio contendo melação de cana-de-açúcar e 2 g L⁻¹ de ureia, relataram pico de atividade de lacase de 9630 U L⁻¹ no 10º dia de cultivo. No presente estudo as atividades de lacase de *A. subrufescens* U7-1 e U7-3 em um meio de cultivo com a mesma composição foram 3,5 e 4,2 vezes maiores, respectivamente. Tais resultados indicam a variabilidade de respostas das diferentes cepas da mesma espécie às condições do meio de cultivo. Além disso, o MC é uma fonte de carbono complexa cuja composição reflete as características sazonais da produção de cana-de-açúcar, bem como as peculiaridades do processo industrial de produção de açúcar (Arakaki et al., 2011) o que pode interferir na concentração e tipos de açúcares fermentescíveis do melação e sua disponibilidade para o fungo (Elisashvili et al., 2008). Usualmente os açúcares presentes no MC em maior concentração são a sacarose e a glicose e essa combinação aliada aos demais componentes do melação como minerais, aminoácidos e vitaminas (Feltrin et al., 2000) afetou

positivamente a atividade de lacase. Como os picos de atividade foram antecipados pelo MC, na etapa experimental subsequente os cultivos foram conduzidos por 30 dias e a fonte de carbono utilizada foi o MC.

A adição de indutores ao meio de cultivo a base de MC contendo ureia ou não, afetou o perfil de produção de lacase ao longo do tempo das duas cepas de *A. subrufescens* (Figuras 6 e 7). Todos os indutores promoveram um rápido aumento da atividade de lacase de *A. subrufescens* o que não ocorreu no meio sem a adição destes compostos. Para *A. subrufescens* U7-1 (Figura 6) o efeito mais significativo ($p \leq 0,05$) foi observado cinco dias após a adição do composto fenólico vanilina ao meio de cultivo. A vanilina promoveu um aumento de 29% na atividade máxima de lacase (44380 U L^{-1}) e antecipou o pico de atividade do 25º para o 10º dia de cultivo. Esta antecipação na produção enzimática representou um salto de produtividade do micélio de 1370 U dia^{-1} para 4438 U dia^{-1} . A atividade enzimática na presença de etanol e álcool veratrílico não diferiu ($p > 0,05$) da atividade máxima no meio sem indutor, contudo, a antecipação do pico para o 10º dia elevou a produtividade para 3670 U dia^{-1} . O guaiacol, por outro lado, atrasou o pico de atividade para o 30º dia, mas a atividade de lacase alcançou 43840 U L^{-1} . Mesmo apresentando um pico mais tardio, a produtividade do micélio no meio com guaiacol (1460 U dia^{-1}) foi maior do que no meio sem indutor.

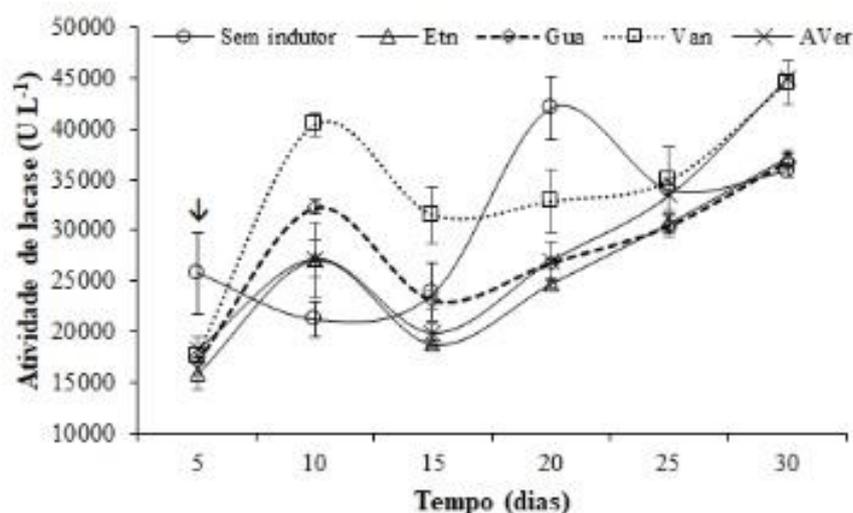
Figura 6. Atividade de lacase (média \pm desvio padrão) de *Agaricus subrufescens* U7-1 crescido em meio líquido contendo 2 g L^{-1} de ureia e melão de cana-de-açúcar (10 g L^{-1} de açúcares totais), suplementado com 1 mM de diferentes compostos químicos: etanol (Etn), guaiacol (Gua), vanilina (Van) e álcool veratrílico (AVer). A seta indica o momento em que os compostos foram adicionados ao meio de cultivo.



Fonte: Autores.

Os indutores também afetaram a atividade de lacase de *A. subrufescens* U7-3 (Figura 7). A vanilina e o álcool veratrílico promoveram a maior atividade de lacase (44770 U L^{-1}), mas atrasaram o pico de atividade em 10 dias comparado o meio sem indutor. Entretanto, é importante destacar que no meio com vanilina a atividade de lacase no 10º dia (40400 U L^{-1}) foi similar ($p > 0,05$) à atividade máxima no meio sem indutor (40250 U L^{-1}) que ocorreu no 20º dia, implicando em um aumento de 100% na produtividade. O etanol e o guaiacol também atrasaram o pico de atividade para o 30º dia.

Figura 7. Atividade de lacase (média \pm desvio padrão) de *A. subrufescens* U7-3 crescido em meio líquido melão de cana-de-açúcar (10 g L^{-1} de açúcares totais), suplementado com 1 mM de diferentes compostos químicos: etanol (Etn), guaiacol (Gua), vanilina (Van) e álcool veratrílico (AVer). A seta indica o momento em que os compostos foram adicionados ao meio de cultivo.



Fonte: Autores.

Nossos resultados revelaram, portanto, que diferentes cepas de *A. subrufescens* apresentam lacases induzíveis pela presença de compostos fenólicos como a vanilina. A indução de lacase por tais compostos e outras classes químicas é conhecida. Valle et al. (2015) relataram a indução e lacase de *A. subrufescens* por vanilina, guaiacol, etanol e álcool veratrílico, porém, a atividade de lacase foi menor do que a observada no presente estudo. Para *A. subrufescens* U2-4, por exemplo, Valle et al. (2015) relataram 27300 U L^{-1} de atividade de lacase induzida por vanilina, valor 1,6 vezes menor que o observado para *A. subrufescens* U7-1 e U7-3 no mesmo intervalo de tempo. Os resultados do presente estudo e os de Valle et al. (2015) indicam que a resposta de *A. subrufescens* a indutores químicos é

fortemente dependente da linhagem avaliada. O uso de compostos fenólicos para indução de lacase de várias outras espécies de basidiomicetos já foi relatada como para *Lentinus strigosus* em meio com guaiacol (Myasoedova et al., 2008), *Ganoderma lucidum* em meio com pirogalol (Elisashvili et al., 2009) e *Lentinus crinitus* em meio com guaiacol, xilidina e álcool veratrílico (Santana et al., 2018).

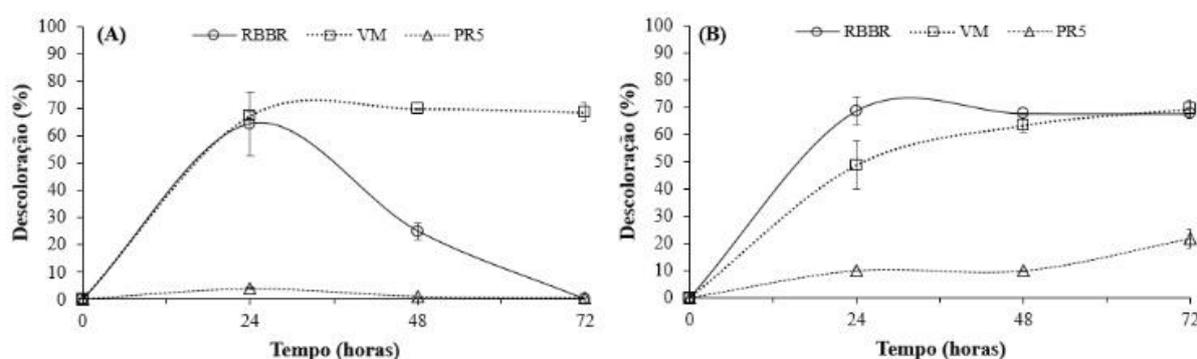
Compostos químicos fenólicos ou álcoois quando incorporados ao meio de cultivo podem ser tóxicos ao micélio provocando um estado de estresse oxidativo que afeta diretamente a transcrição de genes de lacase (Palmieri et al., 2000). Genes que codificam lacases e outras ligninases de fungos são diferencialmente regulados em resposta a compostos fenólicos (Piscitelli et al., 2011). A presença destes compostos afeta a transcrição gênica graças à presença de sequências conservadas presentes na região promotora dos genes denominadas elementos responsivos à xenobióticos (XRE) (Almeida et al., 2018). Por interação indireta com XRE, compostos indutores aumentam a transcrição de genes de lacase (Giardina et al., 2010; Elisashvili et al., 2009).

A capacidade do extrato enzimático de *A. subrufescens* descolorir corantes têxteis foi avaliada utilizando-se os extratos de *A. subrufescens* U7-1 e U7-3 contendo lacase induzida por vanilina no 10º dia de cultivo. As reações de descoloração foram preparadas sem a presença de peróxido de hidrogênio, minimizando a ação de peroxidases. Todos os corantes foram descoloridos parcialmente pelo extrato enzimático de *A. subrufescens* e os resultados da descoloração ao longo de 72 horas estão na figura 8. Em 24 horas os extratos de *A. subrufescens* U7-1 e U7-3 promoveram 65% e 70%, respectivamente, de descoloração do RBBR. Para *A. subrufescens* U7-3 não houve redução adicional da cor até 72 horas (Figura 8B), contudo, para *A. subrufescens* U7-1, a mudança da cor da reação levou a uma aparente diminuição do percentual de descoloração do RBBR (Figura 8A). Tal fato ocorre quando a descoloração do RBBR é avaliada por espectrofotometria, pois produtos intermediários da biodegradação do RBBR por lacase absorvem luz no mesmo comprimento de onda do corante íntegro e elevam a absorvância da reação de descoloração (Eichlerová et al., 2007). Vale destacar, porém, que o acúmulo destes intermediários químicos e a elevação da absorvância são indicativos da atuação efetiva de lacase sobre a estrutura do RBBR (Pype et al., 2019). As diferenças na descoloração do RBBR das cepas de *A. subrufescens* observadas neste estudo sugerem que as linhagens produziram lacases com mecanismos de ação diferentes durante o cultivo e indução por vanilina, o que pode ser explicado pela expressão de isoenzimas distintas. Xiao et al. (2004), relataram que a suplementação do meio com o composto vanilina induziu a expressão de uma isoenzima de *Trametes* sp. que não fora expressa na ausência

deste indutor. Em fungos, a produção de isoenzimas é comum e genes de lacase se organizam em famílias com vários genes (Yan et al., 2019).

O corante triarilmetano VM foi descolorido mais rapidamente por *A. subrufescens* U7-1 do que por *A. subrufescens* U7-3 (Figura 8). *A. subrufescens* U7-1 reduziu a cor do VM em 70% após 24 h e *A. subrufescens* U7-3 só promoveu 70% de descoloração após 72 h. O extrato enzimático de *A. subrufescens* foi pouco eficiente em descolorir o corante azo PR5 e a máxima descoloração observada ocorreu com *A. subrufescens* U7-3 com 22% de redução da cor em 72 h. Santos et al. (2004), relataram o cultivo de *A. subrufescens* em meio líquido suplementado com o corante reativo azul-BF-R (0,5 g L⁻¹), porém não detectaram descoloração significativa (< 8%). Portanto, até o momento, os resultados deste estudo são os primeiros a demonstrar a capacidade da lacase de *A. subrufescens* cultivado em meio líquido descolorir corantes têxteis.

Figura 8. Descoloração (média ± desvio padrão) dos corantes remazol azul brilhante R (RBBR), verde malaquita (VM) e preto reativo 5 (PR5) pelo extrato enzimático de *A. subrufescens* U7-1 (A) e *A. subrufescens* U7-3 (B) obtido no pico de atividade máxima de lacase induzida por vanilina.



Fonte: Autores.

Variações na eficiência de degradação de diferentes classes químicas de corantes podem ocorrer por fatores como características da enzima e complexidade da estrutura molecular dos corantes (Chatha et al., 2017). A presença de resíduos de aminoácidos específicos nos sítios ativos da lacase podem afetar a interação enzima-substrato e o potencial redox da enzima, provocando diferenças na descoloração (Glazunova et al., 2018). Adicionalmente, diferenças no potencial redox entre a lacase e diferentes substratos determinam a taxa de oxidação do substrato. Lacases possuem quatro átomos de cobre em três sítios de ligação sendo o cobre do sítio T1, o acceptor primário de elétrons cuja redução é etapa limitante do processo catalítico

(Morozova et al., 2007). Portanto, lacases somente oxidam compostos com potencial redox menor do que o potencial redox do cobre T1 o que pode limitar a eficiência de descoloração (Giardina et al., 2010). Corantes possuem estruturas complexas e o tipo de interação com o sítio ativo da enzima pode determinar a taxa de descoloração. Corantes que formam número maior de ligações de hidrogênio com o sítio catalítico de lacases são mais eficientemente descoloridos (Hsu et al., 2012; Glazunova et al., 2018), contudo a possibilidade de interações adicionais do tipo π - π e van der Waals entre corante e enzima podem favorecer a descoloração (Morales-Álvarez et al., 2017). A afinidade da lacase de *A. subrufescens* por corantes ainda não foi determinada, mas sabe-se que a afinidade de lacases diferentes pelos mesmos substratos pode variar bastante (Nakade et al., 2010).

Agaricus subrufescens representa uma fonte de recursos biotecnológicos e, apesar do número limitado de corantes analisados e da avaliação preliminar da descoloração, pode produzir enzimas para biorremediação de efluentes coloridos.

4. Conclusões

As menores concentrações de ureia favorecem a atividade de lacase de *Agaricus subrufescens*. A substituição da fonte de carbono no meio de cultivo por melaço de cana-de-açúcar produz grande atividade de lacase e antecipa o pico e atividade enzimática. A suplementação do meio de cultivo com compostos químicos aumenta a atividade de lacase e antecipa o pico de atividade. A maior atividade de lacase de *A. subrufescens* U7-1 (44380 U L⁻¹ no 10º dia) ocorre em meio com 2 g L⁻¹ de ureia, melaço de cana (10 g L⁻¹ de açúcares) e 1 mM de vanilina. A maior atividade de lacase de *A. subrufescens* U7-3 (44770 U L⁻¹ no 30º dia) ocorre em meio sem ureia, com melaço de cana (10 g L⁻¹ de açúcares) e 1 mM de vanilina. Os extratos enzimáticos de *A. subrufescens* U7-1 e U7-3 produzidos no 10º dia de cultivo promovem a descoloração do RBBR em 24 horas (65% e 75%, respectivamente) e do VM (70% em 24 horas e 72 horas, respectivamente), mas não reduzem a cor do PR5 de forma significativa. A lacase de *A. subrufescens* produzida em meio de baixo custo é uma alternativa para a descoloração de corantes. Contudo, novos estudos são necessários para a purificação da lacase e avaliação de seu potencial para a descoloração de outros corantes.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade Paranaense, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Aplicada à Agricultura, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – código financeiro 001), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 307953/2017-3) e Fundação Araucária pelo apoio financeiro e bolsas.

Referências

Al Loman, A., & Ju, L. K. (2016). Soybean carbohydrate as fermentation feedstock for production of biofuels and value-added chemicals. *Process Biochemistry*, 51(8), 1046-1057.

Almeida, P. H., Oliveira, A. C. C., Souza, G. P. D., Friedrich, J. C., Linde, G. A., Colauto, N. B., & Valle, J. S. (2018). Decolorization of remazol brilliant blue R with laccase from *Leptinus crinitus* grown in agro-industrial by-products. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90(4), 3463-3473.

Aragão, M. S., Menezes, D. B., Ramos, L. C., Oliveira, H. S., Bharagava, R. N., Ferreira, L. F. R., Teixeira, J.A., Ruzene, D.S., & Silva, D. P. (2020). Mycoremediation of vinasse by surface response methodology and preliminary studies in air-lift bioreactors. *Chemosphere*, 244, 125432.

Arakaki, A. H., Souza Vandenberghe, L. P. D., Soccol, V. T., Masaki, R., Rosa Filho, E. F. D., Gregório, A., & Soccol, C. R. (2011). Optimization of biomass production with copper bioaccumulation by yeasts in submerged fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(5), 1027-1034.

Bertéli, M. B. D., Umeo, S. H., Bertéli, A., Valle, J. S., Linde, G. A., & Colauto, N. B. (2014). Mycelial antineoplastic activity of *Agaricus blazei*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(8), 2307-2313.

- Bertéli, M. B., Lopes, A. D., Colla, I. M., Linde, G. A., & Colauto, N. B. (2016). *Agaricus subrufescens*: substratum nitrogen concentration and mycelial extraction method on antitumor activity. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 88(4), 2239-2246.
- Chatha, S. A. S., Asgher, M., & Iqbal, H. M. (2017). Enzyme-based solutions for textile processing and dye contaminant biodegradation—a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(16), 14005-14018.
- Cheng, C., Zhou, Y., Lin, M., Wei, P., & Yang, S. T. (2017). Polymalic acid fermentation by *Aureobasidium pullulans* for malic acid production from soybean hull and soy molasses: fermentation kinetics and economic analysis. *Bioresource Technology*, 223, 166-174.
- Colauto, N.B., Silveira, A.R., Eira, A.F., & Linde, G.A. (2010). Alternative to peat for *Agaricus brasiliensis* yield. *Bioresource Technology*, 101(2), 712-716.
- Collins, P. J., & Dobson, A. (1997). Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(9), 3444-3450.
- CONAB, 2020. - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Levantamento da safra de cana-de-açúcar (área plantada, produtividade e produção). Disponível em <http://www.conab.gov.br> (Acesso em 05 dez. 2020).
- Costa, M. C. D., Regina, M., Cilião Filho, M., Linde, G. A., Do Valle, J. S., Paccola-Meirelles, L. D., & Colauto, N. B. (2015). Photoprotective and antimutagenic activity of *Agaricus subrufescens* basidiocarp extracts. *Current Microbiology*, 71(4), 476-482.
- D'Agostini, É. C., Mantovani, T. R. D. A., Valle, J. S. D., Paccola-Meirelles, L. D., Colauto, N. B., & Linde, G. A. (2011). Low carbon/nitrogen ratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation. *Scientia Agricola*, 68(3), 295-300.
- Eggert, C., Temp, U., Dean, J. F., & Eriksson, K. E. L. (1995). Laccase-mediated formation of the phenoxazinone derivative, cinnabarinic acid. *FEBS letters*, 376(3), 202-206.
- Eichlerová, I., Homolka, L., Benada, O., Kofroňová, O., Hubálek, T., & Nerud, F. (2007).

Decolorization of orange G and Remazol Brilliant Blue R by the white rot fungus *Dichomitus squalens*: Toxicological evaluation and morphological study. *Chemosphere*, 69(5), 795-802.

Elisashvili, V., & Kachlishvili, E. (2009). Physiological regulation of laccase and manganese peroxidase production by white-rot Basidiomycetes. *Journal of Biotechnology*, 144(1), 37-42.

Elisashvili, V., Kachlishvili, E., & Asatiani, M. D. (2018). Efficient production of lignin-modifying enzymes and phenolics removal in submerged fermentation of olive mill by-products by white-rot basidiomycetes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 134, 39-47.

Elisashvili, V., Kachlishvili, E., & Penninckx, M. (2008). Effect of growth substrate, method of fermentation, and nitrogen source on lignocellulose-degrading enzymes production by white-rot basidiomycetes. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35(11), 1531-1538.

Elisashvili, V., Kachlishvili, E., Asatiani, M. D., Darlington, R., & Kucharzyk, K. H. (2017). Physiological peculiarities of lignin-modifying enzyme production by the white-rot basidiomycete *Coriopsis gallica* strain BCC 142. *Microorganisms*, 5(4), 73.

Fabrini, F. F., Avelino, K. V., Marim, R. A., Cardoso, B. K., Colauto, G. A. L., Colauto, N. B., & do Valle, J. S. (2016). Produção de lacase de *Pycnoporus sanguineus* em meio de cultivo à base de melação soja. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, 19(3), 159-164.

Feltrin, V. P., Sant'Anna, E. S., Porto, A. C. S., & Torres, R. C. O. (2000). *Lactobacillus plantarum* production with sugarcane molasses. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 43(1), 119-124.

Fernández-López, C. L., Torrestiana-Sánchez, B., Salgado-Cervantes, M. A., García, P. M., & Aguilar-Uscanga, M. G. (2012). Use of sugarcane molasses “B” as an alternative for ethanol production with wild-type yeast *Saccharomyces cerevisiae* ITV-01 at high sugar concentrations. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35(4), 605-614.

Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S., & Sannia, G. (2010). Laccases: a never-ending story. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(3), 369-385.

Glazunova, O. A., Trushkin, N. A., Moiseenko, K. V., Filimonov, I. S., & Fedorova, T. V. (2018). Catalytic efficiency of basidiomycete laccases: redox potential versus substrate-binding pocket structure. *Catalysts*, 8(4), 152.

Hou, H., Zhou, J., Wang, J., Du, C., & Yan, B. (2004). Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochemistry*, 39(11), 1415-1419.

Hsu, C. A., Wen, T. N., Su, Y. C., Jiang, Z. B., Chen, C. W., & Shyur, L. F. (2012). Biological degradation of anthraquinone and azo dyes by a novel laccase from *Lentinus* sp. *Environmental Science & Technology*, 46(9), 5109-5117.

Largeteau, M. L., Llarena-Hernández, R. C., Regnault-Roger, C., & Savoie, J. M. (2011). The medicinal *Agaricus* mushroom cultivated in Brazil: biology, cultivation and non-medicinal valorisation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(5), 897-907.

Marim, R. A., Oliveira, A. C. C., Marquezoni, R. S., Servantes, J. P. R., Cardoso, B. K., Linde, G. A., Colauto, N.B., & Valle, J. S. (2016). Use of sugarcane molasses by *Pycnoporus sanguineus* for the production of laccase for dye decolorization. *Genetics and Molecular Research*, 15, gmr15048972.

Martani, F., Beltrametti, F., Porro, D., Branduardi, P., & Lotti, M. (2017). The importance of fermentative conditions for the biotechnological production of lignin modifying enzymes from white-rot fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 364(13), fnx134.

Martínková, L., Kotik, M., Marková, E., & Homolka, L. (2016). Biodegradation of phenolic compounds by Basidiomycota and its phenol oxidases: a review. *Chemosphere*, 149, 373-382.

Meniqueti, A. B., Ruiz, S. P., Faria, M. G. I., do Valle, J. S., Gonçalves Jr, A. C., Dragunski, D. C., Colauto, N.B., & Linde, G. A. (2020). Iron-enriched mycelia of edible and medicinal basidiomycetes. *Environmental Technology*, 29, 1-7.

Mikiashvili, N., Wasser, S. P., Nevo, E., & Elisashvili, V. (2006). Effects of carbon and nitrogen sources on *Pleurotus ostreatus* ligninolytic enzyme activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(9), 999-1002.

Morales-Álvarez, E. D., Rivera-Hoyos, C. M., Poveda-Cuevas, S. A., Reyes-Guzmán, E. A., Pedroza-Rodríguez, A. M., Reyes-Montaña, E. A., & Poutou-Piñales, R. A. (2018). Malachite green and crystal violet decolorization by *Ganoderma lucidum* and *Pleurotus ostreatus* supernatant and by rGLCC1 and rPOXA 1B concentrates: molecular docking analysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 184(3), 794-805.

Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Shleev, S. V., & Yaropolov, Y. I. (2007). Laccase-mediator systems and their applications: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 43(5), 523-535.

Morsy, S. A. G. Z., Ahmad Tajudin, A., Ali, M., Mohamad, S., & Shariff, F. M. (2020). Current development in decolorization of synthetic dyes by immobilized laccases. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2350.

Myasoedova, N. M., Chernykh, A. M., Psurtseva, N. V., Belova, N. V., & Golovleva, L. A. (2008). New efficient producers of fungal laccases. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44(1), 73-77.

Nakade, K., Nakagawa, Y., Yano, A., Sato, T., & Sakamoto, Y. (2010). Characterization of an extracellular laccase, PbLac1, purified from *Polyporus brumalis*. *Fungal Biology*, 114(8), 609-618.

Oliveira, J. M., Michelon, M., & Burkert, C. A. V. (2020). Biotechnological potential of soybean molasses for the production of extracellular polymers by diazotrophic bacteria. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 101609.

Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B., & Sannia, G. (2000). Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(3), 920-924.

Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Parreira, F. B., & Shitsuka, R. (2018). *Metodologia da pesquisa científica* [recurso eletrônico[eBook]]. Santa Maria. Ed. UAB/NTE/UFSM. Recuperado de https://repositorio.ufsm.br/bitstream/handle/1/15824/Lic_Computacao_MetodologiaPesquisa-Cientifica.pdf?sequence=1.

Piscitelli, A., Giardina, P., Lettera, V., Pezzella, C., Sannia, G., & Faraco, V. (2011). Induction and transcriptional regulation of laccases in fungi. *Current Genomics*, 12(2), 104-112.

Pype, R., Flahaut, S., & Debaste, F. (2019). On the importance of mechanisms analysis in the degradation of micropollutants by laccases: The case of Remazol Brilliant Blue R. *Environmental Technology & Innovation*, 14, 100324.

Rodrigues, E. M., Karp, S. G., Malucelli, L. C., Helm, C. V., & Alvarez, T. M. (2019). Evaluation of laccase production by *Ganoderma lucidum* in submerged and solid-state fermentation using different inducers. *Journal of Basic Microbiology*, 59(8), 784-791.

Rodriguez-Couto, S. (2013). Treatment of textile wastewater by white-rot fungi: still a far away reality. *Textiles and Light Industrial Science and Technology*, 2(3), 113-119.

Romão, B. B., da Silva, F. B., de Resende, M. M., & Cardoso, V. L. (2012). Ethanol production from hydrolyzed soybean molasses. *Energy & Fuels*, 26(4), 2310-2316.

Rubel, R., Dalla Santa, H. S., Dos Santos, L. F., Fernandes, L. C., Figueiredo, B. C., & Soccol, C. R. (2018). Immunomodulatory and antitumoral properties of *Ganoderma lucidum* and *Agaricus brasiliensis* (Agaricomycetes) medicinal mushrooms. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 20(4), 393-403.

Santana, T. T., Linde, G. A., Colauto, N. B., & do Valle, J. S. (2018). Metallic-aromatic compounds synergistically induce *Lentinus crinitus* laccase production. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 625-630.

Santos, A. Z., Cândido Neto, J. M., Granhen Tavares, C. R., & Gomes da Costa, S. M. (2004). Screening of filamentous fungi for the decolorization of a commercial reactive dye. *Journal of Basic Microbiology*, 44(4), 288-295.

Scheid, S. S., Faria, M. G. I., Velasquez, L. G., do Valle, J. S., Gonçalves, A. C., Dragunski, D. C., Colauto, N.B., & Linde, G. A. (2020). Iron biofortification and availability in the mycelial biomass of edible and medicinal basidiomycetes cultivated in sugarcane molasses. *Scientific reports*, 10(1), 1-6.

Sen, S. K., Raut, S., Bandyopadhyay, P., & Raut, S. (2016). Fungal decolouration and degradation of azo dyes: a review. *Fungal Biology Reviews*, 30(3), 112-133.

Siqueira, P. F., Karp, S. G., Carvalho, J. C., Sturm, W., Rodríguez-León, J. A., Tholozan, J. L., Singhanía, R.R., Pandey, A., & Soccol, C. R. (2008). Production of bio-ethanol from soybean molasses by *Saccharomyces cerevisiae* at laboratory, pilot and industrial scales. *Bioresource Technology*, 99(17), 8156-8163.

Songulashvili, G., Spindler, D., Jimenez-Tobon, G. A., Jaspers, C., Kerns, G., & Penninckx, M. J. (2015). Production of a high level of laccase by submerged fermentation at 120-L scale of *Cerrena unicolor* C-139 grown on wheat bran. *Comptes Rendus Biologies*, 338(2), 121-125.

Ullrich, R., Dung, N. L., & Hofrichter, M. (2005). Laccase from the medicinal mushroom *Agaricus blazei*: production, purification and characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(3), 357-363.

Umeo, S. H., Faria, M. G. I., Vilande, S. S. S., Dragunski, D. C., do Valle, J. S., Colauto, N. B., & Linde, G. A. (2019). Iron and zinc mycelial bioaccumulation in *Agaricus subrufescens* strains. *Semina: Ciências Agrárias*, 40(6), 2513-2522.

Umeo, S. H., Souza, G. P. N., Rapachi, P. M., Garcia, D. M., Paccola-Meirelles, L. D., Valle, J. S., Colauto, N.B., & Linde, G. A. (2015). Screening of basidiomycetes in submerged cultivation based on antioxidant activity. *Genetics and Molecular Research*, 14(3), 9907-9914.

Upadhyay, P., Shrivastava, R., & Agrawal, P. K. (2016). Bioprospecting and biotechnological applications of fungal laccase. *3 Biotech*, 6(1), 15.

Valle, J. S., Vandenberghe, L. P. S., Santana, T. T., Linde, G. A., Colauto, N. B., & Soccol, C. R. (2014). Optimization of *Agaricus blazei* laccase production by submerged cultivation with sugarcane molasses. *African Journal of Microbiology Research*, 8(9), 939-946.

Valle, J. S., Vandenberghe, L. P. S., Oliveira, A. C. C., Tavares, M. F., Linde, G. A., Colauto, N. B., & Soccol, C. R. (2015). Effect of different compounds on the induction of laccase production by *Agaricus blazei*. *Genetics and Molecular Research*, 14(4), 15882-15891.

Vijayalaxmi, S., Jayalakshmi, S. K., & Sreeramulu, K. (2015). Polyphenols from different agricultural residues: extraction, identification and their antioxidant properties. *Journal of Food Science and Technology*, 52(5), 2761-2769.

Vikrant, K., Giri, B. S., Raza, N., Roy, K., Kim, K. H., Rai, B. N., & Singh, R. S. (2018). Recent advancements in bioremediation of dye: current status and challenges. *Bioresource Technology*, 253, 355-367.

Wisitrassameewong, K., Karunarathna, S. C., Thongklang, N., Zhao, R., Callac, P., Moukha, S., Férandon, C., Chukeatirote, E., & Hyde, K. D. (2012). *Agaricus subrufescens*: a review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(2), 131-146.

Wu, J., Choi, J., Asiegbu, F. O., & Lee, Y. H. (2020). Comparative genomics platform and phylogenetic analysis of fungal laccases and multi-copper oxidases. *Mycobiology*, 48(5), 373-382.

Xiao, Y. Z., Chen, Q., Hang, J., Shi, Y. Y., Xiao, Y. Z., Wu, J., Hong, Y.Z., & Wang, Y. P. (2004). Selective induction, purification and characterization of a laccase isozyme from the basidiomycete *Trametes* sp. AH28-2. *Mycologia*, 96(1), 26-35.

Yan, L., Xu, R., Bian, Y., Li, H., & Zhou, Y. (2019). Expression Profile of laccase gene family in white-rot basidiomycete *Lentinula edodes* under different environmental

stresses. *Genes*, 10(12), 1045.

Yang, Y., Wei, F., Zhuo, R., Fan, F., Liu, H., Zhang, C., Ma, L., Jiang, M., & Zhang, X. (2013). Enhancing the laccase production and laccase gene expression in the white-rot fungus *Trametes velutina* 5930 with great potential for biotechnological applications by different metal ions and aromatic compounds. *PLoS One*, 8(11), e79307.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Genyfer Poline Neri de Souza - 25%

Marisangela Isabel Wietzikoski Halabura - 10%

Katielle Vieira Avelino - 10%

Marcella Ribeiro da Costa - 5%

Thiago Teodoro Santana - 5%

Renan Alberto Marim - 5%

Adma Soraia Serea Kassem - 5%

Maria Graciela Iecher Faria Nunes - 5%

Giani Andrea Linde Colauto - 5%

Nelson Barros Colauto - 5%

Juliana Silveira do Valle - 20%