

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 24/07/2019.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**BUSCA DE BIOMOLÉCULAS COM POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO EM DATABASE METAGENÔMICO
POR *SEQUENCE-DRIVEN***

Natália Sarmanho Monteiro Lima
Engenheira Agrônoma

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**BUSCA DE BIOMOLÉCULAS COM POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO EM DATABASE METAGENÔMICO
POR *SEQUENCE-DRIVEN***

**Natália Sarmanho Monteiro Lima
Orientadora: Prof^a. Dra. Eliana G. de Macedo Lemos
Coorientadoras: Dra. Elisângela Soares Gomes Pepe
Dra. Mariana Rangel Pereira**

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para obtenção do título de
Mestre em Microbiologia Agropecuária**

2017

L732b Lima, Natália Sarmanho Monteiro
Busca de biomoléculas com potencial biotecnológico em database metagenômico por *sequence-driven* / Natália Sarmanho Monteiro
Lima. -- Jaboticabal, 2017

x, 69 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017

Orientadora: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Banca examinadora: João Martins Pizauro Júnior, Gustavo Orlando
Bonilla Rodriguez

Bibliografia

1.SLAC. 2. Lacase. 3. Metagenômica. 4. Corantes I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 579.22:579.25

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVACAO

TITULO DA DISSERTACAO: BUSCA DE BIOMOLECULAS COM POTENCIAL BIOTECNOLOGICO EM DATABASE METAGENOMICO POR *sequence-driven*

AUTORA: NATALIA SARMANHO MONTEIRO LIMA

ORIENTADORA: ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS

COORIENTADORA: MARIANA RANGEL PEREIRA

COORIENTADORA: ELISANGELA SOARES GOMES

Aprovada como parte das exigencias para obtencao do Titulo de Mestre em MICROBIOLOGIA AGROPECUARIA, pela Comissao Examinadora:



Profa. Ora. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS
Departamento de Engenharia de Alimentos / CAV / UNESP- Jaboticabal

Prof. Dr. GUILLERMO DO BONILLA RODRIGUEZ
Departamento de Quimica e Ciencias Ambientais / Instituto de Biociencias, Letras e Ciencias Exatas / Sao Jose do Rio Preto/SP



Prof. Dr. JOÃO MARTINS PIZAU JUNIOR
Departamento de Tecnologia / UNESP / FCAV- Jaboticabal

Jaboticabal, 24 de julho de 2017

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Natália Sarmanho Monteiro Lima – Nascida em 19 de dezembro de 1991, em Parnaíba, Piauí. Iniciou sua graduação em março de 2010 no curso de Agronomia pela Universidade Federal do Amazonas (UFAM), na cidade de Manaus, AM, concluindo em Julho de 2015. Em agosto de 2015 ingressou no curso de Mestrado em Microbiologia Agropecuária, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – FCAV/UNESP, na cidade de Jaboticabal sob a orientação da Prof^a. Dra. Eliana G. de Macedo Lemos.

[...] claro que quando chegar ao fim do meu passeio saberei mais, mas também é certo que saberei menos, precisamente por mais saber, por outras palavras, a ver se me explico, a consciência de saber mais conduz-me à consciência de saber pouco, aliás, apetece perguntar, que é saber...

José Saramago

DEDICATÓRIA

Dedico primeiramente a **Deus!** Gratidão sempre!

Aos meus pais, vocês são as pessoas que mais amo nesse mundo. Meus maiores exemplos, meus melhores amigos e meus amores. Agradeço imensamente o incentivo, esforço e apoio, sem vocês isso não teria o menor sentido. Essa é a realização de um sonho que sonhei com vocês.

Mainha/Mãezinha, à senhora todo meu amor, pois nós duas sabemos que o caminho não foi fácil.

Pai/Papai, o senhor é meu maior exemplo de honestidade e trabalho e tenha toda certeza que foi de tanto te admirar que escolhi esse caminho. Te amo!

Aos meus irmãos **Mariana, Emiliano e Otávio**, apesar da distância meu amor por vocês é gigantesco. Essa conquista também é de vocês.

As famílias **de Oliveira Monteiro** e **Sarmanho da Costa Lima**, os meus mais sinceros agradecimentos pela compreensão nos momentos que estive ausente e pelo amor que sempre recebi de vocês.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Profa. Dra. Eliana Lemos** pela confiança, apoio, exemplo e por ter me recebido com tanto amor e carinho.

Ao programa de **Pós – Graduação em Microbiologia Agropecuária**.

À **CAPES** pela bolsa concedida.

Às minhas coorientadoras **Dra. Elisângela Gomes-Pepe** e **Dra. Mariana Rangel**, por todo apoio e confiança. Aprendi e aprendo muito com vocês duas, são exemplos de profissionais das quais me orgulho muito de ter trabalhado.

Ao **Dr. João Carlos Capanharo**, pela a alegria, amizade e carinho que recebi todos os dias. Com você o trabalho se torna mais divertido.

À **Dra. Camila Cesário**, **Dr. Luciano Kishi** e **Dra. Erica Lopes**, pelas inúmeras conversas, conselhos e conhecimentos repassados.

À **Michelli Funicelli**, **Bárbara Bonfá**, **Tatiane Leonel**, **Joana Desiderato**, **Gabriela Cabral**, **Milena Tavares**, **Bruna Fernanda** e **Pâmela Maldaner** pela companhia diária, dentro e fora do laboratório, o apoio nos momentos de desespero e as diversas risadas compartilhadas.

À toda **equipe do LBMP**, pelo convívio diário, amizade, carinho e troca de conhecimento. Vocês contribuíram muito para o meu crescimento pessoal e profissional.

À **Vanessa Santos**, **Roberta Mendes**, **Luan Adames**, **Stéfane Faria**, **Laiana Bentes** e **Paola Escobar**, pela companhia, os abraços sinceros, apoio e pelas diversas vezes que nos reunimos para chorar e no fim acabávamos rindo (e muito). Vocês foram minha família aqui e guardo cada momento no meu coração.

Ao professor **Dr. João Pizauro** e ao **LEIA** pelo apoio técnico.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para essa jornada o meu muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
ABREVIATURAS	vii
LISTA DE UNIDADES	viii
RESUMO -	ix
ABSTRACT-.....	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. O solo como fonte de metabólitos microbianos.....	4
2.2. Metagenômica	5
2.3. Multicobre oxidases – MCOs	6
2.4. Lacases	9
2.5. Prospecção de genes codificadores de lacases em amostras ambientais e a utilização de novas ferramentas	11
2.6. Atuação das lacases na catalise de compostos contaminantes no meio ambiente	12
3. OBJETIVOS.....	14
3.1. Objetivo geral	14
3.2. Objetivos específicos	15
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
4.1. Prospecção dos genes de interesse	15
4.2. Análise das sequências e Modelagem estrutural por homologia	16
4.3. Amplificação dos genes codificadores de lacase	18
4.4. Ligação dos fragmentos ao vetor de expressão.....	19
4.5. Transformação das células de <i>Escherichia coli</i> BL21.....	20
4.6. Coleta, estoque dos clones e confirmação da clonagem	21
4.7. Ensaio de expressão, super expressão e extração das proteínas recombinantes	21
4.8. Purificação por cromatografia de afinidade a metal	22
4.9. Purificação por exclusão molecular (Filtração em gel)	22
4.10. Análise por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e zimograma	23
4.11. Ligação ao cobre e determinação concentração da proteína recombinante (holoenzima)	23

4.12.	Determinação da atividade de lacase	24
4.13.	Efeito do pH sobre a atividade da enzima	24
4.14.	Determinação do efeito da temperatura sobre a atividade enzimática	24
4.15.	Influência do efeito de detergentes e íons metálicos sobre a atividade enzimática	25
4.16.	Determinação dos parâmetros cinéticos	25
4.17.	Avaliação da estabilidade temporal.....	25
4.18.	Ensaio de descoloração de corantes.....	26
4.19.	Análise estatística	26
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1.	Análise das sequências	26
5.2.	Clonagem das sequências e expressão das proteínas	33
5.2.1.	Amplificação e clonagem das ORFs	33
5.3.	Expressão e purificação enzimática.....	36
5.4.	Caracterização <i>in silico</i> e <i>in vitro</i> para LacMeta.....	40
5.5.	Caracterização enzimática e parâmetros cinéticos.....	44
5.6.	Tempo de estabilidade da atividade enzimática.....	49
5.7.	Descoloração de corantes	50
6.	CONCLUSÕES	52
7.	REFERÊNCIAS.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Bancos de dados e ferramentas úteis para análise <i>in silico</i> de proteínas.....	17
Tabela 2. Características teóricas previstas para as ORFs a partir do ProtParam.	36
Tabela 3. Comparação de kcat, Km e kcat/Km com outras lacases descritas na literatura.....	48
Tabela 4. Efeito de LacMeta na degradação de 7 corantes industriais.	50
Tabela 5. Comparação da eficiência de Lacmeta para degradação de corantes com outras lacases.....	51

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fluxograma dos bancos de dados metagenômicos existentes atualmente no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas, e demonstração da estratégia de prospecção utilizada no presente trabalho.. **3**
- Figura 2.** Arranjo dos sítios de ligação ao cobre encontrado nas “Multicopper oxidases”. O número de resíduos e as distâncias entre átomos são representados em cores (ENGUITA, 2011). **7**
- Figura 3.** Mecanismo da reação de oxidação de compostos fenólicos por lacases. Fonte: (LE ROES-HILL; PRINS, 2016)..... **10**
- Figura 4.** Esquema ilustrativo do vetor utilizado para a expressão das ORFs. **20**
- Figura 5.** Arquitetura de domínios enzimáticos obtido para sequências de diferentes famílias de Lacases caracterizadas e depositadas na base de dados LccED,. Nomes em vermelho correspondem as sequências dos metagenomas. O mapeamento de domínios foi obtido junto ao programa DoMosaics (MOORE et al., 2014)..... **29**
- Figura 6.** Árvore fenéticas entre as lacases dos bancos de dados metagenômicos e sequências depositadas no LccED. Caixas vermelhas - sequências dos bancos de dados metagenômicos. **30**
- Figura 7.** Características estruturais das ORFs metagenômicas. A) Modelo da ORF50MF; B) Modelo ORF51ME e C) Modelo da ORF13SE. As esferas pretas representam os sítios de ligação ao cobre. Os domínios coloridos com a mesma cor são equivalentes. **32**
- Figura 8.** Eletroferograma dos fragmentos de interesse a partir do DNA metagenômico. (M) Marcador tamanho molecular. (1 e 2) ORF51ME e (3 e 4) ORF50MF. **33**
- Figura 9.** Eletroferograma da confirmação de clonagem das ORFs. (M) Marcador de tamanho molecar; (1-5) Confirmação da PCR dos clones da ORF51ME; (6 e 7) Confirmação da PCR dos clones da ORF50MF. **34**
- Figura 10.** Região “upstream” e “downstream” á ORF13SE. Em Vermelho: bases G/C, verde conteúdo A/T; cinza: gene. **35**
- Figura 11.** Eletroforograma em gel de poliacrilamida 12% com SDS (SDS-PAGE) do extrato celular total das bactérias E. coli BL21 transformadas em vetor pHAT2 (orf51me e orf50mF) e pET28-orf13se. Canaletas: (M) Marcador de tamanho molecular (Precision Plus Protein Unstained BioRad), (1) extrato celular (EC) sem indução na temperatura de 30 °C, (2) EC após 1 h de indução com 1 mM de IPTG na temperatura de 30 °C, (3) EC após 2 h de indução na temperatura de 30 °C, (4) EC sem indução na temperatura de 37 °C, (5) EC após 1 h de indução da na

temperatura de 37 °C 1 mM de IPTG e (6) EC após 2 h de indução na temperatura de 37 °C . A seta preta sinaliza a banda das proteínas e tamanho molecular compatível para estas. 37

Figura 12. Análise de extração e purificação das proteínas recombinantes. (M) Marcador de tamanho molecular (Precision Plus Protein Unstained BioRad), (1) Extrato solúvel, (2) Proteínas não ligadas na coluna de Ni-NTA, (3) Proteínas eluídas com 20 mM de imidazol, (4) Proteínas eluídas com 100 mM de imidazol; (5) Proteínas eluídas com 200 mM de imidazol (6) Proteínas eluídas com 500 mM de imidazol, (7) Proteínas eluídas com 500 mM de imidazol. Setas pretas indicam a massa molecular das proteínas..... 39

Figura 13. Alinhamento múltiplo parcial da LacMeta com outras “multicooper oxidases” presentes no “Laccase and Multicopper Oxidase Engineering Database”, LccED. *S. azurea* (EHY87960.1), *S. glauca* (EIE99516.1), *Isoptericola variabilis* (AEG44518.1), *S. viridis* (ACU97130.1), *S. lavendulae* (JC8030), *Frankia sp.* (EFC82031.1), *P. infestans* (EEY67979.1), *O. sativa Japonica* (EAZ10382.1), *Brucella ceti* (EEH12728.1), *B. ovis* (ABQ62535.1). Triângulos pretos representam os sítios de ligação ao cobre e círculos brancos os ligantes do grupo trinuclear. Retângulos na cor azul representam sequências da família K (SLAC-like), retângulos na cor amarela representam sequências da família I (Bacterial Bilirubin Oxidase) e retângulos vermelhos representam sequências da família J (Bacterial CueO), de acordo com LccED. 41

Figura 14. a) Gel de SDS-PAGE 10% de expressão e frações da purificação por afinidade com metal da proteína recombinante. M. marcador de tamanho molecular, 1: células não induzidas. 2: células induzidas 3: flow 4, 5 6: frações de eluição de 20, 500 e 1000mM de imidazol. b) Gel nativo de LacMeta corado com 1mM de ABTS em tampão citrato de sódio pH 4,0. 42

Figura 15. Perfil Cromatográfico da enzima Lacase metagenômica purificada por filtração em gel, submetida à cromatografia empregando coluna Superdex 16 600 200; fluxo de 0,5 mL/min. Imagem interna corresponde ao perfil de migração eletroforética em gel SDS-Page 10% dos padrões de proteínas (Bio-RAAd, Cat. #161-0374) correspondentes aos respectivos tamanhos moleculares de 50 e 37 kDa (1) e as frações equivalentes a enzima Lacase purificada (2-8). Estimativa do tamanho molecular de LacMeta por filtração em gel com base na regressão linear. Dos padrões de migração relativos dos padrões LacMeta e proteína versus seus valores de tamanho molecular logarítmico. P1-P4: Proteínas utilizadas como padrões de peso molecular, correspondendo (Protein Standard Mix 15 ± 600 kDa, Sigma, St. Louis, MO, EUA). 43

Figura 16. Efeitos do pH e temperatura na atividade de LacMeta. As reações foram realizadas utilizando ABTS como substrato a 1mM e monitoradas na absorbância de 420nm. a) Efeito do pH sobre a atividade da lacase. Os tampões usados foram, citrato de sódio a 20 mM (pH 3,5 a 6,5) (círculo preto), fosfato de sódio a 20 mM (pH 6,5 a 7,0) (triângulo branco); TRIS-HCl a 20mM (pH 7,0 a 7,5 e 8,5 a 9,0) (quadrado

preto), HEPES a 20 mM (pH 7,5 a 8,5) (losango branco) e bicarbonato de sódio a 20 mM (9,0 a 11) (círculo branco). b) Efeito da temperatura sobre a atividade. A atividade enzimática foi mensura de 4 a 60 °C em tampão citrato de sódio 20mM (pH 4,0). As letras minúsculas no topo de cada ponto dentro do gráfico indicam a diferença significativa entre cada condição realizada no experimento. Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente, de acordo com a ANOVA e teste de Tukey a probabilidade de 5%. **45**

Figura 17. Influência de detergentes e íons na atividade enzimática da lacase. a) As reações foram feitas utilizando os detergentes SDS, Triton x-100 e Tween 80 nas concentrações de 0%, 1% e 2%. Barras pretas correspondem a SDS, barras cinzas correspondem a Triton x-100 e barras listradas correspondem a Tween 80. b) O controle das reações foi realizado sem a presença de aditivos (íons), sendo utilizado como base de cálculo para atribuição das demais porcentagens (valor 100%). As letras minúsculas no topo indicam a diferença significativa entre cada condição realizada no experimento. Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente, de acordo com a ANOVA e teste de Tukey a probabilidade de 5%..... **47**

Figura 18. Efeitos da concentração de substrato sobre a velocidade inicial da LacMeta. A atividade enzimática foi mensurada na presença das concentrações correspondentes do substrato ABTS em pH 4.0 em 0-20 min de reação. A. Regressão não linear da velocidade inicial em relação a diferentes concentrações de substrato (0,1-10 mM) foi obtida através do software “Graph Pad Prism”. **48**

Figura 19. Avaliação da estabilidade temporal. As reações foram realizadas com enzimas purificadas em datas posteriores ao teste, utilizando ABTS como substratos nos parâmetros estipulados com ótimos para a atividade enzimática (pH 4,0 e temperatura de 37 °C). As letras minúsculas no topo indicam a diferença significativa entre cada condição realizada no experimento. Valores seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente, de acordo com a ANOVA e teste de Tukey a probabilidade de 5%. **49**

ABREVIATURAS

DNA- ácido desoxirribonucleico
dNTP- desoxirribonucleotídeos fosfatados
EDTA- ácido etilenodiaminotetracético
IPTG – isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
p/v – peso por volume
PCR- reação em cadeia da polimerase
Tris- tris[hidroximetil]aminometano
UV- luz ultravioleta
v/v- volume por volume
BLAST – *Basic Local Alignment Sequence Tool*
D.O. ₆₀₀ – densidade ótica a 600 nm de comprimento de onda
E.C. – *Enzyme Commission*
GenBank – banco de sequências de genes e proteínas do *NCBI*
kb – mil pares de base
NCBI – *National Center for Biotechnology Information*
ORF – *Open Reading Frame* (região codificadora de proteína)
pb – pares de bases
PCR – *Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)
PDB – *Protein Data Bank*
pH – potencial hidrogeniônico $\log [H^+]$
pI – ponto isoelétrico
p/p – peso por peso
ppm – partes por milhão
rpm – rotações por minuto
SAP – *Shrimp Alkaline Phosphatase* (fosfatase alcalina de camarão)
SDS – dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
FT- “Flow through” (Fração do lavado referente às proteínas que não se ligaram à resina)

LISTA DE UNIDADES

g – aceleração da gravidade

g – grama

L – litro

$g\text{-L}$ – gramas por litro

kb – kilobase

M – molar

mg – miligrama

mL – mililitro

mM – milimolar

μg – micrograma

μL – microlitro

μM – micromolar

ng – nanogramas

pb – pares de bases

U – unidades

V- volt

kDa- Quilo Daltons

h – horas

s – segundos

min – minutos

BUSCA DE BIOMOLÉCULAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO EM DATABASE METAGENÔMICO POR SEQUENCE-DRIVEN

RESUMO - O mercado industrial está se tornando cada vez mais dependente do uso de enzimas como catalisadores. Dentre as enzimas utilizadas industrialmente estão as de origem microbiana, por serem ativas nas mais diversas condições. As lacases são enzimas com alto potencial, pois atuam sobre diversos compostos, o que possibilita uma vasta diversidade de possíveis aplicações. Entre as formas de prospecção de novas enzimas microbianas, encontra-se a metagenômica. Diante disto, foi realizada a busca por potenciais lacases seguindo uma estratégia “sequence-driven” em uma base de dados metagenômicos composta por amostras de diversos ambientes, pertencente ao Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP). As ORFs previamente anotadas por similaridade de sequências e domínios conservados como possíveis “Multicopper oxidases” (grupo no qual se encontram as lacases) foram prospectadas pela região conservada para lacases L3 (HLHGH). Esta estratégia retornou três ORFs, a ORF50MF; a ORF51ME e a ORF13SE (*lacmeta*), as quais foram clonadas e submetidas as análises de super-expressão e purificação. LacMeta, similar em 82% com a sequência de proteína hipotética de *Streptomyces rubidus* [WP_069465126.1], foi a proteína que apresentou o melhor resultado de expressão e purificação, sendo então submetida a caracterização cinética. A proteína fusionada a uma cauda de hexa-histidina foi purificada na forma homotrimérica, com 107 kDa, e apresentou atividade ótima em pH ácido para o substrato ABTS, para o qual obteve os parâmetros catalíticos k_{cat} , K_m e V_{max} iguais a 1,85 ($\pm 0,07$) min^{-1} ; 4,04 mM ($\pm 0,37$) e 24,43 ($\pm 0,94$) $\mu\text{M min}^{-1}$, respectivamente. Quanto à estabilidade de estocagem, a enzima apresentou considerável estabilidade temporal, permanecendo com 50% da atividade após 150 dias a 4°C na presença de glicerol 5% como estabilizador estrutural. A enzima LacMeta apresentou atividade em uma ampla faixa de temperatura, atuando entre 10-60 °C com atividade acima de 50%. Sob o aspecto de aplicação biotecnológica, a enzima demonstrou elevado potencial para o tratamento de água residual de indústria têxtil, uma vez que foi capaz de degradar sete corantes de cinco classes distintas sem a presença de um mediador redox.

Palavras-chave: Slac; lacase, metagenômica; corantes;

SEQUENCE-DRIVEN PROSPECTION FOR BIOMOLECULES WITH BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL IN METAGENOMIC DATABASE

ABSTRACT- The industrial market is becoming increasingly dependent on the use of enzymes as biocatalysts. Among the enzymes used industrially are those of microbial origin, because they are active in the most diverse conditions. Laccases are enzymes with high potential, since they act on several compounds, which allows a wide diversity of possible applications. Among the search for new forms of microbial enzymes, is the metagenomic. In this way, the search for potential laccases was carried out following a sequence-driven strategy in a metagenomic database composed of samples from different environments, belonging to the Laboratory of Biochemistry of Microorganisms and Plants (LBMP). The ORFs previously annotated by similarity of sequences and conserved domains as possible "Multicopper oxidases" (group in which the laccases are) were prospected by the region conserved for laccases L3 (HLHGH). This strategy returned three ORFs, the ORF50MF; the ORF51ME and the ORF13SE (*lacmeta*), which were cloned and subjected to super-expression and purification analyzes. LacMeta, similar in 82% to the hypothetical protein sequence of *Streptomyces rubidus* [WP_069465126.1], was the protein that presented the best expression and purification result and was then subjected to kinetic characterization. The protein fused to a hexa-histidine tail was purified in the homo-trimeric form with 128.22 kDa and presented optimum acidic pH activity for the ABTS substrate, for which obtained the catalytic parameters k_{cat} , K_m and V_{max} equal to $1.85(\pm 0.07) \text{ min}^{-1}$, $4.04 (\pm 0.37) \text{ mM}$ and $24.43 (\pm 0.94) \mu\text{M min}^{-1}$, respectively. Regarding the storage stability, the enzyme showed considerable time stability, with 50% remaining activity after 150 days at 4°C in the presence of 5% glycerol as a structural stabilizer. The enzyme presented a wide temperature range, acting between $10\text{-}60^\circ \text{C}$ with activity above 50%. Under the aspect of biotechnological application, the enzyme demonstrated a high potential for the treatment of waste water from the textile industry, since it was able to degrade seven dyes of five distinct classes without the presence of a redox mediator.

Key-words: Slac; Laccase, metagenomics; Dyes;

1. INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas em processos industriais já é bastante conhecida, como por exemplo, há milhares de anos o uso de biocatalisadores pelo homem na fabricação de pães, bebidas e laticínios. Dentro deste contexto, nos dias atuais, o mercado industrial está se tornando cada vez mais dependente do uso de enzimas como catalisadores (SARROUH et al., 2012), por se tratar de uma forma de catalise rápida, eficaz e pouco agressiva para o meio ambiente. Dentre os segmentos industriais que utilizam enzimas estão o de detergentes, que utilizam as lipases e proteases; o têxtil, com as lacases e amilases; o de papel e celulose, com as lipases e celulasas; e o de bebidas, utilizando lacases e β -glicanases (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002).

Neste contexto, entre as enzimas de elevado potencial biotecnológico estão as lacases [benzenodiol: oxigênio redutases (E.C. 1.10.3.2)], que são enzimas oxidativas, atuando sobre os mais variados compostos. Podem ser encontradas em plantas vascularizadas, fungos, insetos e bactérias (COPETE et al., 2015) e possuem ampla distribuição na natureza (HILDÉN; HAKALA; LUNDELL, 2009). Dentre os organismos vivos, estas enzimas têm sido extensivamente descritas em eucariotos, principalmente fungos, ao passo que os dados de lacases de outros organismos, como as bacterianas, ainda são escassos (CLAUS, 2003; HILDÉN; HAKALA; LUNDELL, 2009). Apesar disso, dentre as poucas lacases bacterianas estudadas foi possível notar a descoberta de muitas particularidades de interesse para os processos industriais, como a resistência à alcalinidade e salinidade (SHARMA; GOEL; CAPALASH, 2007), o que torna interessante a busca por estas novas lacases.

Por definição, metagenômica refere-se à extração do genoma total da comunidade microbiana de uma determinada amostra ambiental, sendo este material denominado como genoma coletivo (HANDELSMAN et al., 1998). Geralmente estudos envolvendo a abordagem metagenômica constituem na extração do DNA metagenômico, clonagem do DNA em um vetor cosmidial/fosmidial e a transformação em uma célula hospedeira, tornando possível

o acesso e estudo do material genético (HANDELSMAN, 2004). Entretanto, novas tecnologias de sequenciamento têm permitido o acúmulo de “bibliotecas virtuais”, nas quais o metagenoma é diretamente sequenciado, submetido a montagens e anotação gênica automática, gerando grandes quantidades de dados. Nesta “biblioteca virtual”, que pode conter também sequências geradas pelo sequenciamento de clones de bibliotecas cosmidiais tradicionais (sequenciamento massivo de insertos), a busca por novas biomoléculas de interesse é feita através da prospecção de regiões conservadas de sequências (nucleotídica ou protéica) denominadas “motifs”. A busca através de “motifs” é denominada prospecção “sequence-driven” (MARDIS, 2009; SIMON; DANIEL, 2011; MAYO et al., 2014; MITCHELL et al., 2016).

Visto que 99% de micro-organismos não são ainda cultivados em métodos tradicionais de cultivo, com a abordagem metagenômica espera-se explorar a vasta biodiversidade ainda não estudada (HANDELSMAN et al., 1998; MITCHELL et al., 2016). Com a expansão dessa técnica, foi possível ampliar o conhecimento sobre as populações de micro-organismos, o que resultou em uma grande quantidade de novas enzimas descobertas a partir de amostras de metagenomas (UFARTÉ; POTOCKI-VERONESE; LAVILLE, 2015), como por exemplo, uma nova esterase proveniente do metagenoma de um solo contaminado por hidrocarbonetos (PEREIRA et al., 2015).

Considerando o imenso potencial do uso da metagenômica para busca de novos biocatalizadores, o Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP) conta com uma estrutura bem desenvolvida e montada no que diz respeito a plataformas de sequenciamento e anotação gênica, de forma que a geração de dados se torna rápida e de excelência. Sob este aspecto, uma série de dados de sequência foram gerados permitindo a semi-estruturação de um banco de dados rico em informação. Dentre estes dados, têm-se os Metagenomas das comunidades microbianas de solos de cinco ecossistemas de Sabará (Minas Gerais); o Metagenoma da comunidade microbiana do solo sob plantação de mata de eucaliptos mantida sem tratos culturais por 50 anos (Faculdade de Ciências

Agrarias – FCAV/UNESP), bem como também o metagenoma de um consórcio degradador de biodiesel.

Diante dos pontos abordados, no presente trabalho foi realizada a prospecção de genes de lacases neste banco de dados do LBMP, utilizando a estratégia “sequence-driven” conforme esquematizado abaixo (Figura 1).

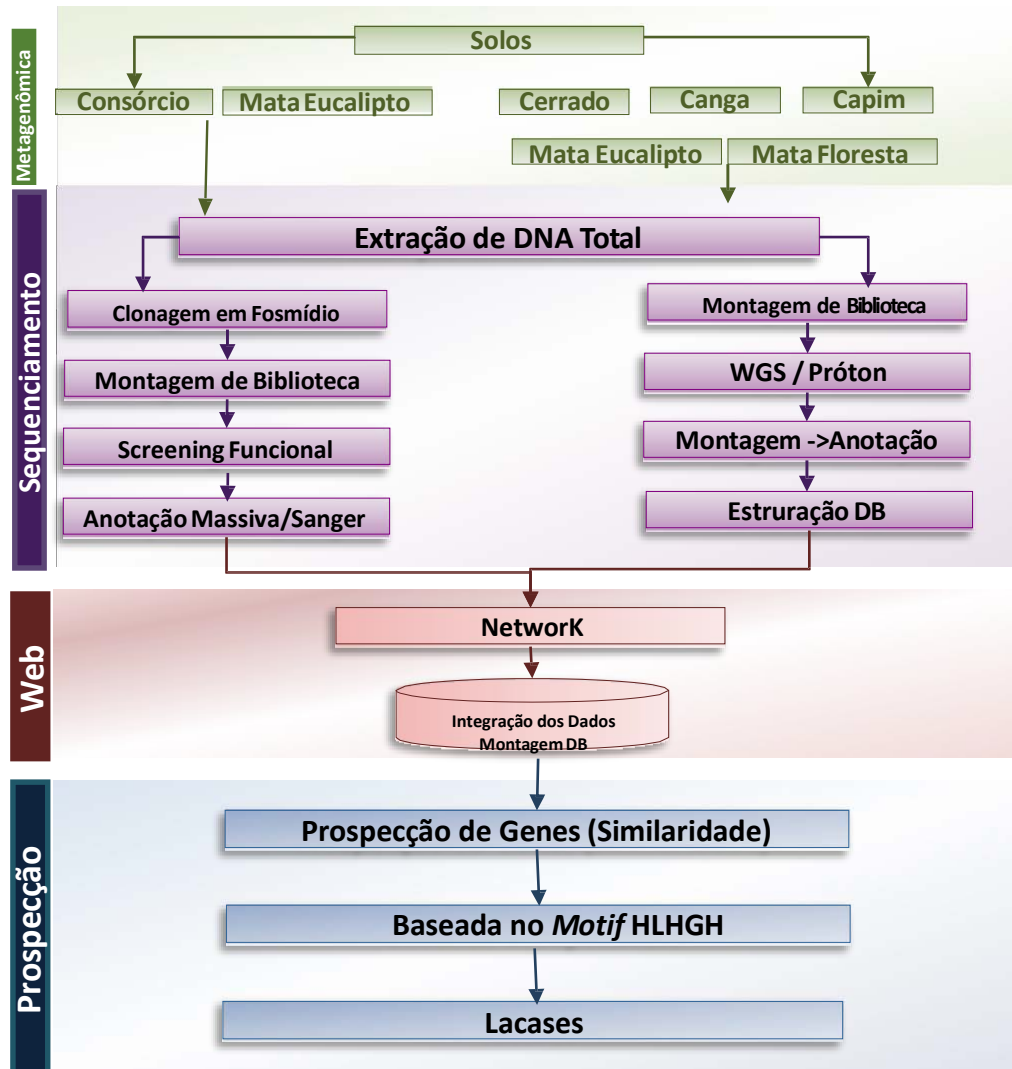


Figura 1. Fluxograma dos bancos de dados metagenômicos existentes atualmente no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas, e demonstração da estratégia de prospecção utilizada no presente trabalho. Fonte: O autor.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível identificar três ORFs codificadoras de lacase nos bancos de dados metagenômicos do LBMP e desenvolver a caracterização cinética e estrutural de uma nova SLAC, denominada LacMeta:

- Foi possível clonar e expressar as três proteínas;
- A atividade máxima de LacMeta se deu em 37 °C, porém a sua atividade foi menor que 50% somente na temperatura de 4 °C;
- LacMeta apresentou atividade em pH ácido, 4,5, quando utilizado ABTS como substrato;
- Após longos períodos de armazenamento, LacMeta manteve sua atividade;
- Os resultados obtidos em relação a degradação de corantes, demonstram o potencial de LacMeta para a aplicação citada.

7. REFERÊNCIAS

- ABADULLA, E.; TZANOV, T.; COSTA, S.; ROBRA, K.; CAVACO-PAULO, A.; GU, G. M. Decolorization and Detoxification of Textile Dyes with a Laccase from *Trametes hirsuta*. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3357–3362, 2000.
- ALCALDE, M.; FERRER, M.; PLOU, F. J.; BALLESTEROS, A. Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 6, p. 281–287, 2006.
- ARNOLD, K.; BORDOLI, L.; KOPP, J.; SCHWEDE, T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 22, n. 2, p. 195–201, jan. 2006.
- AUSEC, L.; DIRK, J.; ELSAS, V.; MANDIC-MULEC, I. Soil Biology & Biochemistry Two- and three-domain bacterial laccase-like genes are present in drained peat soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 5, p. 975–983, 2011a.
- AUSEC, L.; ZAKRZEWSKI, M.; GOESMANN, A.; SCHLÜTER, A.; MANDIC-MULEC, I. Bioinformatic Analysis Reveals High Diversity of Bacterial Genes for Laccase-Like Enzymes. **PLoS ONE**, v. 6, n. 10, p. e25724, 2011b.
- BALCÁZAR-LÓPEZ, E.; MÉNDEZ-LORENZO, L. H.; BATISTA-GARCÍA, R. A.; ESQUIVEL-NARANJO, U.; AYALA, M.; KUMAR, V. V.; SAVARY, O.; CABANA, H.; HERRERA-ESTRELLA, A.; FOLCH-MALLOL, J. L. Xenobiotic Compounds Degradation by Heterologous Expression of a *Trametes sanguineus* Laccase in *Trichoderma atroviride*. **PLOS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0147997, 5 fev. 2016.
- BALDRIAN, P. Fungal laccases-occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 215–242, mar. 2006.
- BELOQUI, A.; PITA, M.; POLAINA, J.; MARTINEZ-ARIAS, A.; GOLYSHINA, O. V.; ZUMARRAGA, M.; YAKIMOV, M. M.; GARCIA-ARELLANO, H.; ALCALDE, M.; FERNANDEZ, V. M.; ELBOROUGH, K.; ANDREU, J. M.; BALLESTEROS, A.; PLOU, F. J.; TIMMIS, K. N.; FERRER, M.; GOLYSHIN, P. N. Novel Polyphenol Oxidase Mined from a Metagenome Expression Library of Bovine Rumen: BIOCHEMICAL PROPERTIES, STRUCTURAL ANALYSIS, AND PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 32, p. 22933–22942, 11 ago. 2006.
- BERTRAND, T.; JOLIVALT, C.; BRIOZZO, P.; CAMINADE, E.; JOLY, N.; MADZAK, C.; MOUGIN, C. Crystal structure of a four-copper laccase complexed with an arylamine: Insights into substrate recognition and correlation with kinetics. **Biochemistry**, v. 41, n. 23, p. 7325–7333, 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRANDER, S.; MIKKELSEN, J. D.; KEPP, K. P. Characterization of an alkali- and halide-resistant laccase expressed in *E. coli*: CotA from *Bacillus clausii*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.

CHANDRA, R.; CHOWDHARY, P. Properties of bacterial laccases and their application in bioremediation of industrial wastes. **Environmental science. Processes & impacts**, v. 17, n. 2, p. 326–42, 2015.

CLAUS, H. Laccases and their occurrence in prokaryotes. **Archives of microbiology**, v. 179, n. 3, p. 145–150, 2003.

COPETE, L. S.; CHANAGÁ, X.; BARRIUSO, J.; LÓPEZ-LUCENDO, M. F.; MARTÍNEZ, M. J.; CAMARERO, S. Identification and characterization of laccase-type multicopper oxidases involved in dye-decolorization by the fungus *Leptosphaerulina* sp. **BMC Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 74, 2015.

COSTA, P. S.; REIS, M. P.; ÁVILA, M. P.; LEITE, L. R.; DE ARAÚJO, F. M. G.; SALIM, A. C. M.; OLIVEIRA, G.; BARBOSA, F.; CHARTONE-SOUZA, E.; NASCIMENTO, A. M. a. Metagenome of a microbial community inhabiting a metal-rich tropical stream sediment. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0119465, jan. 2015.

DA SILVEIRA, N.; UCHÔA, H.; PEREIRA, J.; CANDURI, F.; BASSO, L.; PALMA, M.; SANTOS, D.; AZEVEDO JR., W. Molecular models of protein targets from *Mycobacterium tuberculosis*. **J Mol Model**, v. 11, p. 160–166, 2005.

DANIEL, R. The soil metagenome - A rich resource for the discovery of novel natural products. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 199–204, 2004.

DITTMER, N. T.; KANOST, M. R. **Insect multicopper oxidases: Diversity, properties, and physiological roles** *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, mar. 2010. .

DUBÉ, E.; SHARECK, F.; HURTUBISE, Y.; DANEULT, C.; BEAUREGARD, M. Homologous cloning, expression, and characterisation of a laccase from *Streptomyces coelicolor* and enzymatic decolourisation of an indigo dye. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 4, p. 597–603, 24 abr. 2008.

DWIVEDI, U. N.; SINGH, P.; PANDEY, V. P.; KUMAR, A. Structure–function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 2, p. 117–128, 2011.

DYRLØV BENDTSEN, J.; NIELSEN, H.; VON HEIJNE, G.; BRUNAK, S. Improved

Prediction of Signal Peptides: SignalP 3.0. **Journal of Molecular Biology**, v. 340, n. 4, p. 783–795, jul. 2004.

ENGUIITA, F. J. Chapter 4 - Structural Biology of Fungal Multicopper Oxidases. **Mycofactories**, p. 57–72, 2011.

FANG, Z.; LI, T.; WANG, Q.; ZHANG, X.; PENG, H.; FANG, W.; HONG, Y.; GE, H.; XIAO, Y. A bacterial laccase from marine microbial metagenome exhibiting chloride tolerance and dye decolorization ability. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 4, p. 1103–1110, 21 fev. 2011.

FANG, Z.; LIU, X.; CHEN, L.; SHEN, Y.; ZHANG, X.; FANG, W.; WANG, X.; BAO, X.; XIAO, Y. Identification of a laccase Glac15 from *Ganoderma lucidum* 77002 and its application in bioethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 54, 31 dez. 2015.

FANG, Z. M.; LI, T. L.; CHANG, F.; ZHOU, P.; FANG, W.; HONG, Y. Z.; ZHANG, X. C.; PENG, H.; XIAO, Y. Z. A new marine bacterial laccase with chloride-enhancing, alkaline-dependent activity and dye decolorization ability. **Bioresource Technology**, v. 111, p. 36–41, 2012.

FENG, H.; ZHANG, D.; SUN, Y.; ZHI, Y.; MAO, L.; LUO, Y.; XU, L.; WANG, L.; ZHOU, P. Expression and Characterization of a Recombinant Laccase with Alkalistable and Thermostable Properties from *Streptomyces griseorubens* JSD-1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, n. 2, p. 547–562, 2015.

FERNANDES, T. A. R.; DA SILVEIRA, W. B.; PASSOS, F. M. L.; ZUCCHI, T. D. Characterization of a thermotolerant laccase produced by *Streptomyces* sp. SB086. **Annals of Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 1363–1369, 2014a.

FERNANDES, T. A. R.; SILVEIRA, W. B. da; PASSOS, F. M. L.; ZUCCHI, T. D. Laccases from <i>Actinobacteria</i>—What We Have and What to Expect. **Advances in Microbiology**, v. 4, n. 6, p. 285–296, 2014b.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. Á.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1808–1825, 2013.

FERRER, M.; BELOQUI, A.; TIMMIS, K. N.; GOLYSHIN, P. N. Metagenomics for mining new genetic resources of microbial communities. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 16, n. 1–2, p. 109–123, 2008.

GARBEVA, P.; VAN VEEN, J. A.; VAN ELSAS, J. D. MICROBIAL DIVERSITY IN SOIL: Selection of Microbial Populations by Plant and Soil Type and Implications for Disease Suppressiveness. **Annual Review of Phytopathology**, v. 42, n. 1, p. 243–270, set. 2004.

GARCIA, R. A. M.; PEREIRA, M. R.; MAESTER, T. C.; DE MACEDO LEMOS, E. G. Investigation, Expression, and Molecular Modeling of ORF2, a Metagenomic Lipolytic Enzyme. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 8, p. 3875–3887, 2015.

GIANFREDA, L.; XU, F.; BOLLAG, J.-M. Laccases: A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes. **Bioremediation Journal**, v. 3, n. 1, p. 1–26, 1999.

GOMES-PEPE, S.; GUILLERMO, E.; SIERRA, M.; PEREIRA, R.; CRISTINA, T.; CASTELLANE, L.; DE, E. G.; LEMOS, M. Bg10: A Novel Metagenomics Alcohol-Tolerant Suitable for Lactose-Free Milk Preparation. **PLOS ONE**, v. 11, n. 12, p. 1–25, 21 dez. 2016.

GOMES, E. S.; SCHUCH, V.; LEMOS, E. G. de M. Biotechnology of polyketides: new breath of life for the novel antibiotic genetic pathways discovery through metagenomics. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1007–1034, dez. 2013.

GU, C.; ZHENG, F.; LONG, L.; WANG, J.; DING, S. Engineering the expression and characterization of two novel laccase isoenzymes from *Coprinus comatus* in *Pichia pastoris* by fusing an additional ten amino acids tag at N-terminus. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

GUNNE, M.; AL-SULTANI, D.; URLACHER, V. B. Enhancement of copper content and specific activity of CotA laccase from *Bacillus licheniformis* by coexpression with CopZ copper chaperone in *E. coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 168, n. 3, p. 252–255, 2013.

GUNNE, M.; HÖPPNER, A.; HAGEDOORN, P. L.; URLACHER, V. B. Structural and redox properties of the small laccase Ssl1 from *Streptomyces sviveus*. **FEBS Journal**, v. 281, n. 18, p. 4307–4318, 2014.

GUNNE, M.; URLACHER, V. B. Characterization of the Alkaline Laccase Ssl1 from *Streptomyces sviveus* with Unusual Properties Discovered by Genome Mining. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e52360, 20 dez. 2012.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. **Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms**. v. 68, n. 4, p. 669–685, 2004.

HANDELSMAN, J.; RONDON, M. R.; BRADY, S. F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, v. 5, n. 10, p. R245–R249, 1998.

HILDÉN, K.; HAKALA, T. K.; LUNDELL, T. **Thermotolerant and thermostable laccases** *Biotechnology Letters*, 2009. .

HOEGGER, P. J.; KILARU, S.; JAMES, T. Y.; THACKER, J. R.; KÜES, U. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. **The FEBS journal**, v. 273, n. 10, p. 2308–26, 2006.

HUNTER, S.; CORBETT, M.; DENISE, H.; FRASER, M.; GONZALEZ-BELTRAN, A.; HUNTER, C.; JONES, P.; LEINONEN, R.; MCANULLA, C.; MAGUIRE, E.; MASLEN, J.; MITCHELL, A.; NUKA, G.; OISEL, A.; PESSEAT, S.; RADHAKRISHNAN, R.; ROCCA-SERRA, P.; SCHEREMETJEW, M.; STERK, P.; VAUGHAN, D.; COCHRANE, G.; FIELD, D.; SANSONE, S. A. EBI metagenomics - A new resource for the analysis and archiving of metagenomic data. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 600–606, 2014.

IHSSEN, J.; REISS, R.; LUCHSINGER, R.; THÖNY-MEYER, L.; RICHTER, M. Biochemical properties and yields of diverse bacterial laccase-like multicopper oxidases expressed in *Escherichia coli*. **Scientific reports**, v. 5, p. 10465, jan. 2015.

KAKIRDE, K. S.; PARSLEY, L. C.; LILES, M. R. Size does matter: Application-driven approaches for soil metagenomics. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 11, p. 1911–1923, nov. 2010.

KIM, H.-W.; LEE, S.-Y.; PARK, H.; JEON, S.-J. Expression, refolding, and characterization of a small laccase from *Thermus thermophilus* HJ6. **Protein Expression and Purification**, v. 114, p. 37–43, 2015.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 345–351, 2002.

KOMORI, H.; MIYAZAKI, K.; HIGUCHI, Y. X-ray structure of a two-domain type laccase: a missing link in the evolution of multi-copper proteins. **FEBS letters**, v. 583, n. 7, p. 1189–95, 2 abr. 2009.

KOSCHORRECK, K.; RICHTER, S. M.; ENE, A. B.; RODUNER, E.; SCHMID, R. D.; URLACHER, V. B. Cloning and characterization of a new laccase from *Bacillus licheniformis* catalyzing dimerization of phenolic acids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 2, p. 217–224, 2008.

KOSMAN, D. J. FET3P, ceruloplasmin, and the role of copper in iron metabolism. **Advances in Protein Chemistry**, v. 60, n. 1, p. 221–246, 2002.

KUNAMNENI, A.; CAMARERO, S.; GARCÍA-BURGOS, C.; PLOU, F. J.; BALLESTEROS, A.; ALCALDE, M. Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis. **Microbial Cell Factories**, v. 7, n. 1, p. 32, 2008.

KUPPUSAMY, S.; SETHURAJAN, M.; KADARKARAI, M.; ARULIAH, R. Biodecolourization of textile dyes by novel, indigenous *Pseudomonas stutzeri* MN1 and *Acinetobacter baumannii* MN3. **Journal of Environmental Chemical**

Engineering, v. 5, n. 1, p. 716–724, 2017.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 15 ago. 1970.

LARRONDO, L. F.; GONZÁLEZ, B.; CULLEN, D.; VICUÑA, R. Characterization of a multicopper oxidase gene cluster in *Phanerochaete chrysosporium* and evidence of altered splicing of the mco transcripts. **Microbiology**, v. 150, n. 8, p. 2775–2783, 2004.

LAWTON, T. J.; BOWEN, K. E.; SAYAVEDRA-SOTO, L. A.; ARP, D. J.; ROSENZWEIG, A. C. Characterization of a Nitrite Reductase Involved in Nitrifier. **The Journal of biological chemistry**, v. 288, n. 35, p. 25575–25583, 2013.

LE ROES-HILL, M.; PRINS, A. Biotechnological Potential of Oxidative Enzymes from Actinobacteria. **Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications**, 2016.

LEE, M. H.; LEE, S.-W. Bioprospecting Potential of the Soil Metagenome: Novel Enzymes and Bioactivities Soil Microbial Diversity. **Genomics Inform**, v. 11, n. 3, p. 114–120, 2013.

LIU, Y. H.; YE, M.; LU, Y.; ZHANG, X.; LI, G. Improving the decolorization for textile dyes of a metagenome-derived alkaline laccase by directed evolution. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 3, p. 667–675, 27 ago. 2011.

LIU, Y.; HUANG, L.; GUO, W.; JIA, L.; FU, Y.; GUI, S.; LU, F. Cloning, expression, and characterization of a thermostable and pH-stable laccase from *Klebsiella pneumoniae* and its application to dye decolorization. **Process Biochemistry**, v. 53, p. 125–134, fev. 2017.

LU, L.; ZENG, G.; FAN, C.; REN, X.; WANG, C.; ZHAO, Q.; ZHANG, J.; CHEN, M.; CHEN, A.; JIANG, M. Characterization of a laccase-like multicopper oxidase from newly isolated *Streptomyces* sp . C1 in agricultural waste compost and enzymatic decolorization of azo dyes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 72, p. 70–76, 2013.

MACHCZYNSKI, M. C.; VIJGENBOOM, E.; SAMYN, B.; CANTERS, G. W. Characterization of SLAC: a small laccase from *Streptomyces coelicolor* with unprecedented activity. **Protein science : a publication of the Protein Society**, v. 13, n. 9, p. 2388–97, set. 2004.

MADHAVI, V.; LELE, S. S. Laccase: Properties and applications. **BioResources**, v. 4, p. 1694–1717, 2009.

MAESTER, T. C.; PEREIRA, M. R.; MACHADO SIERRA, E. G.; BALAN, A.; DE

MACEDO LEMOS, E. G. Characterization of EST3: a metagenome-derived esterase with suitable properties for biotechnological applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 13, p. 5815–5827, 2016.

MARDIS, E. R. New strategies and emerging technologies for massively parallel sequencing: applications in medical research. **Genome Medicine**, v. 1, n. 4, p. 40, 2009.

MARTINS, L. O.; DURÃO, P.; BRISSOS, V.; LINDLEY, P. F. Laccases of prokaryotic origin: enzymes at the interface of protein science and protein technology. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 5, p. 911–922, 2015.

MARTINS, L. O.; SOARES, C. M.; PEREIRA, M. M.; TEIXEIRA, M.; COSTA, T.; JONES, G. H.; HENRIQUES, A. O. Molecular and biochemical characterization of a highly stable bacterial laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 21, p. 18849–18859, 2002.

MATE, D. M.; ALCALDE, M. Laccase engineering: from rational design to directed evolution. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 1, p. 25–40, 27 jan. 2014.

MAYO, B.; RACHID, C. T. C. C.; ALEGRÍA, Á.; LEITE, A. M. O.; PEIXOTO, R. S.; DELGADO, S. Impact of Next Generation Sequencing Techniques in Food Microbiology. **Current Genomics**, v. 15, n. 4, p. 293–309, 2014.

MITCHELL, A.; BUCCHINI, F.; COCHRANE, G.; DENISE, H.; HOOPEN, P. ten; FRASER, M.; PESSEAT, S.; POTTER, S.; SCHEREMETJEW, M.; STERK, P.; FINN*, R. D. EBI metagenomics in 2016 - an expanding and evolving resource for the analysis and archiving of metagenomic data. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D595–D603, 2016.

MOGHARABI, M.; FARAMARZI, M. A. Laccase and Laccase-Mediated Systems in the Synthesis of Organic Compounds. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 356, n. 5, p. 897–927, 2014.

MOLINA-GUIJARRO, J. M.; PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; GUILLÉN, F.; MOYA, R.; HERNÁNDEZ, M.; ARIAS, M. E. Detoxification of azo dyes by a novel pH-versatile, salt-resistant laccase from *Streptomyces ipomoea*. **International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 13–21, 2009.

MOORE, A. D.; HELDY, A.; TERRAPON, N.; WEINER, J.; BORNBERG-BAUER, E. DoMosaics: Software for domain arrangement visualization and domain-centric analysis of proteins. **Bioinformatics**, v. 30, n. 2, p. 282–283, 2014.

MYROLD, D. D.; ZEGLIN, L. H.; JANSSON, J. K. The Potential of Metagenomic

Approaches for Understanding Soil Microbial Processes. **Soil Science Society of America Journal**, v. 78, n. 1, p. 3, 2014.

NAKAMURA, K.; KAWABATA, T.; YURA, K.; GO, N. Novel types of two-domain multi-copper oxidases: possible missing links in the evolution. **FEBS Letters**, v. 553, n. 3, p. 239–244, 23 out. 2003.

NANNIPIERI, P.; ASCHER, J.; CECCHERINI, M. T.; LANDI, L.; PIETRAMELLAR, G.; RENELL, G. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, v. 54, n. December, p. 655, 2003.

NYANHONGO, G. S.; GOMES, J.; GÜBITZ, G. M.; ZVAUYA, R.; READ, J.; STEINER, W. Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. **Water Research**, v. 36, n. 6, p. 1449–1456, 2002.

PERÄNEN, J.; RIKKONEN, M.; HYVÖNEN, M.; KÄÄRIÄINEN, L. T7 Vectors with a Modified T7lacPromoter for Expression of Proteins in *Escherichia coli*. **Analytical Biochemistry**, v. 236, n. 2, p. 371–373, maio 1996.

PEREIRA, M. R.; MERCALDI, G. F.; MAESTER, T. C.; BALAN, A.; DE MACEDO LEMOS, E. G. Est16, a New Esterase Isolated from a Metagenomic Library of a Microbial Consortium Specializing in Diesel Oil Degradation. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0133723, 27 jul. 2015.

PISCITELLI, A.; PEZZELLA, C.; GIARDINA, P.; FARACO, V.; GIOVANNI, S. Heterologous laccase production and its role in industrial applications. **Bioengineered Bugs**, v. 1, n. 4, p. 252–262, 2010.

RAMOS, T.; TAMAYO RAMOS, J. A.; BARENDTS, S.; VERHAERT, R.; DE GRAAFF, L. H. The *Aspergillus niger* multicopper oxidase family: analysis and overexpression of laccase-like encoding genes. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n. 1, p. 78, 2011.

REISS, R.; IHSEN, J.; RICHTER, M.; EICHHORN, E.; SCHILLING, B.; THÖNYMEYER, L. Laccase versus laccase-like multi-copper oxidase: a comparative study of similar enzymes with diverse substrate spectra. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e65633, 2013.

RIVA, S. **Laccases: blue enzymes for green chemistry** *Trends in Biotechnology*, 2006. .

SAKURAI, T.; KATAOKA, K. Basic and applied features of multicopper oxidases, CueO, bilirubin oxidase, and laccase. **The Chemical Record**, v. 7, n. 4, p. 220–229, 2007.

SARROUH, B.; SANTOS, T. M.; MIYOSHI, A.; DIAS, R.; AZEVEDO, V. Up-To-Date Insight on Industrial Enzymes Applications and Global Market. **Journal of**

bioprocessing & biotechniques, v. S4, n. 2, p. 1–10, 2012.

SCHUCH, V. **Prospecção de genes envolvidos na biossíntese de antibióticos através da abordagem metagenômica**. 2007. Faculdade de Ciências Agrária e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo, 2007.

SHARMA, P.; GOEL, R.; CAPALASH, N. Bacterial laccases. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 823–832, 2007.

SI, J.; PENG, F.; CUI, B. Purification, biochemical characterization and dye decolorization capacity of an alkali-resistant and metal-tolerant laccase from *Trametes pubescens*. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 49–57, 2013.

SIMON, C.; DANIEL, R. **Metagenomic analyses: Past and future trends** *Applied and Environmental Microbiology*, 2011. .

SIRIM, D.; WAGNER, F.; WANG, L.; SCHMID, R. D.; PLEISS, J. The Laccase Engineering Database: A classification and analysis system for laccases and related multicopper oxidases. **Database**, v. 2011, p. 1–7, 2011.

SKÁLOVÁ, T.; DOHNÁLEK, J.; ØSTERGAARD, L. H.; ØSTERGAARD, P. R.; KOLENKO, P.; DUŠKOVÁ, J.; ŠTĚPÁNKOVÁ, A.; HAŠEK, J. The Structure of the Small Laccase from *Streptomyces coelicolor* Reveals a Link between Laccases and Nitrite Reductases. **Journal of Molecular Biology**, v. 385, n. 4, p. 1165–1178, 2009.

SOLOMON, E. I.; SUNDARAM, U. M.; MACHONKIN, T. E. Multicopper Oxidases and Oxygenases. **Chemical reviews**, v. 96, n. 7, p. 2563–2606, 1996.

SURESH KUMAR, S. V; PHALE, P. S.; DURANI, S.; WANGIKAR, P. P. Combined Sequence and Structure Analysis of the Fungal Laccase Family. **Biotechnol Bioeng**, v. 83, p. 386–394, 2003.

TELKE, A. A.; GHODAKE, G. S.; KALYANI, D. C.; DHANVE, R. S.; GOVINDWAR, S. P. Biochemical characteristics of a textile dye degrading extracellular laccase from a *Bacillus* sp. ADR. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 2, p. 1752–1756, jan. 2011.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 240–245, 2002.

UCHIYAMA, T.; MIYAZAKI, K. Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 6, p. 616–622, 2009.

UFARTÉ, L.; POTOCKI-VERONESE, G.; LAVILLE, É. Discovery of new protein families and functions: new challenges in functional metagenomics for

biotechnologies and microbial ecology. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 563, 2015.

UNDERKOFER, L. A.; BARTON, R. R.; RENNERT, S. S. Production of microbial enzymes and their applications. **Applied microbiology**, v. 6, n. 3, p. 212–221, 1958.

VISWANATH, B.; CHANDRA, M. S.; KUMAR, K. P.; PALLAVI, H.; REDDY, B. R. Fungal laccases and their biotechnological applications with special reference to bioremediation. **Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology**, v. 2, n. 1, p. 1–13, 2008.

VOGEL, T. M.; SIMONET, P.; JANSSON, J. K.; HIRSCH, P. R.; TIEDJE, J. M.; VAN ELSAS, J. D.; BAILEY, M. J.; NALIN, R.; PHILIPPOT, L. TerraGenome: a consortium for the sequencing of a soil metagenome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 252–252, abr. 2009.

XING, M.-N.; ZHANG, X.-Z.; HUANG, H. Application of metagenomic techniques in mining enzymes from microbial communities for biofuel synthesis. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 4, p. 920–9, 2012.

YAN, J.; CHEN, D.; YANG, E.; NIU, J.; CHEN, Y.; CHAGAN, I. Purification and characterization of a thermotolerant laccase isoform in *Trametes trogii* strain and its potential in dye decolorization. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 93, p. 186–194, 2014.

YE, M.; LI, G.; LIANG, W. Q.; LIU, Y. H. Molecular cloning and characterization of a novel metagenome-derived multicopper oxidase with alkaline laccase activity and highly soluble expression. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 1023–31, 2010.

ZILLE, A.; GO, B.; REHOREK, A.; CAVACO-PAULO, A. Degradation of Azo Dyes by *Trametes villosa* Laccase over Long Periods of Oxidative Conditions. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 11, p. 6711–6718, 2005.