
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)**

TESE DE DOUTORADO

**LACASES MARINHAS: EXPRESSÃO HETERÓLOGA, ESTRUTURA E
APLICAÇÃO**

IGOR VINICIUS RAMOS OTERO

**Rio Claro/SP
Novembro de 2022**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR, MOLECULAR E MICROBIOLOGIA)**

TESE DE DOUTORADO

**LACASES MARINHAS: EXPRESSÃO HETERÓLOGA, ESTRUTURA E
APLICAÇÃO**

IGOR VINICIUS RAMOS OTERO

Orientadora: Profa. Dra. Lara Durães Sette

Co-orientador: Prof. Dr. Henrique Ferreira

Tese apresentada ao Instituto de Biociências de Rio Claro - UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia).

**Rio Claro/SP
Novembro de 2022**

O871 Otero, Igor Vinicius Ramos
Lacases marinhas: expressão heteróloga, estrutura e aplicação / Igor
Vinicius Ramos Otero. -- Rio Claro, 2022
124 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientadora: Lara Durães Sette
Coorientador: Henrique Ferreira

1. Biotecnologia microbiana. 2. Enzimas microbianas. 3.
Biodegradação. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

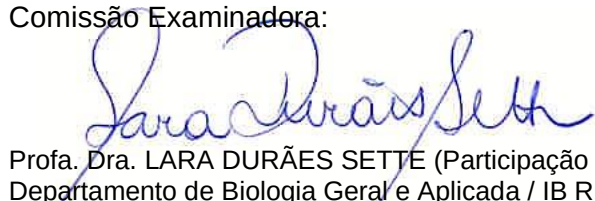
TÍTULO DA TESE: LACASES MARINHAS: EXPRESSÃO HETERÓLOGA, ESTRUTURA E APLICAÇÕES

Título alterado para: "LACASES MARINHAS: EXPRESSÃO HETERÓLOGA, ESTRUTURA E APLICAÇÃO"

AUTOR: IGOR VINICIUS RAMOS OTERO

ORIENTADORA: LARA DURÃES SETTE

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular, Molecular e Microbiologia), área: Estrutura, Função e Produção de Biomoléculas pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. LARA DURÃES SETTE (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Geral e Aplicada / IB Rio Claro



Prof. Dr. FERNANDO ARARIPE GONÇALVES TORRES (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Celular / Universidade de Brasília



Profa. Dra. ELIS MARINA TURINI CLARO (Participação Virtual)
Unoeste / Universidade do Oeste Paulista



Prof. Dr. RENATO NALLIN MONTAGNOLLI (Participação Virtual)
Departamento de Ciências da Natureza, Matemática e Educação / UFSCar

Rio Claro, 24 de novembro de 2022

PREFÁCIO

Faço aqui uma breve introdução a dedicatória do presente trabalho, não por ser obrigado a fazê-la, mas pelo simples desejo de querer eternizá-la.

A dedicatória deste trabalho será direcionada a mulher que mesmo não tendo tido o reconhecimento profissional que merecia, ao me ouvir dizer que gostaria de me tornar um professor, assim como ela, ao invés de me desmotivar, preferiu sugerir que eu seguisse uma carreira de docência que, segundo ela, teria melhores condições de trabalho e desenvolvimento. Encantado com essa nova possibilidade, aceitei a sugestão dela. Então ela, com uma didática impecável, explicou para mim, então uma criança de 12 anos, quais seriam as etapas que eu precisaria percorrer para me tornar um professor universitário. Explicou que depois de me graduar na universidade, eu teria que fazer Mestrado e depois o Doutorado, cursos que ajudariam a me formar e me dariam os títulos necessários para que eu pudesse realizar meu sonho. É verdade que 20 anos depois eu consiga compreender melhor a carreira do magistério superior, e, agora, duvide um pouco sobre esse ser o melhor caminho para a minha vida; mas de qualquer forma, eu me orgulho muito do que eu trilhei até agora. Caminho que eu só enxerguei graças a ela e que eu percorri sempre com o apoio dela. Dessa forma, não poderia ser diferente a dedicatória desta Tese de Doutorado.

DEDICATÓRIA

À mulher que foi minha primeira inspiração profissional;
Minha primeira professora;
Meu apoio incondicional;
Meu maior guia;
Minha mãe.

Elizabete Nunes Ramos

Com amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

A professora Lara Durães Sette, minha orientadora, pela orientação deste trabalho de Doutorado, pelas oportunidades concedidas, pelo acolhimento no LAMAI desde o mestrado, passando pelo treinamento técnico e chegando até o presente momento. Pela amizade nesses oito anos de trabalho, pelo clima leve, pelas palavras de conforto quando necessárias, e, claro, pelas danças, sempre divertidas, durante as confraternizações dos congressos e simpósios Brasil a fora.

Ao professor Henrique Ferreira, meu coorientador, pelas aulas quase que particulares em biologia molecular, pelo acompanhamento do meu projeto, pelo acolhimento no LGB e pela disponibilização de todo espaço e equipamentos de seu laboratório para a realização dos meus experimentos.

Ao professor Volker Sieber, meu supervisor na Alemanha, pelo aceite e acolhimento no CBR durante os 14 meses que passei lá. Pela disponibilização irrestrita de toda estrutura disponível em seus laboratórios, pelo acompanhamento contínuo e orientação do meu projeto, e pela preocupação com meu bem-estar durante a minha estadia no país estrangeiro durante a pandemia de COVID-19.

A Magdalena Halsbeck, por ter atuado como uma verdadeira tutora durante a minha estadia no CBR e ter me ensinado todos os protocolos do Pichia Toolkit, sempre com muita paciência e atenção. Obrigado pela amizade, por me ensinar que comida vegana pode ser deliciosa e por fazer eu me sentir bem-vindo naquele país distante.

A Anja Schmidt e o Christoffer Schilling pelo auxílio com os experimentos de fermentação em biorreatores.

Ao Vivian Willers pelo auxílio com a purificação da LacI.

Ao Samuel Sutiono, Samed Güner e Alexander Fuchs pelo auxílio com os experimentos de cinética e caracterização da LacI, pela amizade, e pelas melhores cervejas que eu já experimentei na vida!

A Lara Santello, Elisa Pelizzer, Adriano Uemura e Patricia Giovanella pelo auxílio com os experimentos de GC-MS e FTIR, pela amizade e parceria de sempre.

A Livia Brenelli pelos dados de genoma do *Peniophora* sp. CBMAI 1063 e a Milene Ferro pelo auxílio com as análises de bioinformática.

Às demais técnicas da Bioquímica, Fátima Neves e Carmen Casonato, pelo suporte técnico e auxílio durante todo o doutorado.

A Angela Scatolin e ao Felipe Marchi pelo auxílio técnico envolvendo as burocracias do Departamento e do Programa de Pós-Graduação. Bem como a Elisabeth Aichner, secretária do CBR, que me ajudou não só com as questões da TUM, como também da imigração.

Às minhas alunas Mariana Pupo, Vanessa Lourenço e aos meus alunos Eduardo Paes e Daniel Dovigo pelo auxílio com os experimentos, pela amizade e convivência, e por me formarem continuamente como orientador.

Aos grupos de pesquisa LAMAI, LGB, CBR e LabQuim, incluindo todos os seus integrantes atuais e todos aqueles que já seguiram por outros caminhos, mas que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho. Obrigado também pela convivência, pelas conversas e pela amizade, trabalhar ao lado de vocês foi uma honra e uma satisfação enorme.

A todos os amigos e amigas da Bioquímica e da Unesp, bem como os de Rio Claro, Campo Grande/MS e Straubing-DE. Não irei citar nomes sob o risco de esquecer algum, mas saibam que tenho cada um de vocês no meu coração e que vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho, sempre me motivando e me animando a continuar. Amo vocês.

À senhora Ellen Limmer, que me recebeu em sua casa durante os 14 meses que passei em Straubing. Obrigado pela acolhida, pelos almoços, pelas tardes de chá e pelos passeios no centro antigo da cidade.

À minha família, que é a base de tudo e sempre será o meu porto seguro. Obrigado por tudo! Amo vocês.

Ao Lucas Miotelo, que acompanha este trabalho desde a escrita do projeto, que passou comigo todas as frustrações e todos os momentos difíceis, sempre me motivando, oferecendo apoio e me incentivando a seguir em frente. Por ter suportado a barra do distanciamento por 14 meses durante o meu estágio no exterior, mas também por ter celebrado comigo cada resultado e cada conquista. Obrigado por tudo, amo você.

Às agências de fomento que financiaram o meu projeto de pesquisa e o meu trabalho.
Processo nº 2018/12098-9, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Processo nº 170714/2017-9.
O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A todos aqueles e aquelas que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação e realização deste trabalho, e, que por ventura eu tenha esquecido de mencionar aqui, meu muitíssimo obrigado.

RESUMO

Lacases de origem marinha podem oxidar diferentes compostos fenólicos e aminícos, além de apresentar boa termoestabilidade e tolerância a sais. A expressão heteróloga de lacases pode ser uma estratégia vantajosa para obter essas enzimas em larga escala, facilitando os processos de purificação, minimizando custos e otimizando o tempo de produção. Diferentes variáveis moleculares e metabólicas podem interferir na expressão heteróloga de lacases. Portanto, é necessário utilizar sistemas de expressão que possibilitem a análise dessas variáveis em menos tempo e com mais eficiência. No presente estudo, a lacase codificada pelo gene *Pnh_Lac1* (Lac1) do fungo marinho *Peniophora* sp. CBMAI 1063 foi selecionada para expressão em *Pichia pastoris* utilizando o sistema Pichia Toolkit. Promotores constitutivos (n=5) e indutivos (n=3) foram avaliados em associação com diferentes peptídeos sinal (n=21) quanto à sua eficiência na produção da Lac1. A influência da *his-tag* na produção da Lac1 também foi avaliada. Após a seleção da variante com melhor construção molecular, diferentes condições de cultivo foram testadas, visando selecionar as melhores condições para expressão da enzima heteróloga. Posteriormente, a Lac1 foi purificada e caracterizada. Os promotores pGAP e pAOX1 apresentaram o melhor desempenho nas bibliotecas constitutivas e indutivas, respectivamente. A associação com o sinal peptídico α -amilase- α MFA foi mais eficiente para ambos os promotores. A expressão constitutiva da Lac1 teve uma produção 1,37 vezes maior que a expressão induzida por pAOX1. A variante 117 foi selecionada para otimização das condições de cultivo. Temperatura (18 °C) e pH (6) foram as variáveis que mais influenciaram a expressão heteróloga de Lac1. A lacase heteróloga apresentou tamanho aproximado de 72 kDa com alta afinidade para siringaldazina e ABTS, atividade ótima a 60 °C e pH 3 com boa termoestabilidade ($T_{50}^{lh} = 56$ °C). Lac1 foi inibida por seus inibidores convencionais, mas apresentou grande tolerância a íons metálicos. Apesar de sua origem marinha, Lac1 não apresentou alta tolerância ao NaCl. Sob baixa concentração enzimática, condições não ótimas e na presença de mediadores, a Lac1 foi capaz de descolorir corantes sintéticos de diferentes classes, com excelente desempenho na descoloração do corante índigo carmim (93% após 2h de incubação). Experimentos em Erlenmeyer com o corante preto reativo 5 demonstraram a habilidade da enzima em descolorir 62% do corante após 36h de incubação, na presença do mediador siringaldeído. Análises de metabólitos em GC-MS revelaram a habilidade do LMS na degradação do corante tóxico em moléculas menores e menos recalcitrantes. Contudo, análises de toxicidade revelaram que a degradação do corante preto reativo 5 pela Lac1 na presença de siringaldeído, pode resultar em compostos com toxicidade ainda elevada. Até o momento, este é o primeiro caso da utilização de um Toolkit para a expressão heteróloga de uma lacase em *P. pastoris*. Os resultados obtidos neste estudo contribuem para o desenvolvimento da biotecnologia marinha mostrando o potencial da Lac1 para aplicação biotecnológica em processos de descoloração/degradação de corantes sintéticos em diferentes temperaturas, bem como na presença de íons metálicos e solventes.

Palavras-chave: Biotecnologia microbiana, enzimas microbianas, biodegradação.

ABSTRACT

Marine-derived laccases can oxidize different phenolic and amine compounds, in addition to showing good thermostability and salt tolerance. The heterologous expression of laccases can be an advantageous strategy to obtain these enzymes on a large scale, increasing the time of purification processes, minimizing the cost, and optimizing downstream processing. Different molecular and metabolic variables can interfere with the heterologous expression of laccases. Therefore, it is necessary to use expression systems that allow the analysis of these variables in less time and more efficiently. In the present study, the laccase encoded by the *Pnh_Lac1* (Lac1) gene from the marine fungus *Peniophora* sp. CBMAI 1063 was selected for expression in *Pichia pastoris* using the Pichia Toolkit system. Constitutive (n=5) and inducible (n=3) promoters were evaluated in association with different signal peptides (n=21) for their efficiency in producing Lac1. The influence of his-tag on Lac1 production was also evaluated. After the selection of the variant with the best molecular construction, different culture conditions were tested, aiming to select the best conditions for the expression of the heterologous enzyme. Subsequently, Lac1 was purified and characterized. The pGAP and pAOX1 promoters showed the best performance in constitutive and inducible libraries, respectively. The association with the α -amylase- α MFA signal peptide was more efficient for both promoters. The constitutive expression of Lac1 had a production 1.37 times greater than the expression induced by pAOX1. Variant 117 was selected to optimize the culture conditions. Temperature (18 °C) and pH (6) were the variables that most influenced the heterologous expression of Lac1. The heterologous laccase had an approximate size of 72 kDa with high affinity for syringaldazine and ABTS, optimal activity at 60 °C and pH 3 with good thermostability ($T_{50}^{lh} = 56$ °C). Lac1 was inhibited by its conventional inhibitors but showed great tolerance to metal ions. Despite its marine origin, Lac1 did not show high tolerance to NaCl. Under low enzyme concentration, non-optimal conditions, and in the presence of mediators, Lac1 was able to decolorize synthetic dyes of different classes, with excellent performance in decolorizing the indigo carmine dye (93% after 2h of incubation). Experiments in Erlenmeyer flasks with the reactive black 5 dye demonstrated the enzyme's ability to decolorize 62% of the dye after 36h of incubation, in the presence of syringaldehyde. Analysis of metabolites using GC-MS revealed the ability of the LMS to degrade the toxic dye into smaller and less recalcitrant molecules. However, toxicity analyses revealed that the degradation of the reactive black 5 by Lac1 in the presence of syringaldehyde, can result in compounds with still high toxicity. To date, this is the first time that a Toolkit is been used for the heterologous expression of laccase in *P. pastoris*. The results obtained in this study contribute to the development of marine biotechnology showing the potential of Lac1 for biotechnological application in the decolorization/degradation processes of synthetic dyes at different temperatures, as well as in the presence of metal ions and solvents.

Keywords: Microbial biotechnology, microbial enzymes, biodegradation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Estrutura das lacases fúngicas	3
2.2 Capacidade catalítica das lacases.....	5
2.3 Mediadores sintéticos e naturais de lacases presentes em reações do tipo 2	7
2.4 Características gerais de lacases fúngicas.....	7
2.5 Ocorrência natural de lacases.....	9
2.6 O fungo <i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063 e a produção de lacases marinhas	10
2.7 Expressão heteróloga de lacases.....	12
2.8 Novas tecnologias para a expressão heteróloga de lacases	16
2.9 Aplicação das lacases	18
3. OBJETIVOS GERAIS	25
3.1 Objetivos específicos	25
4. CAPÍTULO I. CARACTERIZAÇÃO DOS NOVOS GENES DE LACASE DO BASIDIOMICETO DE ORIGEM MARINHA <i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063 E ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA	26
5. CAPÍTULO II. UTILIZAÇÃO DO PICHIA TOOLKIT PARA A EXPRESSÃO DA LACASE DE ORIGEM MARINHA Pnh_Lac1 (Lac1)	43
6. CAPÍTULO III. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA LACASE MARINHA LAC1	73
7. CAPÍTULO IV. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA LAC1 NA BIORREMEDIAÇÃO DE CORANTES SINTÉTICOS	87
8. CONCLUSÕES GERAIS.....	109
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111

1. INTRODUÇÃO GERAL

As lacases (EC 1.10.3.2) são enzimas multicobre-oxidases capazes de oxidar centenas de compostos fenólicos e não fenólicos. Devido a versatilidade, essas enzimas possuem potencial de aplicação em diferentes setores industriais e ambientais, e vêm sendo continuamente exploradas pelo campo da ciência que busca alternativas mais sustentáveis e menos prejudiciais ao ambiente, quando comparado ao uso de reagentes químicos, muitas vezes derivados de recursos não renováveis.

A busca por novos recursos genéticos impulsionou a prospecção de micro-organismos derivados do ambiente marinho. Baseado na hipótese de que as enzimas produzidas por tais micro-organismos possuem propriedades para aplicação biotecnológica distintas das produzidas pelos micro-organismos terrestres (e.g.: resistência a condições salinas), o fungo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063, isolado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa, vem sendo explorado quanto à sua aplicação em diferentes processos, incluindo a produção de enzimas ligninolíticas e a descoloração, degradação e destoxificação de poluentes ambientais como os hidrocarbonetos derivados do petróleo e os corantes têxteis.

Considerado como um excelente produtor de lacases, o basidiomiceto *Peniophora* sp. CBMAI 1063 apresenta uma família multigênica de lacases, capaz de produzir diferentes proteoformas da enzima. A proteoforma Lac1, codificada pelo gene *Pnh_Lac1*, é a lacase mais secretada pelo fungo marinho em meio de cultivo salino, fazendo dela uma forte candidata para estudos de aplicação biotecnológica. Apesar de ser vasto o número de lacases terrestres, purificadas e caracterizadas, ainda são escassos os estudos desse tipo com enzimas derivadas do ambiente marinho, as quais podem apresentar novas propriedades.

Uma das grandes vantagens da expressão heteróloga de proteínas é a possibilidade de manipulação genética das mesmas, possibilitando a inserção de características favoráveis para o processo de obtenção, como a inserção de caudas que facilitam o processo de purificação de enzimas heterólogas. A levedura *Komagataella phaffii*, também conhecida como *Pichia pastoris*, é um dos hospedeiros de expressão heteróloga mais utilizados para expressão de enzimas eucarióticas, devido a diversas vantagens sobre outros tipos de hospedeiros.

Contudo, há muitas variáveis que podem interferir no sucesso da expressão de uma lacase heteróloga, algumas dessas variáveis estão relacionadas aos processos de regulação da expressão, enquanto outras estão relacionadas as condições de cultivo da levedura hospedeira. Visando obter

o melhor arranjo molecular para a expressão mais eficiente de proteínas heterólogas por *P. pastoris*, um sistema modular capaz de combinar diferentes fatores de regulação e montar bibliotecas de expressão com essas diferentes combinações foi criado, e chamado de Pichia Toolkit.

No presente estudo, o Pichia Toolkit foi utilizado para expressar o gene *Pnh_Lac1* que codifica uma lacase do fungo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063. Diferentes regiões controladoras da expressão foram avaliadas em todas as combinações possíveis. As condições de cultivo para a expressão da Lac1 pela melhor variante foram otimizadas. A Lac1 foi então purificada, caracterizada e aplicada em processos de descoloração, degradação e destoxificação de corantes têxteis, bem como de outros tipos de corantes sintéticos.

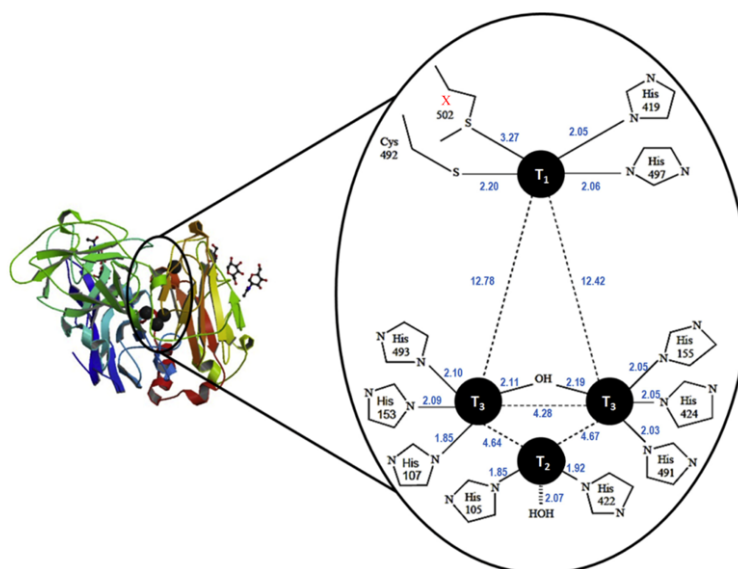
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Estrutura das lacases fúngicas

As lacases (sinônimos: Benzenediol: oxigênio-oxirredutase; p-Difenol oxidase; Urishiol oxidase) são enzimas glicosiladas (glicoproteínas), geralmente monoméricas, pertencentes ao grupo das multicobre oxidases (MCOs), as quais estão amplamente distribuídas na natureza (RIVERA-HOYOS et al., 2013).

Assim como outras MCOs, a principal característica estrutural das lacases é a presença de íons de cobre em seu sítio ativo. No caso dessas enzimas, quatro íons formam dois arranjos altamente conservados, que formam dois clusters. O cluster mononucleado é formado por um cobre tipo 1 (T1), coordenado por dois resíduos de histidina, um de cisteína e um resíduo variável (que pode ser metionina, leucina ou fenilalanina). Enquanto o cluster trinucleado é formado por um cobre tipo 2 (T2), e dois cobres tipo 3 (T3), todos eles coordenados por resíduos de histidina como demonstrado na figura 1. A classificação dos íons de cobre nas lacases em três tipos diferentes (T1, T2 e T3), se deve ao fato desses íons apresentarem características físico-químicas singulares, que os diferenciam entre si (CLAUS, 2004).

Figura 1. Representação do sítio ativo de uma lacase fúngica contendo o cluster mononucleado acima e o cluster trinucleado abaixo. O “X” vermelho no cluster mononucleado representa o resíduo variável que pode ser metionina, leucina ou fenilalanina (figura adaptada de Rivera-Hoyos et al., 2013). T1: Cobre tipo 1. T2: Cobre tipo 2. T3: dupla de íons de cobre tipo 3.



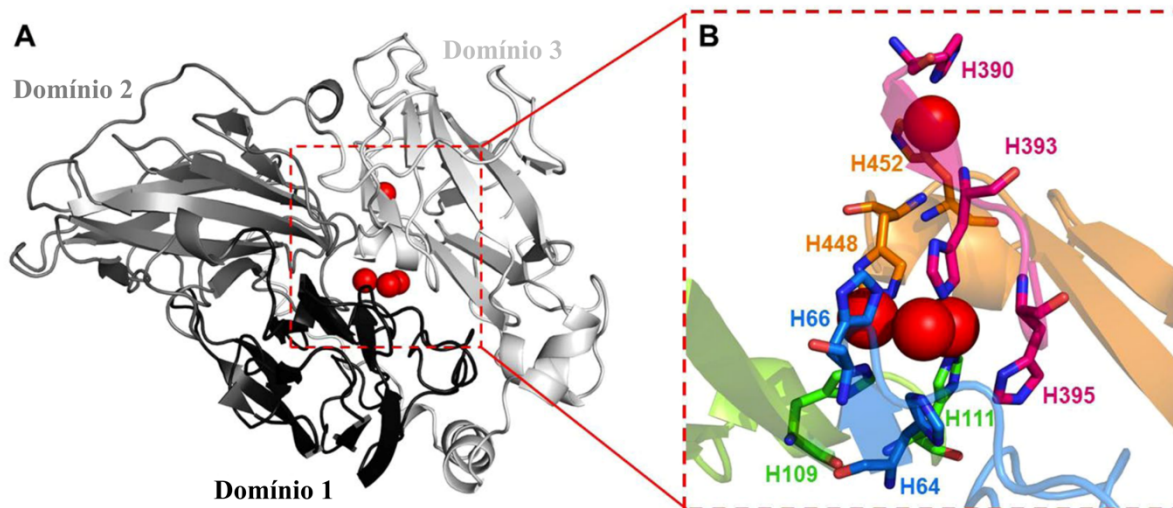
Os 12 resíduos de aminoácidos que coordenam os íons de cobre em lacases fúngicas estão distribuídos em quatro regiões altamente conservadas, chamadas de L1, L2, L3 e L4 (figura 2). Também estão presentes nessas regiões os resíduos responsáveis pela ligação do substrato a enzima, muito embora, com maior variabilidade (MEHRA et al., 2018). De acordo com Kumar et al. (2003), a presença dessas quatro regiões configura uma marca molecular exclusiva de lacases fúngicas. Logo, a identificação de novos genes/proteoformas pode ser feita pela identificação direta dessas regiões.

Figura 2. Alinhamento da cadeia polipeptídica de diferentes lacases fúngicas (*Agaricomycetes*), apresentando os resíduos presentes nas regiões conservadas L1, L2, L3 e L4. TvL1KYA: *Trametes versicolor* KYA. TvL1GYC: *Trametes versicolor* GYC. R1G1V10: *Rigidoporus lignosus*. CcL1A65: *Cantharellus cinereus*. LtL2QT6: *Lentinus tigrinus*, TtL2HRG: *Trametes trogii*. Figura adaptada de Giardina et al., (2010).

Enzima	L1	L2	L3	L4
TvL1KYA	⁶⁴ HWHGFFQKGTNWADGPAFINQCPI	¹⁰⁴ GTFWYHSHLSTQYCDGLRGPF	³⁹⁵ HPFHLHGH	⁴⁴⁷ GPWFLHCHIDFHLEAGFAVVF
TvL1GYC	⁶⁴ HWHGFFQAGTNWADGPAFVNQCPI	¹⁰⁴ GTFWYHSHLSTQYCDGLRGPF	³⁹⁵ HPFHLHGH	⁴⁴⁷ GPWFLHCHIDFHLEAGFAIVF
R1G1V10	⁶⁴ HWHGFFQAGTTEMDGPAFVNQCPI	¹⁰⁴ GTWYHSHLSTQYCDGLRGAF	³⁹⁶ HPFHLHGH	⁴⁴⁶ GPWFLHCHIDWHLEAGLAVVF
CcL1A65	⁶⁴ HWHGLFQRTNWADGADGVNQCPI	¹⁰⁴ GTFWYHSHFGTQYCDGLRGPM	³⁹⁵ HPFHLHGH	⁴⁴⁶ GPWFFHCHIEFHLMNGLAIVF
LtL2QT6	⁶⁴ HWHGFFQKGTNWADGPAFINQCPI	¹⁰⁴ GTFWYHSHLSTQYCDGLRGPF	³⁹⁴ HPFHLHGH	⁴⁴⁶ GPWFLHCHIDFHLDAGFAVVM
TtL2HRG	⁶⁴ HWHGFFQHGTNWADGPAFVNQCPI	¹⁰⁴ GTFWYHSHLSTQYCDGLRGPI	³⁹⁴ HPFHLHGH	⁴⁴⁴ GPWFLHCHIDFHLEAGFAVVM

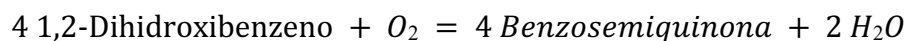
Quanto à estrutura tridimensional, as lacases fúngicas apresentam três domínios, chamados de copredoxina (do inglês *cupredoxin domains*), fortemente arranjados por duas pontes dissulfeto, bem como por outras interações intramoleculares (DESKA; KOŃCZAK, 2019; DWIVEDI et al., 2011). Cada um dos três domínios apresenta topologia de chave grega com simetria do tipo barril beta (figura 3A), muito semelhante a outras MCOs, como a ascorbato oxidase (GIARDINA et al., 2010; MEHRA et al., 2018). Assim como nas lacases de plantas, os domínios 1 e 3 é que guardam as quatro regiões conservadas (L1, L2, L3 e L4), que não só coordenam os íons de cobre (figura 3B), como também formam o sítio de ligação ao substrato (domínio 3).

Figura 3. Domínios de copredoxina de uma lacase marinha com a indicação dos sítios de ligação aos íons de cobre. **A:** Os três domínios de copredoxina da Lac1 do fungo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063. Os domínios estão apresentados graficamente em tons de cinza e preto (estrutura tridimensional obtida por modelagem *in silico* baseada na estrutura de lacases filogeneticamente mais próximas, depositadas no *Protein Data Bank* (PDB) do NCBI). **B:** Destaque do sítio ativo com os resíduos de histidina que coordenam os quatro íons de cobre na enzima. Regiões conservadas estão apresentadas em cores diferentes: L1 (azul), L2 (verde), L3 (magenta) e L4 (laranja). Figura adaptada do trabalho de Brenelli et al., (2019).



2.2 Capacidade catalítica das lacases

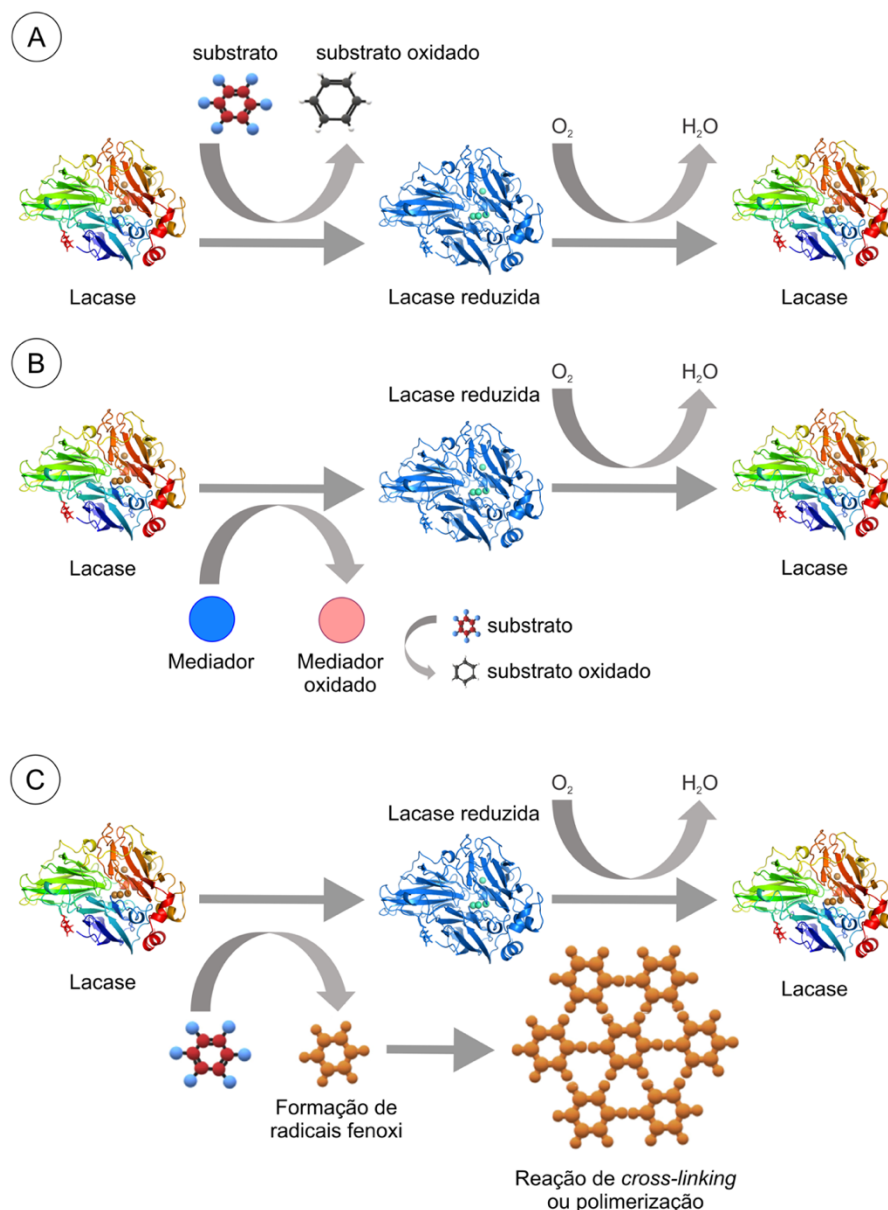
Por definição, as lacases são oxidases com atividade catalítica sobre difenóis e compostos derivados (EC 1.10.3.2), com uma reação geral definida como:



Essas enzimas promovem a oxidação de até quatro substratos e utilizam oxigênio molecular como aceptor final de elétrons, reduzindo-o a H_2O ao final do processo. Com elevada plasticidade e baixa afinidade, as lacases são capazes de oxidar mais de 200 tipos diferentes de substratos, entre eles compostos aromáticos, compostos não fenólicos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, aminas alifáticas e aromáticas (RIVA, 2006; XU et al., 2019). Assim, as lacases catalisam a remoção de um elétron e um próton de grupos hidroxila em fenóis (-OH) ou amina aromático para formar radicais fenóxi livres ou radicais amino, respectivamente. De acordo com Leonowicz et al. (2001), as lacases fúngicas não só oxidam os ácidos fenólicos e metoxifenólicos, como também são capazes de descarboxilar esses compostos (AGEMATU et al., 1993) ao atacarem seus grupos metoxila promovendo a desmetilação ou a desmetoxilação.

De acordo com Deska; Konczac (2019) a atividade catalítica de lacases pode ser classificada em três tipos. Tipo 1: oxidação direta de compostos fenólicos e seus derivados (com substituições incluindo grupos funcionais amina, carboxil, metoxi ou sulfônico); sem o auxílio de mediadores (figura 4A). Tipo 2: oxidação indireta de compostos fenólicos e não-fenólicos, na presença de mediadores (figura 4B). Tipo 3: formação de radicais reativos que promovem o acoplamento e/ou a polimerização dos produtos de oxidação da enzima (figura 4C).

Figura 4. Esquema ilustrativo dos três tipos de reações catalisadas por lacases. A: reação do tipo 1. B: reação do tipo 2. C: reação do tipo 3. Fonte: próprio autor.



2.3 Mediadores sintéticos e naturais de lacases presentes em reações do tipo 2

Nas reações do tipo 2 as lacases oxidam primeiramente uma molécula, geralmente, de baixa massa molecular que atua como mediadora oxidativa, e essa então promove a oxidação do substrato (RIVA, 2006). A utilização de mediadores é muito útil para a oxidação de substratos com alta massa molecular (incapazes de se ligar ao sítio de ligação do substrato na enzima) e/ou com elevado potencial redox (DESKA; KOŃCZAK, 2019). Diferentes compostos sintéticos e naturais podem ser utilizados como mediadores oxidativos de lacases. Entre os mediadores sintéticos mais utilizados podemos destacar: o hidroxibenzotriazol (HBT), o ácido hidroxiantranílico (HAA), o ácido siríngico, o 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil (TEMPO), e o sal de diamônio 2,2'-azino-bis [ácido 3-etilbenztiazolina-6-sulfônico] (ABTS) (DESKA; KOŃCZAK, 2019).

Além dos mediadores sintéticos, foi descoberto que diferentes moléculas de baixa massa molecular, derivadas da degradação da lignina, podem atuar como mediadores oxidativos de lacases fúngicas. Entre esses mediadores naturais estão a acetosiringona, a siringaldazina (SYR), o siringaldeído (SHD); e alguns ácidos orgânicos, como o ácido verátrico, o ácido p-cumárico e o ácido ferúlico (CAÑAS; CAMARERO, 2010).

No campo da biotecnologia, os processos que utilizam mediadores oxidativos, sintéticos ou naturais, envolvendo lacases, são denominados sistema mediador de lacase (do inglês *laccase mediator system* - LMS).

2.4 Características gerais de lacases fúngicas

Lacases fúngicas típicas apresentam tamanho médio entre 60 e 70 kDa, mas dependendo do filo (Ascomycota ou Basidiomycota) ou mesmo da espécie, os tamanhos em gel de SDS-Page podem variar entre 43 e 100 kDa (BALDRIAN, 2005). Apesar da grande maioria das lacases fúngicas serem monoméricas (ou seja, formadas por um único monômero), alguns fungos podem apresentar lacases homodiméricas, como os basidiomicetos *Pleurotus pulmonarius* (dE SOUZA; PERALTA, 2003) e *Trametes villosa* (YAYER; GOLIGHTLY, 1996). Quanto à função celular em fungos, a maior parte das lacases já descritas são enzimas extracelulares que constituem o coquetel enzimático com função ligninolítica; secretadas diretamente no meio visando a quebra da lignina e o alcance da celulose e hemicelulose. No entanto, análises *in silico* e *in vitro* indicam a existência de proteoformas dessas enzimas com atividade intracelular (WANG et al., 2015). No estudo reportado por Palmieri et al. (2000), análises do extrato intracelular do fungo *Pleurotus ostreatus*

cultivado previamente na presença de cobre, indicou a presença de uma lacase intracelular com atividade para o ABTS.

Com uma plasticidade catalítica muito grande, as lacases podem ser consideradas enzimas promíscuas (AHARONI et al., 2005), contudo, isso não significa que a mesma enzima terá a mesma afinidade (K_M) por todos os substratos. Considerando os substratos mais utilizados em estudos de cinética enzimática (ABTS, SYR, Guaiacol e o 2,6-dimetoxifenol (DMP)), os valores obtidos para K_M de uma mesma enzima para esses diferentes substratos podem variar significativamente (BALDRIAN, 2005). Por exemplo, a lacase do fungo ectomicorrízico *Telephora terrestres* apresentou valores de K_M iguais a 121, 16 e 3 μM para os substratos guaiacol, ABTS e SYR, respectivamente; indicando maior afinidade pelo substrato siringaldazina (KANUNFRE; ZANCAN, 1998). De modo similar, a lacase do fungo comestível *Agaricus subrufescens* (syn: *A. blazei*), apresentou K_M igual a 4307, 1026, 63 e 4 μM para os substratos guaiacol, DMP, ABTS e SYR, respectivamente, ou seja, com uma afinidade 1000 vezes maior para a siringaldazina em relação ao guaiacol (ULLRICH et al., 2005).

Diferentes compostos já foram descritos como inibidores de lacases fúngicas, entre eles podemos destacar a azida (NaN_3) e o fluoreto de sódio (NaF), os quais também são inibidores de outras MCOs e parecem interferir no transporte de elétrons que ocorre entre os íons de cobre no sítio ativo dessas enzimas; outros inibidores, como ditiotreitol, ácido tioglicólico e L-cisteína também foram descritos como capazes de prejudicar a atividade enzimática de lacases (ALI et al., 2020a; BALDRIAN, 2005). Devido ao potencial de aplicação das lacases, a sensibilidade a íons metálicos também precisa ser avaliada. Enquanto algumas lacases apresentam elevada tolerância a metais pesados (ASADI; MAKHDOUMI; ASOODEH, 2020; D'SOUZA-TICLO; SHARMA; RAGHUKUMAR, 2009), outras podem ser altamente sensíveis (ALI et al., 2020b; NAGAI et al., 2002).

Quanto ao pH ótimo de atividade, as lacases fúngicas tendem a apresentar melhor atividade em pH ácido, com pico geralmente entre 4 e 6, e perfil de atividade em função do pH em formato de sino. Contudo, os valores de pH ótimo podem variar para uma mesma enzima dependendo do tipo de substrato analisado. Além disso, a Lcc9 de *Coprinopsis cinerea* submetida a estudos de evolução dirigida passou a apresentar um pico de atividade em pH 8 e 8,5 para os substratos guaiacol e DMP, respectivamente; indicando que estudos de engenharia genética podem ampliar o potencial de aplicação de lacases fúngicas para ambientes mais alcalinos (YIN et al., 2019).

A respeito da influência da temperatura na atividade das lacases fúngicas, essas enzimas tendem a apresentar um perfil termofílico, com atividade ótima em torno dos 60 °C. Curiosamente a maior parte das lacases já purificadas e caracterizadas são produzidas por fungos mesofílicos (BALDRIAN, 2005). O que de certa forma, explica o fato da estabilidade dessas lacases serem maior em temperaturas mais amenas (25-35°C) e menor próxima ao pico de atividade. Com exceção para lacases produzidas por fungos termofílicos, como a do ascomiceto *Melanocarpus albomyces* capaz de manter 50% da atividade ótima após 50h de incubação a 50 °C (KIISKINEN; VIIKARI; KRUUS, 2002).

2.5 Ocorrência natural de lacases

Isoladas e descritas inicialmente a partir da planta *Rhus vernicifera*, as lacases também são encontradas em insetos, bactérias e fungos (RIVERA-HOYOS et al., 2013). Nesses organismos elas catalisam reações de oxi-redução relacionadas a diferentes processos fisiológicos como esclerotização da cutícula em insetos, polimerização de pigmentos na formação de esporos em bactérias, formação da parede celular em plantas, e deslignificação do substrato vegetal por fungos (GIARDINA et al., 2010; RIVA, 2006). Contudo, as lacases têm sido majoritariamente estudadas em fungos da chamada decomposição branca, devido a alta taxa de produção dessas enzimas, bem como a facilidade de obtenção (enzimas secretadas diretamente no meio de cultivo) (BALDRIAN, 2005; RIVERA-HOYOS et al., 2013).

O termo fungo de decomposição branca (do inglês *white-rot fungi*) diz respeito ao tipo de degradação que esses fungos promovem no material lignocelulósico, removendo a lignina e deixando o material vegetal (madeira) com aspecto esbranquiçado e textura fibrosa (ABDEL-HAMID; SOLBIATI; CANN, 2013). Apesar de não ser uma característica exclusiva, a classe com maior prevalência de fungos de decomposição branca são os Agaricomycetos (FLOUDAS et al., 2012; NAGY et al., 2015). Dentre as 17 ordens da classe Agaricomycetos, podemos destacar a ordem Russulales, que contava até 2008 com cerca de 12 famílias (KIRK et al., 2008). De acordo com o estudo filogenético de genomas realizado por Nagy et al. (2015), Russulales se apresenta como grupo irmão de Agaricales, Polyporales e Corticiales (os três com origem monofilética), e assim como eles, os membros dessa ordem também apresentam a habilidade de degradação da lignina, promovendo a decomposição branca com o auxílio de peroxidases, lacases e outras enzimas auxiliares.

Outra característica presente em Russulales e em outros agaricomycetos é a presença de famílias multigênicas de lacase (MOISEENKO et al., 2016), capazes de expressar diferentes proteoformas da enzima com características bioquímicas e moleculares distintas umas das outras (GIARDINA et al., 2010; OTERO et al., 2017; WANG et al., 2015).

O gênero *Peniophora*, pertencente à família Peniophoraceae (ordem Russulales), conta com espécies terrestres e marinhas capazes de produzir grandes quantidades de lacase (MAINARDI et al., 2018), bem como expressar/secretar diferentes proteoformas da enzima (FONTES et al., 2021; MOISEENKO et al., 2016).

2.6 O fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 e a produção de lacases marinhas

O basidiomiceto de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 (figura 5) foi isolado da esponja marinha *Amphimedon viridis*, coletada na região de São Sebastião no litoral norte do Estado de São Paulo (MENEZES et al., 2010). Esse fungo vem sendo explorado pelo grupo de pesquisa liderado pela professora Lara Durães Sette tanto para produção de enzimas ligninolíticas, quanto para a avaliação do potencial de biorremediação de poluentes ambientais, incluindo corantes têxteis em ambientes salinos e não salinos.

Figura 5. O fungo derivado do ambiente marinho *Peniophora* sp. CBMAI 1063, cultivado em ágar malte 2%. Fonte: próprio autor.



De acordo com Bonugli-Santos; Durrant e Sette (2012), o fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 foi capaz de descolorir 100 % de corante Remazol azul brilhante R (RBBR) após cinco dias de incubação. Além disso, o fungo foi capaz de descolorir 94% do corante Preto reativo 5 após três

dias de cultivo em condição otimizada, sem gerar compostos mutagênicos durante o processo (BONUGLI-SANTOS et al., 2016). Nesse último caso, a salinidade foi fundamental para otimização do processo de descoloração e degradação.

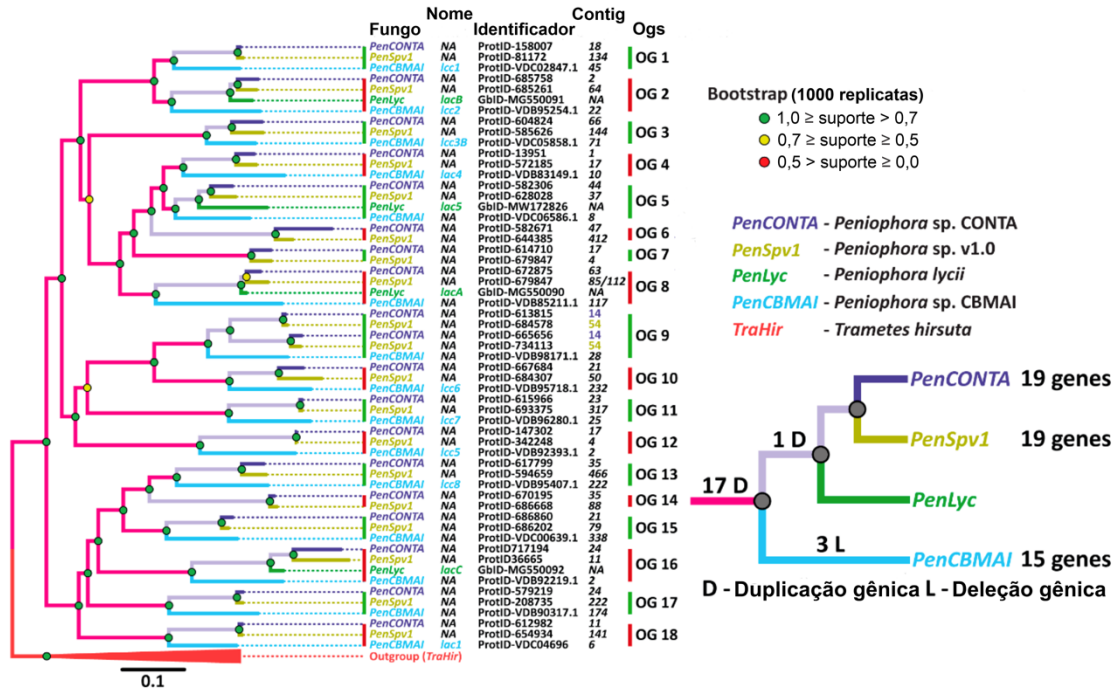
O fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 também foi descrito como bom produtor de enzimas ligninolíticas, principalmente lacases (BONUGLI-SANTOS; DURRANT; SETTE, 2010). O processo de produção de lacases por esse basidiomiceto marinho foi otimizado e um pedido de patente foi solicitado ao Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) sob registro INPI BR: 1040140085025. Em meio otimizado, o fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 foi capaz de produzir em escala de biorreator 2.800 UL^{-1} de lacase em apenas 5 dias (MAINARDI et al., 2018).

Análises de transcriptoma demonstraram que assim como outros basidiomicetos de decomposição branca, *Peniophora* sp. CBMAI 1063 também apresenta uma família multigênica de lacases (OTERO et al., 2017). Estudos complementares, analisando o genoma, transcriptoma e proteoma deste fungo, revelaram que a lacase mais secretada no meio otimizado é a Lac1, codificada pelo gene *Pnh_Lac1* (BRENELLI et al., 2019).

De acordo com Bonugli-Santos et al. (2015) enzimas produzidas por fungos derivados do ambiente marinho apresentam grande potencial para exploração biotecnológica devido à possibilidade dessas enzimas apresentarem características diferentes comparadas às equivalentes produzidas por fungos terrestres. Dentre essas características podemos destacar a elevada tolerância a sais, boa termoestabilidade, atividade sob baixas temperaturas e pressão elevada (no caso de fungos originários de alta profundidade).

Até o presente momento, poucos estudos comparativos entre lacases marinhas e terrestres foram realizados (FONTES et al., 2021), contudo, a diferença entre lacases marinhas e terrestres podem ser evidenciadas por análises filogenéticas. Num estudo publicado em 2015 por Passarini e colaboradores (2015), lacases produzidas por ascomicetos marinhos agruparam em um clado separado das lacases produzidas por ascomicetos terrestres. Mais recentemente, Glazunova et al. (2020), analisando genes de lacase de quatro espécies de *Peniophora*, incluindo a espécie CBMAI 1063, demonstrou que as lacases do fungo marinho sempre agrupam separadamente das lacases terrestres (figura 6). Apesar da análise realizada por Glazunova et al. (2020), apresentar uma visão geral sobre as relações evolutivas entre os genes de lacase no gênero *Peniophora*, os autores não se aprofundam no tema e deixam várias lacunas para serem respondidas, principalmente quanto a possível adaptação ao ambiente salino das lacases do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063.

Figura 6. Relações filogenéticas entre lacases de diferentes espécies do gênero *Peniophora*. Os clados que formam grupos ortólogos estão designados como OG. Figura adaptada de Glazunova et al. (2020).



2.7 Expressão heteróloga de lacases

Apesar da boa produção de lacases por fungos filamentosos, a expressão heteróloga dessas enzimas pode otimizar o processo, aumentando significativamente a produção, e diminuindo tempo e demandas nutricionais que os fungos nativos podem apresentar (PISCITELLI et al., 2010). A produção de lacase pelo fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063, por exemplo, é estritamente dependente de água do mar e da suplementação por CuSO_4 (MAINARDI et al., 2018).

Diferentes hospedeiros de expressão heteróloga já foram descritos como capazes de produzir altas taxas de lacases fúngicas e bacterianas, quimicamente ativas. Apesar de plantas e células animais já terem sido utilizadas como hospedeiros para expressão heteróloga de lacases (DITTMER; GORMAN; KANOST, 2009; SAKAMOTO et al., 2008), a presente revisão irá focar apenas em hospedeiros microbianos.

Entre os hospedeiros bacterianos, a bactéria *Escherichia coli* se destaca como o hospedeiro mais utilizado para expressão heteróloga de lacases (IHSEN et al., 2015). Diferentes lacases bacterianas já foram expressas utilizando esse sistema (PISCITELLI et al., 2010), incluindo a CotA de *Bacillus subtilis* (BRISOS et al., 2009), a lacase Tth da bactéria termofílica *Thermus*

thermophilus (MIYAZAKI, 2005) e a lacase derivada do ambiente marinho Ppo da bactéria *Marinomonas mediterranea* (SANCHEZ-AMAT et al., 2001). Contudo, até o presente momento, poucas lacases fúngicas foram expressas utilizando esse hospedeiro (LIU et al., 2019; SALONY et al., 2008; YANG; GU; LIN, 2020), nem sempre com atividade da enzima heteróloga confirmada (SALONY et al., 2008; LIU et al., 2019).

Apesar da facilidade de manipulação, baixo custo e o estabelecimento de protocolos bem definidos para a expressão de diversas enzimas comerciais (KAUR; KUMAR; KAUR, 2018), a utilização de *E. coli* para a expressão heteróloga de lacases fúngicas enfrenta algumas barreiras. As lacases fúngicas são enzimas glicosiladas, com pelo menos duas pontes dissulfeto (uma que liga o domínio 1 ao domínio 2 e outra que liga o domínio 3 ao domínio 1), sendo as bactérias como *E. coli* incapazes de promover tais modificações pós-traducionais, o que acarreta redução da atividade ou mesmo inativação dessas enzimas (ANTOŠOVÁ; SYCHROVÁ, 2016; ROSANO; CECCARELLI, 2014). Além disso, a super expressão de lacases em *E. coli* no meio intracelular, promove a formação de corpos de inclusão (do inglês *inclusion bodies*) insolúveis que demandam processos de renaturação das enzimas (ROSANO; CECCARELLI, 2014; LIU et al., 2019).

Assim como outros eucariotos, leveduras e fungos filamentosos são capazes de realizar modificações pós-traducionais nas proteínas expressas, além de apresentarem a vantagem de secretar as enzimas heterólogas diretamente no meio, e serem passíveis de escalonamento da produção (PISCITELLI et al., 2010). Logo, esses são os sistemas mais utilizados para a expressão de proteínas/enzimas heterólogas de origem eucariótica. A levedura *Komataella phaffii* (sinônimo *Pichia pastoris*) por exemplo, apresenta como diferencial a capacidade de glicosilar proteínas heterólogas com um perfil semelhante ao que é encontrado em proteínas humanas (ATA et al., 2021).

Diferentes fungos filamentosos já foram utilizados como hospedeiros para expressão heteróloga de lacases, entre eles os ascomicetos *Trichoderma reesei* (ZHAO et al., 2018); *Aspergillus oryzae* (de SALAS et al., 2019) e *Aspergillus niger* (MATE; ALCALDE, 2016). Com maior destaque para o sistema baseado em *A. oryzae* que expressa uma lacase comercial utilizada para o tratamento de tecidos em escala industrial (PISCITELLI et al., 2010) e de *A. niger* que já foi utilizado para expressar três lacases de origem marinha (ALI et al., 2020b; WIKKEE et al., 2019).

As vantagens da utilização de fungos filamentosos para a expressão de lacases fúngicas incluem: (1) a maior proximidade evolutiva entre o organismo natural que produz a enzima e o

hospedeiro de expressão (quando comparado a leveduras). O “maquinário” celular e molecular mais semelhante aumentam muito as chances de sucesso na expressão. (2) fungos filamentosos tendem a secretar grandes quantidades de enzima no meio extracelular, com taxas impressionantes que superam os 1000 mg.L⁻¹ de cultivo. Enquanto leveduras, com raras exceções, tendem a apresentar um rendimento bem mais baixo. Talvez o único ponto limitante na expressão heteróloga de lacases em fungos filamentosos seja a falta de ferramentas moleculares (ANTOŠOVÁ; SYCHROVÁ, 2016) que permitam não só o controle fino da expressão como também uma seleção (*screening*) rápida e eficiente; ferramentas essas, já bem estabelecidas tanto para bactérias quanto para leveduras (MATE; ALCALDE, 2015). Em alguns casos, estudos de evolução dirigida e otimização do gene/enzima podem ser primariamente realizados em leveduras e posteriormente transferidos para fungos filamentosos para obtenção de maiores quantidades da lacase “otimizada” (de SALAS et al., 2019).

Por sua vez, leveduras são hospedeiros unicelulares, com rápido crescimento celular e de fácil manipulação genética. Reflexo disso, é a disponibilidade de diferentes sistemas de expressão heteróloga baseados nesses organismos, incluindo a construção da primeira levedura autotrófica capaz de fixar CO₂ do mundo (uma *P. pastoris*) que futuramente poderá servir como mais uma opção de sistema (GASSLER et al., 2020).

Domesticada e utilizada pelo homem há milhares de anos, na fabricação de pães, vinhos e cervejas, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi o primeiro eucarioto a ter seu genoma completamente sequenciado (GELLISSEN; HOLLENBERG, 1997; GOFFEAU et al., 1996), mas muito antes já era considerada um dos melhores modelos eucarióticos de estudo, devido ao vasto conhecimento molecular e fisiológico reunido a cerca dessa levedura nas últimas décadas do século XX (BUCKHOLZ; GLEESON, 1991; GELLISSEN; HOLLENBERG, 1997). Não à toa, a primeira vacina desenvolvida a partir da tecnologia do DNA recombinante, para o combate do vírus da hepatite B em humanos, foi expressa e produzida em *S. cerevisiae* (KARBALAEI; REZAEI; FARSIANI, 2020).

A expressão em *S. cerevisiae*, possibilitou a obtenção, purificação e caracterização de diferentes lacases fúngicas (PISCITELLI et al., 2010), contudo, estudos comparativos demonstraram que a taxa de produção em nesta levedura é muito baixa comparada à produção de lacases em *K. phaffii* (ANTOSOVA; SYCHROVA, 2016). Além disso, outro problema muito comum encontrado em sistemas baseados em *S. cerevisiae* é a hiperglicosilação das lacases

heterólogas, o que pode prejudicar significativamente a atividade da enzima (MAESTRE-REYNA et al., 2015; PISCITELLI et al., 2010). De acordo com Baldrian (2005), a glicosilação em lacases fúngicas heterólogas é o maior fator limitante para obtenção de enzimas quimicamente ativas.

Outro sistema unicelular muito utilizado é baseado na levedura *P. pastoris*. Desde o seu desenvolvimento em 1985 (CREGG et al., 1985), mais de 1000 proteínas e 500 compostos farmacêuticos já foram expressos utilizando essa levedura, incluindo nessa lista dezenas de lacases (ANTOŠOVÁ; SYCHROVÁ, 2016; YANG; ZHANG, 2018).

Dentre as vantagens desse sistema, podemos destacar o rápido crescimento, a elevada expressão da proteína de interesse sob alta densidade celular, a facilidade na manipulação genética, a capacidade de realizar modificações pós-traducionais em proteínas eucarióticas, a disponibilidade de linhagens comerciais com diferentes perfis gênicos, e a habilidade de secretar a proteína de interesse diretamente no meio de cultivo (AHMAD et al., 2014; ANTOŠOVÁ; SYCHROVÁ, 2016; GASSER; MATTANOVICH, 2018).

Capaz de crescer utilizando apenas metanol como fonte de carbono (metilotrofia), *P. pastoris* possui dois genes relacionados com a metabolização desse álcool. Os genes *AOX1* e *AOX2* codificam duas proteoformas da enzima álcool oxidase, que convertem metanol em formaldeído na primeira etapa do processo metabólico de assimilação do carbono (JUTURU; WU, 2018). Na presença de metanol e na ausência de outras fontes de carbono (repressoras), o promotor *pAOX1* é fortemente induzido, possibilitando uma elevada expressão das proteínas de interesse de forma controlada. Considerado muito eficiente, *pAOX1* foi o primeiro promotor utilizado para a expressão heteróloga de proteínas em *P. pastoris* e é até hoje um dos mais utilizados. Bronikowski et al. (2017), reportaram a maior taxa de produção de lacase heteróloga obtida até o momento (1,05 g.L⁻¹), para a lacase 2 de *Moniliophthora roreri*, expressa sob regulação deste promotor.

Devido ao fato de o metanol ser um composto altamente volátil, inflamável e tóxico, a utilização desse álcool como indutor em processos de expressão, demandam estrutura e treinamento específico para a manipulação desse reagente, bem como oferece riscos adicionais ao processo (YANG; ZHANG, 2018). Dessa forma, diferentes promotores constitutivos ou diferentemente induzidos vêm sendo descritos e propostos como alternativas viáveis ao uso do metanol nos processos de expressão (GAO; JIANG; LIAN, 2021; VOGL et al., 2015).

De acordo com Antosova e Sychrova (2016), a escolha do promotor mais adequado é apenas uma das etapas necessárias para a otimização do processo de expressão heteróloga em

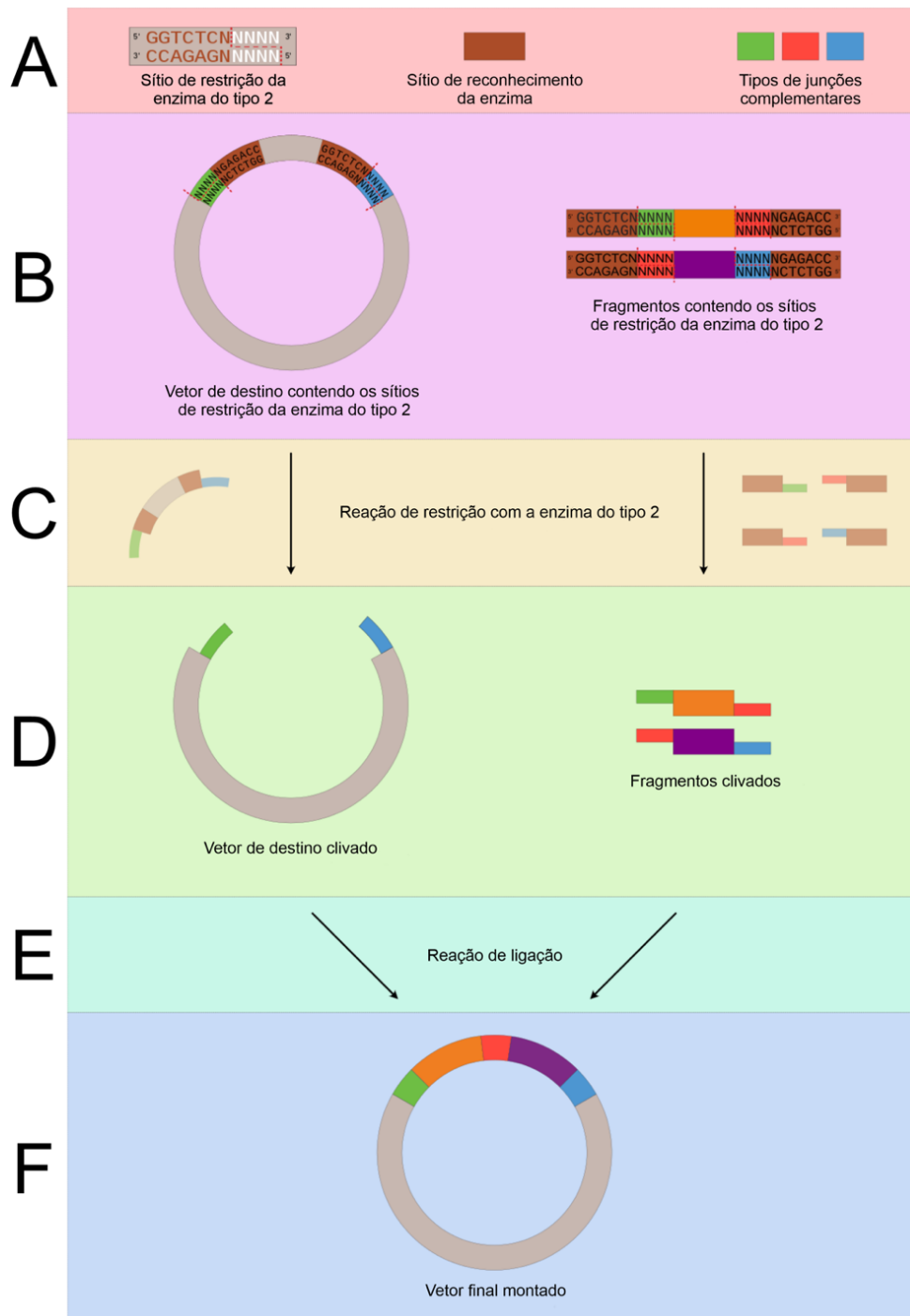
leveduras, contudo, a lista de variáveis capazes de interferir e/ou prejudicar esse processo passa ainda pela escolha da linhagem hospedeira mais adequada, a otimização do códon gênico ou não, a seleção do melhor peptídeo sinal (PS) (que irá coordenar a secreção da enzima no meio); e vai até a adequação das melhores condições de cultivo que a variante com a melhor construção molecular será submetida.

2.8 Novas tecnologias para a expressão heteróloga de lacases

Com tantas variáveis ainda na etapa de construção dos sistemas de expressão, diferentes ferramentas moleculares vêm sendo desenvolvidas, principalmente na área da biologia sintética, visando otimizar os processos de engenharia genética na levedura *P. pastoris* (GAO et al., 2021), bem como em outras leveduras. Com especial atenção a manipulação das regiões controladoras (promotores, peptídeos sinal, e terminadores), diferentes sistemas modulares foram propostos baseados na montagem por Golden gate (do inglês *Golden gate assembly*).

Desenvolvido inicialmente para a bactéria *E. coli* (WEBER et al., 2011) e aplicado com sucesso na levedura *S. cerevisiae* (LEE et al., 2015), a técnica de Golden gate se baseia na atividade das enzimas de restrição do tipo II, que são capazes de clivar fora do sítio de reconhecimento (geralmente 4 a 5 bases adjacentes ao sítio de reconhecimento), possibilitando a criação de junções complementares que se ligam a fragmentos diferentes em cada uma das extremidades do fragmento de DNA recombinante (LEBEDENKO et al., 1991). Imaginem que o promotor, o peptídeo sinal e o gene de interesse precisam ser clonados num mesmo vetor de expressão (*backbone*) exatamente nessa ordem. O vetor é criado com dois sítios de restrição para a mesma enzima do tipo II, mas com junções diferentes para a inclusão do cassete de expressão, nesse exemplo, uma das extremidades irá se ligar ao promotor (na porção 3') e a outra ao gene de interesse (na porção 5'). Todos os fragmentos são criados de forma semelhante, com cada uma das pontas desenhadas para se ligar a partes diferentes, mas sequenciais. A figura 7 ilustra uma reação clássica de Golden gate, onde dois fragmentos são ligados em sequência a um vetor.

Figura 7. Reação clássica de Golden gate representando a ligação de dois fragmentos, em sequência, ao vetor desejado. **A:** legenda da figura. **B:** vetor e fragmentos contendo o mesmo sítio de reconhecimento para a enzima de restrição do tipo 2. **C:** Reação de restrição com a enzima de restrição do tipo 2. **D:** Vetor e fragmentos após a restrição, apresentando as junções complementares. **E:** reação de ligação dos fragmentos entre si e posterior ligação ao vetor. **F:** produto da reação de Golden gate com os fragmentos ligado em sequência no vetor final. Figura adaptada de Hurt (2020).



Seguindo o raciocínio da figura 7, diferentes “classes” de fragmentos podem ser criadas. Por exemplo, diferentes promotores podem ser sintetizados com a extremidade 5’ com a junção laranja e a extremidade 3’ com a junção verde. Da mesma forma, diferentes PS podem ser sintetizados com a extremidade 5’ contendo a junção verde e a extremidade 3’ com a junção azul; e assim sucessivamente, considerando todas as regiões controladoras da expressão e/ou secreção da proteína de interesse, ou mesmo das diferentes proteínas de interesse, pois nesse modelo, diferentes genes podem ser avaliados simultaneamente (PÜLLMANN; WEISSENBOERN, 2021). Com exceção do *backbone*, cada fragmento é clonado separadamente num plasmídeo primário, dando origem a bibliotecas plasmidiais com cada uma das classes ou partes (do inglês *part plasmids*) reguladoras/codificantes.

Para montagem, todos os fragmentos de DNA são fornecidos como plasmídeos não cortados, e combinados com o vetor de expressão (*backbone*), utilizando a enzima de restrição tipo II e uma T4 DNA ligase em uma única mistura de reação (*one pot reaction*). O uso da técnica de ligação-restrição permite a montagem de múltiplos fragmentos com eficiência extremamente alta (WEBER et al., 2011). De acordo com Weber et al. (2011) até 10 fragmentos de DNA podem ser montados com 95-100% de colônias obtidas contendo a construção esperada.

Diferentes sistemas modulares, que utilizam a montagem por Golden gate já foram estabelecidos para as leveduras *S. cerevisiae* (LEE et al., 2015), *Yarrowia lipolytica* (LARROUDE et al., 2019), e *P. pastoris* (OBST; LU; SIEBER, 2017; PÜLLMANN; WEISSENBOERN, 2021). Os chamados *Toolkits* contam com diversas regiões controladoras que são intercambiáveis e podem gerar bibliotecas de leveduras com diferentes construções, facilitando a descoberta da melhor combinação entre as regiões controladoras da expressão e o gene de interesse que será expresso e da proteína/enzima que será secretada.

Até o momento, nenhum Toolkit foi utilizado para expressar uma lacase fúngica ou de qualquer outra origem.

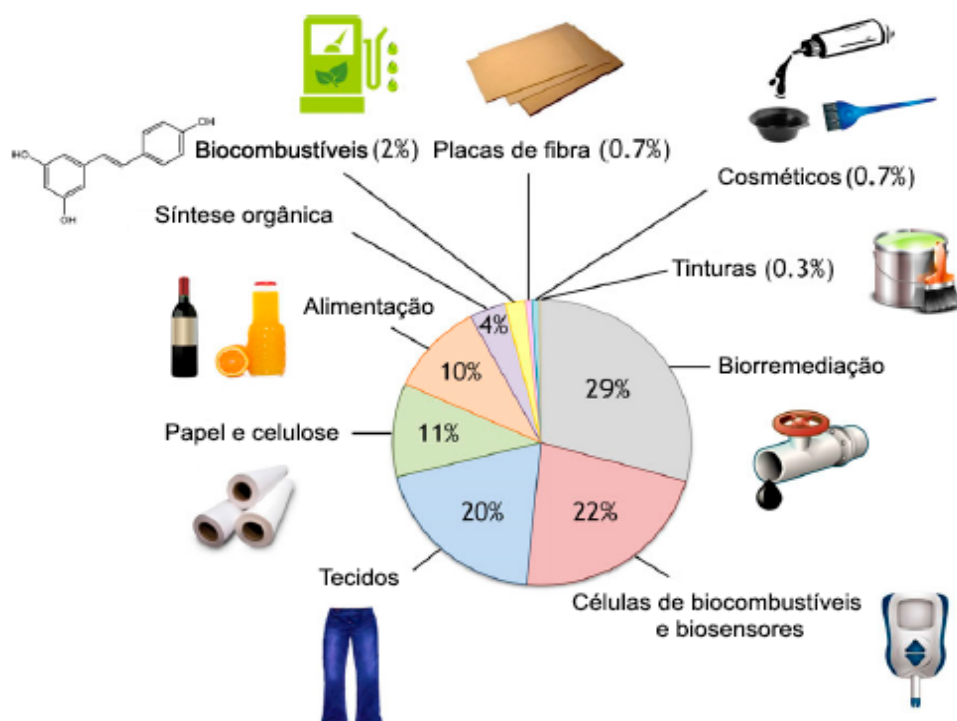
2.9 Aplicação das lacases

Devido a versatilidade catalítica, boa termoestabilidade e potencial de aplicação em diferentes pH, mesmo em condições muito desfavoráveis, as lacases vêm sendo amplamente exploradas para aplicação na chamada “Química Verde” (RIVA, 2006; de SALAS et al., 2019). Essa área da química visa a obtenção de produtos e/ou processos que possam ser utilizados na

indústria como uma alternativa à utilização de reagentes químicos, reduzindo o impacto ambiental causado por esses reagentes.

Com um potencial de aplicação muito grande, a figura 8 apresenta as áreas de aplicação das lacases na indústria e na biotecnologia, bem como o percentual de trabalhos publicados relacionados a cada área. Como parte do complexo de enzimas ligninolíticas, as lacases podem ser utilizadas na indústria do papel e celulose para o tratamento da polpa de celulose com o objetivo de degradar parte da lignina remanescente e clarear a polpa (MATE; ALCALDE, 2016; RIVERA-HOYOS et al., 2013). Com o mesmo objetivo as lacase podem ser utilizadas na indústria de biocombustíveis no pré-tratamento da biomassa vegetal para melhorar os processos fermentativos, facilitando a produção de etanol. Essas enzimas também podem ser utilizadas na indústria têxtil para o clareamento de tecidos de algodão. Mate; Alcalde (2016), relatam a existência de pelo menos 19 sistemas comerciais baseados na enzima lacase para o branqueamento de denim.

Figura 8. Potencial de aplicação de lacases na indústria e biotecnologia, com percentual de trabalhos publicados relacionados a cada área até o ano de 2016. Figura adaptada de Mate; Alcalde (2016).



Apesar de não serem oficialmente consideradas como GRAS - geralmente reconhecida como segura (do inglês *Generally Recognized as Safe*), estudos indicam a utilização das lacases na indústria alimentícia, no clareamento e estabilização de bebidas, e na remoção de compostos fenólicos que possam gerar sabores e/ou aromas indesejáveis (MINUSSI; PASTORE; DURÁN, 2002; OSMA; TOCA-HERRERA; RODRÍGUEZ-COUTO, 2010).

De todas as aplicações apresentadas na figura 8, a que recebe maior destaque é a de biorremediação. Diferentes estudos vêm apresentando o potencial uso de lacases na degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), inseticidas e corantes (BONUGLI-SANTOS et al., 2016; DWIVEDI et al., 2011; GIARDINA et al., 2010; RIVERA-HOYOS et al., 2013). Os corantes sintéticos correspondem a compostos aromáticos complexos, sintetizados quimicamente, que conferem diferentes cores a alimentos, fármacos e tecidos (LEGERSKA; CHMELOVA; ONDREJOVIC, 2016).

Efluentes têxteis, em específico, representam um grande problema ambiental, seja pela toxicidade dos corantes, interferência na absorção de luz por organismos fotossintéticos ou pela elevada salinidade (HOU et al., 2004). Nesse sentido, a utilização de lacases derivadas do ambiente marinho podem representar uma alternativa viável para biorremediação de corantes e efluentes em ambientes salinos.

2.9.1 Corantes sintéticos

Corantes e pigmentos naturais são utilizados pela humanidade há milênios, seja para pinturas rupestres, criação de arte e artesanatos, tingimento de tecidos, maquiagem, pinturas cerimoniais, escrita, entre muitas outras aplicações (ARDILA-LEAL et al., 2021). Por definição, pigmentos são agentes coloridos, não-coloridos ou fluorescentes em forma de sólidos particulados ou pó, insolúveis, que conferem cor ou fluorescência ao serem associados/misturados a um determinado meio (GÜRSES et al., 2016). Enquanto isso, corantes são naturalmente coloridos, devido a estrutura química das moléculas que os constituem, e são altamente solúveis (GÜRSES et al., 2016), a solubilidade é, portanto, a principal diferença entre esses dois tipos de agentes (TKACZYK; MITROWSKA; POSYNIK, 2020).

Corantes e pigmentos podem ser divididos em dois grupos. O primeiro formado por pigmentos inorgânicos e o segundo formado por pigmentos e corantes orgânicos, tanto naturais, quanto sintéticos (TKACZYK; MITROWSKA; POSYNIK, 2020). Desde a descoberta do

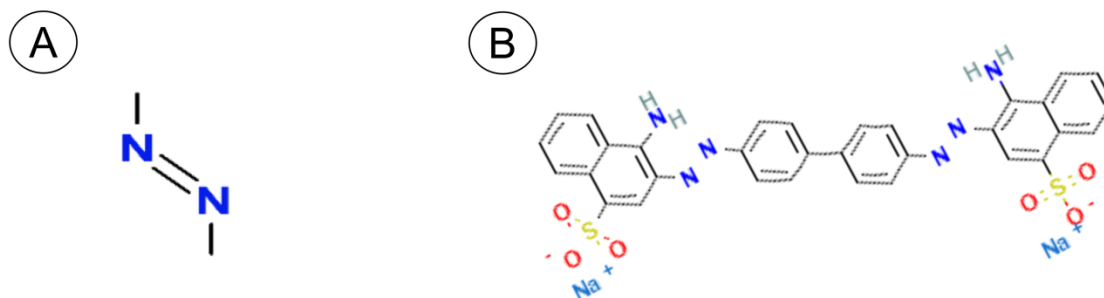
primeiro corante sintético em 1865, a mauveína, pelo químico britânico Willian Perkin, os corantes sintéticos vêm sendo amplamente produzidos e aplicados em diferentes setores da indústria (ZIARANI et al., 2018). As principais características dos corantes sintéticos são: (1) são quimicamente estáveis ao longo do tempo; (2) inertes a degradação física, química e biológica; (3) dão cor à fibra que será tingida através de processos reprodutíveis, mantendo a intensidade da cor; e (4) possuem baixo custo de produção (ARDILA-LEAL et al., 2021).

Corantes sintéticos podem ser divididos em diferentes classes ou tipos de acordo com a finalidade de aplicação ou de acordo com regiões cromóforas presentes na molécula (TKACZYK; MITROWSKA; POSYNIK, 2020), a seguir serão apresentados diferentes tipo de corantes sintéticos, classificados de acordo com o grupo cromóforo.

2.9.1.1 Corantes Azo

Os corantes sintéticos do tipo azo são os mais utilizados na indústria, e correspondem a mais de dois terços de todos os corantes sintetizados no mundo todo (BERRADI et al., 2019). Possuem como principal característica a presença do grupo cromóforo azo ($-N=N-$) e podem ser classificados em mono-, di- ou triazo dependendo da quantidade de grupos cromóforos presentes na molécula (BENKHAYA; M'RABET; EL HARFI, 2020). A figura 9 apresenta um exemplo de azocorante do tipo diazo. Quanto mais ligações do tipo azo, mais difícil é a degradação do corante. Cerca de 70% dos corantes azo são notoriamente tóxicos (RAWAT et al., 2018). Além da citotoxicidade, os azocorantes ou seus subprodutos podem também apresentar efeitos teratogênicos, carcinogênicos e/ou mutagênicos em diferentes espécies (CARVALHO DA CRUZ BRAMBILLA et al., 2019; RODRIGUES DE ALMEIDA et al., 2019).

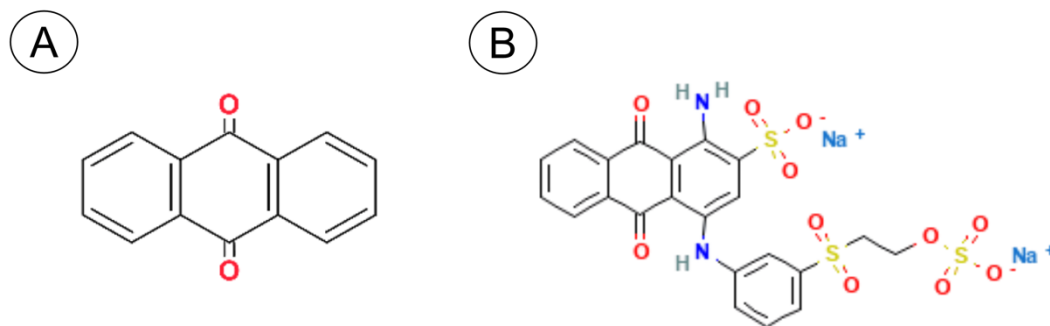
Figura 9. Ligação azo e exemplo de azocorante utilizado na indústria. **A:** Ligação do tipo Azo (adaptada de Ardila-Leal et al. (2021)). **B:** Estrutura molecular do corante vermelho congo (PubChem).



2.9.1.2 Corantes Antraquinona

Os corantes do tipo antraquinona representam o segundo grupo de corantes mais utilizados mundialmente, devido a boa eficiência e principalmente seu baixo custo (ARDILA-LEAL et al., 2021). Como o próprio nome diz, a antraquinona é um composto derivado do antraceno (um hidrocarboneto policíclico aromático, com três anéis) contendo duas carbonilas de cada lado do anel central de benzeno (figura 10). Podendo apresentar outros substituintes na molécula, a antraquinona pode reagir com outros compostos, dando origem a diferentes corantes, com propriedades físico-químicas diferentes (ZIARANI et al., 2018). Justamente devido ao arcabouço policíclico aromático, corantes do tipo antraquinona tendem a apresentar elevada recalcitrância no ambiente, dificultando os processos de degradação (SHARMA; SHARMA; SONI, 2021). Além disso, os corantes desse grupo podem apresentar elevadas taxas de toxicidade aguda e crônica, principalmente para organismos aquáticos (CROCE et al., 2017; NOVOTNÝ et al., 2006; VIEIRA et al., 2021). A elevada recalcitrância, associada a presença de outros substituintes na molécula dos corantes desse tipo, favorecem ainda processos de bioacumulação em organismos e micro-organismos dos níveis tróficos primários (SHARMA; SHARMA; SONI, 2021).

Figura 10. Arcabouço de um corante antraquinona e exemplo de um corante do mesmo tipo. **A:** Antraquinona (adaptada de Ardila-Leal et al. (2021)). **B:** Estrutura molecular do corante Remazol Azul Brilhante R (RBBR) (PubChem).

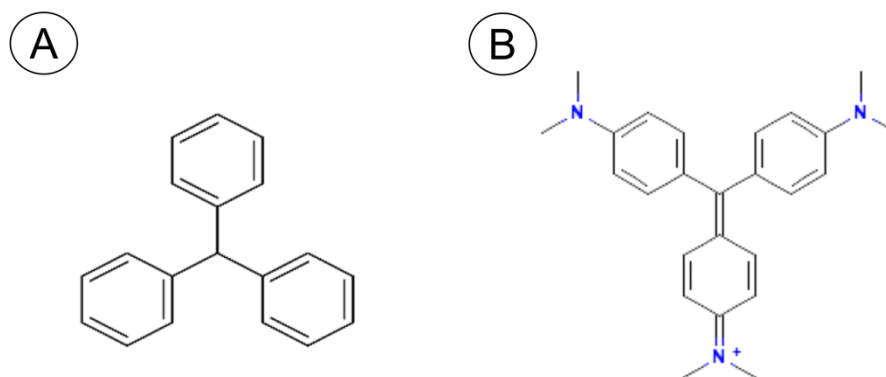


2.9.1.3 Corantes Triarilmetano

Corantes do tipo triarilmetano apresentam como principal característica estrutural a presença de um carbono central sp^3 ligado a três grupos aril. A figura 11 apresenta a estrutura clássica de um corante triarilmetano. Esse grupo de corantes merece destaque por ser um dos mais utilizados em indústrias têxteis e, conseqüentemente, por estarem em maior abundância nos

efluentes desse setor industrial (ARDILA-LEAL et al., 2021). Corantes desse grupo apresentam elevada citotoxicidade e genotoxicidade. O corante cristal violeta, por exemplo, tem o potencial de causar cistite química, irritação da pele e do sistema digestivo, bem como insuficiência respiratória e renal em humanos (AL-TOHAMY et al., 2022; MANI; BHARAGAVA, 2016). Além disso, pode causar envenenamento mitótico, resultando em danos cromossômicos permanentes (MANI; BHARAGAVA, 2016); e está associado ao sarcoma de células reticulares em vários órgãos (AL-TOHAMY et al., 2022; LELLIS et al., 2019). Outro corante desse grupo que gera bastante preocupação é o verde malaquita, que além do potencial mutagênico, carcinogênico e teratogênico, ainda apresenta o risco de bioacumulação e biomagnificação (TKACZYK; MITROWSKA; POSYNIK, 2020).

Figura 11. Arcabouço de um corante triarilmetano e exemplo de um corante do mesmo tipo. **A:** Triarilmetano (adaptada de Ardila-Leal et al. (2021)). **B:** Estrutura molecular do corante cristal violeta (PubChem).

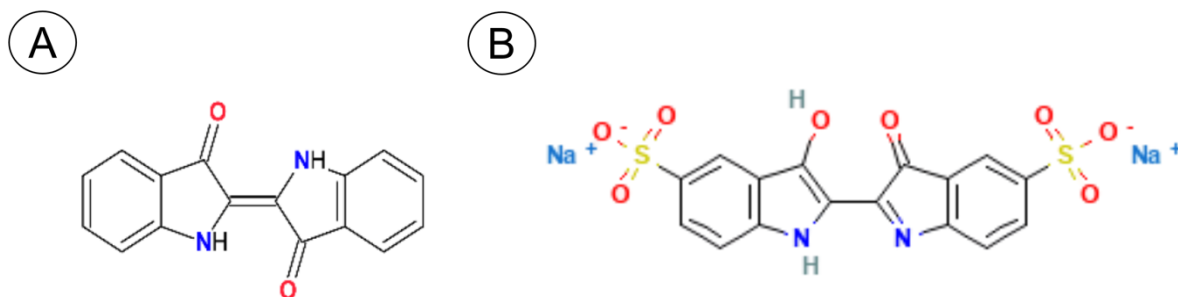


2.9.1.4 Corantes Índigo

O grupo de corantes sintéticos do tipo índigo, é o mais utilizado na indústria têxtil, principalmente para o tingimento do denim, e assim como o grupo de corantes triarilmetano, apresentam alta prevalência nos efluentes têxteis (HERNÁNDEZ-GORDILLO et al., 2016). Possuem como principal característica estrutural, a presença de dois ou mais compostos aromáticos heterocíclicos do tipo indol (figura 12), contendo carbonilas ou outros substituintes e uma gama diversa de radicais associados ao grupo principal (ZIARANI et al., 2018). Como característica física, os corantes desse grupo tendem a ser altamente resistentes à luz e ao calor (ARDILA-LEAL et al., 2021). Estudos de toxicidade demonstraram que corantes desse grupo podem inibir o crescimento, diminuir a densidade e quantidade de clorofila A em organismos aquáticos

fotossintetizantes (CHIA; MUSA, 2014). Além disso, o corante índigo carmim apresenta elevada toxicidade em humanos podendo causar problemas respiratórios e cardiovasculares, irritação gastrointestinal, vômito e diarreia ou mesmo ser letal se ingerido (PEREIRA et al., 2017). Estudos toxicológicos em mamíferos apontaram toxicidade aguda em porcos e toxicidade crônica em ratos (SRIWONG; WONGNAWA; PATARAPAIBOOLCHAI, 2010). A análise de metabólitos gerados, durante o processo de degradação desse corante, revelou que os produtos de degradação, além da toxicidade, podem aumentar a taxa de mortalidade e/ou o comprometer do sistema imune de anelídeos (PEREIRA et al., 2017).

Figura 12. Arcabouço de um corante indigoide e exemplo de um corante do mesmo tipo. **A:** Arcabouço índigo (adaptada de Ardila-Leal et al. (2021)). **B:** Estrutura molecular do corante índigo carmim (PubChem).



3. OBJETIVOS GERAIS

O presente estudo está associado ao projeto “Sulfatases e oxidases marinhas para a obtenção de produtos biogênicos e de base biológica (BioTrim)” desenvolvido de forma colaborativa pela UNESP e a *Technical University of Munich* - TUM (Acordo de cooperação Fapesp-BMBF – Processo Fapesp 2018/12098-9); e teve como objetivo principal, expressar uma lacase do fungo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063, utilizando *P. pastoris* como organismo hospedeiro de expressão e visando a obtenção, a caracterização e a aplicação da enzima pura na descoloração, degradação e destoxificação de corantes sintéticos.

3.1 Objetivos específicos

1. Selecionar a lacase com melhor adaptação ao ambiente salino;
2. Avaliar a viabilidade da expressão heteróloga da lacase selecionada utilizando o sistema Pichia Toolkit;
3. Avaliar a influência combinatória de diferentes promotores e peptídeos sinal na produção da lacase heteróloga;
4. Selecionar a melhor variante entre as bibliotecas indutivas e constitutivas;
5. Definir as melhores condições de cultivo para produção da lacase heteróloga pela variante selecionada;
6. Purificar e caracterizar a lacase heteróloga;
7. Aplicar a lacase em processos de descoloração de corantes sintéticos na presença e ausência de mediadores;
8. Avaliar o potencial da Lac1 na degradação e destoxificação de corantes sintéticos, utilizando como modelo de estudo o corante Preto Reativo 5.

4. CAPÍTULO I. CARACTERIZAÇÃO DOS NOVOS GENES DE LACASE DO BASIDIOMICETO DE ORIGEM MARINHA *Peniophora* sp. CBMAI 1063 E ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA

4.1 Introdução

A lignina é um polímero capaz de enrijecer as paredes das células de transporte do xilema, favorecendo o transporte de água via capilaridade. Assim, o surgimento de plantas vasculares seguido do seu rápido estabelecimento e domínio no ambiente terrestre está diretamente relacionado a “invenção” da lignina (RENAULT; WERCK-REICHHART; WENG, 2019). Além de facilitar o transporte de água pelas células xilemáticas, a lignina também atua como escudo protetor para outras células e tecidos das plantas, protegendo-as dos ataques de animais e micro-organismos. A diversidade e abundância crescente de plantas vasculares no período Devoniano favoreceu a fixação massiva de carbono por quase 200 milhões de anos na Terra. Contudo, devido à recalcitrância da lignina e a inexistência de enzimas capazes de degradá-la (i.e., enzimas ligninolíticas), grande parte do material vegetal foi acumulado na Terra durante o todo o período Devoniano e parte do período Carbonífero (FLOUDAS et al., 2012; RENAULT; WERCK-REICHHART; WENG, 2019).

Com tamanha pressão seletiva, as enzimas ligninolíticas surgiram há aproximadamente 300 milhões de anos, no final do período Carbonífero, concomitantemente ao surgimento e proliferação de fungos pertencentes ao grupo da chamada decomposição branca (do inglês *white-rot fungi*) (FLOUDAS et al., 2012; NAGY et al., 2015). Destacam-se entre as enzimas ligninolíticas, as peroxidases de classe II: lignina peroxidase, manganês peroxidase e versátil peroxidase; além delas, as multicobre-oxidases atuantes sobre fenóis (lacases) e outras peroxidases podem ser utilizadas pelos fungos da decomposição branca para degradar a lignina e acessar a celulose e a hemicelulose, fontes de nutrientes ricas em carbono (NAGY et al., 2015).

Uma característica que agrupa os fungos da decomposição branca, capazes de degradar eficientemente a lignina, é a presença de várias cópias de genes que codificam enzimas ligninolíticas, tanto lacases quanto peroxidases; formando famílias gênicas com até 19 genes em alguns casos (FLOUDAS et al., 2012; GLAZUNOVA et al., 2020; KUES; RUHL, 2011). Pertencente a Classe Agaricomycetes, os fungos do gênero *Peniophora* tendem a apresentar

grandes famílias gênicas de multicobre oxidases, tanto para linhagens de origem marinha quanto terrestre (Otero et al., 2017; Brenelli et al., 2019; Glazunova et al., 2020; Fontes et al., 2021).

Ao analisarem o transcriptoma do fungo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 após cultivo em condições otimizadas para produção de lacase, Otero et al. (2017), propuseram uma família gênica contendo 8 genes de lacase para esse fungo. Contudo, análises multi-ômicas realizadas por Brenelli et al. (2019) demonstraram a presença de 18 genes no genoma do fungo, capazes de codificar multicobre oxidases atuantes sobre compostos fenólicos. Dentre esses 18 genes, o *Pnh_Lac1* apresentou as marcas moleculares características de lacases fúngicas (Kumar et al., 2003) e foi descrito como sendo de uma nova lacase marinha (Brenelli et al., 2019). Dessa forma, aumentando a família gênica do fungo para 9 genes codificantes para lacase.

Análises filogenéticas realizadas por Glazunova et al. (2020), comparando três famílias gênicas de lacase do gênero *Peniophora* (incluindo a linhagem CBMAI 1063) demonstraram que pelo menos 15 genes de multicobre oxidases do fungo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 agrupam com lacases de outras duas espécies do mesmo gênero (de origem terrestre). A mesma análise ainda permite reconhecer que os genes putativos do fungo marinho agrupam em clados separados das lacases terrestres. É possível que, em virtude da adaptação do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 ao ambiente marinho, os genes dessas enzimas tenham passado por mutações que garantiram melhor adaptação ao novo ambiente salino, contudo, os autores do trabalho não discutem ou investigam essa possibilidade.

De acordo com os estudos de Wikee et al. (2019) e Ben Ali et al. (2020), é possível correlacionar as cargas eletrônicas dos aminoácidos dispostos na superfície da enzima com a tolerância ao sal e, dessa forma, prever a potencial resistência a sais por análises *in silico*. A tolerância a sais é algo esperado para lacases de origem marinha (BONUGLI-SANTOS et al., 2015), e uma característica desejada para aplicação dessas enzimas na biorremediação de xenobióticos em ambientes salinos, como efluentes têxteis e derramamento de petróleo no mar.

Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar *in silico* os novos genes de lacase do fungo *Peniophora* CBMAI 1063, bem como investigar a potencial tolerância ao sal das enzimas codificadas por todos os genes de lacase verdadeiros do fungo e, por fim, avaliar o perfil de expressão dos genes em meio salino, visando a seleção da proteoforma mais adaptada àquele ambiente.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Obtenção das sequências de multicobre oxidases (MCOs) do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 e caracterização dos novos genes de lacase

Um gene de lacase e os outros 9 genes de MCOs foram obtidos a partir do trabalho realizado por Brenelli et al. (2019). Todas as ORFs foram traduzidas em aminoácidos e alinhadas usando ClustalW (Bioedit 7.0). Após os alinhamentos, foi realizada a busca das regiões conservadas L1, L2, L3 e L4 de acordo com Kumar et al. (2003), a fim de separarmos os genes de lacases de outras MCOs. A predição do peso molecular e ponto isoelétrico teórico foi feita utilizando ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>). A predição dos sítios de N-glicosilação foi feita utilizando NetNGlyc 1.0 server (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetNGlyc-1.0>), considerando o potencial acima de 0,6 e validados utilizando o GlicoEP (<http://www.imtech.res.in/raghava/glycoep/submit.html>) (CHAUHAN; RAO; RAGHAVA, 2013). A análise de similaridade das cadeias polipeptídicas foi feita utilizando a ferramenta BLASTP (NCBI) que comparou os resultados com o NR e o UniProtKB/Swiss-Prot data bank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4.2.2 Análises filogenéticas

Todos os genes de lacases do fungo *Peniophora* CBMAI 1063 foram submetidas a análises filogenéticas entre si e em comparação com lacases de outras famílias gênicas. As famílias gênicas de lacase dos fungos *Peniophora* sp. CONTA e *Peniophora* sp. V1 foram extraídas do portal JGI (*Joint Genome Institute*) (GLAZUNOVA et al., 2020; NORDBERG et al., 2014). As famílias gênicas de *Coprinosia cinerea* e *Flammulina velutipes* foram obtidas no GenBank do NCBI baseado nos trabalhos de Wang et al. (2015) e Otero et al. (2017). As análises filogenéticas foram realizadas no MEGA X (KUMAR et al., 2018). As distâncias foram calculadas usando o método de *neighbor-joining* e um *bootstrap* com 1000 pseudoréplicas (FELSENSTEIN, 1985). Os alinhamentos prévios a montagem das árvores, foram realizados no software on-line MAFFT v.7 utilizando o servidor on-line (disponível em: <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>).

4.2.3 Modelagem e predição da resistência a salinidade

A modelagem de todas as isoformas foi feita por meio do software SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) utilizando homologia com outras lacases depositadas

no *Protein Data Bank* (PDB) (WATERHOUSE et al., 2018). O estado de protonação foi previamente definido pela ferramenta PDB2PQR (<https://server.poissonboltzmann.org>) utilizando como referência o pH 7 e o campo de força PARSE. As cargas superficiais foram calculadas utilizando o plug-in APBS *Electrostatics* do software PyMOL (WIKKEE et al., 2019).

4.2.4 Análise da expressão gênica em condição salina por RT-qPCR

Iniciadores específicos (*primers*) para todos os genes de lacase do fungo foram desenhados com o auxílio do software GeneRunner 5.0. Sete genes candidatos foram selecionados como controle e normalização da expressão (*housekeeping genes*): *Cyt-c*, β -*tubulin*, *GAPDH*, *TEF1*, *RPB1*, *RPB2* e *18s RNA*. Todos os *primers* utilizados estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Primers específicos desenhados para as lacases e genes controle do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063.

Nome do gene	Primer	Sequência	Tamanho do amplicon	GC%
<i>Lcc1</i>	Lcc1_F	CTTTGGCGTCGAGGCTCTGGCA	109	58,7
	Lcc1_R	CGCTCCATTACGAGGGAAGC		
<i>Lcc2</i>	Lcc2_F	CTCGCTCGGCATCCCTTGTC	111	54,1
	Lcc2_R	CAAGGGTGGTATCGTCGAGGTTA		
<i>Lcc3B</i>	Lcc3B_F	CGAGTCCCTCGCTGCCGTGGTGCA	106	53,8
	Lcc3B_R	GATCTCTTGGCCGTTAATAAGA		
<i>Lcc4</i>	Lcc4_F	CCAATTTCCAGGCCCGGTTATCACA	106	51,9
	Lcc4_R	ATGTAGCGTAGTGACGGTGTG		
<i>Lcc5</i>	Lcc5_F	CCTACTCCAGTTGGCGCTGTTA	105	54,6
	Lcc5_R	GCAGGTCGGTAGTACCCGTCG		
<i>Lcc6</i>	Lcc6_F	CACCAAATCAGCCACTCTTGTC	111	51,4
	Lcc6_R	CCGTTCGATTGGGTCAAGC		
<i>Lcc7</i>	Lcc7_F	CTTTGGGCTTGTCTTTGTCTG	103	50,5
	Lcc7_R	CGAGAGAGACGTTGCGGTTGAC		
<i>Lcc8</i>	Lcc8_F	GTACATGCGAGACACCGTCGTCGTC	100	59
	Lcc8_R	GTCCGTAAGAGCGTCGAAGAC		
<i>Pnh_Lac1</i>	Pnh_Lac1_F	CTGAGCAGGAGCTCCGTCCTCG	114	63,2
	Pnh_Lac1_R	CATTGTGGTGTCGGTGAGGC		
<i>Pnh_Lac2</i>	Pnh_Lac2_F	GCGGGACACTGTCGTTGTGAAC	110	57,3
	Pnh_Lac2_R	CGAGACTCTTGTCAGTGAG		

<i>Pnh_Lac3</i>	Pnh_Lac3_F	GTCTCTCCGGTTTGCCTTG	102	60,8
	Pnh_Lac3_R	GGATTCACGTCTCTCGACGAAG		
<i>Pnh_Lac4</i>	Pnh_Lac4_F	CGTCCCTAGAGTGGTCGCCA	115	63,5
	Pnh_Lac4_R	CGCAGAGTAAGCATAGTGC		
<i>Pnh_Lac5</i>	Pnh_Lac5_F	CAAGCGAATCGGAACCTTGGTC	110	53,6
	Pnh_Lac5_R	GCTGGTCGTATGTGAGGTTGTCTG		
<i>Pnh_Lac6</i>	Pnh_Lac6_F	CGCATGACACCATCGTAGTGA	107	47,7
	Pnh_Lac6_R	GTCTGTATCTGAGAGAAGATTC		
<i>Pnh_Lac7</i>	Pnh_Lac7_F	CGGTGTCACTGTCAATGGTC	101	54,5
	Pnh_Lac7_R	GAGACTCGTCTTTCAAGTCG		
<i>Pnh_Lac8</i>	Pnh_Lac8_F	GAGACACGACGGTCGTCAATG	100	52
	Pnh_Lac8_R	CCGTCCGTCAGAGCATCGAC		
<i>Pnh_Lac9</i>	Pnh_Lac9_F	CGGTCCTGTCATTACTGGAAACAAG	99	51,5
	Pnh_Lac9_R	CAGTGGACGGCGGTCAACAAGGT		
<i>Pnh_Lac10</i>	Pnh_Lac10_F	CCTTTCTTGCCTCGACGCTTC	119	47,9
	Pnh_Lac10_R	GAGGCGCGAGAATCCATCGAGA		
<i>18S rRNA</i>	18S rRNA_F	GCACCGTTTGCCAAGAAGCCTT	110	56,4
	18S rRNA_R	GAGTTGCAGATGAGGTAGGGT		
<i>β-tubulin</i>	B-tubulin_F	CTCGCGCGTTTCTCGTCGATC	132	63,6
	B-tubulin_R	GTCCTTTCGCCCAGTTGTTAC		
<i>Cyt-c</i>	Cyt-c_F	GATTGGAATTATCAGCTCCAG	160	33,8
	Cyt-c_R	GCTCCTACTTGTAATGGTAAG		
<i>GAPDH</i>	GAPDH_F	GTTCGTCGTCGGCGTTAACCTC	112	60,7
	GAPDH_R	CTTGTCGTGGACGGCCTTGGCG		
<i>TEF1</i>	TEF1_F	CAGTGGAACCACGCTGCTTGAG	119	53,8
	TEF1_R	GAACAGTACCAATACCACCAAT		
<i>RPB1</i>	RPB1_F	CGTATCGATCTGCGGTACAAC	110	56,4
	RPB1_R	GACGGCTGGCGGTAAACAGC		
<i>RPB2</i>	RPB2_F	GACATTCTCGAGCACATCTGC	114	55,3
	RPB2_R	GAAGTCCAACGCAATGTCGCG		

Para a análise de expressão gênica, o fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 foi cultivado em meio otimizado para produção de lacases, contendo extrato de levedura 0,2 %, peptona bacteriológica de caseína 0,27 %, extrato de malte 0,14 %, glicose 0,27 %, água do mar artificial (ASW) 2,6% e CuSO₄ 2 mM. Os frascos contendo 50 mL de meio e seis cilindros de inóculo fúngico foram incubados a 28 °C, 140 RPM por 7 dias. A biomassa de três réplicas biológicas foi

misturada e macerada em nitrogênio líquido. O RNA total foi extraído utilizando *RNeasyPlant* Mini Kit (QIAGEN) de acordo com o protocolo da fabricante. As amostras de RNA foram tratadas com DNase I (ThermoFisher) e a integridade das amostras antes e após o tratamento foi avaliada em gel de agarose 1%. A eletroforese foi feita em cuba pequena (Hoefer) a 90V por 45 min. As amostras de RNA livres de DNA foram quantificadas usando espectrofotômetro para ácidos nucleicos NanoDrop (ThermoFisher). Oligo DT₁₈ foi utilizado como *primer* para conversão do RNA mensageiro em cDNA utilizando o Kit de RT-PCR RevertAid H Minus *First strand* cDNA *synthesis* (ThermoFisher), de acordo com o protocolo definido pelo fabricante. As reações de qPCR foram realizadas no aparelho QuantStudio (Life Technologies, USA). Cada reação continha 5 ng de cDNA, 1 µL de cada *primer* (10 µM), 10 µL de SYBR Green qPCR Master Mix (ThermoFisher) e H₂O para um volume final de 20 µL. A amplificação foi realizada da seguinte forma: uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C por 1min, seguida de 40 ciclos de 94 °C por 15s e 60 °C por 45s. Após a amplificação, foram realizadas análises de curva de *melting*, de 70 °C a 95 °C com rampa de 1 °C/s. Todas as reações foram feitas em triplicata técnica e o controle negativo (NTC) foi definido como aquele contendo água e Master Mix, sem cDNA. A fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ foi utilizada para calcular as quantidades relativas dos transcritos de lacase (YANG et al., 2016).

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Identificação e caracterização dos novos genes de lacase

Os quatro íons de cobre presentes no sítio ativo das lacases são fundamentais para a captura dos elétrons dos substratos e a consequente conversão de O₂ em H₂O. Dessa forma, os aminoácidos que coordenam a ligação de tais íons à enzima são altamente conservados (GIARDINA et al., 2010); De acordo com Kumar et al. (2003), a conservação desses sítios em fungos é tão evidente que foi possível o estabelecimento de marcas moleculares capazes de diferenciar lacases de outras MCOs. Baseado nessas marcas, foi possível reconhecer que as nove sequências de MCOs identificadas nos estudos de Brenelli et al. (2019) correspondem a lacases verdadeiras. A figura 1 apresenta as regiões L1, L2, L3 e L4 identificadas nas nove MCOs identificadas por Brenelli et al. (2019).

Com esses resultados, a família multigênica de lacases do fungo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 passa a ter 18 genes putativos, uma das maiores famílias gênicas entre os fungos da decomposição branca e muito semelhante ao que foi encontrado previamente

para correlatos terrestres (*Peniophora* sp. CONTA e *Peniophora* sp. V1) (NAGY et al., 2015; GLAZUNOVA et al., 2020). Os novos genes de lacase foram renomeados de acordo com o padrão estabelecido previamente por Brenelli e colaboradores (2019).

Figura 1. Identificação das marcas moleculares em L1, L2, L3 e L4 que caracterizam lacases fúngicas nas nove MCOs do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063.

	L1 HWHG-X ₃ -DG-X ₅ -QCPI	L2 GT-X-WYHSH-X ₃ -QYC-X-DGL-X-G-X
	140 150 160	200 210 220 230
g12154.t1 MCO 7	VHWHGFFQHGTTNEMDGVATVNCQPIVP	GTYWYHSHYS-----TQYCDGLRGP
g14272.t1 MCO 8	IHHWGLFQHTTNHADGVAFTVTCQPLIP	GTFWYHSHYK-----TQYCDGLRGP
g1439.t1 MCO 5	IHHWGLFQKGTAEVDGVAQVGCQPIVP	GNWYHSHYS-----TQYCDGLRGP
g17194.t1 MCO 2	IHHWGLFQKGTNWADGPSQINQCPIIP	GTFWYHSHYR-----NQYCDGLRGP
g3313.t1 MCO 9	VHWHGFFQQTNEMDGVDTVTTCQPIIP	GTYWYHSHYK-----TQYCDGLRGP
g4654.t1 MCO 4	IHHWGLYQNSTPWTGTLGITECGILP	GTTWWHAHPYGSSTDLKSDIAGTQYSDGVVGA
g483.t1 MCO 6	VHWHGGLFQHGSAADGPAFTVTCQPIVP	GTYWYHSHYK-----LQYCDGLRGP
g5981.t1 MCO 10	VHWHGIDQLHSNWADGVDSVTTCQPIIP	GTFLYHSHYS-----NQYCDGLRGP
g714.t1 MCO 3	IHHGGMFFNSTSWYDGAAGVSECPIIP	GTWWHAHDG-----GHYVDGMRAP
	L3 HP-X-HLHGH	L4 G-(PA)-W-X-(LVF)-HCHIDAE-X-H-X ₃
	560 570	630 640
g12154.t1 MCO 7	PHPMHLHGHHQFWVLRVRSAGN	AGPWILHCHIDWHLNNGLAHVMAEN
g14272.t1 MCO 8	PHPIHLHGHTFSVVRVRSAGN	PGPWFLHCHIDWHLNNGFAVVAED
g1439.t1 MCO 5	PHPMHLHGHHQFWVLRVRSAGN	PGPWIFHCHIDWHLNNGFAVVAED
g17194.t1 MCO 2	PHPVHLHGHAFTSVVRVRSAGN	PGPWFFHCHIDWHLNNGFAVVAED
g3313.t1 MCO 9	PHPMHLHGHNFWVVRVRSAGN	PGPWFIHCHIDWHLNNGGLGVVMAES
g4654.t1 MCO 4	DHPFHIHGYPWIMAVGSG	PGLWAFHCHIQWHMAQGLLMQIAIQ
g483.t1 MCO 6	PHPVHLHGHAFTSVVRVRSAGN	PGPWFFHCHIDFHLAEGFAVVFVED
g5981.t1 MCO 10	PHPIHLHGHTFWVVRVRSAGN	PGPWILHCHIDWHLNNGFAVVAED
g714.t1 MCO 3	KHPFHLHGHHQMLINRAED	PGAWFFHCHIEWHLEAGLAVTFTEA

De acordo com Giardina et al. (2010) e Dwivedi et al. (2011), a estrutura e atividade das lacases não são definidas apenas pelos resíduos que coordenam os íons de cobre, mas por toda cadeia polipeptídica que compõem os três domínios da enzima, os *loops* de adesão ao substrato, bem como o tamanho da enzima, a taxa de glicosilação, e as cargas. Dessa forma, no presente estudo, foram utilizados softwares para identificar e/ou prever tais características. A tabela 2 apresenta as diferentes características dos novos genes de lacase do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063. Todos os novos genes de lacase codificam proteoformas com características intrínsecas diferentes, desde composição, tamanho molecular, atividade celular, cargas, e taxa de glicosilação. Com tamanho variando entre 53 e 68 kDa as proteoformas codificadas pelos novos genes de lacase apresentam tamanho da média de outras lacases fúngicas (CLAUS 2004, BALDRIAN, 2005).

Tabela 2. Caracterização dos novos genes de lacase do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063. Números em negrito representam sítios com maior probabilidade de ocorrência de acordo com os parâmetros do software NetNGlyc. Números em itálico correspondem a posições muito próximas.

Sequencia	Nome	Tamanho (aa)	Tamanho (kDa)	pI	Síto de clivagem	Razão (D+E)/(R+K)	Similaridade com outras lacases (NR)	Sítios de N-glicosilação (posição do resíduo de Asn)
g17194.t1	Pnh_Lac2	540	56,34	5,82	18-19	1,36	67,25% lacase C (<i>P. lycii</i>)	184, 305, 394, 427
g714.t1	Pnh_Lac3	581	61,11	4,63	19-20	2,83	66,15% lacase (<i>Ganoderma lucidum</i>)	27, 48, 86, 115, 147, 198, 222, 316, 401
g4654.t1	Pnh_Lac4	616	68,89	5,01	NA	-	47,85% lacase 1 (<i>Trametes pubescens</i>)	-
g1439.t1	Pnh_Lac5	525	55,94	5,18	18-19	1,70	73,75% lacase A (<i>P. lycii</i>)	68, 366, 385, 403
g483.t1	Pnh_Lac6	517	54,27	6,02	17-18	1,39	75,73% lacase C (<i>P. lycii</i>)	195, 311, 345, 349, 425
g12154.t1	Pnh_Lac7	522	55,39	4,98	19-20	2,18	73,82% lacase A (<i>P. lycii</i>)	184, 357, 433, 451
g14272.t1	Pnh_Lac8	524	53,85	4,78	18-19	2,42	67,93% lacase C (<i>P. lycii</i>)	185, 392
g3313.t1	Pnh_Lac9	527	55,51	4,80	18-19	2,21	67,88% lacase A (<i>P. lycii</i>)	203
g5981.t1	Pnh_Lac10	554	58,23	5,29	24-25	1,57	54,98% lacase (<i>Dentipellis</i> sp. KUC8613)	70, 120, 225, 275, 417, 450

Apesar da grande maioria das lacases fúngicas serem enzimas extracelulares, existem alguns casos em que algumas proteoformas podem apresentar atividade intracelular, como pode ser o caso da proteoforma codificada pelo gene *Pnh_Lac4* (Lac4). Enzimas eucarióticas extracelulares são sintetizadas no formato pré-pró-enzima, contendo um peptídeo sinal na região N-terminal. Após a síntese, o peptídeo sinal é reconhecido por enzimas de clivagem específicas do complexo de Golgi, que as encapsulam e promovem a secreção das mesmas no meio extracelular (OBST et al., 2017). Logo, proteoformas de lacase que não possuem peptídeo sinal não são secretadas e, portanto, devem atuar oxidando compostos fenólicos dentro da célula, por exemplo aqueles relacionados a parede celular (WANG et al., 2015), ou mesmo participando em outros processos celulares. Em bactérias e leveduras, MCOs que possuem os três domínios de ligação ao cobre (*copredoxin domains*), como a Lac4, estão relacionados ao controle do ciclo celular, separação cromossômica, divisão celular, resistência, homeostase e transporte de íons metálicos como Cu^{2+} e Fe^{3+} (ASKWITH et al., 1994; GILLET; LAWARÉE; MATROULE, 2019; MZHEL'SKAYA, 2000; SPIZZO et al., 1997).

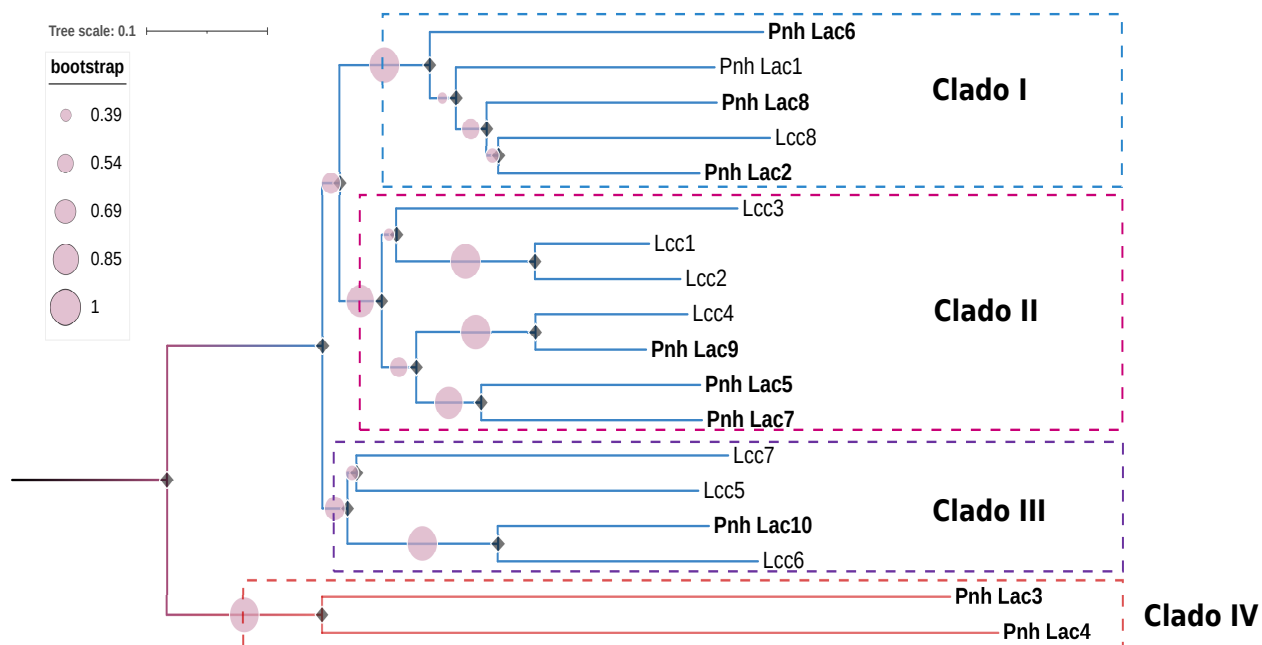
A glicosilação é uma das modificações pós-traducionais mais comuns em proteínas eucarióticas que são secretadas (DESHPANDE et al., 2008). Lacases podem passar tanto por N- quanto por O-glicosilação. Nessas enzimas a parte glicídica são essenciais para a estabilidade, atividade e resistência a proteases presentes no meio extracelular (MAESTRE-REYNA et al., 2015; VITE-VALLEJO et al., 2009; XU et al., 2019). Com exceção da proteoforma codificada pelo gene Lac4, todas as outras proteoformas apresentam pelo menos um sítio de N-glicosilação. Apesar da Lac3 ter apresentado oito sítios de N-glicosilação é provável que apenas quatro deles sejam glicosilados (dados NetNGlyc). Já para Lac6, apesar de todos os sítios encontrados terem elevada probabilidade de glicosilação, dois deles estão espacialmente muito próximos (Asn345 e Asn349), indicando que apenas um dos sítios deve ser ligado a glicanos de manose (DESHPANDE et al., 2018; XU et al., 2019).

4.3.2 Estudos de filogenia da família gênica e respectivas proteoformas de lacase do fungo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063

A diversidade gênica encontrada no presente estudo é muito semelhante ao que foi reportado por Otero et al. (2017), para os outros oito genes do fungo *Peniophora* CBMAI 1063 (*Lcc1-Lcc8*). Dessa forma, é possível hipotetizar que a família gênica de lacases desse fungo não

só tenha passado por sucessivos eventos de duplicação gênica durante a história evolutiva do organismo, como também tenha sido submetida a forte pressão seletiva sobre cada novo gene formado, resultando na diversidade encontrada hoje. Para compreender melhor o processo evolutivo dessa família, foi calculado a filogenia das proteoformas codificadas pelos 18 genes de lacase do basidiomiceto de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 (figura 2).

Figura 2. Árvore filogenética apresentando as relações evolutivas das 18 proteoformas de lacase do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063. Proteoformas em negrito são codificadas por genes que foram descritos e caracterizados no presente estudo. As proteoformas Lcc1 a Lcc8 foram descritas por Otero et al., (2017), enquanto a proteoforma Pnh_Lac1 foi descrita por Brenelli et al., (2019). A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados agrupados no teste de bootstrap (1000 replicatas) são mostrados ao lado dos ramos. A árvore foi desenhada em escala, com comprimentos de galhos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de correção de Poisson e estão nas unidades do número de substituições de aminoácidos por sítio. Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par de sequências (opção de deleção em pares). Losangos pretos apresentam eventos de duplicação gênica.



A análise filogenética das proteoformas apresentou a formação de quatro clados diferentes (I, II, III e IV). Com exceção do clado IV, onde duas das novas proteoformas agruparam separadamente das outras lacases (figura 2), as outras novas proteoformas foram amplamente distribuídas, com maior ou menor similaridade com outras lacases previamente descritas do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063. Já era esperado o agrupamento da Lac4 em um clado distante das outras, principalmente devido a função atribuída a ela de atividade intracelular; contudo, a Lac3 agrupou no mesmo clado, uma proteoforma extracelular, altamente glicosilada, com provável

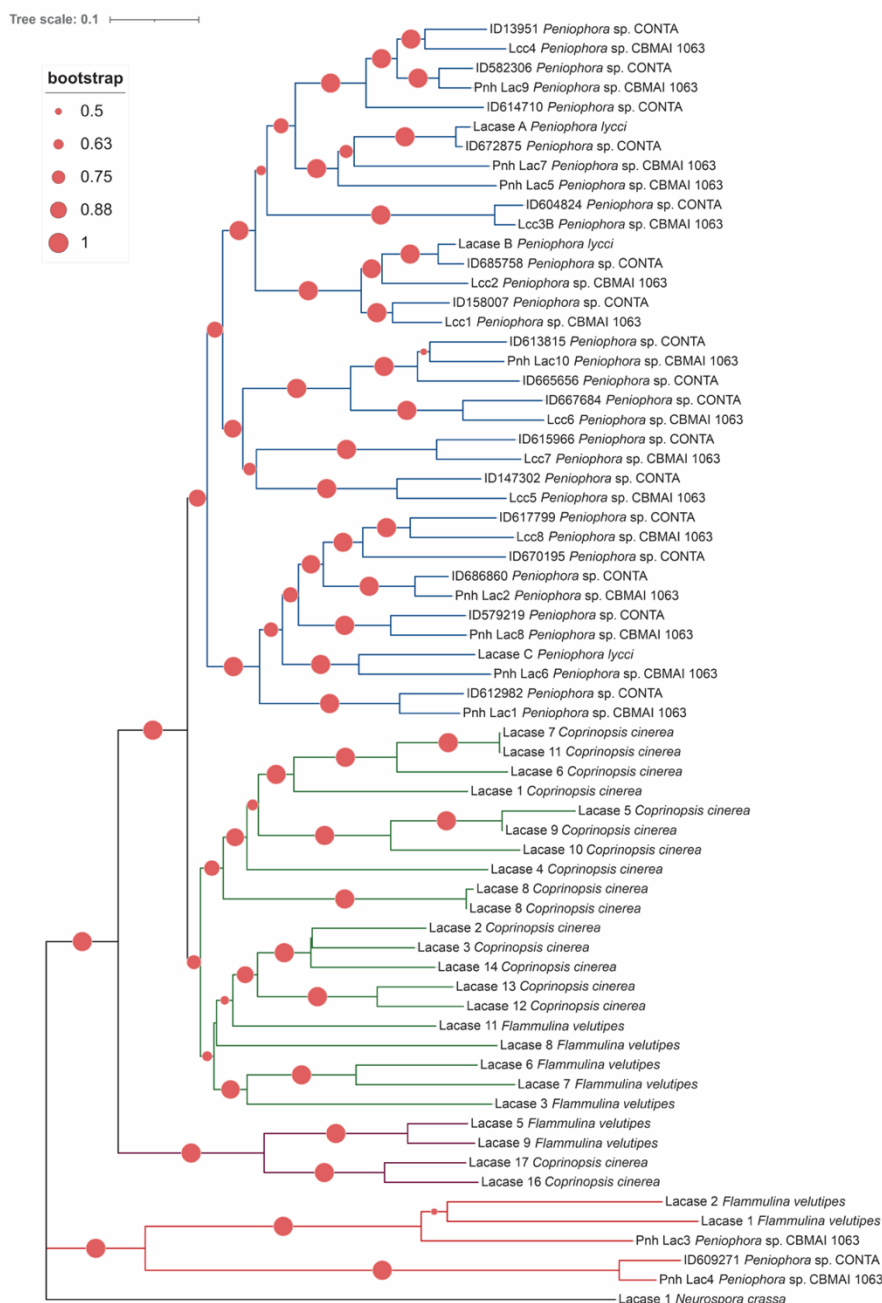
atividade sobre substratos convencionais de lacases extracelulares (devido a similaridade com outras lacases já caracterizadas). Considerando a história evolutiva das lacases e de outras enzimas ligninolíticas é bem provável que o surgimento de formas extracelulares tenham sido a partir de mutações ocorridas em genes relacionados ao metabolismo primário (vide o caso das MCOs intracelulares mencionadas anteriormente). De acordo com Aharoni et al. (2004), uma nova função enzimática surge a partir de mutações no gene parental que não causem efeito deletério na atividade primária, mas que promova maior versatilidade da enzima, aumentando a aptidão e o potencial de resposta a uma determinada pressão seletiva. No caso das lacases do *Peniophora* CBMAI 1063, é possível que o gene que codificava uma MCO exclusivamente intracelular tenha passado por mutações que ampliaram significativamente o espectro oxidativo da enzima (hoje sabemos, por exemplo, que lacases podem oxidar mais de 200 tipos diferentes de substratos fenólicos e amínicos (XU et al., 2019) e que após o primeiro evento de duplicação gênica deu-se origem ao gene que posteriormente codificou a primeira ancestral extracelular. Esse mesmo gene, durante o processo evolutivo da linhagem, passou por sucessivos eventos de duplicação (clados azuis). Com o fenômeno da irradiação adaptativa das plantas vasculares no final do Devoniano (RENAULT et al., 2019; FLOUDAS et al., 2012), houve também a irradiação adaptativa dos fungos da decomposição branca, logo, é possível inferir que diferentes tipos de lignina promoveram a seleção de diferentes genes e proteoformas de lacase. Reflexo disso, é o surgimento de mais uma lacase extracelular após o segundo evento de duplicação gênica, ainda a partir do ramo que codificava uma lacase intracelular (clado vermelho).

Ao agruparmos a família gênica do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 com outras famílias gênicas (figura 3), foi possível perceber um padrão semelhante de agrupamento da Lac3 em relação a Lac4 (clado vermelho), sustentando a hipótese levantada anteriormente. Apesar de estar em um sub-clado diferente e apresentar uma relação filogenética mais próxima com uma lacase do isolado terrestre *Peniophora* sp. CONTA, a Lac4 agrupou com outra lacase intracelular, indicando que o processo de derivação das proteoformas extracelulares das lacases do fungo marinho ocorreu muito antes do surgimento do gênero *Peniophora*. Considerando ainda que o *outgroup* é a lacase de um ascomiceto e a árvore apresenta o arranjo da Lac3 com proteoformas de Agaricales, a derivação das lacases extracelulares pode ter ocorrido antes mesmo do surgimento da ordem Russulales; e esse pode ter sido um fator importante para os processos de especiação dessa ordem, dado a importância dessas enzimas na obtenção de nutrientes. Contudo, para uma

elucidação mais robusta dessas relações, outras famílias gênicas da ordem Russulales e Agaricales precisam ser descritas e consideradas.

A análise de diferentes famílias gênicas permitiu agrupar, com exceção da Lac3, todas as lacases extracelulares apenas com lacases de outros isolados/espécies do gênero *Peniophora* (clado azul). Apesar das lacases marinhas não terem formado um sub-clado separado dentro do clado azul, quando analisamos os genes A, B e C do isolado terrestre *Peniophora lycii*, apenas a lacase C agrupou com a Lac6 do *Peniophora* sp. CBMAI 1063, mas tanto a proteoforma A quanto a B apresentaram maior similaridade a lacases do também isolado terrestre *Peniophora* sp. CONTA, portanto é possível que a mudança para o ambiente marinho tenha atuado como pressão seletiva com maior ou menor força sobre os 18 genes do fungo marinho (BONUGLI-SANTOS et al., 2015). É importante ressaltar que resultados anteriores demonstram a necessidade da condição salina para o fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 produzir grandes quantidades de lacase no meio otimizado (MAINARDI et al., 2018).

Figura 3. Árvore filogenética apresentando as relações evolutivas entre quatro famílias gênicas de lacase em relação a do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063. Cores representam clados diferentes. A história evolutiva foi inferida usando o método Neighbor-Joining. A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons associados agrupados no teste de bootstrap (1000 replicatas) são mostrados ao lado dos ramos. A árvore foi desenhada em escala, com comprimentos de galhos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de correção de Poisson e estão nas unidades do número de substituições de aminoácidos por sítio. Todas as posições ambíguas foram removidas para cada par de sequências (opção de deleção em pares).

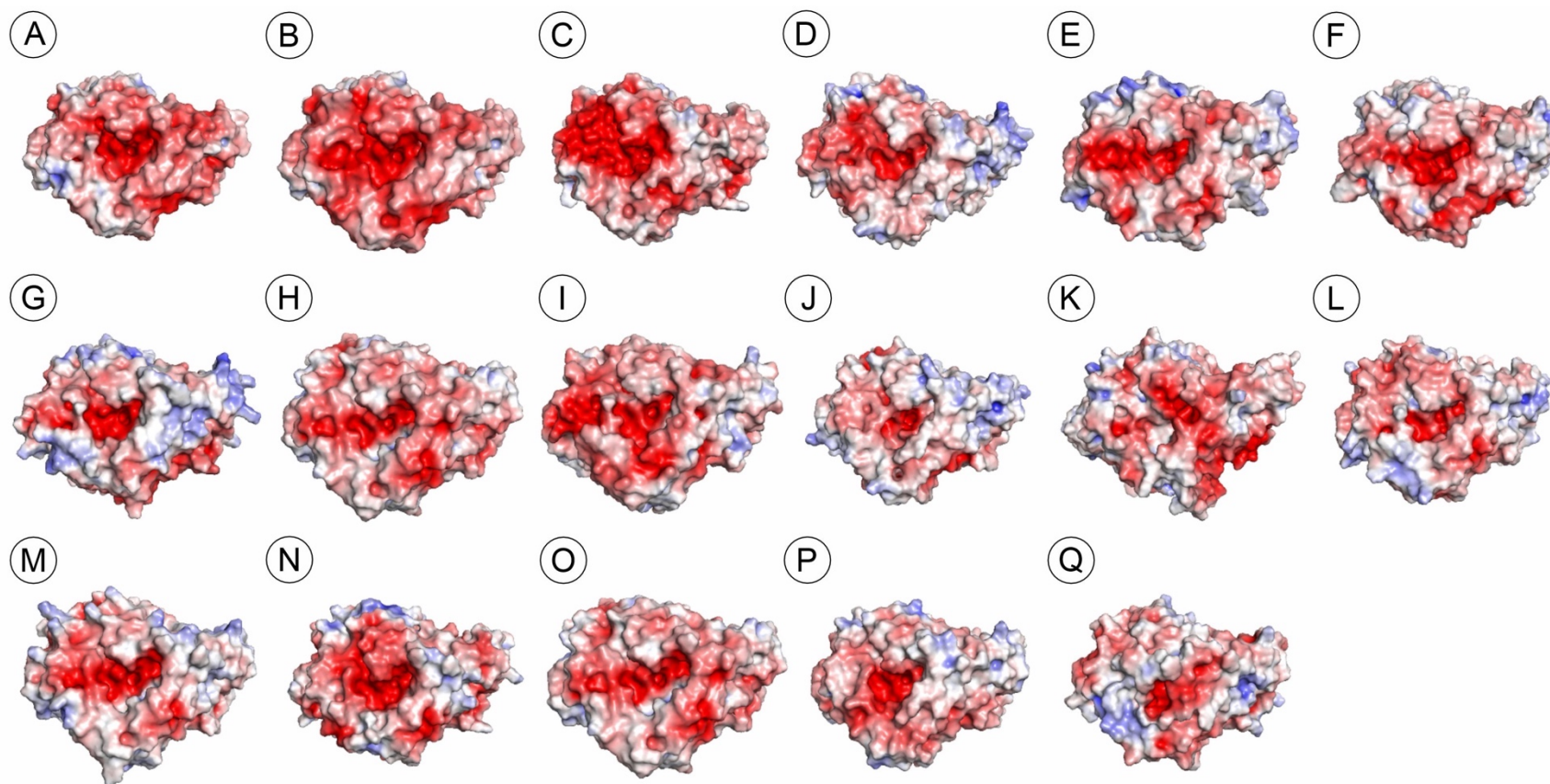


4.3.3 Avaliação *in silico* do potencial das proteoformas de lacase em tolerar ambientes salinos

Devido ao alto potencial de aplicação, uma das características mais procuradas em enzimas marinhas é a tolerância a salinidade. Como nem todas as proteoformas de lacase podem apresentar a mesma tolerância, em virtude de processos evolutivos diferentes, a predição dessa característica pode facilitar a seleção das proteoformas com maior potencial a resistência/tolerância ao sal (WIKKEE et al., 2019). Dessa forma, as 17 proteoformas de lacase foram submetidas a análises *in silico* para avaliação das cargas superficiais (figura 4). De acordo com os estudos de Wikee et al. (2019) e Ali et al. (2020), quanto maior a porção carregada negativamente e mais intensa for a carga superficial negativa da enzima, maior é a tolerância a salinidade. Após os cálculos de carga e eletrostática, a forma gráfica gerada no software PyMol está representada da seguinte forma: as cargas negativas são as manchas vermelhas na superfície da enzima, enquanto as manchas azuis representam as cargas positivas. Quanto mais intensa a cor, maior a carga.

Na figura 4 é possível ver as 17 proteoformas analisadas sob o mesmo ângulo, com diferentes padrões de distribuição de carga superficial. Enquanto a Lcc7 e a Lac2 apresentam maior teor de cargas positivas, menos manchas vermelhas e mais azuis (razão (D+E)/(R+K) igual a 1,31 e 1,36, respectivamente); Lcc2 e Pnh_Lac1 apresentaram maior proporção de cargas superficiais negativas, com a razão (D+E)/(R+K) igual a 4,60 e 1,96, respectivamente. De acordo com Ali et al. (2020), a razão entre o número total de resíduos negativamente carregados (D+E) pelo número total de resíduos positivamente carregados (R+K) também pode ser um indicativo da tolerância da enzima a salinidade. Quanto maior a razão, maior a tolerância.

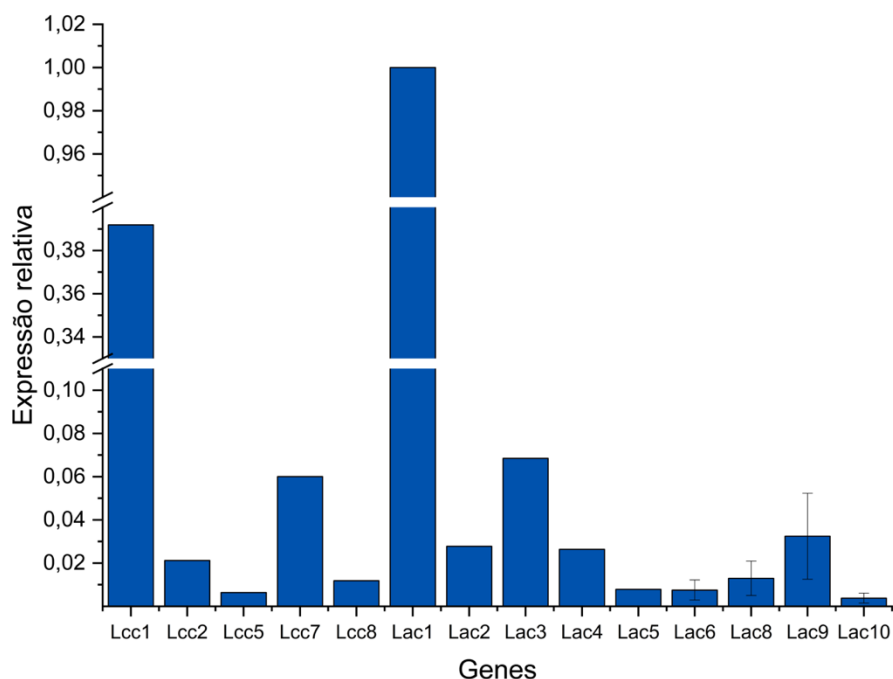
Figura 4. Avaliação das cargas superficiais das 17 proteoformas de lacase extracelular do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063. **A:** Lcc1. **B:** Lcc2. **C:** Lcc3. **D:** Lcc4. **E:** Lcc5. **F:** Lcc6. **G:** Lcc7. **H:** Lcc8. **I:** Pnh_Lac1. **J:** Pnh_Lac2. **K:** Pnh_Lac3. **L:** Pnh_Lac5. **M:** Pnh_Lac6. **N:** Pnh_Lac7. **O:** Pnh_Lac8. **P:** Pnh_Lac9. **Q:** Pnh_Lac10. Cargas superficiais negativas estão expressas em vermelho. Cargas superficiais positivas estão expressas em azul. Cargas superficiais neutralizadas estão expressas em cor branca. Intensidade da cor corresponde a intensidade da carga.



4.3.4 Análise da expressão gênica diferencial dos 18 genes de lacase do fungo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 em ambiente salino

Visando validar os novos genes e avaliar a expressão gênica diferencial dos 18 genes de lacase do fungo de origem marinha estudado, o basidiomiceto foi cultivado nas condições otimizadas para produção da enzima e o RNA da biomassa micelial foi utilizado para quantificar os genes por RT-qPCR. A figura 5 apresenta a expressão relativa dos 14 genes que apresentaram amplificação. Quatro genes de lacase não foram detectados por qPCR (*Lcc3*, *Lcc4*, *Lcc6* e *Pnh_Lac7*) em nosso estudo, contudo, a análise da expressão gênica das 18 MCOs do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 (cultivado nas mesmas condições) por análise transcriptômica detectou a expressão de todos os genes (BRENELLI et al., 2019). Apesar da alta eficiência de ambas as técnicas, é possível que a técnica de *Next Generation Sequencing* (NGS) utilizada por Brenelli et al. (2019) tenha sido mais sensível que a RT-qPCR utilizada em nosso estudo ou que os *primers* utilizados para os genes não amplificados não tenham anelado de forma correta (nenhuma análise prévia dos *primers* com amplificação de DNA genômico foi realizada), justificando a diferença nos resultados. No presente estudo, o gene *Lac1* foi o mais expresso na condição salina e, de acordo com a análise do secretoma realizada por Brenelli et al. (2019), essa foi também a proteoforma de lacase mais secretada no meio otimizado. O gene *Lcc1* foi o segundo gene mais expresso na condição salina e codifica uma proteoforma com o segundo maior valor obtido para a razão $(D+E)/(R+K)$ ($= 3,62$). Dessa forma, tanto a proteoforma *Lac1* quanto a *Lcc1* são boas candidatas para a exploração biotecnológica, visando a obtenção de enzimas com potencial de aplicação em ambientes salinos, incluindo a biorremediação de efluentes têxteis.

Figura 5. Níveis relativos de expressão gênica relativa dos 18 genes de lacase do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 em condição salina (2,6% de ASW).



4.4 Conclusões

Nove novos genes de lacase foram descritos para o fungo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063. Com uma família gênica total de 18 genes, o fungo não só apresenta uma das maiores famílias gênicas entre os fungos de decomposição branca, como também representa um recurso microbiano, com um arsenal de genes contendo diferentes características, que podem ser úteis em aplicações biotecnológicas diversificadas. As análises filogenéticas indicam que a família gênica passou por diferentes pressões seletivas durante o processo evolutivo do organismo e que o ambiente marinho pode ter selecionado proteoformas mais aptas para atuar naquele ecossistema. Apesar de já ter sido descrito anteriormente, o gene *Pnh_Lac1* codifica uma proteoforma com potencial para a resistência a ambientes salinos e destaca-se entre os outros genes como o mais expresso em condição salina.

5. CAPÍTULO II. UTILIZAÇÃO DO PICHIA TOOLKIT PARA A EXPRESSÃO DA LACASE DE ORIGEM MARINHA *Pnh_Lac1* (*Lac1*)

5.1 Introdução

A levedura não convencional *Pichia pastoris*, tornou-se uma das plataformas mais utilizadas para expressão de proteínas recombinantes (rProt) (ATA et al., 2021). Várias vantagens destacam *P. pastoris* em relação a outros sistemas de expressão e justificam seu sucesso. Entre essas vantagens, está a capacidade da levedura de realizar modificações pós-traducionais, como glicosilação e formação de ligações dissulfeto (BUSTOS et al., 2022), que são comumente necessárias para expressão de proteínas eucarióticas ativas. Além disso, se o gene alvo for expresso em fase com um peptídeo sinal adequado, a levedura pode secretar a rProt diretamente no meio de cultivo relativamente livre de outras proteínas, considerando que menos de 5% das proteínas endógenas da levedura são secretadas (ZHU et al., 2019).

A levedura *P. pastoris* pode atingir alta densidade celular utilizando diferentes fontes de carbono e expressar proteínas recombinantes de forma indutiva ou constitutiva (ATA et al., 2021; BUSTOS et al., 2022). Devido à sua capacidade incomum de utilizar metanol como fonte de carbono (metilotrofia), a metabolização deste álcool pela levedura é bem conhecida. O promotor que regula a primeira etapa da oxidação do metanol, pAOX1, é fortemente induzido na presença de metanol enquanto é completamente reprimido na presença de glicose ou glicerol, permitindo um bom controle da expressão da rProt desejada. Devido à sua força, pAOX1 é o promotor preferido para expressão induzida e diferentes sistemas disponíveis comercialmente o utilizam (E.g.: pPIC9, pPICZ, pPICZ α - Invitrogen®). Por outro lado, o promotor gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (pGAP) é comumente oferecido por sistemas comerciais como uma alternativa para expressão constitutiva de rProt não tóxicas para a levedura.

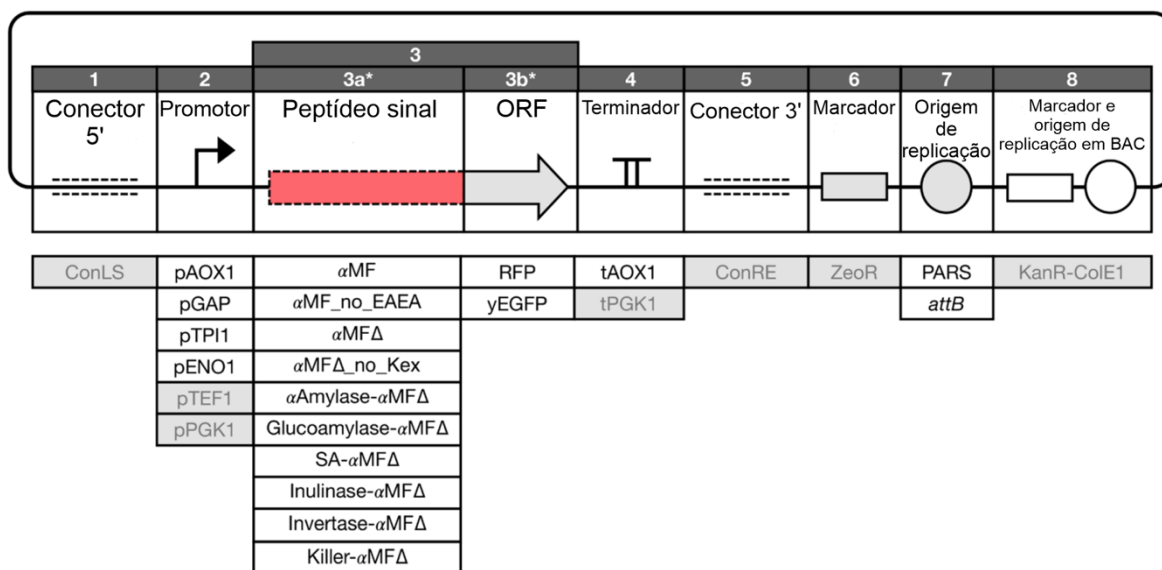
Diferentes promotores indutivos e constitutivos têm sido investigados e descritos nas duas últimas décadas, visando aumentar a produção de rProt por sistemas que utilizam a levedura *P. pastoris* como hospedeira de expressão (VOGL; GLIEDER, 2013). Dentre eles é possível destacar os promotores pPMP20 e pDAS2, ambos induzidos por metanol que apresentaram maior expressão de GFP quando comparados ao pAOX1 (VOGL et al., 2015). Em outro estudo, a expressão constitutiva foi considerada semelhante ou até maior ao comparar a regulação dos promotores constitutivos pG6 e pG1 a pGAP para a expressão de GFP ou a expressão de albumina sérica, respectivamente (PRIELHOFER et al., 2013).

Para proteínas secretadas, a regulação da secreção por peptídeos sinal interfere diretamente nos rendimentos de produção da rProt desejada. Embora os sinais de secreção do fator alfa de acasalamento (α MF) derivado de *Saccharomyces cerevisiae* venha sendo amplamente utilizado na expressão de diferentes proteínas, o peptídeo sinal do gene nativo, ou de outras proteínas ou mesmo sintéticos têm se mostrado mais ou menos eficientes que o α MF dependendo da rProt expressa (ANTOSOVA; SYCHROVA, 2016; MASSAHI; ÇALIK, 2015).

Diferentes regiões reguladoras da expressão, principalmente promotores e peptídeos sinal, influenciam significativamente na eficiência das variantes em expressar determinada proteína. Contudo, a montagem de diferentes vetores utilizando estratégias de clonagem convencionais, demandam muito tempo, trabalho e apresentam custo elevado; limitando o número de regiões que podem ser avaliadas ao mesmo tempo ou em combinação com outras (YANG et al., 2015). Nesse sentido, a biologia sintética aparece como uma estratégia para superar as limitações da biologia molecular convencional (WEBER et al., 2011). Sistemas com montagem modular com as regiões de controle estabelecidos em partes de plasmídeos intercambiáveis vêm sendo desenvolvidos para leveduras, como o Yeast Golden Gate para *S. cerevisiae* (AGMON et al., 2015; CHUANG; BOEKE; MITCHELL, 2018) e o Pichia Toolkit para *P. pastoris* (OBST; LU; SIEBER, 2017).

O Pichia Toolkit é um sistema que utiliza como estratégia a montagem hierárquica em dois níveis, baseada na técnica de Golden gate assembly (WEBER et al., 2011). A técnica de Golden gate utiliza enzimas de restrição do tipo 2 e permite a restrição e ligação de dois ou mais fragmentos de DNA em ordem sequencial num mesmo tubo reacional (*one pot reaction*) (ENGLER et al., 2009; WEBER et al., 2011). De acordo com Engler et al. (2009), a reação de Golden gate pode ligar até nove fragmentos em sequência sem perder a eficiência. Desse modo, Obst; Lu e Sieber (2017), propuseram a construção de bibliotecas de vetores primários contendo diferentes regiões reguladoras (ou partes) (figura 1), que poderiam ser ligadas aleatoriamente numa segunda reação de Golden gate, dando origem a uma biblioteca de vetores secundários contendo diferentes combinações das regiões controladoras, com o gene de interesse. Essa estratégia possibilita a triagem de variantes com o melhor arcabouço molecular para expressão da proteína de interesse.

Figura 1. Representação esquemática das partes intercambiáveis que compõem o Pichia Toolkit. ORF: Open Reading Frame ou gene de interesse. Marcador: marcador de seleção por antibiótico em levedura e/ou bactéria. BAC: bactéria. Imagem adaptada de Obst; Lu e Sieber (2017).



Neste capítulo, o Pichia toolkit foi utilizado para a expressão da lacase Pnh_Lac1 (Lac1), expressa naturalmente pelo fungo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063. Com o objetivo de selecionar a melhor combinação entre promotor, peptídeo sinal e cauda, quatro bibliotecas foram criadas, utilizando cinco promotores constitutivos e três promotores indutivos, em combinação com diferentes peptídeos sinal ($n^\circ = 21$), na presença e ausência de caudas do tipo 6x *his-tag*.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Obtenção do gene de lacase e otimização do códon para expressão em *P. pastoris*

O gene *Pnh_Lac1* foi previamente descrito por Brenelli et al. (2019), e depositado no *Non Redundant* (NR) database do NCBI sob o código de acesso VDC04696.1. A sequência codificante foi submetida ao software GENEius (Eurofins) para otimização utilizando o códon *usage* de *P. pastoris*. A otimização foi realizada de modo a excluir os sítios de restrição para *BsmBI* e *BsaI*. O gene *Pnh_Lac1* otimizado foi enviado para síntese na GeneArt Regensburg (Alemanha). O gene liofilizado foi suspenso em água ultrapura, seguindo as recomendações da fabricante. O peptídeo sinal nativo do gene também foi enviado para síntese em duas versões, otimizado e não otimizado.

5.2.2 Montagem dos plasmídeos primários contendo o gene de lacase e os peptídeos sinais

Seguindo o método descrito por Obst; Lu e Sieber (2017), os fragmentos foram ligados ao vetor primário pUO_401 por reação de Golden gate. A reação geral continha 6 μL de ddH₂O, 1 μL de 150 ng. μL^{-1} do fragmento, 1 μL do vetor, 1 μL de tampão 10X T4 DNA ligase (NEB), 0,5 μL T7 DNA ligase (NEB), e 0,5 μL BsmBI (NEB). A reação foi incubada em termociclador a 42 °C por 2 min, seguido de 16 °C por 5 min. Após 25 ciclos, 60 °C por 10 min, seguido por 80 °C por 10 min. Um total de 10 μL de cada reação foi transformado em *E. coli* NEBTurbo quimicamente competentes.

As suspensões foram plaqueadas em meio ágar Lúria Bertani (LB), contendo 10 g.L⁻¹ tripton, 5 g.L⁻¹ extrato de levedura e 5 g.L⁻¹ NaCl, suplementado com 35 mg.mL⁻¹ de cloranfenicol. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Por possuir o gene de resistência a cloranfenicol, todas as colônias presentes na placa foram consideradas positivas para presença do vetor. Colônias verdes foram consideradas negativas para presença dos fragmentos, devido à expressão do GTP nativo do vetor pUO_401.

Em média, de cinco a 10 clones classificados como positivos (colônias brancas) foram submetidos ao PCR de colônia utilizando os *primers* 11 e 12 do Pichia Toolkit. Os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1%, a eletroforese correu em cuba grande a 110V por 25 min. Pelo menos três *amplicons* com o tamanho esperado para cada fragmento foram extraídos do gel, purificados e enviados para sequenciamento pelo método de Sanger (Eurofins-Alemanha). Os clones contendo os fragmentos validados por sequenciamento foram preservados em glicerol 40% a -80 °C.

5.2.3 Montagem de variantes pré-definidas de *P. pastoris* para testes da viabilidade do sistema de expressão

Para analisar a viabilidade da expressão heteróloga da LacI em placas de 96 poços pela linhagem de *P. pastoris* NRRL Y-11430 (BxbI), bem como selecionar o melhor meio de cultivo para realização do *screening*, quatro variantes foram montadas de acordo com a tabela 1. A reação de Golden gate foi realizada utilizando as concentrações e volumes descritos na tabela 2. Todas as reações continham 1 μL de tampão T4 DNA ligase 10x (NEB), 0,5 μL de T4 DNA ligase (NEB) e 0,5 de *BsaI* (NEB). As reações foram incubadas em termociclador com restrição inicial a 37 °C por 10 min, seguido de 50 ciclos de restrição a 37 °C por 5 min e ligação a 16 °C por 5 min. Por último, uma restrição final a 37 °C por 10 min, e inativação a 65 °C por 20 min.

Tabela 1. Configuração molecular das variantes pré-definidas. PS: peptídeo sinal. TT: terminador. α MF: fator alfa de secreção. α MF no EAEA: fator alfa de secreção com deleção dos quatro últimos resíduos.

Nome	Vetor	Promotor	PS	Gene	TT
pIO_109	pUO_501	pAOX1	α MF	Pnh_LacI	tAOX1
pIO_110			α MF no EAEA		
pIO_113		pGAP	α MF		
pIO_114			α MF no EAEA		

Tabela 2. Concentrações e volumes dos reagentes utilizados nas reações de Golden gate

Nome (Variante/Parte)	Tamanho do plasmídeo (pb)	Tamanho do fragmento (pb)	Concentração do estoque (ng. μ L ⁻¹)	Quantidade de DNA (fmol)	Volume de DNA/reação (μ L)
109					
pUO_501	3297	3297	138	60	0,946
pAOX1	2143	447	142	300	0,623
α MF	1932	267	94,5	300	0,559
LacI	3183	1521	223	300	1,350
tAOX1	1916	247	82	300	0,596
				Água:	3,924
110					
pUO_501	3297	3297	138	60	0,946
pAOX1	2143	447	142	300	0,623
α MF no EAEA	1920	256	97	300	0,523
LacI	3183	1521	223	300	1,350
tAOX1	1916	247	82	300	0,596
				Água:	3,961
113					
pUO_501	3297	3297	138	60	0,946
pGAP	2143	481	128	300	0,744
α MF	1932	267	94,5	300	0,559
LacI	3183	1521	223	300	1,350
tAOX1	1916	247	82	300	0,596
				Água:	3,804
114					
pUO_501	3297	3297	138	60	0,946
pGAP	2143	481	128	300	0,744
α MF no EAEA	1920	256	97	300	0,523
LacI	3183	1521	223	300	1,350
tAOX1	1916	247	82	300	0,596

Diferentes suspensões de *E. coli* quimicamente competentes foram transformadas com 5 μL de cada reação. As suspensões foram plaqueadas em meio ágar LB, suplementado com 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de zeocina (Invitrogen). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Colônias brancas foram consideradas positivas para a presença do gene *Pnh_Lac1* e algumas foram submetidas ao PCR de colônia, utilizando os *primers* 73 e 116 do Pichia Toolkit. A visualização das amplificações foi feita por eletroforese em gel de agarose, como descrito anteriormente.

Uma colônia positiva para cada construção foi selecionada para cultivo em caldo LB, suplementado com zeocina. Após o período de incubação, foi feita a extração plasmidial (miniprep) utilizando o GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher). Os plasmídeos foram quantificados em espectrofotômetro para ácidos nucleicos e transformados em suspensões de *P. pastoris* eletro competentes. As transformações ocorreram em cubetas de 0,1 cm, contendo 30 μL de suspensão celular, 200 ng do vetor de interesse, e 200 ng do vetor integrativo (BxbI). A eletroporação foi realizada em eletroporador Bio-Rad, utilizando o programa EC1, com 1,8V. Imediatamente após a eletroporação, 1 mL de solução PERS (50% YPD, 50% 1M Sorbitol) foi adicionado a cubeta, para estabilização osmótica das células. As suspensões foram incubadas a 30 °C por 3 h e 30 min e depois plaqueadas em meio ágar YPD, contendo 10 g.L^{-1} extrato de levedura, 20 g.L^{-1} peptona e 20 g.L^{-1} dextrose, suplementado com 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de zeocina. As placas foram incubadas a 30 °C por 48 h.

Colônias brancas foram consideradas positivas e submetidas a extração de DNA genômico por LiOAc-SDS (LÖÖKE; KRISTJUHAN; KRISTJUHAN, 2011). As amostras de DNA foram utilizadas para validação da integração dos vetores de interesse no genoma da levedura. A reação de amplificação foi feita utilizando os *primers* 73 e 116 do Pichia Toolkit. A visualização das amplificações foi feita por eletroforese em gel de agarose, como descrito anteriormente. Pelo menos um *amplicon* de cada construção/variante positivo foi extraído do gel, purificado e enviado para sequenciamento pelo método de Sanger (Eurofins-Alemanha).

Uma linhagem controle foi criada, contendo apenas o vetor pUO_501. As variantes validadas pelo sequenciamento foram preservadas em glicerol 20% a -80 °C.

5.2.4 Testes de viabilidade do Pichia Toolkit

5.2.4.1 Variantes com promotor constitutivo

As variantes pIO_113 e pIO_114 foram submetidas inicialmente a testes em placa MD-ABTS (meio mínimo dextrose-ABTS), contendo 13,4 g.L^{-1} de base nitrogenada de levedura

(YNB), e 20 g.L⁻¹ de dextrose, 0,0004 g.L⁻¹ de biotina, suplementado com 0,5 mM de ABTS e 75 µg.mL⁻¹ de zeocina. As variantes foram inoculadas em placas com e sem suplementação de 0,1 mM de CuSO₄. As placas foram incubadas no escuro a 30 °C por 48 h. Considerando a importância do cobre nos cultivos, todos os ensaios seguintes realizados em meio líquido foram suplementados com CuSO₄.

O pré-inóculo foi preparado em meio BMGY 1% glicerol, contendo 10 g.L⁻¹ extrato de levedura, 20 g.L⁻¹ peptona, 100 mM tampão fosfato de potássio (pH 6), 13,4 g.L⁻¹ YNB, 10 g.L⁻¹ glicerol (m/v), 0,0004 g.L⁻¹ de biotina, suplementado com zeocina. As placas foram incubadas a 30 °C e a 900 RPM, por 24 h. Dois meios de cultivo foram testados para expressão constitutiva da lacase heteróloga: BMG (contendo 100 mM tampão fosfato de potássio (pH 6), 13,4 g.L⁻¹ YNB, 20 g.L⁻¹ glicerol (m/v), 0,0004 g.L⁻¹ de biotina) e BMGY, ambos com 2% de glicerol, 0,1 mM CuSO₄, e zeocina. Um total de 100 µL de pré-inóculo foram transferidos para 900 µL do meio de expressão. As placas foram vedadas com membrana e incubadas a 25 °C, 900 RPM, por 48 h. A biomassa e a atividade enzimática foram mensuradas como descrito no item 5.2.4.2 e 5.2.7.

5.2.4.2 Variantes com promotor indutivo

Para expressão da lacase em meio líquido para as variantes 109 e 110, o pré-inóculo foi cultivado em 1 mL de BMGY 1% glicerol, suplementado com zeocina em placas de poço profundo com 96 poços. Colônias frescas foram transferidas para os poços com o auxílio de ponteiros estéreis. Um total de 32 poços foi utilizado para cada variante, incluindo 32 poços para a linhagem controle. As placas foram vedadas com membrana capaz de permitir trocas gasosas e incubadas a 30 °C e a 900 RPM, por 48 h. Após o período de incubação, dois meios de cultivo foram testados como meio indutor para expressão heteróloga: BMM e BMMY, ambos suplementados com 0,5% MeOH, 0,1 mM CuSO₄, e zeocina. O meio BMM continha 100 mM tampão fosfato de potássio (pH 6), 13,4 g.L⁻¹ YNB, 0,0004 g.L⁻¹ de biotina. Enquanto o meio BMMY continha 10 g.L⁻¹ extrato de levedura, 20 g.L⁻¹ peptona, 100 mM tampão fosfato de potássio (pH 6), 13,4 g.L⁻¹ YNB, 0,0004 g.L⁻¹ de biotina. Alíquotas de 100 µL do pré-inóculo foram transferidas para 900 µL do meio indutor. As placas foram vedadas com membrana e incubadas a 25 °C e a 900 RPM, por 48 h. A indução foi mantida pela adição de 0,5% MeOH a cada 24 h. A biomassa foi analisada por densidade ótica a 600 nm (DO₆₀₀), as placas foram então centrifugadas a 4.000 x g por 10 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi utilizado para análise enzimática realizada de com o item 5.2.7. Todas as

análises de determinação da biomassa foram feitas no leitor de placas Biotek Epoch em temperatura ambiente.

5.2.5 Montagem das bibliotecas com promotores indutivos e constitutivos

Duas bibliotecas com promotores constitutivos e duas bibliotecas com promotores indutivos foram montadas, sendo duas com cauda de histidina (*his-tag*) na posição C-terminal (L3 e L5) e duas sem cauda (L4 e L6). A tabela 3 detalha a construção das bibliotecas. Para a montagem das bibliotecas, foram selecionados cinco promotores constitutivos, três promotores indutivos e 21 peptídeos sinal, descritos na tabela 4. Cada reação continha 150 fmol de vetor pUO_501, 300 fmol do total de insertos para cada categoria (incluindo caudas e terminadores), 4 µL de tampão T4 DNA ligase 10x, 2 µL de T4 DNA ligase, 2 µL de enzima *BsaI*, e água ultrapura para completar o volume total de 40 µL. As reações foram incubadas em termociclador nas condições descritas previamente no item 5.2.3.

Tabela 3. Descrição das bibliotecas quanto a presença de cauda de histidina.

Nome da biblioteca	Descrição	Presença de <i>his-tag</i>
L3	Bibliotecas com promotores constitutivos	Sim
L4		Não
L5	Bibliotecas com promotores indutivos	Sim
L6		Não

Tabela 4. Descrição dos promotores e peptídeos sinal utilizados na construção das bibliotecas indutivas e constitutivas.

Categoria	Parte	Descrição	Referência
Promotores indutivos	pAOX1	Alcool oxidase 1	Obst; Lu e Sieber (2017)
	pDAS1	Dihidroxiacetona sintase	Vogl et al. (2015)
	pPMP20	Glutathione peroxidase	Vogl et al. (2015)
Promotores constitutivos	pGAP	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	Obst; Lu e Sieber (2017)
	pPET9	Carreador de ADP-ATP	Stadlmayr et al. (2010)
	pG1	Proteína hipotética G1	Prielhofer et al. (2013)
	pG6	Proteína hipotética G6	Prielhofer et al. (2013)
	pADH2	Metanoato de metila sintase, alcool desidrogenase	Vogl et al. (2015)
Peptídeos sinal	α MF	Fator alfa de secreção	Obst; Lu e Sieber (2017)
	α MF no EAEA	Fator alfa de secreção com deleção dos quatro últimos resíduos	Obst; Lu e Sieber (2017)
	α Amilase-aMF Δ	Peptídeo sinal de alfa amilase seguido de aMF encurtado	Obst; Lu e Sieber (2017)
	Dissulfeto isomerase	Dissulfeto isomerase	Massahi; Çalik (2015)
	Proteína hipotética 2	Proteína hipotética (C4R6P1)	Massahi; Çalik (2015)
	PP	Proteína de parede celular	Massahi; Çalik (2015)
	Ciclofilina	Peptidil-prolil cis-trans isomerase	Massahi; Çalik (2015)
	CSN2	Beta-caseína	He et al. (2012)
	PHA-E	Fitohemaglutinina	Raemaekers et al. (1999)
	MF41	Peptídeo sinal sintético MF41	Xiong et al. (2006)
	Proteína hipotética 1	Proteína hipotética (C4R8H7)	Massahi; Çalik (2015)
	Proteína hipotética 3	Peptidilprolil isomerase putativa	Massahi; Çalik (2015)
	AS	Albumina sérica	Xiong; Chen e Chen (2008)
	Scw11p	Proteína de parede celular (Scw11p)	Massahi; Çalik (2015)
	Mucina	Membro da família das mucinas	Massahi; Çalik (2015)
	AaeUPO	Peroxigenase aromática	Molina-Espeja et al. (2014)
	AaeUPOeng	Peroxigenase aromática engenheirada	Molina-Espeja et al. (2014)
	PHO1	Fosfatase ácida PHO1	Heimo; Palmu e Suominen (1997)
	Suc2	Invertase 2	Paifer et al. (1994)
	Lac1 PS original	Peptídeo sinal do gene Pnh_Lac1 nativo	Presente estudo
	Lac1 PS otimizado	Peptídeo sinal do gene Pnh_Lac1 sequência otimizada	Presente estudo

Um total de 5 μL da reação de cada biblioteca foi utilizado para transformar suspensões de *E. coli* NEB Turbo quimicamente competentes. Foram preparadas três suspensões para cada biblioteca, as quais foram distribuídas em seis placas contendo meio ágar LB suplementado com 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de zeocina. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Foi feita a contagem do número total de colônias na placa, distinguindo colônias verdes (negativo) de colônias brancas (positivas). A placa foi considerada viável para extração plasmidial quando a porcentagem de colônias verdes era igual ou menor que 1,5%. Duas placas foram utilizadas para cada biblioteca. As placas foram lavadas com caldo LB estéril e as colônias foram suspensas no caldo com o auxílio de uma alça de Drigalski. A extração plasmidial foi feita por kit, com descrito no item 5.2.3. As bibliotecas plasmidiais foram quantificadas por espectrofotômetro de ácidos nucleicos e congeladas a -20 °C para posterior uso.

Para transformação em *P. pastoris*, cinco suspensões foram preparadas e transformadas com 200 ng de biblioteca plasmidial e 200 ng de BxbI, para cada biblioteca. As suspensões foram eletroporadas, como descrito anteriormente (item 5.2.3) e incubadas a 30 °C por 3,5 h. Após a incubação, 30 placas contendo meio ágar YPD-zeocina, foram inoculadas para cada biblioteca e incubadas a 30 °C por 48 h.

Para calcular o tamanho mínimo das bibliotecas, de modo que todas as combinações possíveis pudessem ser triadas durante o *screening*, foi utilizado o software GLUE versão 2010-07-16 (PATRICK; FIRTH; BLACKBURN, 2003). O cálculo envolve o número de variantes equiprováveis e a completude desejável da biblioteca. A completude padrão mantida foi a de 95%.

O maior número de colônias possível foi transferido das placas para placas de 96 poços (tipo MTP com fundo chato) contendo meio ágar YPD-zeocina. Cada poço correspondendo a uma variante diferente. As placas foram incubadas por 48 h a 30 °C e mantidas a 4 °C para realização dos experimentos seguintes.

5.2.6 Condições de cultivo do *screening*, preservação das bibliotecas e método de análise da produção

O pré-inóculo de todas as bibliotecas foram preparados de maneira semelhante, utilizando o meio BMGY 1% glicerol, como descrito no item 5.2.4.1. Contudo, as placas foram incubadas em tempos diferentes para as bibliotecas constitutivas e indutivas, 24 e 48 h de incubação, respectivamente. Após o período de incubação, 100 μL de pré-inóculo foram transferidos para 900 μL de meio BMGY 2% glicerol (para bibliotecas constitutivas), ou 900

μL de meio BMM 0,5% MeOH (para bibliotecas indutivas). Todas as placas foram vedadas com membrana e incubadas a 25 °C e a 900 RPM por 48 h. A indução da expressão para bibliotecas indutivas foi mantida pela adição de 0,5% MeOH a cada 24 h.

Todas as bibliotecas foram preservadas a partir do pré-inóculo. Após o preparo dos cultivos para a expressão, 100 μL do pré-inóculo foram transferidos para placas do tipo ELISA de 96 poços (fundo chato), contendo 100 μL de glicerol 40%. As suspensões foram homogeneizadas com auxílio de ponteiros estéreis, as placas foram vedadas com filme selante adesivo e preservadas a -80 °C.

Passado o período de incubação dos meios de expressão, os cultivos foram utilizados para análise de biomassa por DO_{600} e enzimática, como descrito nos itens 5.2.4.2 e 5.2.7.

O processo de *screening* foi realizado em duplicata (dois experimentos independentes) para cada uma das bibliotecas. Para fins de comparação, foi feita a normalização da atividade enzimática pelo crescimento celular. A atividade enzimática normalizada foi dada em unidade arbitrária (UA). Sendo $\text{UA} = \text{U.L}^{-1}/\text{DO}_{600}$.

5.2.7 Análise quantitativa para a lacase heteróloga

Nos experimentos descritos a partir do item 5.2.4 até o item 5.2.10 a atividade da enzima foi avaliada utilizando o Ácido 2,2-Azino-Bis(3-Etilbenzotiazolina-6-Sulfônico) Sal Diamônico (ABTS) como substrato enzimático. A oxidação do ABTS foi medida a 420 nm ($\epsilon = 36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) por 20 min a 37 °C. Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol do substrato por minuto. A atividade enzimática foi expressa em U.L^{-1} e os cálculos foram realizados a partir da equação descrita abaixo, derivada da Lei de Lambert-Beer.

$$\text{U.L}^{-1} = \Delta A \times V \times 10^6 / \epsilon \times R \times t$$

Onde:

- ΔA diferença entre a absorbância final e a inicial
- V volume da reação (L)
- 10^6 converte os mols de ϵ para μmols
- ϵ coeficiente de extinção ($\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
- R quantidade de caldo enzimático (L)
- T tempo de reação (min)

5.2.8 Sequenciamento de variantes e seleção da melhor produtora

Visando identificar a construção molecular das bibliotecas geradas, variantes com diferentes taxas de produção da lacase heteróloga foram selecionadas para sequenciamento do vetor integrado ao genoma. As variantes selecionadas foram transferidas das placas de 96 poços para placas de Petri contendo meio ágar YPD-zeocina e incubadas por 24 h a 30 °C. Os cultivos frescos foram utilizados para extração de DNA genômico por LiOAc-SDS, como descrito no item 5.2.3. A reação de amplificação utilizando os primers 13 e 130 do Pichia Toolkit foi feita nas mesmas condições descritas no item 5.2.3. A visualização da amplificação foi feita por eletroforese em gel de agarose e os *amplicons* com tamanho esperado foram purificados do gel e enviados para sequenciamento (Eurofins-Alemanha).

Os resultados de sequenciamento foram analisados utilizando a ferramenta de alinhamento MAFFT do software online Benchling - *Biology Software* (BENCHLING, 2021). Os sequenciamentos foram inicialmente alinhados com as sequências dos promotores e posteriormente com as sequências dos 21 peptídeos sinal utilizados nesse estudo.

A variante com melhor produção para lacase heteróloga foi nomeada variante 117 e selecionada para os próximos experimentos.

5.2.9 Determinação da cinética de produção e avaliação da influência de diferentes variáveis na produção enzimática e de biomassa pela variante 117

5.2.9.1 Cinética de produção

A variante 117 foi reativada em placas ágar YPD-zeocina e após 2 dias de incubação uma única colônia foi transferida para frascos Erlenmeyer de 150 mL contendo 50 mL de meio BMGY 1% glicerol, suplementado com tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6. Os frascos foram incubados a 30 °C e a 150 RPM por 24 h. Todos os experimentos de expressão foram realizados em placas de 24 poços profundos com volume máximo de 10 mL por poço e 5 mL de volume de trabalho. BMGY com 2% glicerol, suplementado com tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6 e 100 µM de sulfato de cobre foi usado como composição do meio controle. Um total de 500 µL do pré-inóculo foi usado para inocular 4,5 mL do meio de expressão. As placas foram seladas com membranas respiráveis e incubadas a 25 °C e a 900 RPM por até 120 h. Aliquotas do cultivo foram retiradas a cada 24 h para avaliação da biomassa e atividade enzimática.

A avaliação das variáveis foi feita em amostragem de ponto único, considerando o pico de produção. Diferentes tampões, pHs, temperaturas de incubação, concentrações de sulfato de

cobre e de casaminoácidos foram testados visando o aumento da produção da lacase heteróloga. Alterações no meio de cultivo foram feitos de acordo com a necessidade e serão descritos a seguir.

5.2.9.2 *Avaliação da influência dos tampões e do pH*

Para avaliar a influência de diferentes tampões sob o mesmo pH, o tampão fosfato de potássio 100 mM (condição controle) foi substituído pelo tampão de acetato de sódio (100 mM) pH 6. Para avaliar a influência de diferentes pHs, o tampão da condição controle foi substituído da seguinte forma: para pH 5,5 foi usado tampão de acetato de sódio 100 mM no respectivo pH. Para pHs 6,5 e 7 foi usado tampão fosfato de potássio 100 mM nos respectivos pHs. A concentração de sulfato de cobre foi a mesma para todos os experimentos de pH. As placas foram incubadas a 25 °C e a 900 RPM por 72h (condições controle).

5.2.9.3 *Avaliação da influência da temperatura*

Com o objetivo de avaliar a influência da expressão em diferentes temperaturas, as placas preparadas de acordo com a condições controle foram incubadas em 7 temperaturas diferentes: 15, 18, 20, 23, 25, 28 e 30 °C.

5.2.9.4 *Influência de diferentes concentrações de cobre*

Seis concentrações de sulfato de cobre foram testadas como suplementação de meio para expressão de lacase: 10, 20, 40, 60, 80 e 100 µM. Com exceção dessa variável, o meio e as placas foram preparados e incubados de acordo com as condições controle.

5.2.9.5 *Influência de diferentes concentrações de casaminoácidos*

Sete concentrações de casaminoácidos (CA) foram testadas como suplementação do meio para expressão da Lac1: 0; 0,15; 0,30; 0,45; 0,60; 0,75 e 1%. Com exceção dessa variável, o meio e as placas foram preparados e incubados de acordo com as condições controle.

5.2.9.6 *Validação das melhores condições e influência do tempo na adição de casaminoácidos*

As melhores condições encontradas nos experimentos anteriores (composição de meio de cultivo e incubação) foram avaliadas simultaneamente. A influência do tempo na adição dos casaminoácidos foi determinada em 0, 24 e 48h.

Análises de biomassa e atividade enzimática foram realizadas para cada condição testada.

5.2.9.7 Análises estatísticas

Todos os dados foram previamente submetidos ao teste de normalidade por Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) no SigmaPlot versão 14.0. *One-way* ANOVA foi usada para testar a influência significativa do pH, das concentrações de CuSO_4 , das concentrações de CA e do tempo de adição de CA na atividade de lacase, bem como na biomassa de todos os experimentos. Quando necessário, a ANOVA foi seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para realizar comparação múltipla entre os grupos (por exemplo, avaliar a diferença significativa entre o tampão de fosfato de potássio e o tampão de acetato de sódio). A influência da significância da temperatura de incubação na atividade da lacase foi avaliada pelo teste de Kruskal-Wallis seguido de análise post-hoc com o método de ajuste do valor “p” por Bonferroni.

5.2.10 Experimentos em biorreator de bancada e purificação da lacase heteróloga

Dois experimentos em biorreator de bancada foram conduzidos para obtenção da lacase heteróloga em quantidades suficientes para posterior purificação da enzima. Os experimentos foram conduzidos em reatores de 2 L (Sartorius Biostat B plus, Sartorius AG, Alemanha) utilizando uma estratégia de fermentação com duas fases, uma do tipo *batch* seguida de fase *feed-batch*. O pré-inóculo foi preparado em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio BMGY 1%. Os frascos foram incubados a 30 °C e a 150 RPM, por aproximadamente 21 h. Ao atingir $\text{DO}_{600} = 5$, 100 mL de pré-inóculo foram utilizados para inocular 900 mL de meio BMGY 4% glicerol (m/v), o pH 6 foi mantido constante durante todo o processo fermentativo, utilizando 25% NH_4OH (base) e 7% H_3PO_4 (ácido). A espuma foi controlada utilizando 1% antiespumante B (Sigma, Alemanha). A taxa de oxigênio dissolvido (OD) foi mantida estável em 30% sempre que possível com agitação máxima por espátulas a 1000 RPM e injeção de ar comprimido 2-3 VVM máximo. A temperatura da fase *batch* foi mantida constante a 28 °C. O término dessa fase foi caracterizado por picos de OD e baixa concentração de glicerol. Imediatamente após o término da fase *batch*, deu-se início a fase *feed-batch* com alimentação contínua a $8 \text{ mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ de 50% glicerol (m/v), suplementado com $12 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ de PTM1 (Invitrogen). A temperatura foi reduzida a 20 °C no primeiro experimento e a 18 °C no segundo experimento e mantida constante até o final da fermentação.

Amostras foram retiradas regularmente para análise do crescimento por DO_{600} , atividade enzimática, biomassa seca e concentração de glicerol no meio. Para análise de biomassa, 1 mL do caldo de fermentação foi centrifugado em tubo de 1,5 mL, previamente pesado, a 4.000 xg em temperatura ambiente. O sobrenadante foi separado para análise de

glicerol, atividade enzimática e a biomassa foi seca a 105 °C por 24 h. Os tubos com a massa seca foram pesados novamente e a quantidade de biomassa foi expressa em g.L⁻¹. O sobrenadante das amostras foi filtrado a 0,22 µm. Uma diluição 1:10 do sobrenadante foi preparada com 2,5 mM H₂SO₄ para análise da concentração de glicerol em HPLC. Foi utilizado o sistema HPLC-UV-RID (Dionex, EUA) equipado com coluna de ácido orgânico Rezex ROA-H + (300 mm × 7,8 mm Phenomenex, EUA). A temperatura da coluna foi ajustada para 70 °C e 2,5 mM H₂SO₄ foi usado como a fase móvel a um fluxo constante de 0,5 mL.min⁻¹. A fermentações em ambos os experimentos foram encerradas após 95 h.

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Avaliação da viabilidade do Pichia Toolkit na expressão da LacI do *Peniophora* sp. CBMAI 1063

Para avaliar se o sistema Pichia Toolkit seria capaz de expressar a LacI ativa em condições de *screening*, bem como definir quais os melhores meios de cultivo para *screening* das bibliotecas, foram feitos ensaios de expressão com as variantes 109, 110, 113 e 114. Inicialmente, as variantes 113 e 114 (constitutivas) foram submetidas a ensaios em placas de Petri para avaliar se a linhagem de *P. pastoris* BxbI necessitava de suplementação de cobre para expressar a enzima. A figura 2 mostra as placas MD-ABTS, com e sem suplementação por cobre. É possível ver que para ambas as variantes, a presença de cobre no meio resultou em halos verdes mais intensos, indicando maior oxidação do ABTS. Lacases são MCOs que possuem quatro íons de cobre em seu sítio ativo, logo, são enzimas que dependem desses íons para atividade catalítica (CLAUS, 2004). É possível que a concentração de cobre disponível no meio (YNB) não seja suficiente para garantir o carregamento completo da enzima, justificando a suplementação do meio com 0,1 mM de CuSO₄. A linhagem controle não apresentou oxidação do ABTS em nenhuma das condições estudadas.

A expressão em meio líquido utilizando placas de 96 poços foi positiva para as variantes constitutivas. Em ambos os meios testados houve a indução da expressão constitutiva da LacI (figura 3). Contudo, no meio complexo glicerol (BMGY) a expressão da enzima dobrou em relação ao meio mínimo glicerol (BMG). Além do glicerol, o meio BMGY também apresenta extrato de levedura, que pode servir como fonte de carbono adicional, viabilizando maior concentração de gliceraldeído-3-fosfato intracelular e favorecendo a indução da expressão pelo promotor pGAP. Não houve diferença significativa entre o crescimento celular das variantes e da linhagem controle em nenhum dos meios, e a linhagem controle não apresentou atividade

para lacase em nenhuma condição testada, garantindo que a atividade avaliada é da Lac1 e não de outra multicobre oxidase da levedura utilizada como hospedeira.

Figura 2. Placas MD-ABTS. Placas **A**, **C** e **E** sem suplementação por CuSO₄. Placas **B**, **D** e **F** com suplementação por CuSO₄. **A** e **B**: pIO-113. **C** e **D**: pIO_114. **E** e **F**: linhagem controle.

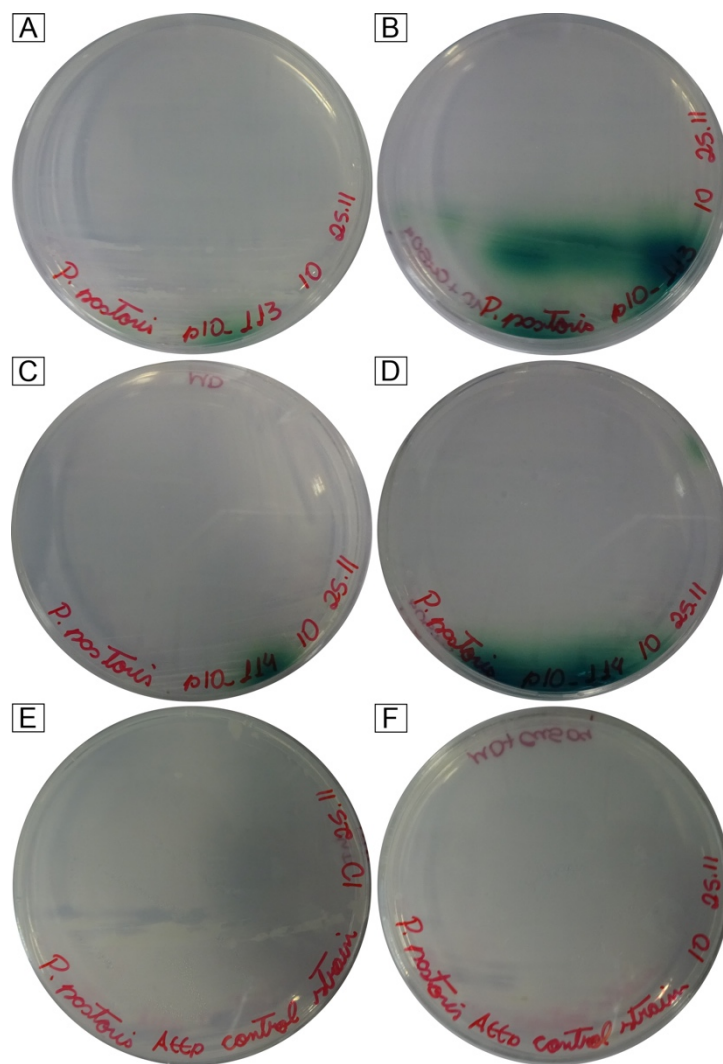
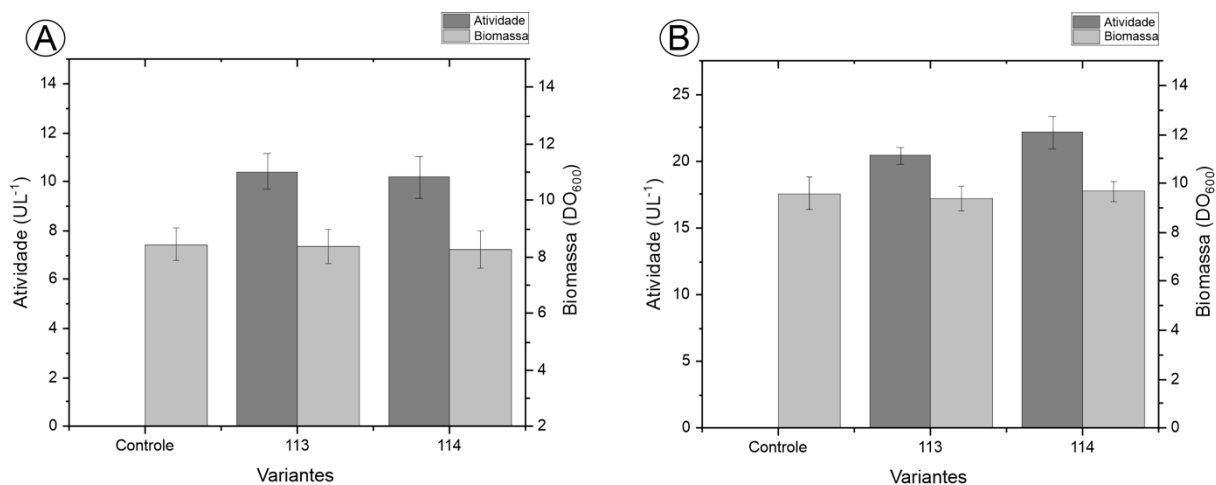


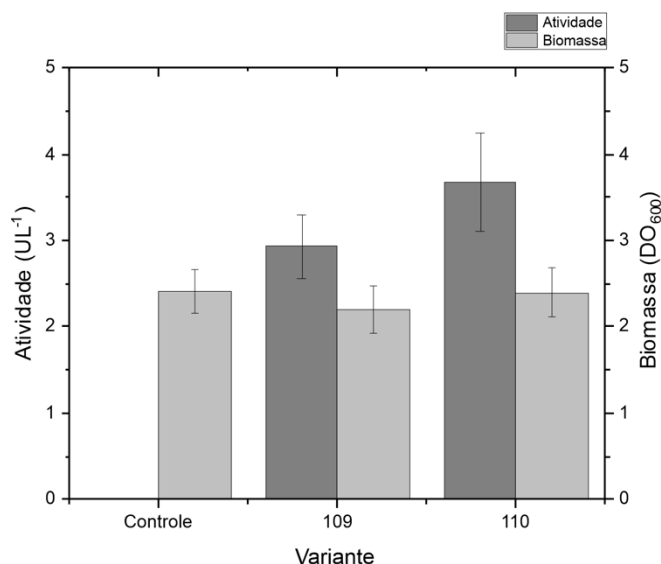
Figura 3. Análise da expressão da Lac1 em meio líquido pelas variantes constitutivas e linhagem controle. **A:** Em meio BMG. **B:** Em meio BMGY.



Considerando a expressão indutiva em meio líquido, apenas o meio mínimo metanol (BMM) foi capaz de induzir a expressão pelas variantes 109 e 110 (figura 4). Diferentes proteínas/enzimas já foram expressas por *P. pastoris* utilizando BMMY como meio indutor. Apesar de o promotor pAOX1 ser induzido na presença de metanol, o mesmo pode ser bloqueado na presença de glicerol, glicose ou outros açúcares. O meio complexo metanol (BMMY) possui extrato de levedura, que como mencionado anteriormente, pode servir como fonte de adicional de carbono, reprimindo o promotor pAOX1. O fato de o meio complexo metanol funcionar para alguns casos e não funcionar para outros ainda não foi elucidado. Novamente, não houve diferença significativa do crescimento celular das variantes e da linhagem controle em nenhum dos dois meios testados. Além disso, a linhagem controle não apresentou atividade de lacase.

O sistema Pichia toolkit foi considerado viável para expressão da Lac1, em condições de *screening* para ambos os tipos de vetores.

Figura 4. Análise da expressão da LacI em meio BMM pelas variantes indutivas e linhagem controle.

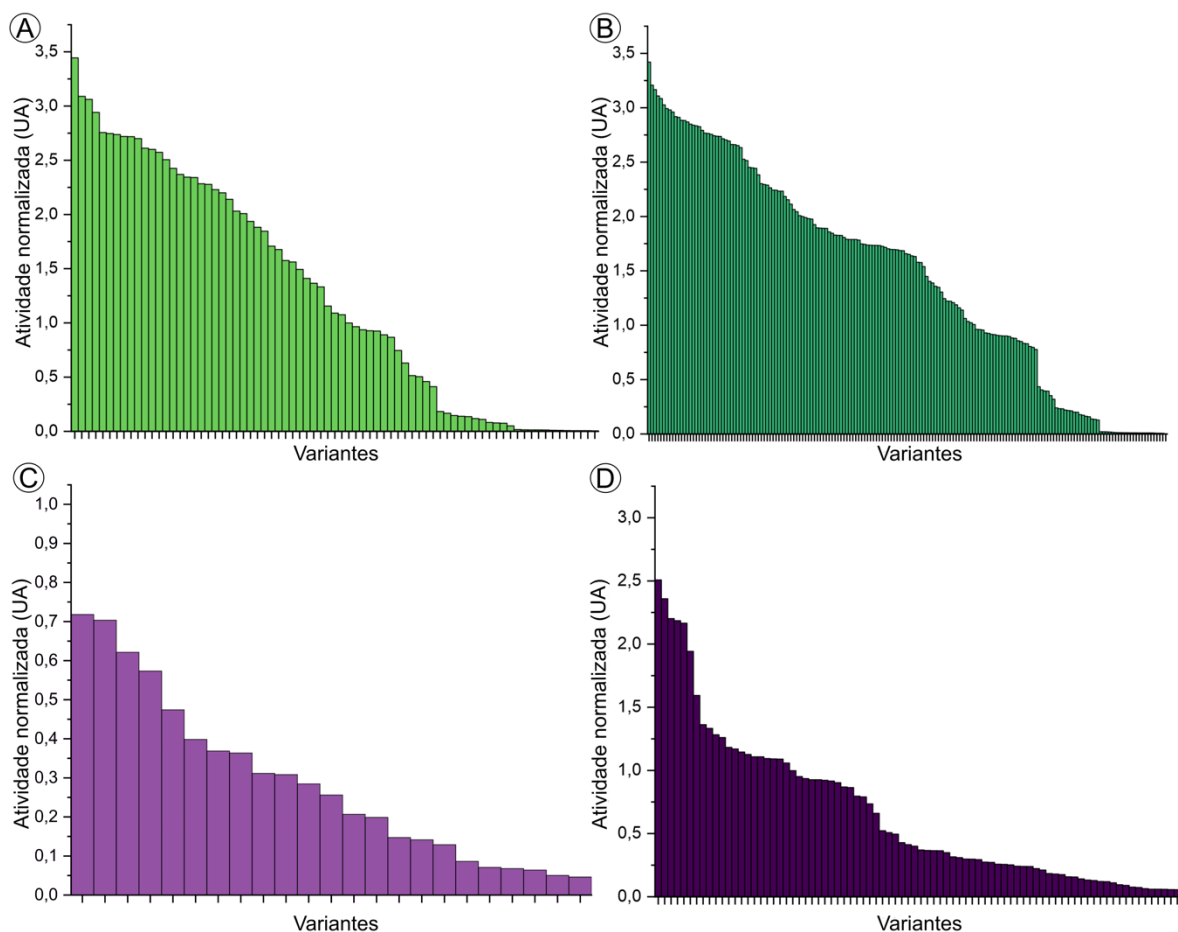


5.3.2 Montagem das bibliotecas, *screening* e seleção da melhor variante

Para alcançar 95% de completude para as bibliotecas, pelo menos 314 e 188 variantes deveriam ser triadas para cada biblioteca constitutiva e indutiva, respectivamente. Para garantir que a completude fosse alcançada, foram triadas 1092 variantes para cada biblioteca constitutiva (L3 e L4) e 546 variantes para cada biblioteca indutiva (L5 e L6), aproximadamente três vezes mais o número mínimo de variantes mínimo para cada biblioteca, totalizando mais de 3200 variantes avaliadas quanto a produção de LacI.

Após 48 h de cultivo em condições de indução e/ou expressão constitutiva, as bibliotecas apresentaram diferentes gradientes de produção (figuras 5A, B, C e D). No geral, as bibliotecas sem cauda *his-tag* (L4 e L6) apresentaram maior número de variantes com resultado positivo para LacI do que as bibliotecas com cauda (L3 e L5). As bibliotecas L3 e L5 apresentaram 107 e 23 variantes positivas, respectivamente; enquanto L4 e L6 apresentaram 280 e 82 variantes positivas, respectivamente.

Figura 5. Perfil de atividade de produção da LacI por variantes constitutivas das bibliotecas L3 e L4. **A:** Biblioteca constitutiva L3 (com cauda *his-tag*). **B:** Biblioteca constitutiva L4 (sem cauda). **C:** Biblioteca indutiva L5 (com cauda *his-tag*). **D:** Biblioteca indutiva L6 (sem cauda). Barras representam a média entre duas réplicas independentes.



Duas hipóteses poderiam justificar o menor número de variantes para as bibliotecas L3 e L5: (1) A cauda *his-tag* poderia estar interferindo na atividade enzimática devido ao arranjo tridimensional da enzima ter sido prejudicado pela presença da cauda (MAJOREK et al., 2014) e (2) O fragmento que codifica a *his-tag* poderia estar interferindo durante a reação de Golden gate, pois quanto maior o número de fragmentos a serem ligados em sequência, maior é a energia e o tempo necessário para reação, favorecendo a religação de fragmentos de GFP nativo do vetor pUO_501 e aumentando o número de colônias negativas presentes nas bibliotecas.

Quanto a produção, as bibliotecas constitutivas foram relativamente melhores que as bibliotecas indutivas. As melhores variantes para as bibliotecas constitutivas apresentaram produção praticamente idênticas, sendo $3,44 \pm 0,04$ UA para a melhor produtora em L3, e $3,42 \pm 0,01$ UA para a melhor produtora em L4. Por outro lado, as variantes com melhor

desempenho nas bibliotecas indutivas apresentaram níveis de produção distintos. A melhor produtora em L5 apresentou atividade 3,4 vezes menor do que a melhor produtora em L6, sendo $0,72 \pm 0,2$ e $2,51 \pm 0,02$ UA, respectivamente. Comparando as atividades obtidas pelas variantes da biblioteca L4 com a variante caracterizada pIO_109, foi possível perceber que os melhores resultados eram superiores a produção apresentada pela pIO_109, indicando uma provável diferença na construção molecular e o sucesso na montagem da biblioteca. O mesmo pôde ser especulado para os resultados da biblioteca L5 com a variante caracterizada pIO_113.

Para validar a eficiência das bibliotecas e caracterizá-las molecularmente, diferentes variantes foram selecionadas para sequenciamento do vetor integrado ao genoma. As tabelas 5, 6, 7 e 8 apresentam as construções moleculares (promotor e peptídeo sinal) de variantes com diferentes taxas de produção da Lac1, incluídas nas bibliotecas L3, L4, L5 e L6, respectivamente.

Dos cinco promotores utilizados para montar as bibliotecas constitutivas, apenas o promotor pG1 não foi encontrado entre as variantes caracterizadas. O promotor pGAP se destacou entre os melhores resultados em combinação com diferentes peptídeos sinal, em ambas as bibliotecas. O promotor pGAP é considerado forte e é utilizado para expressar diferentes proteínas constitutivamente na presença de glicerol, glicose ou metanol (VOGL; GLIEDER, 2013). Comparando apenas os resultados de L4 (sem cauda) e considerando a regulação da secreção pelo mesmo peptídeo sinal (MF41), o controle por pGAP resultou na produção da lacase heteróloga 1,4 e 9 vezes maior em comparação com a produção da enzima com o promotor pG6 e pADH2, respectivamente.

Diferentes estudos investigaram a influência das fontes de carbono na expressão heteróloga de proteínas, quando submetidas ao controle por pGAP. Contudo, pouco se sabe sobre a combinação desse promotor com diferentes sinais. A maior parte dos estudos se resumem a investigar se o fator alfa (α MF) é mais ou menos eficiente que o peptídeo sinal nativo do gene que será expresso (ZHANG et al., 2009). Obst; Lu e Sieber (2017), analisaram a influência de diferentes pré-sequências associadas a α MFA, sob controle do promotor pGAP, mas apenas para avaliar a expressão de GFP. No presente estudo, a associação do promotor constitutivo com os sinais α Amilase- α MFA, Mucina, MF41 e α MF-no-EAEA não apresentou diferença aparente na expressão de Lac1. Contudo, quando o sinal foi alterado para PP ou AS a atividade caiu 1,7 e 1,86 vezes, quando comparada com a atividade apresentada para α Amilase- α MFA (tabela 5).

Tabela 5. Caracterização molecular de diferentes variantes da biblioteca constitutiva L3.

Variante	Promotor	Peptídeo sinal	Atividade (U.L ⁻¹)	Atividade normalizada (UA)
L3.D-F1	pGAP	α Amilase- α MF Δ	34,44	3,44
L3.C-G3	pGAP	Mucina	30,61	3,06
L3.C-H3	pGAP	MF41	29,41	2,94
L3.D-F7	pGAP	α MF no EAEA	27,56	2,76
L3.B-G3	pG6	α MF no EAEA	27,37	2,74
L3.B-F2	pG6	α MF no EAEA	26,11	2,61
L3.C-C7	pPET9	MF41	22,29	2,23
L3.E-C9	pG6	MF41	21,4	2,14
L3.E-C7	pGAP	PP	20,31	2,03
L3.B-A5	pGAP	AS	18,46	1,85
L3.B-A12	pG6	PP	7,46	0,75
L3.C-C2	pG6	Lac1 PS otimizado	1,84	0,18
L3.A-C12	pG6	Lac1 PS original	1,36	0,14
L3.B-D9	pADH2	α Amilase- α MF Δ	1,18	0,12
L3.A-G3	pG6	Lac1 PS otimizado	0,78	0,08
L3.F-E4		GFP	0,12	0,01
L3.A-A9		GFP	0,00	0,00
L3.C-A9		GFP	0,00	0,00
L3.B-C5		GFP	0,00	0,00
L3.E-B12		GFP	0,00	0,00

A influência dos peptídeos sinal fica ainda mais evidenciado quando avaliamos o promotor pG6. Responsável por controlar a expressão de uma proteína hipotética em *P. pastoris*, esse promotor é altamente induzido em condições limitantes de glicose (PRIELHOFER et al., 2013). Quando combinado com o sinal α MF-no-EAEA a produção de Lac1 se equiparou a produção da enzima do controle por pGAP, ambos com 2,7 UA. Contudo, quando combinado com algum dos peptídeos sinal de Lac1 a produção diminuiu em mais de 15 vezes (tabelas 5 e 6).

Tabela 6. Caracterização molecular de diferentes variantes da biblioteca constitutiva L4.

Variante	Promotor	Peptídeo sinal	Atividade (U.L⁻¹)	Atividade normalizada (UA)
L4.C-B3	pGAP	α Amilase- α MF Δ	34,2	3,42
L4.E-D12	pGAP	MF41	32,08	3,21
L4.D-E1	pG6	α MF	31,67	3,17
L4.D-D6	pG6	α MF no EAEA	31,08	3,11
L4.F-D6	pG6	α MF no EAEA	30,84	3,08
L4.D-G2	pG6	α MF no EAEA	30,27	3,03
L4.A-B3	pG6	MF41	23,02	2,30
L4.D-D5	pG6	MF41	22,42	2,24
L4.A-B12	pG6	Dissulfeto isomerase	19,81	1,98
L4.B-B4	pG6	Mucina	17,9	1,79
L4.F-A8	pADH2	Dissulfeto isomerase	15,79	1,58
L4.B-G1	pADH2	MF41	3,53	0,35
L4.C-H9	pG6	Proteína hipotética 2	2,33	0,23
L4.D-B2	pG6	Scw11p	2,21	0,22
L4.D-D12	pG6	Lac1 PS original	1,38	0,14
L4.F-E3	pG6	α Amilase- α MF Δ	0,20	0,02
L4.D-E5	pG6	α Amilase- α MF Δ	0,10	0,01
L4.A-A9		GFP	0,00	0,00
L4.C-A9		GFP	0,00	0,00
L4.E-A9		GFP	0,00	0,00

Quanto aos promotores indutivos (tabelas 7 e 8), todos os três foram encontrados entre as variantes caracterizadas. O promotor pAOX1 foi o que apresentou os melhores resultados de produção da enzima em L6 (sem cauda), enquanto pPMP20 e pDAS1 foram os melhores em L5 (com cauda). O promotor pDAS1 está relacionado a fase assimilatória da indução por metanol e é considerado tão forte quanto o pAOX1 (VOGL et al., 2018). Em L6, o promotor pDAS1 apresentou resultados equiparáveis ao encontrado para pAOX1, quando associados ao mesmo sinal (MF41) (tabela 8).

A influência dos peptídeos sinal na produção da Lac1 ficou mais uma vez evidenciada quando analisamos as bibliotecas indutivas (tabelas 7 e 8). O promotor pAOX1 quando combinado ao sinal α Amilase- α MF Δ , alcançou a maior taxa de produção da enzima (2,51 UA). Contudo, quando combinado com os sinais AaeUPO, CSN2, Lac1 PS otimizado e PHA-E a atividade diminuiu consideravelmente, chegando a uma redução de quase 21 vezes quando combinado com o peptídeo sinal derivado da Fitohemaglutinina (PHA-E) (tabela 8).

Tabela 7. Caracterização molecular de diferentes variantes da biblioteca indutiva L5.

Variante	Promotor	Peptídeo sinal	Atividade (U.L ⁻¹)	Atividade normalizada (UA)
L5.E-C4	pPMP20	α MF no EAEA	1,64	0,72
L5.F-G11	pDAS1	α MF no EAEA	1,65	0,7
L5.E-G9	pAOX1	Mucina	1,16	0,47
L5.A-F5	pDAS1	α Amilase- α MF Δ	0,14	0,36
L5.F-A11	pDAS1	α Amilase- α MF Δ	0,98	0,31
L5.E-E5	pDAS1	Lac1 PS original	0,71	0,28
L5.B-H4	pDAS1	α MF	0,55	0,21
L5.E-G5	pAOX1	Proteína hipotética 1	0,38	0,14
L5.F-D9	pDAS1	AaeUPOeng	0,36	0,09
L5.D-D7	pAOX1	AaeUPO	0,12	0,05
L5.A-G11		GFP	0,09	0,03
L5.D-F11		GFP	0,05	0,02
L5.A-D1		GFP	0,01	0,01
L5.F-C5		GFP	0,00	0,00
L5.C-G1		GFP	0,00	0,00
L5.E-F9		GFP	0,00	0,00

Tabela 8. Caracterização molecular de diferentes variantes da biblioteca indutiva L6.

Variante	Promotor	Peptídeo sinal	Atividade (U.L ⁻¹)	Atividade normalizada (UA)
L6.A-G8	pAOX1	α Amilase- α MF Δ	6,72	2,51
L6.A-G3	pAOX1	α Amilase- α MF Δ	5,85	2,36
L6.B-C5	pAOX1	α Amilase- α MF Δ	6,14	2,20
L6.A-G5	pAOX1	α Amilase- α MF Δ	5,62	1,94
L6.F-G2	pDAS1	α MF no EAEA	3,02	1,59
L6.F-E1	pAOX1	MF41	2,17	1,17
L6.E-F10	pDAS1	MF41	2,05	0,94
L6.F-E2	pAOX1	AaeUPO	1,64	0,87
L6.D-B10	pDAS1	α MF	2,34	0,80
L6.F-H8	pDAS1	Lac1 PS original	0,92	0,43
L6.D-B4	pDAS1	Lac1 PS otimizado	0,92	0,36
L6.C-G4	pAOX1	CSN2	0,59	0,30
L6.F-C3	pDAS1	Proteína hipotética 2	0,63	0,26
L6.B-D10	pDAS1	Dissulfeto isomerase	0,67	0,24
L6.D-C2	pAOX1	Lac1 PS otimizado	0,47	0,18
L6.F-A12	pAOX1	PHA-E	0,23	0,12
L6.F-E6		GFP	0,05	0,01
L6.E-G11		GFP	0,00	0,00
L6.D-F1		GFP	0,00	0,00

A presença da cauda *his-tag* aparentemente teve mais influência na atividade enzimática das variantes indutivas do que das constitutivas. Como exemplo, temos a variante L6.F-G2 que apresentou atividade duas vezes maior do que a variante L5.F-G11, ambas com o mesmo promotor e peptídeo sinal, mas a última com presença da cauda na porção C-terminal. Em adição, a variante L6.F-E2 (sem cauda) apresentou atividade 17 vezes maior que a variante L5.D-D7 (com cauda), ambas reguladas pelo promotor pAOX1 e peptídeo sinal derivado de uma peroxigenase (AaeUPO). Por outro lado, a presença ou ausência de cauda não parece ter interferido na atividade das variantes constitutivas. As variantes L3.A-C12 e L4.D-D12, assim

como as variantes L3.D-F1 e L4.C-B3 (com e sem cauda, respectivamente), apresentaram produções idênticas para Lac1 (tabelas 5 e 6).

Os resultados de caracterização molecular deram sustentação às hipóteses levantadas anteriormente quanto à interferência da cauda *his-tag* no nível enzimático e molecular. A presença de GFP nativo do vetor pUO_501 (variantes negativas) pôde ser encontrado nas quatro bibliotecas triadas, mas em maior número nas bibliotecas com cauda (L3 e L5). Genes repórter como o GFP são comumente utilizados na estratégia de montagem de bibliotecas por Golden gate, visando a identificação visual de colônias negativas (KUCERA; CANTOR, 2018). Contudo, a eficiência da montagem pode ser prejudicada principalmente porque as reações apresentam muitos ciclos (40-50), o que pode consumir cofatores do tampão, como ATP, necessário para atividade correta da T4 ligase, prejudicando a eficiência dessa enzima. A enzima de restrição (BsaI) também pode ser prejudicada pela incubação em ciclos que diminuam a temperatura para 16 °C. Tentativas foram feitas no sentido de otimizar a reação e minimizar o número de variantes negativas nas bibliotecas, mas os estudos não foram conclusivos e, portanto, os resultados não estão apresentados neste trabalho.

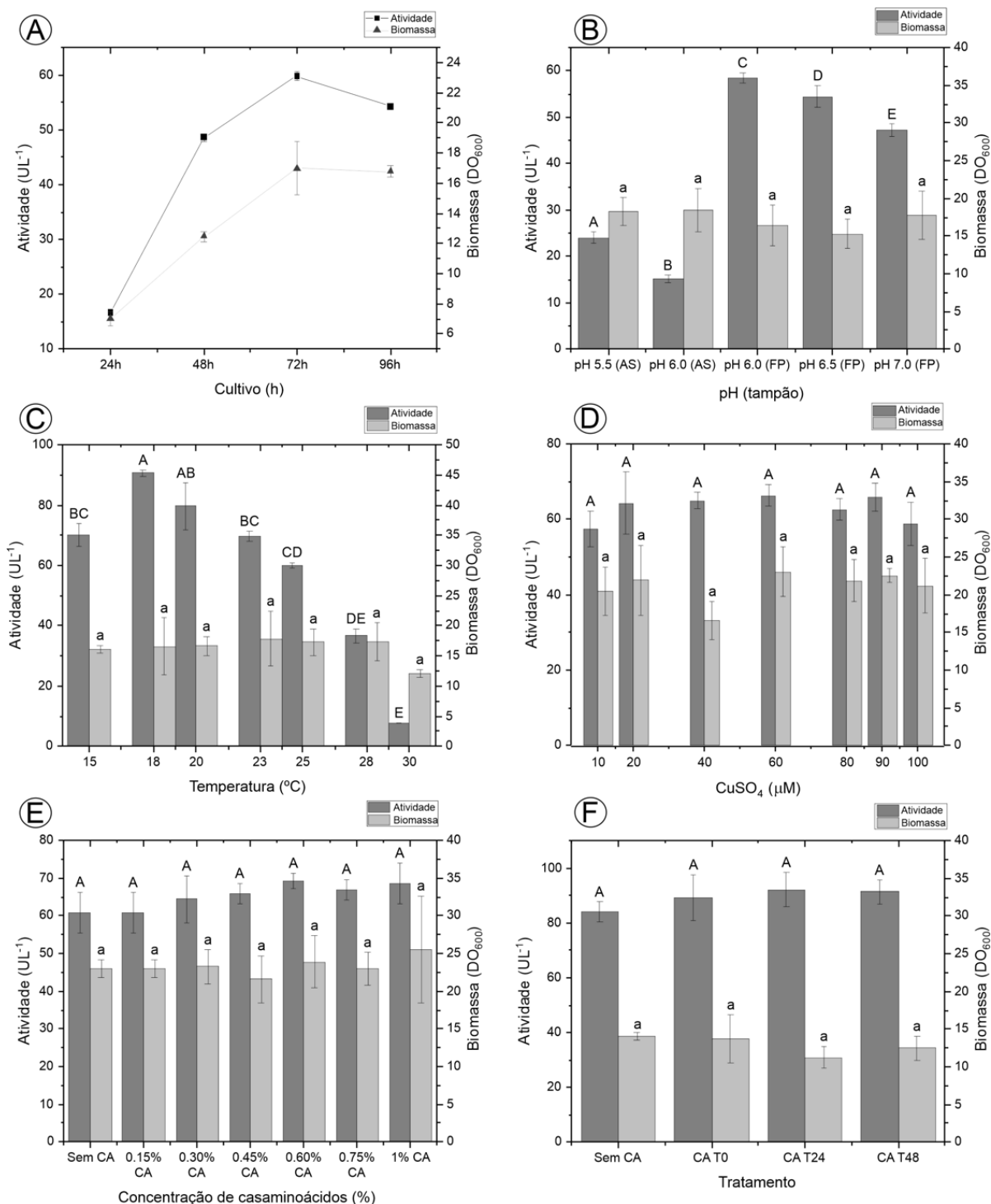
Como já mencionado, as variantes constitutivas controladas pelo promotor pGAP e peptídeo sinal α Amilase- α MFA apresentaram os melhores resultados de produção para Lac1. A expressão constitutiva de proteínas heterólogas apresenta como vantagens a independência da fase de indução por metanol, que é um produto petroquímico, inflamável e com elevada toxicidade. Na expressão constitutiva, a lacase heteróloga pode ser sintetizada concomitantemente ao crescimento celular, sem necessidade da troca da fonte de carbono. Como as variantes L3.D-F1 e L4.C-B3 não apresentaram diferença na produção e a cauda de *his-tag* facilita o processo de purificação da Lac1, a variante L3.D-F1 foi selecionada para os experimentos seguintes e foi renomeada como variante 117.

5.3.3 Determinação da cinética de produção e avaliação da influência de diferentes variáveis na produção enzimática e de biomassa pela variante 117

5.3.3.1 Cinética de produção

A cinética de produção da lacase foi realizada visando a determinação do pico de produção da enzima para a realização dos experimentos posteriores. Como pode ser visto na figura 6A, o pico de produção da Lac1 acompanhou o pico de crescimento celular após 72 h de incubação em meio de expressão BMGY.

Figura 6. Avaliação de diferentes variáveis na expressão da LacI e produção de biomassa pela variante 117. **A:** Cinética de produção. **B:** Influência de diferentes tampões e pHs. **C:** Influência de diferentes temperaturas. **D:** Influência de diferentes concentrações de CuSO_4 . **E:** Influência de diferentes concentrações de casaminoácidos. **F:** Influência do tempo na suplementação por casaminoácidos. AS: tampão acetato de sódio. FP: tampão fosfato de potássio. Letras diferentes indicam diferença significativa.



5.3.3.2 *Influência de diferentes tampões e valores de pH na produção de LacI*

No cultivo em tampão fosfato de potássio a atividade da lacase foi significativamente ($p < 0,001$) maior ($58,48 \text{ U.L}^{-1}$) em comparação com a atividade obtida em tampão de acetato de sódio ($15,21 \text{ U.L}^{-1}$). A atividade da lacase em pH 6 foi ligeiramente maior do que em pH 6,5 e 7, mas todos os grupos foram considerados significativamente diferentes pela análise de Tukey. A figura 6B mostra que, embora o pH tenha influenciado a atividade da lacase, nenhuma influência significativa foi encontrada para a biomassa. Embora o tampão acetato de sódio seja comumente usado para medições de atividade de lacase (BONUGLI-SANTOS et al., 2016; BRONIKOWSKI et al., 2017), a concentração de acetato usada no meio pode ter desviado a via metabólica, diminuindo a concentração de gliceraldeído-3-fosfato intracelular e suprimindo o promotor pGAP. Por outro lado, pHs neutros (6,5 e 7) podem ter afetado diretamente nas cargas da enzima e prejudicado a atividade, considerando que a maioria das lacases descritas na literatura são mais ativas sob condições ácidas (FONTES et al., 2021; VISWANATH et al., 2014).

5.3.3.3 *Influência de diferentes temperaturas de incubação na produção da LacI*

Dentre as variáveis testadas, a temperatura foi a que mais influenciou na produção da LacI. A figura 6C mostra que o pico de atividade foi alcançado a 18°C ($90,07 \text{ U.L}^{-1}$) enquanto a menor atividade foi a 30°C ($7,91 \text{ U.L}^{-1}$). Também foi encontrada diferença significativa ($p < 0,001$) entre a melhor temperatura e a temperatura utilizada durante a triagem das bibliotecas (25°C). Temperaturas mais baixas diminuem o metabolismo celular e podem auxiliar nas etapas de dobramento da enzima heteróloga recém-sintetizada, permitindo a expressão de enzimas com melhor atividade (HONG; MEINANDER; JÖNSSON, 2002). A linhagem *P. pastoris* BxbI utilizada no presente estudo possui genoma muito semelhante ao da linhagem selvagem e não apresenta a deleção de proteases como algumas linhagens comerciais, o que pode ser prejudicial para a produção, pois as proteases da hospedeira podem degradar a enzima heteróloga. Nesse sentido, baixas temperaturas podem favorecer a produção ao diminuir a atividade de proteases, aumentando o rendimento (HONG; MEINANDER; JÖNSSON, 2002). A ampla faixa de temperaturas testadas não influenciou significativamente a produção de biomassa.

5.3.3.4 *Influência de diferentes concentrações de CuSO_4 na produção da LacI*

Um pico de atividade de lacase foi encontrado quando o meio foi suplementado com $60 \mu\text{M}$ de CuSO_4 ($66,38 \text{ U.L}^{-1}$). No entanto, nenhuma diferença significativa ($p = 0,09$) foi

encontrada para atividade de lacase e produção de biomassa ($p = 0,145$) (figura 6D). O CuSO_4 é comumente relatado como indutor de lacases fúngicas (PALMIERI et al., 2000), sendo que a descoberta da concentração ideal pode ser considerada como um desafio. Uma vez determinada a concentração, o aumento da concentração não resulta em aumento da expressão, mas pode fazer o contrário, ou seja, suprimir a expressão. Concentrações superiores a $100 \mu\text{M}$ foram testadas e apresentaram justamente a queda esperada após o pico ótimo (dados não apresentados). É possível que concentrações ainda menores do que $10 \mu\text{M}$ sejam suficientes para induzir a expressão, visto que não foram feitos testes do meio complexo glicerol (BMGY) sem suplementação por cobre e pode ser que a necessidade da suplementação vista anteriormente seja válida apenas para o meio mínimo.

5.3.3.5 Influência de diferentes concentrações de casaminoácidos na produção da LacI

Casaminoácidos (CA) são considerados inibidores de proteases por servir como fonte adicional de nitrogênio facilmente metabolizada. Kaushik et al. (2016), conseguiram otimizar a produção do antígeno EDIII ao diminuir a temperatura durante a fase de indução e suplementar o meio de cultivo com 1% de CA. No presente estudo, não houve diferença significativa para produção de LacI ou de biomassa para nenhuma das concentrações testadas de CA (figura 6E).

5.3.3.6 Validação das melhores condições e avaliação da influência do tempo na adição de casaminoácidos

Considerando que com o decorrer da biorreação as fontes de nitrogênio tendem a diminuir, aumentando assim expressão de proteases, foi feito um experimento avaliando a adição de 0,6% de CA em diferentes tempos, associado as melhores condições de cultivo para produção de LacI encontradas nos experimentos anteriores. Foi considerada como condição controle aquela sem suplementação por CA. Apesar da média de atividade ter sido maior em T0, nenhum dos tempos testados apresentou aumento significativo na produção de LacI (figura 6F), em relação ao controle, validando o resultado anterior.

5.3.4 Experimentos em biorreator

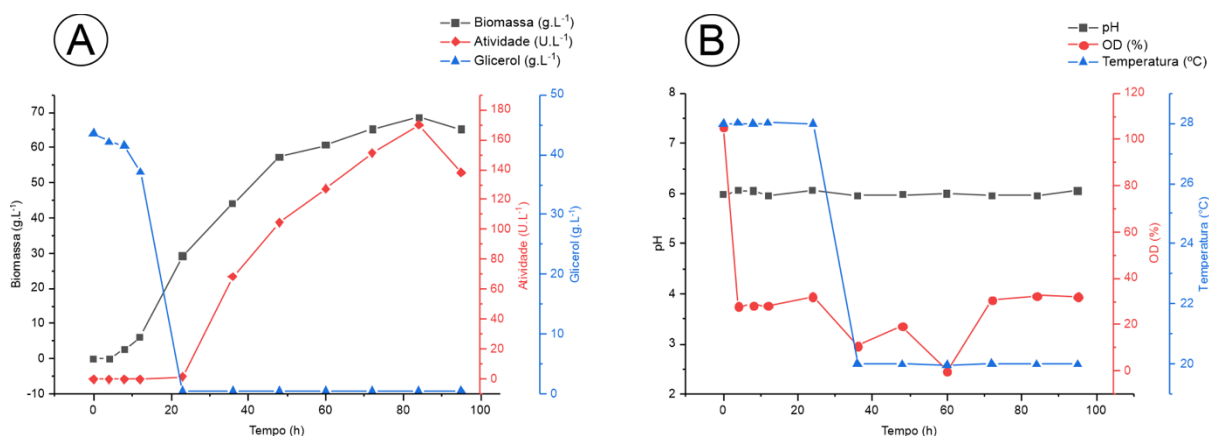
Os experimentos conduzidos em placas de 24 poços foram úteis para selecionar variáveis que influenciaram positivamente a produção da LacI, consumindo poucos recursos e otimizando o tempo. Contudo, a transferência de condições de uma escala para outra (e.g.

placas com poços de 10 mL para frascos com 1.000 mL) nem sempre é possível. Por exemplo, a taxa de oxigenação dos cultivos é um ponto limitante durante os bioprocessos e dificilmente pode ser reproduzido ao mudar da escala de *screening* para escalas maiores (ECK et al., 2018). Experimentos conduzidos em frascos de 2 L com a variante 117 não apresentaram os mesmos resultados encontrados para a produção em placa de 24 poços (dados não apresentados). Nesse sentido, foram realizados cultivos em biorreator de bancada visando ao menos reproduzir as taxas de produção da LacI obtida nos experimentos em placa. Devido ao tempo reduzido para a realização desses experimentos, foram adotados métodos definidos para a expressão de outras proteínas (ABDULRACHMAN et al., 2017; LIU et al., 2019b).

Os dois bioprocessos realizados utilizaram basicamente a mesma estratégia, com algumas adaptações no segundo em relação ao primeiro.

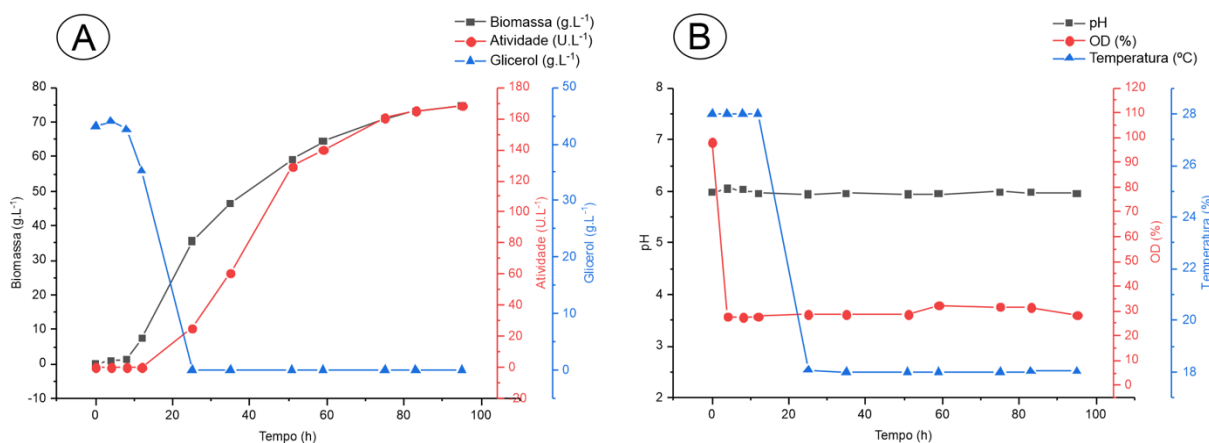
A figura 7, apresenta os resultados do primeiro bioprocessos, onde é possível observar que a levedura entra em fase exponencial após 10 h, ainda durante a fase de *batch*. Além disso, conforme o cultivo entra em fase exponencial, o consumo de glicerol também aumenta exponencialmente, chegando a zero após 22 h. Logo após o início da alimentação contínua (*feed-batch*) a OD se manteve próxima a 30% por 1 h, mas quando a temperatura começou a ser reduzida o OD caiu para próximo de 10%. A aeração foi mantida em 2 VVM devido a formação de espuma viscosa durante a fase de alimentação e a temperatura mantida em 20 °C. É possível ver na figura 7B que a máxima agitação a 1000 RPM e aeração a 2 VVM não foram suficientes para manter a taxa de oxigênio dissolvido em 30%. Essa taxa só foi recuperada após o cultivo entrar em fase estacionária (~70 h). Como esperado para a expressão sob controle do promotor pGAP, a produção da LacI acompanhou paralelamente o crescimento celular, de modo semelhante ao que havia sido encontrado para as placas de 24 poços. O pico de produção foi obtido após 84 h do bioprocessos com 170 U.L⁻¹ de lacase, acompanhando o pico da produção de biomassa com 68,6 g.L⁻¹. O pH foi mantido em 6 durante todo o processo, sem grandes oscilações.

Figura 7. Resultados do primeiro bioprocesso em biorreator de bancada. **A:** Produção de biomassa, de LacI e consumo de glicerol em função do tempo. **B:** valores de pH, taxa de oxigênio dissolvido e temperatura em função do tempo.



O segundo bioprocesso apresentou-se mais estável durante todo o período (figura 8). É possível observar na figura 8B que a OD foi mantida próxima a 30% durante todo o processo. A agitação máxima foi mantida em 1000 RPM como no bioprocesso anterior, mas a aeração máxima foi ajustada para 3 VVM. Novamente a produção de lacase acompanhou o crescimento celular, com pico de lacase após 78 h (178 U.L⁻¹) e máxima produção de biomassa após 94 h (74,7 g.L⁻¹).

Figura 8. Resultados do segundo bioprocesso em biorreator de bancada. **A:** Produção de biomassa, de LacI e consumo de glicerol em função do tempo. **B:** valores de pH, taxa de oxigênio dissolvido e temperatura em função do tempo.



De acordo com Looser et al. (2015), o perfil de crescimento celular de *P. pastoris* pode ser diretamente afetado pelas modificações genéticas realizadas numa determinada linhagem. Por modificações relevantes, entenda-se o tipo de promotor e proteína heteróloga inseridos.

Nesse sentido, a determinação da cinética de crescimento e produção é uma etapa chave para definir a taxa ótima de crescimento específico onde a melhor produção pode ser alcançada (LOOSER et al., 2015). Além disso, definir as características de crescimento para cada variante permite identificar quando o processo passa a prejudicar fisiologicamente a levedura. Em condições em que há prejuízo fisiológico, o crescimento celular tende a parar, há morte celular e lise com a consequente liberação de proteases no meio, prejudicando a produção da enzima heteróloga (JAHIC et al., 2003, 2006; ZHOU; ZHANG, 2002). No presente estudo, não foram feitas análises prévias das taxas de crescimento específico (μ) ou taxa de crescimento específico máxima ($\mu_{\max}$), bem como as taxas de produtividade ($q_p/q_{p,\max}$) e consumo do substrato ($q_s/q_{s,\max}$) para a variante 117 em meio BMGY. Portanto, os resultados apresentados no segundo bioprocesso não refletem uma condição ótima, mas a melhor condição de cultivo encontrada para a expressão de Lac1 em biorreator. Apesar da produção em biorreator ter sido quase duas vezes maior do que a produção em placa, a atividade normalizada em placa foi de 6,5 UA enquanto em biorreator foi de 0,5 UA. Esses resultados indicam uma clara possibilidade de otimização do processo de produção da enzima em biorreator.

5.4 Conclusões

O presente estudo reporta de forma inédita a expressão heteróloga de uma lacase marinha pelo sistema Pichia Toolkit. A expressão constitutiva da lacase por esse sistema foi mais vantajosa e eficiente em relação a expressão indutiva. As diferentes combinações de promotor e peptídeo sinal influenciaram significativamente na produção da lacase heteróloga. Nesse sentido, o sistema utilizado foi muito eficiente para a seleção da variante com a melhor regulação da expressão e secreção da Lac1. Além disso, a análise de diferentes variáveis permitiu encontrar a melhor condição de cultivo para produção heteróloga da Lac1, com especial destaque para o cultivo em baixas temperaturas.

Apesar de inconclusivos, os experimentos em biorreatores poderão servir de base para futuros ensaios de otimização da produção em escala de bancada.

6. CAPÍTULO III. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA LACASE MARINHA LAC1

6.1 Introdução

Lacases são enzimas amplamente distribuídas entre os fungos, assim como outras multicobre-oxidases (BALDRAN, 2005; KÜES; RÜHL, 2011). Tanto basidiomicetos quanto ascomicetos filamentosos ou leveduriformes já foram descritos como capazes de expressar tais enzimas (BALDRAN, 2005). Majoritariamente extracelulares, as lacases fúngicas são secretadas no meio de cultivo, facilitando os processos de purificação.

Assim como para outras proteínas/enzimas nativas, diferentes técnicas de purificação podem ser empregadas sozinhas ou em conjunto para obtenção de lacases puras. Os protocolos mais comuns realizam a purificação em duas etapas, iniciando o processo com uma coluna de troca iônica, seguida por coluna de gel filtração ou exclusão molecular (FONTES et al., 2021; MAINARDI et al., 2018; SHRADDHA et al., 2011). Outros protocolos sugerem a precipitação inicial do caldo enzimático por sulfato de amônio antes das etapas de cromatografia (SHRADDHA et al., 2011). Contudo, quanto mais etapas de purificação envolvidas, menor é o rendimento da enzima pura, devido as perdas durante cada etapa do processo. Dessa forma, a cromatografia por afinidade apresenta vantagem sobre as outras técnicas por ser capaz de purificar a proteína desejada em uma única etapa de cromatografia, minimizando as perdas e aumentando o rendimento da enzima pura, sendo ideal para purificação de enzimas pouco expressas, como é o caso da Lac1 expressa pela variante 117 (capítulo 2).

Como exemplo mais comum de cromatografia por afinidade temos a do tipo IMAC (do inglês *immobilized-metal affinity chromatography*), utilizada para purificação proteínas/enzimas heterólogas com presença de calda de histidina (*his-tag*). Nessas colunas a matriz é carregada com íons metálicos de transição, geralmente níquel (Ni^{2+}), que se ligam de maneira reversível a amida do radical imidazólico da histidina, uma vez ligada a coluna, as outras proteínas/enzimas presentes no meio são lavadas em baixas concentrações de imidazol e por fim a proteína de interesse é eluída em concentrações mais altas de imidazol (que compete pela ligação com o Ni^{2+} , soltando a enzima da coluna).

Independentemente do processo de purificação, lacases podem apresentar diferentes características bioquímicas e estruturais dependendo de sua origem. Por exemplo, enquanto a lacase do fitopatógeno *Magnaporthe grisea* apresentou atividade ótima a 30 °C (IYER; CHATTOO, 2003); a lacase do fungo termofílico *Thermothelomyces thermophila* além de atividade ótima a 50 °C, apresentou também boa atividade relativa até 80 °C (ZERVA et al.,

2019). Quanto ao pH ótimo, lacases fúngicas tendem a apresentar melhor atividade em pH ácido (entre 2 e 5), enquanto lacases bacterianas apresentam atividade ótima em pH alcalino (entre 7,5 e 9).

Além da tolerância maior a salinidade (BONUGLI-SANTOS et al., 2015), lacases derivadas do ambiente marinho podem apresentar também maior resistência a íons metálicos em relação a proteoformas terrestres (ASADI; MAKHDOUMI; ASOODEH, 2020). A tolerância a íons metálicos é característica importante para aplicação dessas enzimas na biorremediação de efluentes têxteis, visto que diferentes íons são utilizados nos processos de tingimento (Pb^{2+} e Cu^{2+}) e/ou fixação (Zn^{2+} e Cr^{4+}), estampagem (Cu^{2+} , Al^{3+} e Fe^{2+}) e finalização (Co^{2+} e Cd^{2+}) (VELUSAMY et al., 2021).

De acordo com Viswanath et al. (2014), mais de 100 lacases fúngicas já foram purificadas, contudo, até o presente momento, poucos trabalhos relatam a purificação total ou parcial e/ou as características bioquímicas de lacases de origem marinha (ALI et al., 2020b; D'SOUZA-TICLO; SHARMA; RAGHUKUMAR, 2009; FONTES et al., 2021; MAINARDI et al., 2018; NIKOLAIVITS et al., 2021; WIKKE et al., 2019) Dessa forma, o presente capítulo visou realizar a purificação da Lac1 por cromatografia de afinidade do tipo IMAC, bem como caracterizar as propriedades bioquímicas da enzima quanto a afinidade por substratos, temperatura e pH ótimos, tolerância a sais, solventes, inibidores e íons metálicos.

6.2 Material e métodos

6.2.1 Purificação da lacase heteróloga Lac1

O pH do caldo de fermentação foi ajustado com 25% NH_4OH para 7,5. O caldo foi centrifugado a 18.000 xg e o sobrenadante foi esterilizado por filtração, utilizando filtro 0,22 μm . Devido a capacidade da variante 117 secretar a lacase heteróloga com cauda *his-tag*, a purificação da enzima foi feita utilizando a coluna Histrap FF Crude 5 mL (GE Healthcare, Alemanha). O tampão de ligação (fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5, cloreto de sódio 500 mM) foi usado para lavar a coluna antes da eluição com o tampão de eluição (fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5, cloreto de sódio 500 mM, imidazol 500 mM). As frações com maior atividade para lacase foram misturadas e dessalinizadas com tampão de dessalinização (fosfato de potássio 100 mM, pH 6, 10 μM $CuSO_4$) em coluna HiPrep 26/10 50 mL (Ge Healthcare, Alemanha). A enzima purificada foi congelada em nitrogênio líquido e armazenada a $-80^\circ C$ até uso posterior.

A concentração da enzima pura foi determinada por espectrofotometria, utilizando o nanofotômetro P-class (Implen, EUA). O peso molecular (MW), bem como o coeficiente de

extinção a 280 nm (ϵ_{280}) da enzima foi calculada com a ferramenta ProtParam, considerando a cauda *his-tag*.

6.2.2 Caracterização da Lac1

6.2.2.1 Verificação da pureza e determinação do tamanho da enzima e da porção glicídica

O tamanho da lacase purificada foi determinada por eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio-poliacrilamida (SDS-page), conforme descrito por (GÜNER et al., 2021), com modificações. Para a preparação da amostra, 12 μ L de amostra da enzima foram misturados com 8 μ L de tampão de amostra SDS 2,5x, a mistura foi centrifugada no modo *spin down* e incubada por 10 min a 95 °C. Em seguida, 10 μ L por amostra foram carregados em um gel de SDS a 12%. O gel foi corrido em sistema Mini-PROTEAN-Tetra Cell (Bio Rad), por cerca de 1 h a 40 mA.

Para avaliação da taxa de glicosilação feita por *P. pastoris* na enzima heteróloga, uma reação de desglicosilação foi realizada utilizando a enzima PNGase F (NEB). A reação inicial continha 20 μ g da enzima, 1 μ L do tampão de desnaturação 10x e água ultrapura para completar o volume final de 10 μ L. A desnaturação foi feita a 100 °C por 10 min. Depois, foi adicionado a reação 2 μ L de tampão 10x da PNGase F, 2 μ L de 10% NP-40, 1 μ L de PNGase F e 5 μ L de água ultrapura para completar o volume final de 20 μ L. A reação foi incubada a 37 °C por 1 h. O efeito da desglicosilação foi visualizado em gel de SDS-page. Uma reação controle foi preparada sem a adição de PNGase F para comparação.

6.2.2.2 Cinética enzimática

Com o objetivo de avaliar as características cinéticas de Lac1, ABTS, guaiacol e siringaldazina foram utilizados como substratos de lacase em diferentes concentrações. As concentrações variaram de 10 a 500 μ M para ABTS, de 50 a 5000 μ M para guaiacol e de 1 a 100 μ M para siringaldazina. A mistura tampão-enzima, bem como os substratos, foram pré-incubados separadamente a 37 °C por 7 min. A reação foi iniciada pela adição do substrato à mistura tampão-enzima. Todas as reações foram realizadas a 37 °C por 20 min no pH ótimo para cada substrato. A quantificação da atividade enzimática foi feita como descrita no item 5.2.7 do capítulo 5. Para o cálculo, foram considerados os seguintes coeficientes de extinção molar: 26.600, 36.000 e 65.000 $M^{-1} cm^{-1}$ para o guaiacol, o ABTS e a siringaldazina, respectivamente. O aumento na absorbância foi detectado a 420, 470 e 525 nm para o ABTS, o guaiacol e a siringaldazina, respectivamente.

6.2.2.3 *Influência do pH na atividade e estabilidade da LacI*

A influência do pH na atividade enzimática foi definida para os três substratos utilizados na análise cinética (item 6.2.2.2). O pH variou de 2 a 8, utilizando os tampões McIlvaine (pH 2), citrato de sódio (pH 3), acetato de sódio (pH 4 e 5) e fosfato de potássio (pH 6, 7 e 8). Todos na concentração final de 100 mM. Para análise de estabilidade em diferentes valores de pH, a enzima foi incubada a 30 °C por 1, 2 e 12 h em pH variando de 2 a 7. Após o período de incubação, a atividade residual foi medida usando ABTS como substrato. A quantificação da atividade enzimática foi feita como descrita no item 5.2.7 do capítulo 5. A atividade enzimática foi considerada 100% para o tempo zero de incubação.

6.2.2.4 *Influência da temperatura na atividade e estabilidade da LacI*

A influência da temperatura na atividade de LacI foi definida usando ABTS como substrato em tampão citrato de sódio 100 mM pH 3. Temperaturas de 25, 30, 40, 50, 60 e 65 °C foram avaliadas. A termoestabilidade foi avaliada pela análise de T_{50}^{1h} , que é definida pela temperatura onde a enzima apresenta 50% da atividade inicial, após 1 h de incubação [29]. Para esta análise, a reação foi preparada a partir de uma mistura de 0,27 mg.mL⁻¹ de enzima em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 6, suplementado com 10 µM de CuSO₄, que foi incubado por 1 h em termociclador em temperaturas variando de 25 a 80°C. A atividade de lacase residual foi realizada usando ABTS como substrato. A reação continha 5 µL da enzima, 195 µL de tampão citrato de sódio 100 mM (pH 3) e ABTS 0,5 mM. A quantificação da atividade enzimática foi feita como descrita no item 5.2.7 do capítulo 5. A atividade enzimática foi considerada 100% para a condição de incubação da enzima a 25 °C.

6.2.2.5 *Efeito de inibidores, solventes, metais pesados, NaCl e água do mar na atividade da LacI*

Com o objetivo de avaliar a influência de diferentes inibidores, íons metálicos e solventes, LacI foi incubada em diferentes concentrações (10, 20 e 30% [v/v]) de solventes orgânicos, incluindo 2-propanol, acetonitrila, acetona, dimetilsulfóxido (DMSO), etanol, glicerol e metanol, bem como inibidores de enzimas (a 0,1, 0,5 e 1 mM), incluindo 2-mercaptoetanol, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), L-cisteína, azida de sódio e dodecil sulfato de sódio (SDS). Cloreto de sódio foi testado a 10, 50, 100, 500 e 1000 mM e a água do mar artificial (ASW) foi testada nas concentrações 1, 2, 3 e 3,5%. Vários íons (K⁺, Fe²⁺, Co²⁺, Ag²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ e Mn²⁺) foram testados a 5, 10 e 15 mM. Todas as reações foram

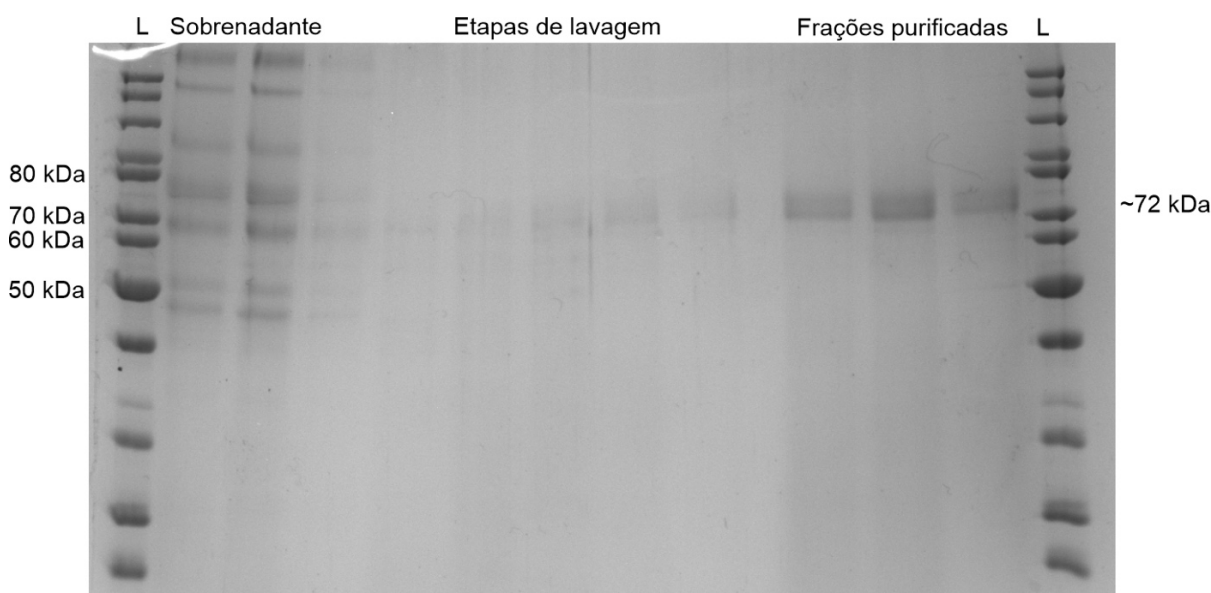
incubadas a 37 °C por 7 min antes de adicionar o substrato (ABTS). A atividade residual foi comparada ao controle onde a reação enzimática foi realizada sem os aditivos mencionados.

6.3 Resultados e Discussão

6.3.1 Purificação e deglicosilação da Lac1

A purificação em duas etapas foi considerada eficiente para purificar a Lac1 heteróloga (figura 1), mesmo as amostras apresentando duas bandas no gel de SDS-PAGE. A enzima purificada apresentou um tamanho aproximado de 72 kDa, bem maior que a lacase nativa purificada do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063, com 55 kDa (MAINARDI et al., 2018), mas semelhante ao encontrado por Fontes et al. (2021), para o pool de lacases do mesmo fungo. A Lac1 heteróloga apresentou porção glicídica estimada em 18,3%. Esses resultados vão de encontro ao que vem sendo reportado para lacases fúngicas (CLAUS, 2004). Lacases são glicoproteínas monoméricas com tamanho médio entre 50 e 100 kDa e porção glicídica representando entre 10 e 45% da massa total da enzima (CLAUS, 2004; RIVERA-HOYOS et al., 2013).

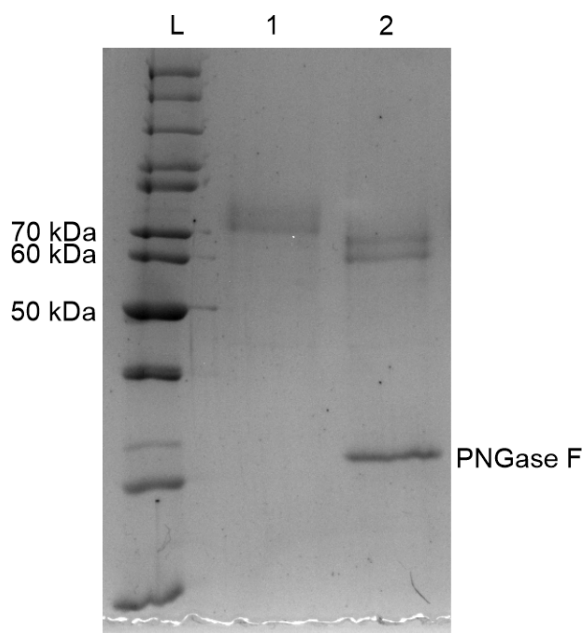
Figura 1. Etapas de purificação da Lac1 utilizando cromatografia de afinidade por *his-trap*. L: *ladder* – padrão de peso molecular.



Apesar de *P. pastoris* não produzir lacases hiper-glicosiladas, como *S. cerevisiae* (PISCITELLI et al., 2010), as enzimas heterólogas podem apresentar diferentes padrões de glicosilação, visto que a Lac1 não é uma enzima nativa para a levedura. Dessa forma, as duas

bandas visualizadas no gel poderiam ser resultantes dessa diferença no padrão de glicosilação. Para avaliar essa hipótese, a enzima purificada foi submetida a um ensaio de deglicosilação por PNGase F visando a obtenção de uma única banda, referente a porção polipeptídica. A figura 2 apresenta o resultado da reação ao lado do controle. Apesar da reação claramente ter funcionado, é possível ver que o padrão de bandas duplas permaneceu. Bazon et al. (2017), reportaram o mesmo padrão de bandas duplas para o antígeno V de *Polybia paulista* expresso por *P. pastoris* X-33. De acordo com os autores do estudo, a segunda banda pode ser resultado do mau processamento do peptídeo sinal. O sinal α MF, presente na maioria dos sistemas comerciais, possui os sítios Ste13 e Kex2 para a clivagem do sinal, contudo o sinal α Amilase- α MFA possui apenas o sítio para Kex2, o que pode aumentar as chances de mau processamento do peptídeo sinal e justificar a segunda banda encontrada no presente estudo.

Figura 2. Ensaio de deglicosilação com PNGase F. **1:** Reação controle preparada sem PNGase F. **2:** Reação de deglicosilação da Lac1. L: ladder – padrão de peso molecular.



6.3.2 Cinética enzimática e afinidade por diferentes substratos

Os parâmetros cinéticos (K_m , V_{max} e K_{cat}) foram determinados para a Lac1, utilizando três substratos: ABTS, guaiacol e siringaldazina. A Lac1 apresentou maior afinidade para siringaldazina ($K_m = 0,019$ mM), seguido por ABTS ($K_m = 0,043$ mM) e menor afinidade para guaiacol ($K_m = 1$ mM) (tabela 1). O mesmo padrão de maior afinidade para o ABTS em relação ao guaiacol foi reportado para a lacase POXC de *Pleurotus ostreatus*, lacases L1 e L2 de

Ceriporiopsis subvermispora e lacase UD4 de um basidiomiceto não identificado (FUKUSHIMA; KIRK, 1995; JORDAAN; PLETSCHKE; LEUKES, 2004; PALMIERI et al., 1997).

É possível observar na tabela 1 que o valor de K_m obtido para ABTS ficou bem próximo ao encontrado por Fontes et al. (2021), para o pool de lacases parcialmente purificadas do *Peniophora* sp. CBMAI 1063, fungo produtor natural da Lac1. Por outro lado, a lacase marinha de *S. lucomagnoense* apresentou um valor de K_m duas vezes menor (ALI et al., 2020b), enquanto a LacA de *Peniophora cinerea* apresentou a maior afinidade por ABTS com $K_m = 0,012$ (MOREIRA; MILAGRES; MUSSATTO, 2014).

Tabela 1. Parâmetros cinéticos da Lac1 em comparação com outras lacases. Syr: siringaldazina. NA: não apresentado.

Origem	Fungo	Lacase	Substrato	pH	Vmax	K _m (mM)	K _{cat} (s ⁻¹)	K _{cat} /K _m (s ⁻¹ mM ⁻¹)	Referência
Marinha	<i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063	Lac1	ABTS	3	3,709	0,043	4,47 x10 ³	104,09 x10 ³	Presente estudo
	<i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063	Lac1	Syr	5	1.152	0,019	3,27 x10 ³	163,55 x10 ³	Presente estudo
	<i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063	Lac1	Guaiacol	3	27,17	1	2,059	2,06	Presente estudo
	<i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063	Pool	ABTS	4	NA	0,047	NA	NA	Fontes et al. (2021)
	<i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063	Pool	Syr	5,5	NA	0,005	NA	NA	Fontes et al. (2021)
	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	Lac1	ABTS	4	NA	0,024	0,696	29,24	Wikee et al. (2019)
	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	Lac1	Syr	5	NA	0,004	0,365	82,93	Wikee et al. (2019)
	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	Lac2	ABTS	4	NA	0,1	0,431	4,33	Wikee et al. (2019)
	<i>Pestalotiopsis</i> sp.	Lac2	Syr	5	NA	0,101	0,573	0,56	Wikee et al. (2019)
	<i>Stemphylium lucomagnoense</i>	Lac2	ABTS	4	NA	0,02	0,153	7,42	Ali et al. (2020)
	<i>Stemphylium lucomagnoense</i>	Lac2	Syr	6	NA	0,003	0,007	2,11	Ali et al. (2020)
Terreste	<i>Peniophora cinerea</i>	LacA	ABTS	4	NA	0,012	NA	NA	Moreira; Milagres e Mussatto. (2014)
	<i>Peniophora cinerea</i>	LacB	ABTS	3	NA	0,02	NA	NA	Moreira; Milagres e Mussatto. (2014)
	<i>Peniophora cinerea</i>	LacC	ABTS	3	NA	0,015	NA	NA	Moreira; Milagres e Mussatto. (2014)
	<i>Pleorotus ostreatus</i>	POXA1	ABTS	3	NA	0,09	5,83 x10 ³	64,80 x10 ³	Palmieri et al. (1997)
	<i>Pleorotus ostreatus</i>	POXC	ABTS	3	NA	0,28	266	950	Palmieri et al. (1997)
	<i>Pleorotus ostreatus</i>	POXC	Guaiacol	6	NA	1,2	2,5	2,1	Palmieri et al. (1997)
	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	L1	ABTS	3	NA	0,03	101	3,40 x10 ³	Fukushima; Kirk, (1995)
	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	L1	Guaiacol	3	NA	1,6	52	33	Fukushima; Kirk, (1995)
	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	L2	ABTS	3	NA	0,02	96	4,80 x10 ³	Fukushima; Kirk, (1995)
	<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	L2	Guaiacol	5	NA	0,44	66	150	Fukushima; Kirk, (1995)
	Basídiomiceto UD4	UD4	ABTS	4	NA	0,012	778	63,30 x10 ³	Jordaan; Pletschke e Leukes (2004)
	Basídiomiceto UD4	UD4	Guaiacol	6	NA	0,251	42,1	168	Jordaan; Pletschke e Leukes (2004)

Derivada do siringaldeído, a siringaldazina é conhecida como o “verdadeiro” substrato de lacases, devido ao fato de que outras multicobre oxidases, como as tirosinases, não podem oxidar o substrato (FUKUSHIMA; KIRK, 1995; GÁSPÁR; BRINDUSE; VASILESCU, 2020; JORDAAN; PLETSCHKE; LEUKES, 2004). Além da alta afinidade para a siringaldazina, Lac1 também apresenta o maior valor de eficiência enzimática ($17,21 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

O ABTS é um substrato sintético que pode ser utilizado como mediador oxidativo, otimizando a atividade de lacases em processos de descoloração de corantes (biorremediação) (ASADI; MAKHDOUMI; ASODEH, 2020). Em experimento de descoloração do vermelho congo (24 mg.L^{-1}), a Lac1 não purificada foi capaz de descolorir 67% do corante em menos de 72 h na presença de ABTS (dados não apresentados). A boa afinidade e o alto K_{cat} , combinados com as concentrações ideais do substrato poderiam resultar em porcentagens de descoloração ainda maiores.

O guaiacol, ou 2-metoxifenol, é um composto derivado da lignina e utilizado em ensaios de detecção de enzimas ligninolíticas. Poucas lacases já caracterizadas são capazes de oxidar o guaiacol. Apesar da baixa afinidade da Lac1 por esse substrato, os resultados são um bom indicativo de que essa enzima também possa ser empregada em processos de oxidação de material ligno-celulósico. Brenelli et al. (2019), demonstraram que a Lac1 nativa na presença de mediadores foi capaz despolimerizar lignina derivada da cana-de-açúcar.

6.3.3 pH ótimo e influência do pH na estabilidade da Lac1

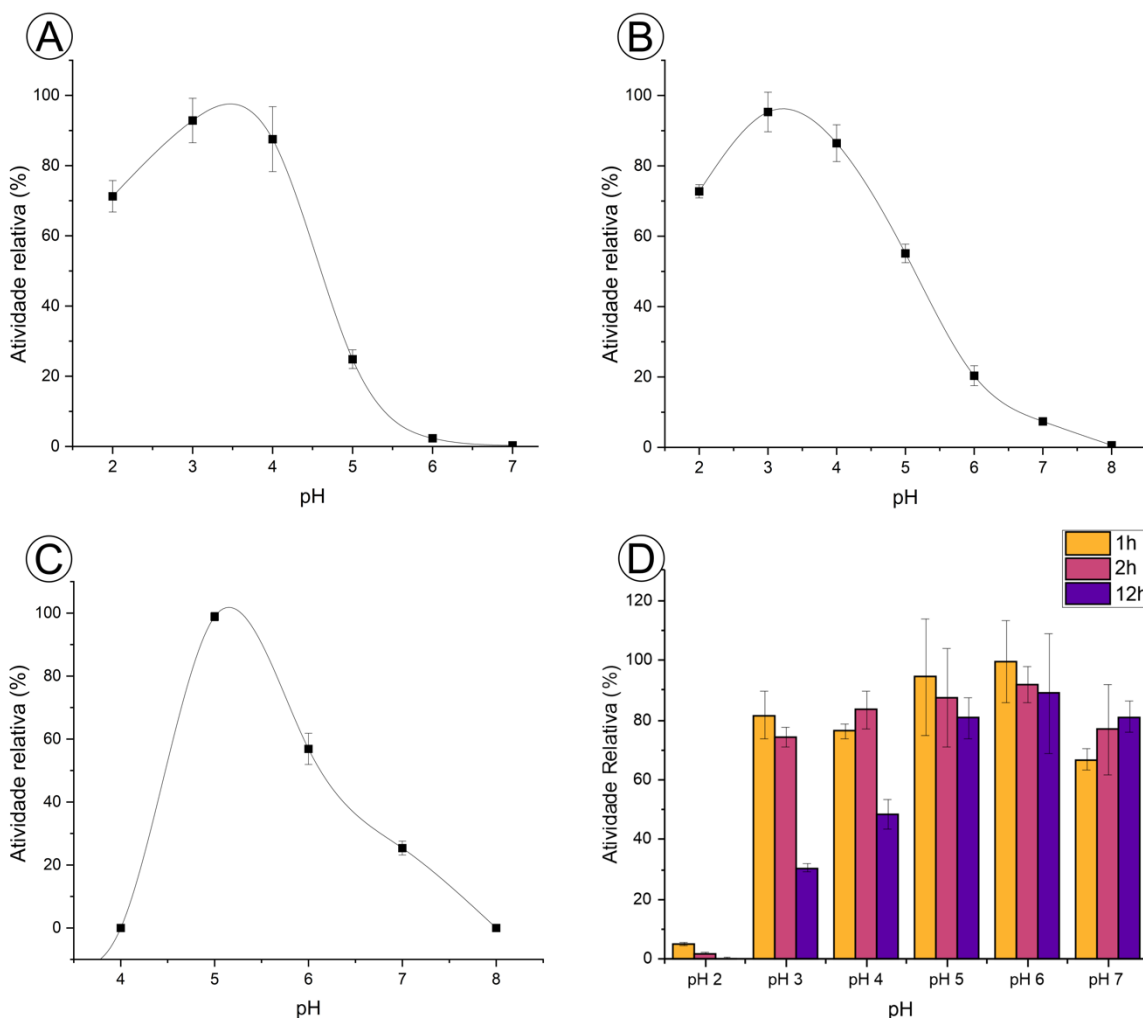
Os experimentos de pH ótimo foram realizados antes da determinação dos parâmetros cinéticos, mas serão apresentados e discutidos abaixo para os três substratos avaliados anteriormente.

Embora o pico de atividade de Lac1 em ABTS e guaiacol tenha sido obtido em pH 3, o pico em siringaldazina foi alcançado em pH 5 (figuras 3A, B e C). A faixa de atividade relativa acima de 50% ficou entre pH 2 e 5 para guaiacol, entre pH 2 e 4 para ABTS e entre 5 e 6 para siringaldazina. A maioria das lacases fúngicas apresenta atividade ótima em pH ácido (BALDRIAN, 2005). Lac1 não apresentou atividade em pH 8 para os substratos ABTS e siringaldazina e apresentou atividade mínima no mesmo pH para guaiacol.

Apesar da boa atividade em pH 2 para ABTS, o ensaio de estabilidade mostrou que a enzima perdeu mais de 90% de sua atividade inicial em 1h neste pH (figura 3D). Em pH ótimo, a meia-vida foi entre 2 e 12 h. A melhor estabilidade para Lac1 foi entre pH 5 e 6, com mais de 80% da atividade inicial mantida após 12 h de incubação. As lacases marinhas de *Pestalotiopsis* sp. e *S. lucomagnoense* parecem ser mais estáveis em pH ácido do que Lac1,

com mais de 50% de atividade após 24 h de incubação entre pH 3 a 7 (ALI et al., 2020b; WIKKE et al., 2019). No entanto, resultados semelhantes foram obtidos no nosso estudo para estabilidade em pH 2.

Figura 3. Efeito do pH na atividade e estabilidade da Lac1. **A:** em ABTS. **B:** em Guaiacol. **C:** em Siringaldazina. **D:** estabilidade em diferentes pH usando ABTS como substrato.

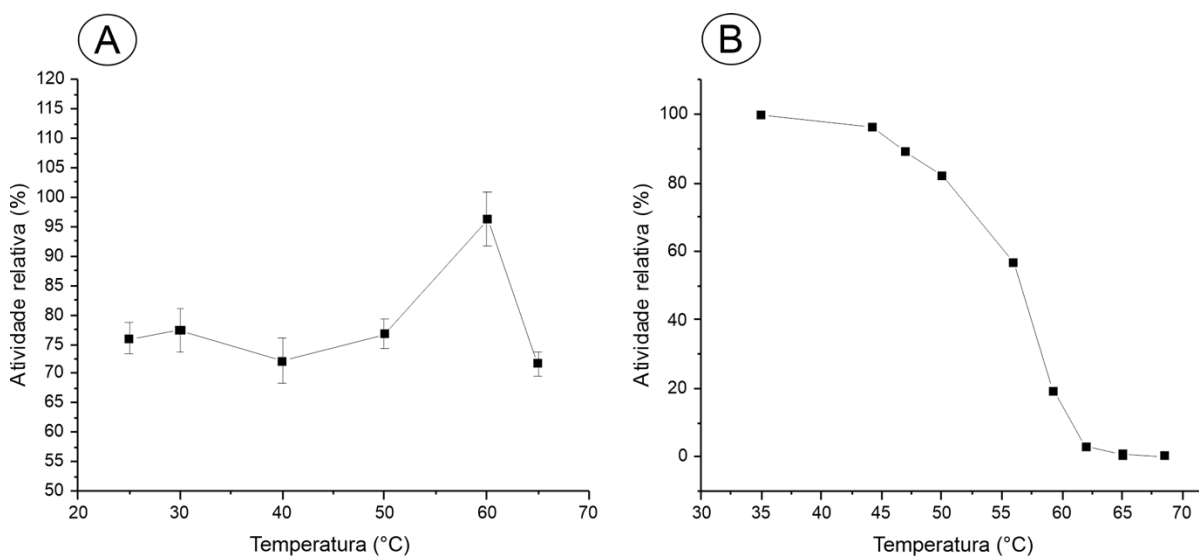


6.3.4 Temperatura ótima e efeito da temperatura na estabilidade da Lac1

Quanto a avaliação da temperatura ótima, a Lac1 apresentou pico de atividade em 60 °C (figura 4A), valor próximo ao encontrado para o pool de lacases do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063, com temperatura ótima registrada em 55 °C (FONTES et al., 2021). A maior parte das lacases fúngicas apresenta temperatura ótima entre 50 e 70 °C, mas um resultado interessante obtido para Lac1 foi o fato de a enzima manter pelo menos 70% da atividade ótima numa grande variação de temperaturas (25 a 65 °C).

Quanto a termoestabilidade, a Lac1 apresentou $T_{50}^{1h} = 56,67$ (figura 4B), muito próximo a temperatura ótima de atividade. Em temperaturas inferiores a 50 °C, a Lac1 foi capaz de manter entre 80 e 100% da atividade de incubação em temperatura ambiente. A Lac1 foi mais estável que a lacase terrestre LacB de *Peniophora lycii*, que apresentou meia vida a 50 °C inferior a meia hora (MOREIRA; MILAGRES; MUSSATTO, 2014). De acordo com Bonugli-Santos et al. (2015), uma das vantagens das enzimas produzidas por microrganismos de origem marinha frente a correlatas terrestres é justamente a maior termoestabilidade. Contudo, o gênero *Peniophora* apresenta diferentes isoformas de lacase e as comparações precisam ser feitas com cautela, levando-se em consideração o fato dos genes que codificam para essas enzimas pertencerem ao mesmo cluster gênico (GLAZUNOVA et al., 2020). De qualquer modo, os resultados obtidos apontam a Lac1 como promissora para aplicação biotecnológica sob diferentes temperaturas e, além disso, a imobilização da enzima poderia aumentar ainda mais sua termoestabilidade e eficiência catalítica (ARIAEENEJAD; MOTAMEDI; HOSSEINI SALEKDEH, 2021).

Figura 4. Caracterização da Lac1 em função da temperatura. **A:** Avaliação da temperatura ótima. **B:** Avaliação da termoestabilidade.



6.3.5 O efeito de inibidores, íons metálicos e solventes orgânicos na atividade da Lac1

Os inibidores de lacase mais comuns foram testados (figura 5A). Dentre eles, a azida sódica foi a que mais afetou a Lac1, diminuindo em 60% a atividade relativa com a menor concentração testada (0,1 mM). Enquanto L-cisteína e 2-mercaptoetanol reduziram a atividade de Lac1 em mais de 50% após a adição de 0,5 mM desses compostos. Apesar de termos testado

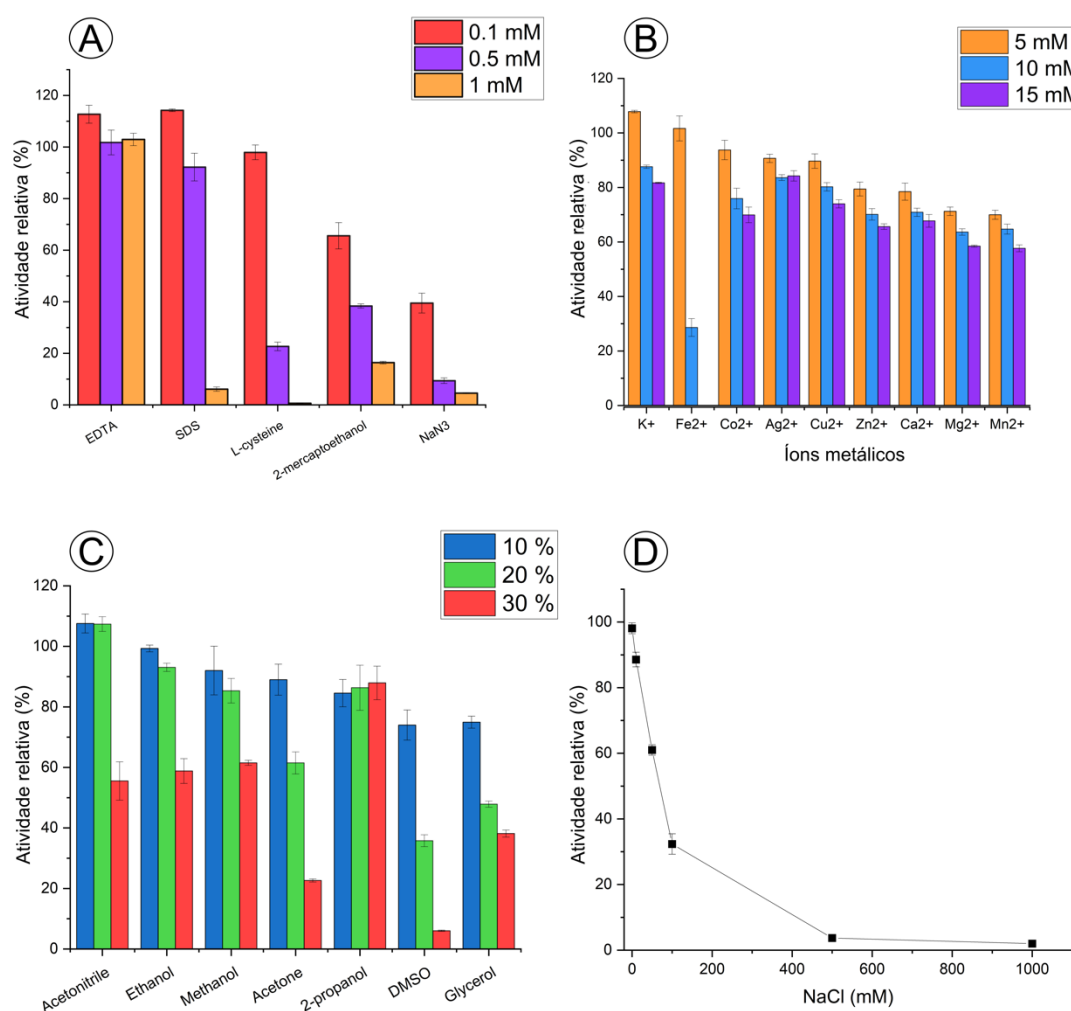
os inibidores comumente utilizados em experimentos de caracterização bioquímica de lacases, o estudo de inibidores dessa enzima deve ser feito com cautela, pois enquanto alguns podem prejudicar diretamente a oxidação enzimática de substratos, como o NaN_3 , outros podem reagir com o substrato oxidado (ABTS^{++}), convertendo-o novamente à forma reduzida (descolorida), portanto não prejudicando diretamente a enzima (JOHANNES; MAJCHERCZYK, 2000). Este poderia ser o caso dos tióis L-cisteína e do 2-mercaptoetanol no presente estudo. De acordo com Johannes e Majcherczyk (2000), a melhor forma de estudar inibidores redox de lacase seria avaliar a captação de O_2 concomitantemente ao ensaio, porém essa abordagem pode ser trabalhosa e demorada. O surfactante SDS só inibiu a enzima após 1 mM, que pode ser quando o meio atingiu a concentração micelar crítica, levando à emulsificação dos compostos orgânicos na solução ou mesmo promovendo a desnaturação da enzima (CHOPRA; SONDH, 2022). Embora o EDTA seja um agente quelante que pode se ligar aos íons de cobre no sítio ativo e interromper a transferência de elétrons, esse inibidor não afetou a atividade de Lac1 mesmo na maior concentração testada. Resultados semelhantes para esse último caso foram encontrados para lacases fúngicas marinhas de *S. lucomagnoense* e *Pestalotiopsis* sp. (ALI et al., 2020b; WIKKE et al., 2019).

Com exceção do ferro ferroso (Fe^{2+}), nenhum dos outros íons metálicos testados afetou severamente a atividade de Lac1 (figura 5B). Mesmo na concentração mais alta testada (15 mM), a atividade relativa da Lac1 se manteve acima dos 50% da atividade relativa em relação controle. Embora já tenha sido relatado que o Fe^{2+} inibe outras lacases marinhas mesmo em concentrações mais baixas (1 mM e 10 mM) (ALI et al., 2020b; ATALLA et al., 2013; D'SOUZA-TICLO; SHARMA; RAGHUKUMAR, 2009), é importante mencionar que o ferro ferroso reagiu com o tampão citrato usado em nossos experimentos, gerando cor verde com pico de absorbância mais próximo ao do ABTS^+ (420 nm). Portanto, os resultados obtidos no presente estudo podem ser uma subestimação da real tolerância de Lac1 frente ao Fe^{2+} . Além disso, a Lac1 se destaca como a lacase marinha fúngica mais resistente a íons metálicos com resultados comparáveis à lacase derivada de esporos da bactéria marinha *Bacillus* sp. KC2 (ASADI; MAKHDOUMI; ASODEH, 2020).

A atividade da enzima Lac1 foi resistente a até 10% de todos os solventes testados; e manteve mais de 50% de atividade relativa para acetonitrila, etanol, metanol e 2-propanol, mesmo na presença de 30% desses solventes (figura 5C). A boa resistência a solventes é uma característica importante para lacases que se destinam a ser aplicadas em processos de biorremediação devido ao fato de poderem solubilizar poluentes/substratos hidrofóbicos auxiliando na degradação e desintoxicação de xenobióticos (ALI et al., 2020b; CHOPRA;

SONDHI, 2022). No entanto, concentrações de 20% ou mais de DMSO e glicerol, bem como 30% de acetona, prejudicaram a atividade da Lac1, diminuindo em mais de 50% a sua atividade relativa. Em alguns casos, os solventes podem desestabilizar as cargas proteicas, promovendo a desnaturação e precipitação das enzimas (CHOPRA; SONDHI, 2022; KEUM; LI, 2004). No entanto, a imobilização da Lac1 poderia solucionar esse problema melhorando a resistência a solventes, ao mesmo tempo em que garantiria outras boas características para processos de biorremediação (DATTA; MELVIN; ETHIRAJ, 2021).

Figura 5. Efeito de inibidores, íons metálicos e solventes orgânicos na atividade da Lac1. **A:** inibidores. **B:** íons metálicos, **C:** solventes. **D:** Cloreto de sódio.



Segundo Bonugli-Santos et al. (2015), enzimas de origem marinha podem apresentar características distintas de relativas terrestres, entre elas é possível destacar a alta tolerância ao sal. Por exemplo, a lacase bacteriana de *Bacillus* sp. KC2 apresentou a mesma atividade que o

controle mesmo na presença de 1 M de NaCl (ASADI; MAKHDOUMI; ASOODEH, 2020). Resultado semelhante foi encontrado para PsLac2 do fungo marinho *Pestalotiopsis* sp. que aumentou sua atividade em 3,6 vezes na maior concentração de sais marinhos testada (5% [m/v]) em relação ao controle (sem sal marinho). No entanto, Lac1 não mostrou a tolerância ao sal esperada para uma lacase derivada do mar, pois a atividade relativa diminuiu à medida que a concentração de NaCl aumentou (figura 5D). Apesar da atividade relativa ter ficado em 60% a 50 mM de NaCl (~0,3%), após 100 mM de NaCl no meio reacional, a atividade relativa mal foi detectada. Resultado semelhante foi encontrado em outro trabalho. A enzima Sllac2 do fungo marinho *S. lucomagnoense* também apresentou baixa tolerância a sais no meio (ALI et al., 2020b). Considerando que o fungo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063, que expressa naturalmente Lac1, possui em seu genoma outros 17 genes putativos de lacase capazes de serem expressos (Capítulo 1), é possível que outra proteoforma deste fungo possa apresentar melhor desempenho em condições salinas.

6.4 Conclusões

A Lac1 expressa com cauda *his-tag* pela variante 117 foi facilmente purificada por uma única etapa de cromatografia e uma de dessalinização. A Lac1 apresenta tamanho muito similar a outras lacases fúngicas, incluindo a porção glicídica da enzima. A oxidação do substrato siringaldazina confirmou que a Lac1 é uma lacase verdadeira e a elevada afinidade por esse substrato, bem como por ABTS, indica que eles podem ser bons mediadores oxidativos para a enzima. Além disso, a caracterização da Lac1 revelou características enzimáticas interessantes para exploração biotecnológica, como boa termoestabilidade, atividade em condições altamente ácidas e resistência a íons metálicos e solventes, incluindo aqueles comumente utilizados na indústria têxtil e presentes em efluentes.

7. CAPÍTULO IV. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA LAC1 NA BIORREMEDIAÇÃO DE CORANTES SINTÉTICOS

7.1 Introdução

A demanda cada vez maior por desenvolvimento nos setores agroindustrial, químico e farmacêutico resulta na liberação de compostos xenobióticos no ambiente, como pesticidas, hormônios, antibióticos e corantes. De acordo com Tkaczyk; Mitrowska e Posyniak (2020), corantes sintéticos orgânicos são poluentes perigosos devido o elevado impacto em corpos d'água mesmo em baixas concentrações, elevada toxicidade, recalcitrância e uso generalizado em diversos setores da indústria, mas que ao mesmo tempo são subestimados devido a falta de legislação regulatória apropriada na maioria dos países (SHARMA; SHARMA; SONI, 2021).

A indústria têxtil, por sua vez, representa o maior setor consumidor de corantes sintéticos, e, por consequência, é responsável pela maior produção de efluentes com cor e liberação dos mesmos no ambiente (LUCATO; COSTA; de OLIVEIRA NETO, 2017; RAMOS et al., 2021). Entre os corantes sintéticos mais utilizados por essa indústria se destaca os do tipo azo ($-N=N-$), que podem ser subclassificados em ácido, básico, direto ou reativo (BERRADI et al., 2019). Os corantes azo do tipo reativo, como o corante Preto Reativo 5, são os que apresentam maior recalcitrância no ambiente por serem de difícil degradação pelos métodos convencionais de tratamento.

Diferentes enzimas vêm sendo relacionadas com a degradação e destoxificação de azocorantes, e podem servir como recursos alternativos aos processos convencionais de tratamento de efluentes contendo esses corantes. Dentre essas enzimas, podemos destacar as enzimas do complexo ligninolítico, como lacases, manganês peroxidases e lignina peroxidases, bem com as azo-redutases, NADH-DCIP redutases, xilanases e endoglucanases (AL-TOHAMY et al., 2020).

Devido ao baixo potencial redox das lacases (450-790 mV), corantes com maior potencial em relação a enzima utilizada, podem passar intactos pelo tratamento enzimático (GU et al., 2021a; XU et al., 1996). Além disso, apesar da baixa especificidade dessas enzimas, a conformação do sítio ativo pode não garantir a mesma eficiência oxidativa para os diferentes tipos de corantes. Nesse sentido, a utilização do chamado *laccase mediator system* (LMS) possibilita a oxidação de compostos que naturalmente não seriam oxidados pela enzima sozinha e otimizam o processo de descoloração e degradação de corantes recalcitrantes (GU et al., 2021). Diferentes estudos reportam a descoloração de corantes por lacases, apenas na presença de mediadores, como no estudo realizado por Asadi e colaboradores (2019), onde os

corantes vermelho congo, índigo carmim e verde malaquita só puderam ser descoloridos por uma lacase bacteriana na presença de ABTS ou siringaldazina.

Além da possibilidade de afetar diferentes níveis tróficos dos ecossistemas aquáticos e terrestres na sua forma original, os metabólitos gerados por processos incompletos de degradação de azo corantes podem resultar numa toxicidade ainda mais elevada (RAWAT et al., 2018; AL-TOHAMY et al., 2022), por isso a avaliação da eficiência de processos de remediação precisa incluir análises de formação de metabólitos e a utilização de organismos modelo, para a avaliação da toxicidade inicial e daquela resultante do processo proposto (AL-TOHAMY et al., 2022).

Organismos produtores, como plantas, algas e cianobactérias, são autotróficos e representam a base das cadeias tróficas. Essenciais para o estabelecimento e manutenção de diferentes ecossistemas; alterações nesse nível trófico podem resultar em um desequilíbrio ambiental grave comprometendo todos os níveis tróficos subsequentes. Dessa forma, é essencial a avaliação da toxicidade em organismos produtores durante os processos de biorremediação. *Cucumis sativus* (pepino) é uma planta eudicotiledônea considerada pertencente ao grupo das plantas superiores (WANG et al., 2001). Com sensibilidade a diferentes contaminantes durante a germinação e as fases iniciais de desenvolvimento, além da facilidade de manipulação e o baixo custo das análises (FARIAS, 2020; WANG et al., 2001) *C. sativus* representa um bom organismo modelo para avaliação da toxicidade em organismos produtores.

Além da investigação da toxicidade em organismos produtores, uma avaliação mais robusta precisa abranger outros níveis tróficos. O procarioto marinho *Aliivibrio fischeri* é uma bactéria heterotrófica, não patogênica, bioluminescente, que pode ser de vida livre ou encontrada em simbiose com outros organismos marinhos, como lulas e peixes (DUNN, 2012). *A. fischeri* emite luminescência sob alta densidade populacional que pode ser detectada no espectro visível por um luminômetro. Sensível a diferentes contaminantes, a luminescência em *A. fischeri* pode ser diretamente afetada pela presença de xenobióticos no meio, seja por alteração das vias metabólicas produtoras de energia, ou mesmo pela morte celular direta causada pelo contaminante (BOND; MARTIN, 2005). Ensaios de toxicidade baseados na luminescência de *A. fischeri*, como o Microtox, são amplamente reconhecidos pela possibilidade avaliação de toxicidade aguda em amostras de água e efluentes, com efeitos comparáveis a peixes e mamíferos (RUBINOS et al., 2014), fazendo desse organismo um bom modelo para níveis tróficos de consumidores.

Dessa forma, o presente estudo avaliou o potencial da LacI na descoloração, degradação e destoxificação de corantes sintéticos na presença e ausência de mediadores oxidativos. Análises de metabólitos foram realizadas utilizando GC-MS; enquanto a toxicidade dos tratamentos foi avaliada utilizando os bioindicadores *C. sativus* e *A. fischeri*.

7.2 Material e métodos

7.2.1 Avaliação do potencial de descoloração de corantes sintéticos pela LacI

O potencial de descoloração da lacase de origem marinha foi determinado em relação a corantes de vários grupos químicos. Os corantes foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (Brasil) ou Synth (Brasil): Vermelho Congo (VC), Remazol Brilliant Blue R (RBBR), Preto Reativo 5 (PR), Indigo Carmim (IC), Cristal Violeta (CV) e Verde Malaquita (VM). Todos os corantes foram testados a 50 mg.L⁻¹, exceto CV que foi testado a 12,5 mg.L⁻¹. A descoloração foi determinada com base no pico máximo de absorção (λ_{max} nm) para cada corante estudado, sendo: 495, 595, 600, 610, 590 e 615 nm, para VC, RBBR, PR, IC, CV e VM, respectivamente. Os experimentos foram realizados com e sem os mediadores ABTS, Siringaldazina (SYR), Siringaldeído (SHD) e ácido p-cumárico (PCA) a 100 μ M. A mistura reacional foi tamponada com tampão acetato de sódio (50 mM) pH 5 e continha 0,02 U.mL⁻¹ ou 0,2 U.mL⁻¹ da lacase. Todos os experimentos de descoloração foram realizados em placas de 96 poços (fundo chato). As placas foram incubadas no leitor de placas Synergy H1 Biotek, a 30 °C por 36h. As placas foram lidas a cada hora, com agitação a 548 RPM por 10 segundos para homogeneização da reação antes de cada leitura. A taxa de descoloração foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Taxa de descoloração (\%)} = \left(\left(\frac{(T_0 \text{ Abs}_{\text{tratamento}} - T_f \text{ Abs}_{\text{tratamento}})}{T_0 \text{ Abs}_{\text{tratamento}}} \right) - \left(\frac{(T_0 \text{ Abs}_{\text{controle}} - T_f \text{ Abs}_{\text{controle}})}{T_0 \text{ Abs}_{\text{controle}}} \right) \right) * 100$$

Onde:

T₀ Abs: absorbância inicial

T_f Abs: absorbância final

7.2.2 Análise do espectro de descoloração

Visando verificar a formação de possíveis metabólitos após o processo de descoloração, foi feito a análise do espectro de absorbância de todos os tratamentos mencionados no item 2.1. As análises foram realizadas nos tempos zero e 36h utilizando leitor de placas Synergy H1

Biotek, a 30 °C. O espectro UV-Vis foi avaliado no modo varredura nos comprimentos de onda entre 300 e 800 nm, com intervalos de 10 nm.

7.2.3 Experimentos de descoloração do corante Preto Reativo 5 em frascos Erlenmeyer

Os ensaios de descoloração foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 50 mL de volume de trabalho, contendo 50 mg/L de corante PR5, 50 mM de tampão acetato de sódio pH 5 e 0,05 U/mL de enzima purificada. Tratamentos com e sem 100 µM de SHD foram testados. Frascos sem enzima foram utilizados como controle. Os frascos foram incubados sob agitação contínua a 150 RPM, 30 °C, no escuro, por 36h. Amostras 500 µL foram retiradas no tempo zero e no tempo 36h para avaliação da descoloração e do espectro. Após as 36h de incubação nenhuma atividade enzimática foi detectada e todo o volume restante nos frascos foram utilizados para as análises de metabólitos, fitotoxicidade e toxicidade aguda (Microtox). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

7.2.4 Avaliação da formação de metabólitos por GC-MS

A extração de metabólitos foi feita em acetato de etila (Pureza: > 99,5%, Sigma-Aldrich). A partir de uma alíquota de 25 mL do ensaio de descoloração do corante PR5 em Erlenmeyer, foi feita uma extração com acetato de etila, na proporção 1:1, de acordo com método descrito por Farias (2022), com adaptações. A mistura foi agitada em vórtex por 5 minutos e depois separada em funil de separação de 250 mL, após 5 minutos e a formação de duas fases imiscíveis, a fase aquosa foi retirada e passou por mais uma extração com acetato de etila (1:1). Ao final, a fração orgânica (contendo os metabólitos) foi transferida para um tubo Falcon e a ele foi adicionado aprox. 1g de NaSO₄ para a desidratação das amostras. As amostras foram centrifugadas a 25 °C e 2500 rpm, por 3 min. Depois o sobrenadante foi filtrado em Nylon 0,22 µm (Analítica) e transferido para tubos de 15 mL. Por fim, as amostras foram concentradas em a 42 °C até a evaporação total do solvente. Os metabólitos foram suspensos em 1,8 mL de acetato de etila e armazenados a -20 °C até as análises de GC-MS.

Os metabólitos foram avaliados no GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu, Japão). A separação foi realizada em coluna Rtx-5MS (0.25mm, 30m – Restek, Estados Unidos). Um total de 2 µL de amostra foi injetado a 300 °C, com temperatura na coluna a 90 °C por 3 min aumentando linearmente 9,5 °C por minuto até 280 °C. O gás hélio foi utilizado como eluente com fluxo constante de 2 mL por minuto. A análise de massa foi realizada em modo *scan*, com analisador quadrupolo, voltagem de ionização foi de 70 eV, com análise a partir dos 3 min até 20 min. Os produtos de degradação foram identificados por comparação do tempo de retenção

e padrão de fragmentação, bem como com a biblioteca de espectros de massa armazenada no software de computador do GC-MS.

7.2.5 Toxicidade aguda em *Microtox*

A toxicidade aguda dos controles e dos tratamentos de descoloração do PR5 foi determinada utilizando a bactéria marinha *A. fischeri* como bioindicador e o analisador Microtox® 500, como descrito anteriormente por Vieira et al. (2021). Primeiramente, foi realizada uma suspensão em tampão de reativação das bactérias liofilizadas (10^8 células/mL). Posteriormente, a suspensão foi diluída (1:10) em solução diluente contendo 2% NaCl. Dessa nova suspensão, 100 µL foram transferidos para as cubetas; a luminescência inicial foi verificada para determinar o tempo zero (T0). Um total de 250 µL de solução de ajuste osmótico contendo 22% de NaCl foi adicionado a 2,5 mL de amostra; essa mistura foi utilizada para preparar diluições seriadas em tampão de diluição (1:1). Após as diluições, uma alíquota de 900 µL foi transferida para as cubetas contendo 100 µL de bactérias. O controle do medidor de luminescência foi realizado a bactéria na presença apenas da solução diluente. A medição do luminômetro ocorreu em dois tempos: 0 e 15 min. Os resultados da luminescência em *A. fischeri* foram avaliados no programa Microtox® 500 e foram expressos na forma de EC₅₀ (concentração que inibe a luminescência da bactéria em 50%). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

7.2.6 Fitotoxicidade em *Cucumis sativus*

Para testar a toxicidade das amostras controle e tratadas em organismos produtores, foram utilizadas sementes de pepino (*C. sativus*) livre de agrotóxicos da linha Blueline – Agristar, com 85% de taxa de germinação. As sementes foram cultivadas em placas de Petri, como descrito por Farias (2022). Em cada placa foram colocadas 15 sementes sobre papel filtro e adicionados 5 mL de cada amostra sem nenhuma diluição, bem como nas diluições 75%, 50% e 25%. Após o preparo, as placas foram envoltas em filme plástico, para evitar a evaporação, e acondicionadas em incubadora a 25 °C ao abrigo de luz, por 5 dias. Água ultrapura MiliQ foi utilizada como controle negativo de fitotoxicidade. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Ao final do período de exposição/incubação, as placas foram congeladas a -20°C por 12h; após esse período o tamanho das radículas e hipocótilos foram mensurados e a taxa de inibição de crescimento foi calculada através da seguinte equação:

$$Taxa\ de\ inibição\ (\%) = \left(\frac{(Média\ Controle_{negativo} - Média\ Amostra)}{Média\ Controle_{negativo}} \right) * 100$$

Onde a média corresponde a média aritmética das medidas aferidas de uma determinada placa em razão do número total de sementes germinadas, tanto para radícula quanto para hipocótilo.

7.2.7 Análises estatísticas

A fim de avaliar a significância dos resultados de toxicidade, foram realizadas análises estatísticas. Todos os grupos amostrais apresentaram homogeneidade e distribuição normal e, portanto, foram aplicados testes paramétricos. Após testar a normalidade (Shapiro-Wilk) e a homogeneidade (Brown-Forsythe), os dados foram submetidos a análise de variância por meio da ANOVA - One Way. Associado a análise de variância, foi aplicado o método Holm-Sidak para comparações múltiplas entre os grupos controle e tratados. O software SigmaPlot (versão 14.5) foi utilizado para realizar as análises estatísticas e o software OriginPro (versão 2022b) foi utilizado para gerar as representações gráficas.

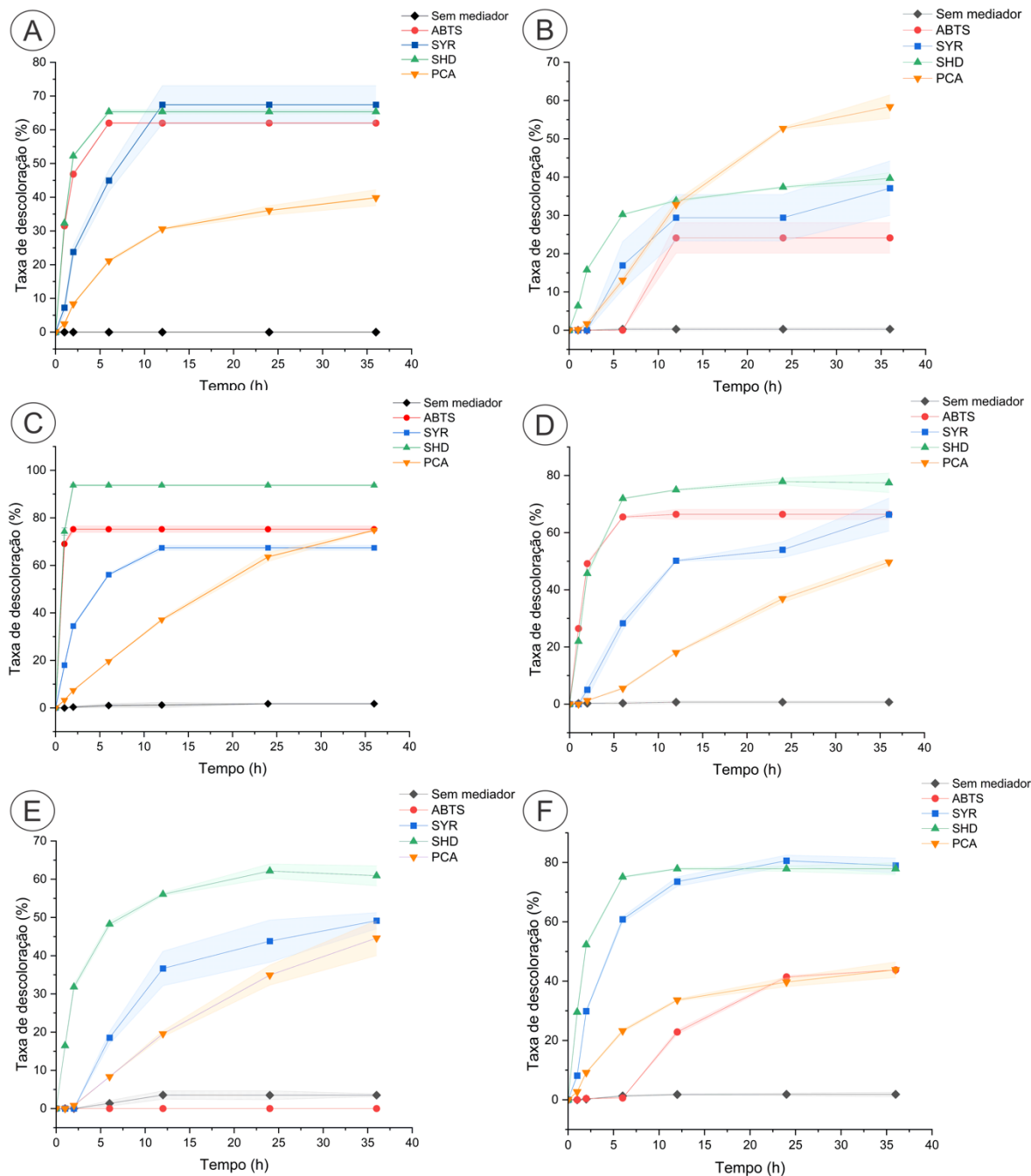
7.3 Resultados e discussão

7.3.1 Descoloração de corantes sintéticos pela Lac1 na presença e ausência de mediadores

Quatro LMS diferentes foram testados para descoloração de corantes sintéticos usando Lac1 como agente oxidante. Todos os corantes foram descoloridos com sucesso com taxas de descoloração superiores a 55% dentro de 12h de incubação (Figura 1). Exceto para o caso do corante CV, o siringaldeído foi o melhor mediador para a descoloração de todos os corantes, incluindo o VM que é do mesmo grupo de corantes que o CV (triarilmetano). Além disso, o LMS com siringaldeído teve o melhor desempenho contra o corante IC com taxa de descoloração de 93% após apenas 2h de incubação. O siringaldeído é um composto não tóxico derivado da lignina (MOTA et al., 2016), menos oneroso quando comparado a outros mediadores e, portanto, adequado para processos ecologicamente sustentáveis (CAÑAS; CAMARERO, 2010).

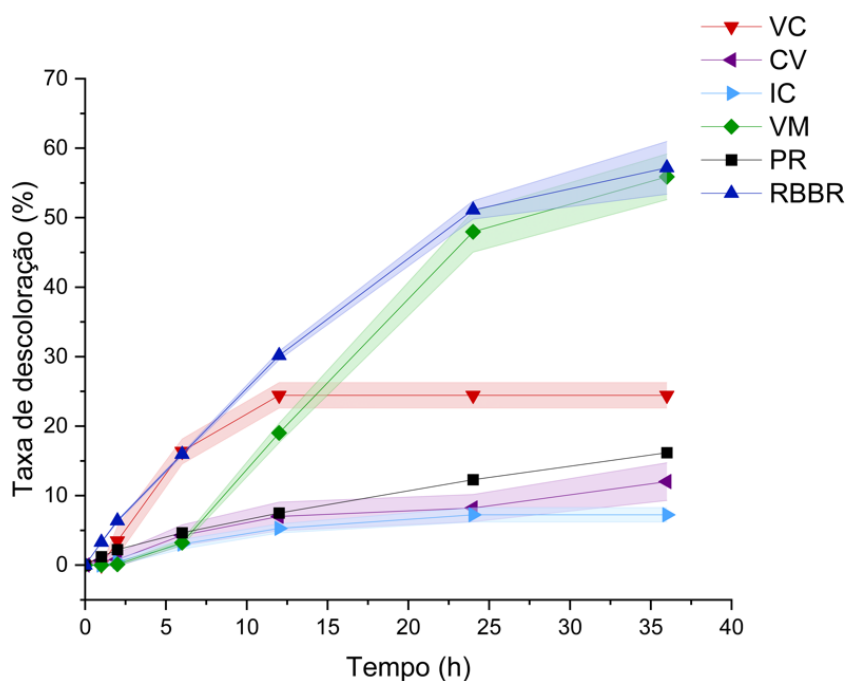
ABTS foi o primeiro mediador de lacase descrito e é frequentemente o mediador escolhido para estudos de biorremediação (GU et al., 2021b). Embora a Lac1 tenha apresentado alta especificidade para ABTS (capítulo 3), esse substrato apenas atuou como um bom mediador para a descoloração dos corantes VC, IC e VM, enquanto para o RBBR seu desempenho foi pior que o da enzima Lac1 utilizada sozinha (Figura 1E). É importante mencionar que os experimentos de descoloração com a lacase purificada foram realizados em pH 5 devido à sua melhor estabilidade neste pH e devido à melhor estabilidade dos controles negativos dos corantes durante todos os experimentos. Além disso, considerando a baixa concentração da enzima (0,02 U/mL) nos experimentos iniciais e as condições reacionais e de incubação não ótimas, menores taxas de descoloração foram obtidas para a enzima sem mediadores.

Figura 1. Descoloração de corantes sintéticos pela LacI e por diferentes LMS. Enzima na concentração de 0,02 U/mL. **A:** Vermelho Congo (Azo). **B:** Cristal violeta (Triarilmetano). **C:** Índigo Carmim (Índigo). **D:** Verde malaquita (Triarilmetano). **E:** RBBR (Antraquinona). **F:** Preto reativo 5 (Azo). SYR: siringaldazina. SHD: siringaldeído. PCA: ácido p-cumárico. O desvio padrão entre triplicatas está ilustrado como tons claros.



Um experimento adicional usando 0,2 U/mL de LacI resultou em uma taxa de descoloração de 7,24%, 12,03%, 16,17%, 24,43%, 55,89% e 57,19% após 36h de incubação para IC, CV, PR, VC, VM e RBBR, respectivamente, sem mediadores (Figura 2). A maior crítica ao uso de mediadores oxidativos em processos de biorremediação se baseia no custo do reagente adicional (CHOPRA; SONDH, 2022). Contudo, a maioria dos experimentos de descoloração bem-sucedidos com lacases sem mediadores (CHOPRA; SONDH, 2022; FONTES et al., 2021; IARK et al., 2019; ZIMBARDI et al., 2016), foram realizados em condições ótimas e/ou com maiores concentrações de enzima (variando de 0,2 a 10 U/mL), o que também pode elevar os custos de aplicação dependendo do pH ótimo e da eficiência na produção dessas enzimas.

Figura 2. Descoloração de corantes sintéticos pela LacI na concentração de 0,2 U.mL⁻¹, sem mediadores. VC: Vermelho Congo. CV: Cristal violeta. IC: Índigo Carmim. VM: Verde malaquita. RBBR: Remazol Azul Brilhante R. PR: preto reativo.



7.3.2 Análise dos espectros de descoloração promovido pela Lac1 na ausência e presença de mediadores

Considerando que os mediadores oxidativos promovem a oxidação de moléculas alvo (nesse caso corante) independentemente do sítio ativo da enzima oxidativa, a presença de mediadores pode levar à oxidação de diferentes partes da molécula do corante, não apenas da região cromófora, possibilitando a degradação do xenobiótico em moléculas com menor toxicidade (COUTO; TOCA-HERRERA, 2006; KHLIFI et al., 2010; RIVA, 2006). Para avaliarmos essa hipótese, os espectros de descoloração dos corantes sintéticos avaliados nos experimentos anteriores, foram submetidos a análise de varredura em espectrofotômetro. As figuras 3 e 4 apresentam os espectros dos seis corantes sintéticos estudados que passaram pelo processo de descoloração enzimática utilizando a Lac1 sozinha, bem como a enzima na presença de mediadores. É possível perceber que em todos os casos em que os corantes foram descoloridos na presença de mediadores (figura 3B, D e F e figura 4B, D e F) houve a formação de um novo pico de absorbância na região entre 360 e 380 nm. Contudo, o mesmo padrão não foi encontrado para os casos em que apenas a Lac1 foi utilizada como agente oxidativa (Figura 3A, C e E e Figura 4A, C e E). De acordo com a literatura, compostos fenólicos, nitrogenados ou não, podem absorver luz na mesma região em que houve a formação dos novos picos (indicados por setas nas figuras) (DEARDEN; FORBES, 1955); indicando uma possível degradação dos corantes promovido pela Lac1 apenas na presença dos mediadores.

Figura 3. Espectro dos corantes sintéticos avaliados com e sem mediadores. **A:** VC sem mediadores. **B:** VC com siringaldazina como mediador. **C:** CV sem mediador. **D:** CV com siringaldeído como mediador. **E:** IC sem mediadores. **F:** IC com siringaldeído como mediador. Linha preta: incubação T0h. Linha vermelha: incubação T36h. Setas apontando metabólitos putativos com absorbância em comprimentos de onda variando de 360 a 380 nm.

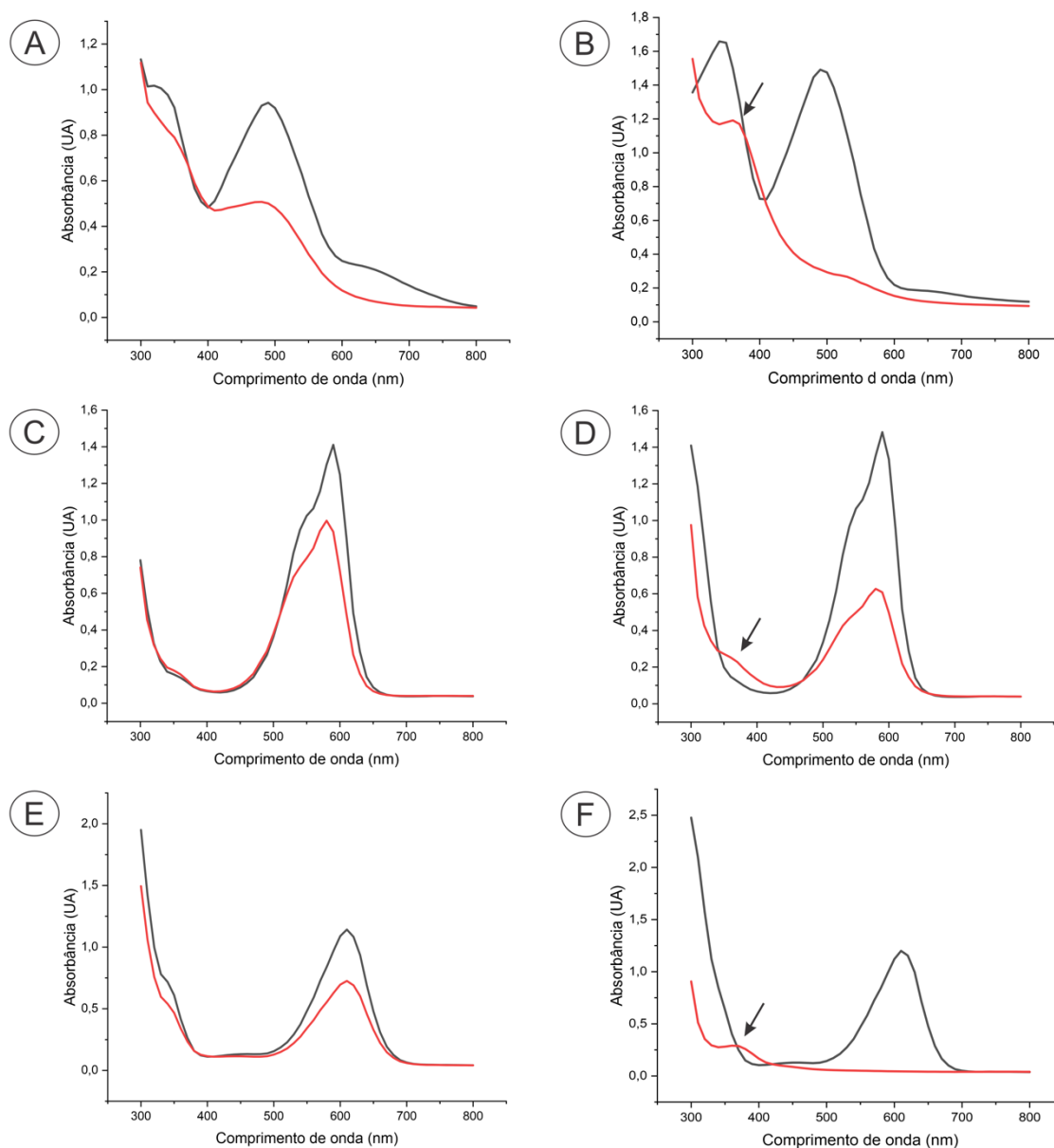
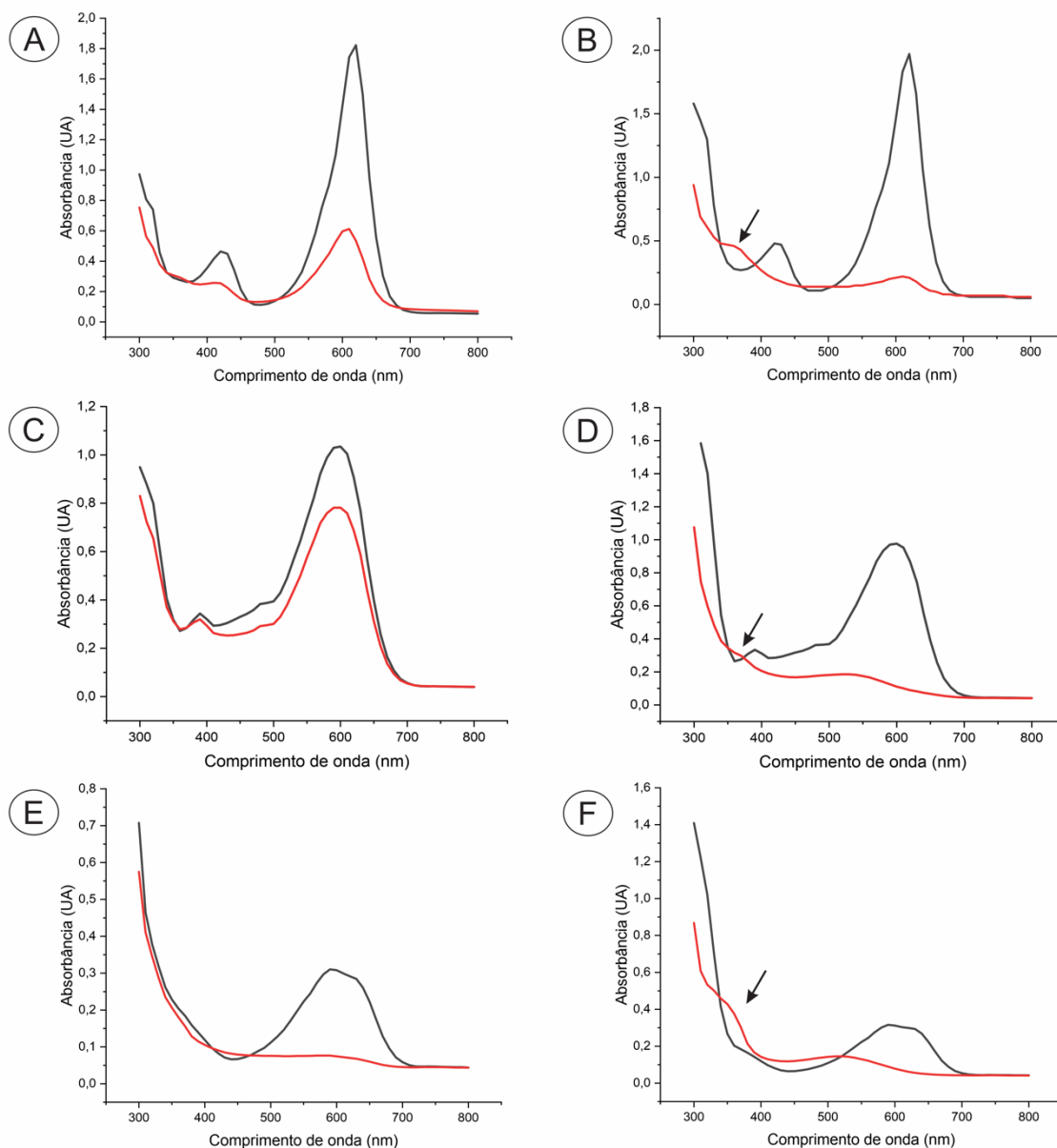


Figura 4. Espectro dos corantes sintéticos avaliados com e sem mediadores (continuação). **A:** VM sem mediadores. **B:** VM com siringaldeído como mediador. **C:** PR sem mediadores. **D:** PR com siringaldeído como mediador. **E:** RBBR sem mediadores. **F:** RBBR com siringaldeído como mediador. Linha preta: incubação T0h. Linha vermelha: incubação T36h. Setas apontando metabólitos putativos com absorbância em comprimentos de onda variando de 360 a 380 nm.



7.3.3 Experimentos de descoloração do corante Preto Reativo 5 em Erlenmeyer e análise da formação de metabólitos

Com o intuito de avaliar o processo de descoloração em maior escala, bem como validar os resultados encontrados com as análises de UV-Vis, e avaliar o processo de biorremediação quanto a toxicidade, um estudo de caso foi proposto utilizando o azo corante Preto Reativo 5.

A descoloração do corante foi testada em 50 mL de meio reacional na mesma concentração testada em placa, tanto na ausência quanto na presença do mediador siringaldeído.

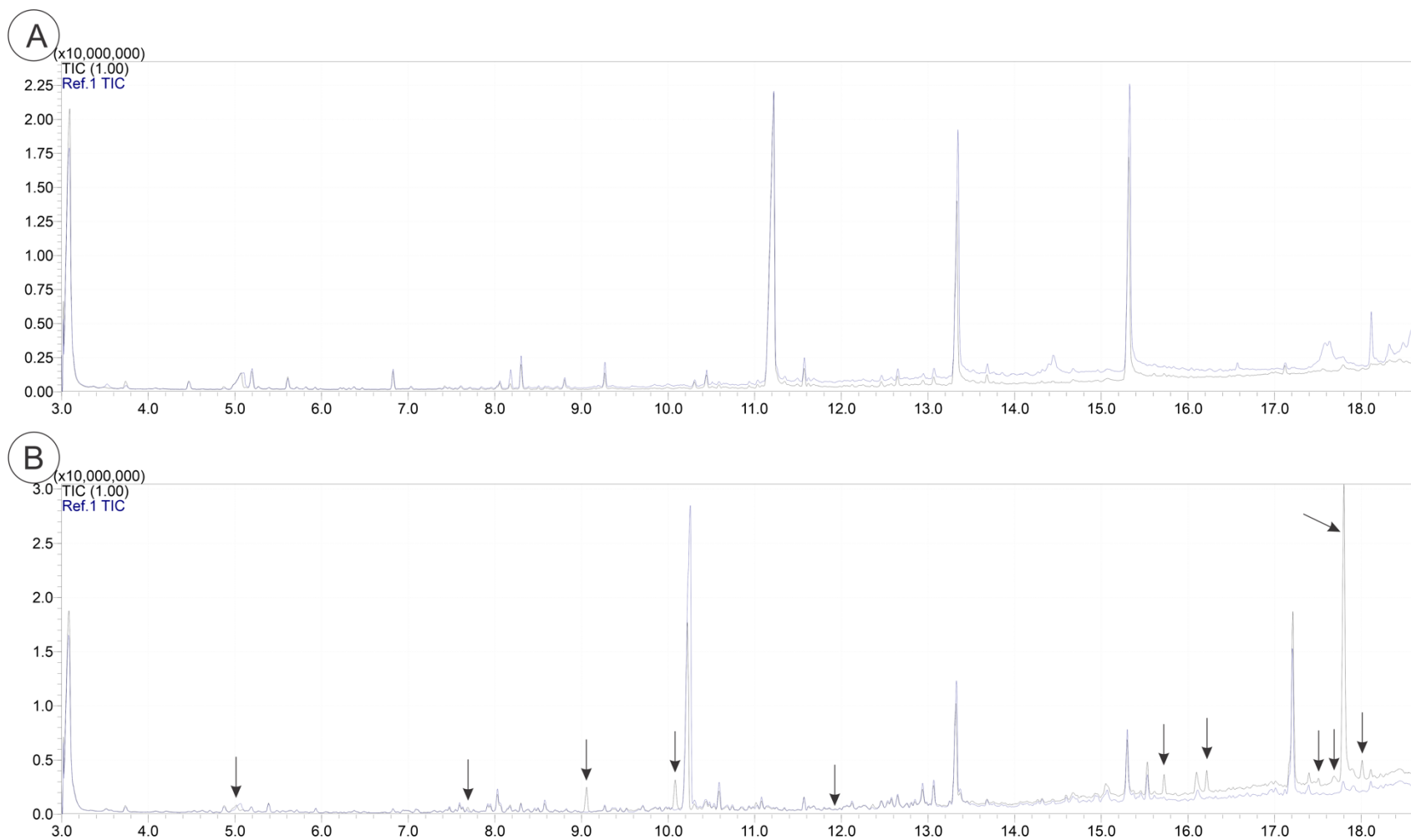
Os resultados da descoloração em frasco estão apresentados na tabela 1. Apesar da descoloração utilizando apenas a Lac1 ter sido idêntica ao encontrado no experimento em placa, a taxa de descoloração para a condição com mediador foi menor que a encontrada no ensaio em placa, mesmo utilizando 2,5 vezes mais enzima.

Tabela 1. Resultados de descoloração do corante preto reativo em frasco Erlenmeyer e em placa (para fins comparativos).

Tratamento	Erlenmeyer		Placa	
	Taxa de descoloração	Desvio padrão	Taxa de descoloração	Desvio padrão
Lac1	1,82 %	0,97	1,82 %	0,76
Lac1 + Shd	62,02 %	5,47	77,89 %	0,32

As análises de GC-MS confirmaram o que já era esperado, apenas o tratamento feito na presença do mediador siringaldeído apresentou a formação de metabólitos diferentes daqueles encontrados nos controles, possivelmente resultantes da degradação do corante. A figura 5 apresenta os espectros obtidos pela análise de cromatografia gasosa (GC) para ambos os tratamentos avaliados nos experimentos em frasco. Apesar da não formação de metabólitos pelo tratamento contendo apenas a Lac1, o experimento de GC-MS foi considerado inconclusivo para esse caso, devido a baixa taxa de descoloração encontrada. Por outro lado, diferentes metabólitos foram encontrados no tratamento conduzido na presença do mediador.

Figura 5. Espectro comparativo dos metabólitos obtidos das amostras controle e tratadas do experimento de descoloração do corante Preto Reativo 5. **A:** tratamento com Lac1. **B:** tratamento com a Lac1 na presença do mediador siringaldeído. Linhas azuis: amostras controle. Linhas pretas: amostras tratadas. Picos presentes apenas no tratamento estão indicados por setas.



A tabela 2 apresenta os metabólitos identificados pela análise de massas com similaridade acima de 60%. Devido a maior similaridade estrutural com a molécula original do corante, alguns metabólitos foram selecionados para comparação com dados já publicados na literatura, visando a proposição do mecanismo metabólico de degradação do corante. O espectro de massas de cada metabólito selecionado, bem como sua respectiva estrutura, está apresentado na figura 6.

Tabela 2. Metabólitos identificados pela análise de GC-MS oriundos da degradação do corante Preto Reativo 5 pela enzima LacI na presença de siringaldeído.

Nome do metabólito	Tempo de retenção (min)	Similaridade (%)
Butanedioic acid	5,017	84
cis-Pentenedioic acid	5,017	82
Cyclopropane-1,1-dicarboxylic acid; 1,1-Cyclopropanedicarboxylic acid	5,017	80
2-Butenedioic acid	5,017	79
Benzene (ethenylsulfonyl)	7,689	75
Benzene (1-propenylsulfonyl)	7,689	72
3-(Phenylsulfonyl) propanoic acid	7,689	72
2,6-Dimethoxybenzoquinone; 2,6-Dimethoxy-p-benzoquinone	9,057	88
4H-Pyran-4-one; 2-Methoxy-6-methyl-4H-pyran-4-one	9,057	73
3-Heptene; 3E)-2,2,3,5,6-Pentamethyl-3-heptene	9,057	73
2,4,6,(1H,3H,5H)-Pyrimidinetrione; 5-acetyl- Barbituric acid	10,080	80
Metharbital; 2,4,6(1H,3H,5H)-Pyrimidinetrione	10,080	77
3,4-Dimethoxythiophenol	10,080	72
Sulfurous acid; octadecyl 2-propyl ester	11,931	73
Tricosyl acetate; n-Tricosyl acetate	15,726	90
1-Docosanol, acetate; Docosyl acetate	15,726	90
Hexacosyl acetate; hexacosyl ester;	15,726	90
N,N-Dimethyldodecanamide; Dodecanamide	16,215	82
2-Nonadecanone; O-methyloxime;	16,215	81
N,N-Dimethyldecanamide; Decanamide	16,215	81
Triacetyl acetate; n-Triacetyl acetate	17,508	84
Heptacosyl acetate; n-Heptacosyl acetate	17,508	84
Hexacosyl acetate; n-Hexacosyl acetate	17,508	84
Z-5-Methyl-6-heneicosen-11-one; (6Z)-5-Methyl-6-heneicosen-11-one	17,685	79
7-Hexadecenal; (Z)-(Z)-7-Hexadecenal	17,685	79
Oleic acid; 3-(octadecyloxy)propyl ester	17,685	78
Phenol, 2,2'-methylenebis[6-(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-p-Cresol	17,800	93
Propanoic acid	17,800	67
Phenol, 2,2'-methylenebis[6-methoxy-3-(2-propenyl)-Phenol	17,800	62
3-Pentanol; 2,3,4-Trimethyl-3-pentanol	18,011	74
2-Nonadecanone; O-methyloxime	18,011	74

Figura 6. Espectro de massas dos diferentes metabólitos identificados a partir da degradação do corante Preto Reativo 5 pela enzima LacI na presença de siringaldeído. **A:** Ácido butanodióico, MM: 116.07g/mol (C₄H₄O₄). **B:** ácido cis-pentenodióico, MM: 130.1g/mol (C₅H₆O₄). **C:** Benzenossulfonato de alfa-d-glucopiranosil, MM = 320.32g/mol (C₁₂H₁₆O₈S). **D:** Etenilsulfonil benzeno, MM: 168.21g/mol (C₈H₈O₂S). **E:** 2,6-Dimetoxibenzoquinona, MM: 168.15g/mol (C₈H₈O₄).

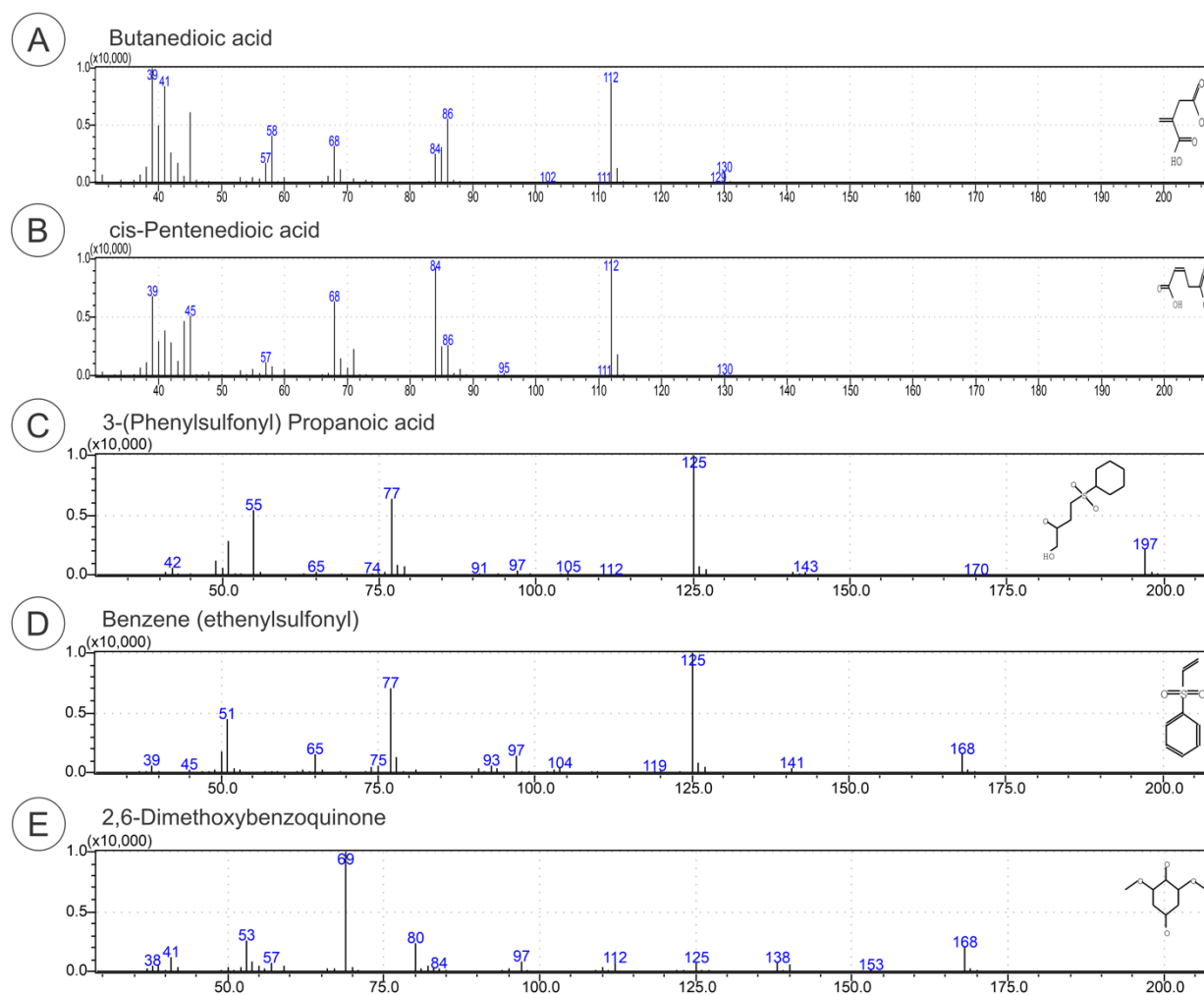
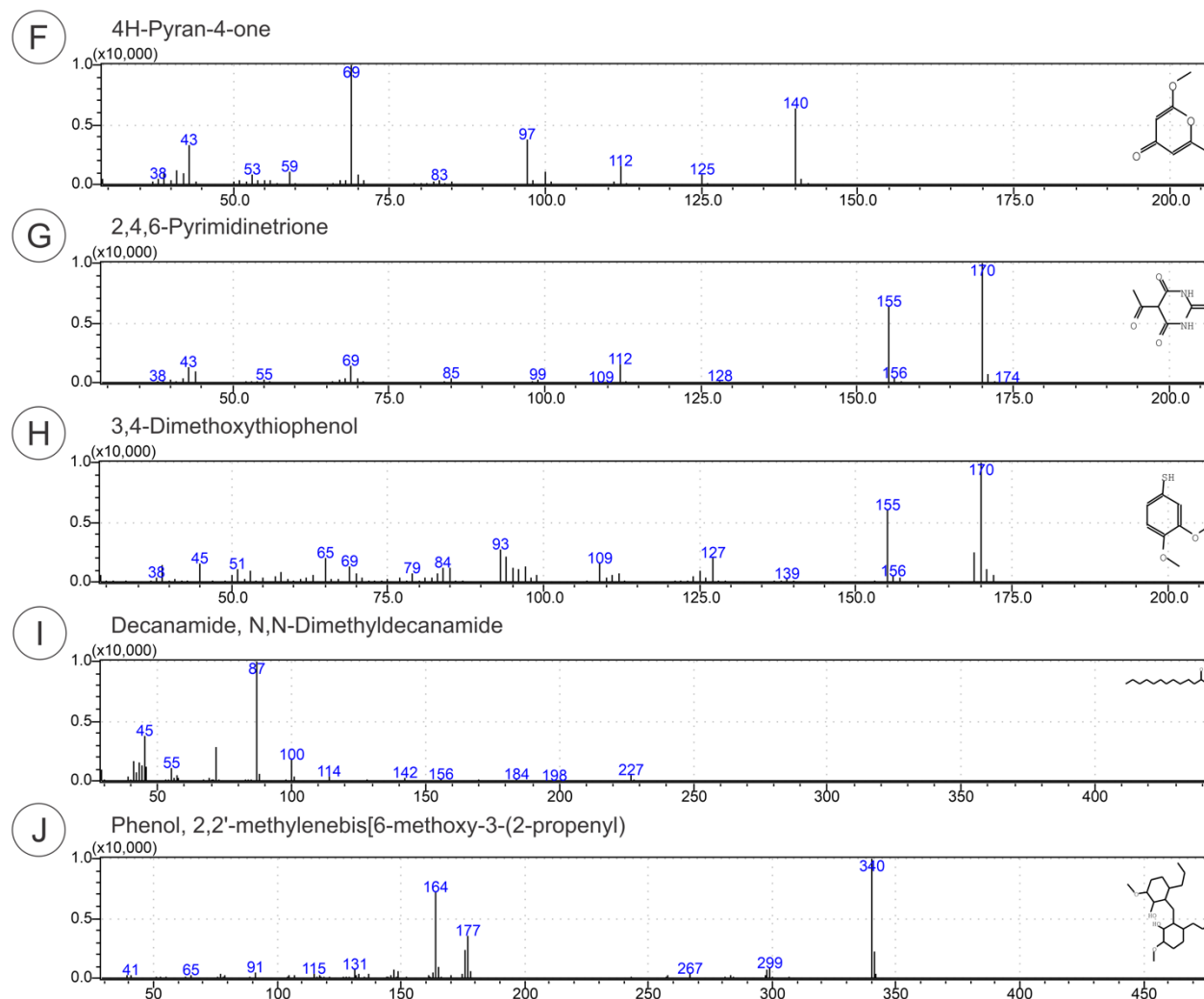


Figura 6 (continuação). **F:** Pirano-4-ona, MM: 96.08g/mol (C₅H₄O₂). **G:** 2,4,6-Pirimidinotriona, MM: 128.09g/mol (C₄H₄N₂O₃). **H:** 3,4-Dimetoxitiofenol, MM: 170.23g/mol (C₈H₁₀O₂S). **I:** N,N-Dimetildecanamida, MM: 199.33g/mol (C₁₂H₂₅NO). **J:** Fenol, 2,2'-metilenebis[6-metoxi-3-(2-propenil)-], MM: 340.4g/mol (C₂₁H₂₄O₄).

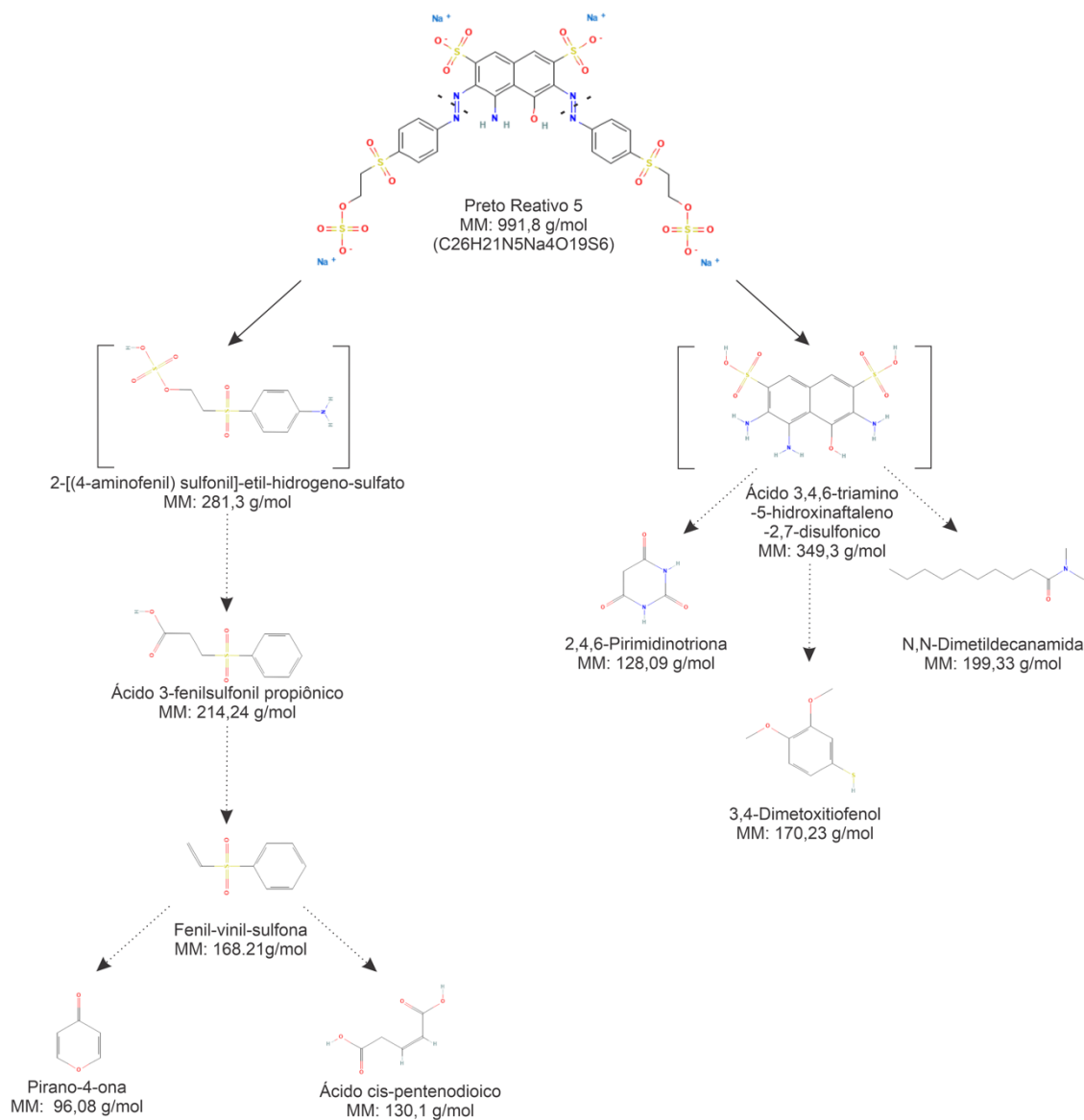


Tanto compostos alifáticos quanto aromáticos vêm sendo reportados na literatura como derivados da degradação do corante Preto Reativo 5 (AL-TOHAMY et al., 2020; CHIVUKULA; RENGANATHAN, 1995; EL BOURAIE; EL DIN, 2016; MARTORELL; PAJOT; FIGUEROA, 2017). Contudo, ainda são escassos os estudos que procuram investigar a formação de metabólitos desse corante em processos de biorremediação. Além disso, até o presente momento, a maioria dos estudos já publicados apresentam resultados obtidos por processos envolvendo micro-organismos ou consórcios, ou seja, que envolvem a ação sinérgica de diferentes enzimas (GIOVANELLA et al., 2020; VASCONCELOS et al., 2019; VIEIRA et al., 2021) dificultando a comparação com os resultados obtidos no presente trabalho.

De acordo com Singh et al. (2015), uma das primeiras regiões a serem atacadas pelas enzimas é a ligação azo ($-N=N-$), como o Preto Reativo 5 é um diazo corante, ambas as ligações podem ser atacadas, podendo liberar um composto com dois anéis aromáticos, chamado de ácido 3,4,6-Triamino-5-hidroxinaftaleno-2,7-disulfônico, mais duas moléculas de 2-[(4-aminofenil) sulfonil]-etil-hidrogeno-sulfato; esse segundo com alta toxicidade, risco de mutagenicidade e potencial corrosivo. Essa via de degradação já foi descrita para a enzima NADH-DCIP redutase (AL-TOHAMY et al., 2020), e apesar de nenhum dos dois metabólitos citados ter sido encontrado nas nossas análises, acreditamos que após uma desaminação das moléculas de 2-[(4-aminofenil) sulfonil]-etil-hidrogeno-sulfato, resulte as moléculas de ácido 3-fenilsulfonil propiônico que foram encontradas nas nossas análises de metabólitos. Continuando o processo, a dessulfonação desse último ácido pode resultar na formação da Fenil-vinil-sulfona (Ethenylsulfony benzene), também encontrada em nossas análises. Por outro lado, como resultado da ação conjunta da LacI com o siringaldeído (no sentido em que ambos são agentes oxidativos), o ataque aos anéis aromáticos do composto hipotético ácido 3,4,6-Triamino-5-hidroxinaftaleno-2,7-disulfônico tenha resultado na formação dos metabólitos 2,4,6- Pirimidinotriona, N,N-Dimetildecanamida e 3,4 dimetoxifenol, todos encontrados em nossas análises.

Baseado nesses resultados, a figura 7 apresenta a via de degradação proposta para o corante Preto Reativo 5 pela LacI na presença de siringaldeído. Nenhum composto de cadeia aberta foi encontrado por Adnan et al. (2015), que investigaram a degradação do PR5 por uma lacase purificada do fungo *Trichoderma atroviride* F03, contudo, além do metabólito N,N-Dimetildecanamida, nossos resultados indicam também a formação do composto ácido cis-pentenodioico, indicando que a presença de mediadores no meio pode sim resultar na formação de compostos menos recalcitrantes e/ou com maior facilidade de assimilação pelo organismos vivos (principalmente micro-organismos e plantas).

Figura 7. Via de degradação putativa do corante Preto Reativo 5 pela LacI na presença de siringaldeído, considerando a quebra inicial das ligações azo. Metabólitos entre chaves não foram detectados no presente estudo e configuram parte de uma via hipotética de degradação. Setas sólidas indicam uma única reação. Setas pontilhadas indicam duas ou mais reações.

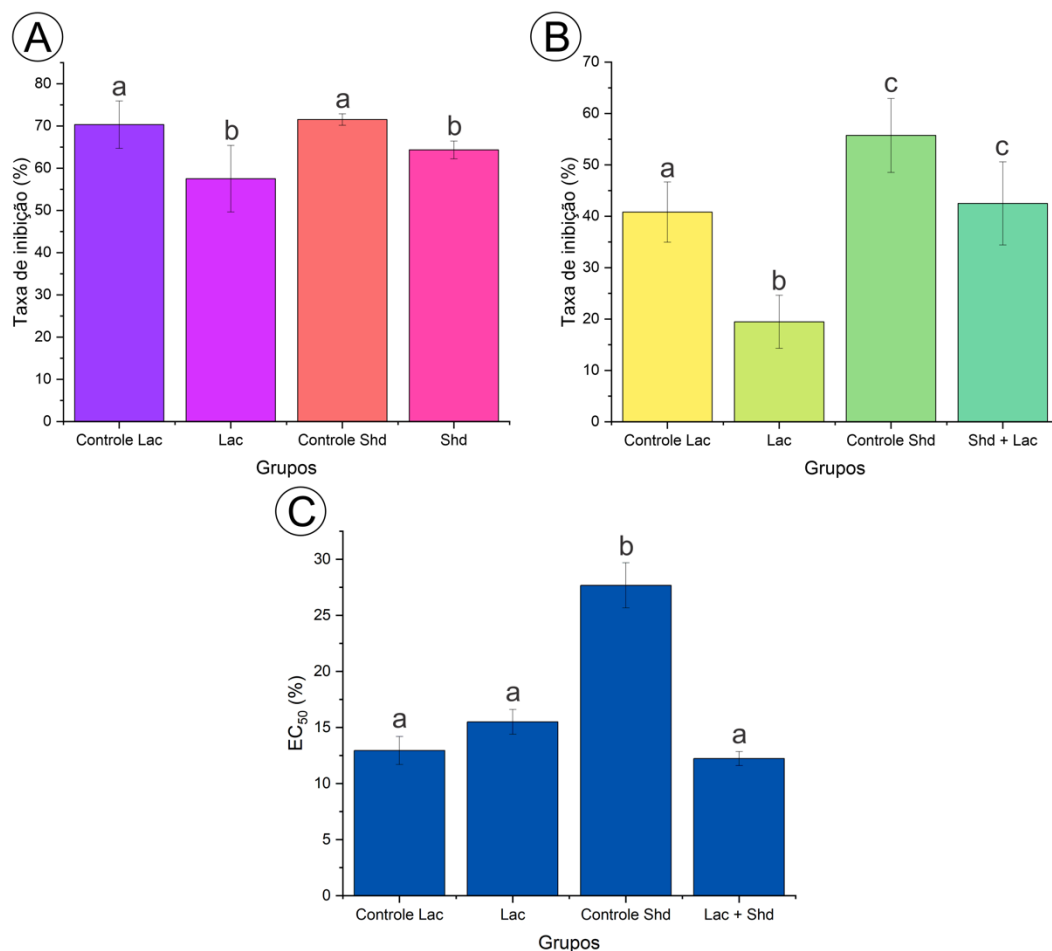


7.3.4 Análises de fitotoxicidade e toxicidade aguda dos tratamentos de descoloração do corante Preto Reativo 5 pela LacI

A eficiência dos processos de biorremediação de corantes não pode ser baseada apenas na taxa de descoloração e na formação de compostos menos recalcitrantes, apesar de importantes, essas análises precisam ser acompanhadas de avaliações da toxicidade resultante dos tratamentos propostos. Nesse sentido, análises de fitotoxicidade e toxicidade aguda foram

realizadas para os dois tratamentos de descoloração em frasco (Lac1 e Lac1 + siringaldeído) e estão apresentadas na figura 8.

Figura 8. Resultados de fitotoxicidade para *C. sativus* e toxicidade aguda em *A. fischerii* após os tratamentos do corante Preto Reativo 5 com a enzima Lac1 na presença e na ausência do mediador siringaldeído. **A:** Taxa de inibição no crescimento da radícula de *C. sativus*. **B:** Taxa de inibição no crescimento do hipocótilo de *C. sativus*. **C:** Toxicidade aguda em *A. fischerii*.



Quanto a fitotoxicidade, tanto o uso da Lac1 sozinha quanto em associação com o siringaldeído resultaram na destoxificação do meio quando avaliada a influência dos tratamentos no crescimento da radícula de *C. sativus*. Mesmo com a baixa taxa de descoloração da Lac1 sozinha, o tratamento foi também capaz de diminuir a taxa de inibição do hipocótilo de *C. sativus* em 20%. Ainda considerando o mesmo experimento, apesar do tratamento utilizando a enzima na presença do mediador também ter diminuído a inibição e, por consequência, a fitotoxicidade, essa diminuição não foi considerada significativa pelas análises estatísticas realizadas (figura 9B).

Os resultados de Microtox demonstraram que nenhum dos dois tratamentos propostos foi eficaz na diminuição da toxicidade aguda, mesmo com elevado nível de descoloração do tratamento com a enzima na presença do mediador e a formação de compostos menores e menos recalcitrantes (e.g.: ácido cis-pentenedioico, ácido butanodioico, N,N-dimetildecanamida), os processos de descoloração e degradação mantiveram os níveis de toxicidade iniciais do corante.

Diferentes estudos reportam casos em que os metabólitos gerados pelas vias de degradação de corantes, principalmente do tipo azo, podem ser mais tóxicos que as moléculas originárias (ALMEIDA; CORSO, 2014; BRÜSCHWEILER et al., 2014; GOTTLIEB et al., 2003; RAWAT et al., 2018) mesmo em casos em que o corante é considerado inofensivo, como no caso do corante azo Laranja Ácido 7, sua degradação pode gerar compostos amínicos de alta toxicidade e genotoxicidade (RAWAT et al., 2018). Uma busca por aminas tóxicas foi feita no espectro dos tratamentos com o auxílio do padrão AE-00049-R1 (AccuStandard®) que contém 22 compostos amínicos descritos como potencialmente tóxicos e/ou mutagênicos. A corrida do padrão foi feita nas mesmas condições em que as amostras foram analisadas no GC-MS, e os espectros foram então comparados, mas nenhuma amina tóxica similar as do padrão foi encontrada nas nossas amostras (dados não apresentados). No entanto, não só compostos amínicos podem apresentar toxicidade, o composto N,N-Dimetildecanamida proposto como resultado da via de degradação do corante apresenta toxicidade para a vida aquática com efeitos duradouros, de acordo com o Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS - United Nations, 2021).

Além da amida tóxica encontrada, é possível que moléculas intermediárias do processo de degradação que foram apenas encontradas nas amostras tratadas com a Lac1 na presença do mediador, tenham elevado a toxicidade do tratamento; justificando assim os resultados de toxicidade aguda encontrados. A tabela 3 apresenta os metabólitos identificados nas análises de GC-MS com o respectivo potencial de toxicidade.

Tabela 3. Metabólitos encontrados na análise de GC-MS com respectivo potencial ecotoxicológico. Dados ecotoxicológicos obtidos a partir Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS Rev. 9, 2021).

Nome do metabólito	Ecotoxicidade
3-(phenylsulfonyl)	Toxicidade aguda em caso de ingestão
2,6-Dimethoxybenzoquinone	Toxicidade para órgãos específicos
4H-Pyran-4-one	Toxicidade para órgãos específicos
Metharbital; Pyrimidinetriene	Altamente tóxico para vida aquática
3,4-Dimethoxythiophenol	Toxicidade aguda em caso de ingestão ou inalação
N,N-Dimethyldodecanamide; Dodecanamide	Muito tóxico para a vida aquática com efeitos de longa duração
N,N-Dimethyldecanamide; Decanamide	Nocivo para a vida aquática com efeitos duradouros
Propanoic acid	Nocivo para a vida aquática com efeitos duradouros

7.4 Conclusões

A Lac1 apresenta capacidade de descoloração de diferentes tipos de corantes sintéticos (azo, antraquinona, triarilmetano e índigo) com e sem mediadores. Contudo, a descoloração com o mediador natural siringaldeído é mais indicada para o LMS com menores quantidades da enzima purificada. Diferentes metabólitos podem ser formados durante degradação do corante Preto Reativo 5 pela Lac1 na presença de siringaldeído. Alguns deles, apesar de serem menores, de cadeia aberta e com menor recalcitrância, podem apresentar elevada toxicidade para organismos aquáticos. Portanto, a utilização do LMS com siringaldeído, pode ser uma alternativa aos meios convencionais de degradação de azo corantes reativos, mas precisa ser aplicado com cautela e em associação com outros sistemas (como fitorremediação) visando a maior redução da toxicidade.

8. CONCLUSÕES GERAIS

Os dados derivados das análises filogenéticas dos genes de lacase do fungo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 em associação com outras análises *in silico*, demonstraram que os genes de lacase do fungo passaram por diferentes pressões seletivas e que mesmo que o fungo tenha sido isolado do ambiente marinho, é possível que nem todas as proteoformas estejam igualmente adaptadas ao ambiente salino. Dessa forma, a análise de expressão gênica em condições salinas, associada aos dados do secretoma obtidos anteriormente apontaram a Lac1 como uma das proteoformas mais aptas a atuar em ambiente salino e, portanto, a mais indicada para ser explorada nos experimentos de expressão heteróloga, purificação e caracterização.

A estratégia de utilizar o sistema modular Pichia Toolkit para a expressão heteróloga da Lac1 foi considerada eficiente, pois o sistema foi capaz de selecionar, entre diferentes combinações possíveis, o melhor arranjo molecular para o controle da expressão. A associação do promotor constitutivo pGAP com o peptídeo sinal α -amilase- $\alpha\Delta$ MF resultou na maior produção de lacase pela levedura *P. pastoris*, em comparação com as outras construções constitutivas e indutivas do sistema. Alterações nas condições de cultivo, como a expressão constitutiva da Lac1 a 18 °C permitiu otimizar o processo de produção da enzima. Apesar de inconclusivos, os experimentos em biorreator demonstraram que outras variáveis precisam ser testadas para o alcance da condição ótima de produção da lacase heteróloga.

A purificação e a caracterização da Lac1 revelaram características interessantes para aplicação da enzima, como alta tolerância a íons metálicos, boa termoestabilidade e atividade próxima a ótima em uma janela ampla de temperaturas. Contudo, a alta tolerância a salinidade não foi encontrada para essa enzima. Com uma sensibilidade ao sal muito semelhante a outras lacases terrestres é possível que a origem da Lac1 na história evolutiva do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063, tenha surgido antes do fungo habitar o ambiente marinho. Logo, sugere-se a aplicação dessa enzima em processos e ambientes não salinos ou com pouca salinidade. Experimentos adicionais precisam ser realizados visando compreender os mecanismos de regulação e expressão gênica do fungo marinho *Peniophora* sp. CBMAI 1063. Considerando o arsenal de lacases e os processos evolutivos, é possível que outras lacases do fungo sejam mais “recentes” e apresentem melhor adaptação ao ambiente salino.

Apesar da baixa resistência a salinidade a enzima Lac1 apresentou forte potencial para a descoloração de diferentes corantes sintéticos, incluindo alguns utilizados na indústria têxtil. A presença de mediadores (LMS) foi essencial para obtenção dos melhores resultados de

descoloração, além disso, os experimentos realizados indicam que a presença de mediadores no meio reacional promove a degradação das moléculas de corante de forma diferente daquela realizada apenas pela enzima. Apesar da elevada afinidade por siringaldazina e ABTS, o melhor mediador foi siringaldeído na maioria dos casos. A degradação do azo corante têxtil Preto Reativo 5 pela LacI na presença do mediador siringaldeído gerou metabólitos de menor massa molecular, muitos dos quais com baixa ou nenhuma toxicidade, contudo alguns dos metabólitos (e.g. 3-(fenilsulfonil), Pirano-4-ona, 3,4-Dimethoxi tiofenol, N,N-Dimetildecanamida) podem apresentar elevada toxicidade para organismos aquáticos e, portanto, a aplicação do LMS com siringaldeído precisa ser associado a outras estratégias de metabolização e redução geral da toxicidade.

Lacases marinhas apresentam características interessantes que podem ser aplicadas em diferentes condições. Tais enzimas representam novos recursos biotecnológicos ainda pouco explorados. A diversidade de lacases de um único fungo (*Peniophora* sp. CBMAI 1063) demonstra o quanto o vasto ecossistema marinho e a biotecnologia marinha ainda podem ser explorados.

Os resultados do presente estudo contribuem para o avanço do conhecimento da micologia marinha e biotecnologia azul e abrem perspectivas para novos estudos que visem compreender melhor o processo de adaptação das lacases marinhas e dos diferentes substratos possíveis de serem utilizados por essas enzimas, visando futuras aplicações.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-HAMID, A. M.; SOLBIATI, J. O.; CANN, I. K. O. Insights into lignin degradation and its potential industrial applications. Em: SARIASLANI, S.; GADD, G.M. **Advances in Applied Microbiology** (1st Ed.). New York: Elsevier, 2013. p. 1–28.
- ABDULRACHMAN, D. et al. Heterologous expression of *Aspergillus aculeatus* endopolygalacturonase in *Pichia pastoris* by high cell density fermentation and its application in textile scouring. **BMC Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 1–9, 2017.
- ADNAN, L. A. et al. Metabolites characterization of laccase mediated Reactive Black 5 biodegradation by fast growing ascomycete fungus *Trichoderma atroviride* F03. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 104, p. 274–282, 2015.
- AGEMATU, H. et al. Oxidative decarboxylations of 4-hydroxymandelic acid and 2-(4-hydroxyphenyl)glycine by laccase from *Coriolus versicolor* and bilirubin oxidases from *Trachyderma tsunodae* and *Myrothecium verrucaria*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 57, n. 11, p. 1877–1881, 1993.
- AGMON, N. et al. Yeast Golden Gate (yGG) for the efficient assembly of *S. cerevisiae* transcription units. **ACS Synthetic Biology**, v. 4, n. 1, p. 853–859, 2015.
- AHARONI, A. et al. The “evolvability” of promiscuous protein functions. **Nature Genetics**, v. 37, n. 1, p. 73–76, 2005.
- AHMAD, M. et al. Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 12, p. 5301–5317, 2014.
- ALI, W. BEN et al. Characterization of the CAZy repertoire from the marine-derived fungus *Stemphylium lucomagnoense* in relation to saline conditions. **Marine Drugs**, v. 18, n. 9, 2020a.
- ALI, W. BEN et al. Enzyme properties of a laccase obtained from the transcriptome of the marine-derived fungus *Stemphylium lucomagnoense*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 21, p. 1–16, 2020b.
- ALMEIDA, E. J. R.; CORSO, C. R. Comparative study of toxicity of azo dye Procion Red MX-5B following biosorption and biodegradation treatments with the fungi *Aspergillus niger* and *Aspergillus terreus*. **Chemosphere**, v. 112, p. 317–322, 2014.
- AL-TOHAMY, R. et al. Performance of a newly isolated salt-tolerant yeast strain *Sterigmatomyces halophilus* SSA-1575 for azo dye decolorization and detoxification. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. June, p. 1–19, 2020.
- AL-TOHAMY, R. et al. A critical review on the treatment of dye-containing wastewater: Ecotoxicological and health concerns of textile dyes and possible remediation approaches for environmental safety. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 231, p. 113160, 2022.

ANTOŠOVÁ, Z.; SYCHROVÁ, H. Yeast hosts for the production of recombinant laccases: A Review. **Molecular Biotechnology**, v. 58, n. 2, p. 93–116, 2016.

ARDILA-LEAL, L. D. et al. A brief history of colour, the environmental impact of synthetic dyes and removal by using laccases. **Molecules**, v. 26, n. 13, 2021.

ARIAEENEJAD, S.; MOTAMEDI, E.; HOSSEINI SALEKDEH, G. Application of the immobilized enzyme on magnetic graphene oxide nano-carrier as a versatile bi-functional tool for efficient removal of dye from water. **Bioresource Technology**, v. 319, n. September 2020, p. 124228, 2021.

ASADI, E.; MAKHDOUMI, A.; ASODEH, A. Laccase mediator system obtained from a marine spore exhibits decolorization potential in harsh environmental conditions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 191, n. September 2019, p. 110184, 2020.

ASKWITH, C. et al. The FET3 gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. **Cell**, v. 76, n. 2, p. 403–410, 28 jan. 1994.

ATA, O. et al. What makes *Komagataella phaffii* non-conventional? **FEMS Yeast Research**, v. 21, n. 11, p. 1–15, 2021.

ATALLA, M. M. et al. Characterization and kinetic properties of the purified *Trematosphaeria mangrovei* laccase enzyme. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 20, n. 4, p. 373–381, 2013.

BALDRIAN, P. Fungal laccases-occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 215–242, 2005.

BAZON, M. L. et al. Heterologous expression, purification and immunoreactivity of the antigen 5 from *Polybia paulista* wasp venom. **Toxins**, v. 9, n. 9, 2017.

BENCHLING. **Benchling [Biology Software]. (2021)**. Acesso em: <https://benchling.com>, 2021.

BENKHAYA, S.; M'RABET, S.; EL HARFI, A. Classifications, properties, recent synthesis and applications of azo dyes. **Heliyon**, v. 6, n. 1, 2020.

BERRADI, M. et al. Textile finishing dyes and their impact on aquatic environs. **Heliyon**, v. 5, n. 11, 2019.

BOND, G. P.; MARTIN, J. Microtox. Em: WEXLER, P. et al. **Encyclopedia of Toxicology** (2nd Ed.). New York: Elsevier, 2005. p. 110–111.

BONUGLI-SANTOS, R. C. et al. Enhanced textile dye decolorization by marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063 using integrated statistical design. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 9, p. 8659–8668, 2016.

BONUGLI-SANTOS, R. C.; DURRANT, L. R.; SETTE, L. D. Laccase activity and putative laccase genes in marine-derived basidiomycetes. **Fungal Biology**, v. 114, n. 10, p. 863–872, 2010.

BONUGLI-SANTOS, R. C.; DURRANT, L. R.; SETTE, L. D. The production of ligninolytic enzymes by marine-derived basidiomycetes and their biotechnological potential in the biodegradation of recalcitrant pollutants and the treatment of textile effluents. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 223, n. 5, p. 2333–2345, 2012.

BRENELLI, L. B. et al. Novel redox-active enzymes for ligninolytic applications revealed from multiomics analyses of *Peniophora* sp. CBMAI 1063, a laccase hyper-producer strain. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 1 dez. 2019.

BRISSOS, V. et al. Expression system of CotA-laccase for directed evolution and high-throughput screenings for the oxidation of high-redox potential dyes. **Biotechnology Journal**, v. 4, n. 4, p. 558–563, 2009.

BRONIKOWSKI, A. et al. Expression of a new laccase from *Moniliophthora roreri* at high levels in *Pichia pastoris* and its potential application in micropollutant degradation. **AMB Express**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

BRÜSCHWEILER, B. J. et al. Identification of non-regulated aromatic amines of toxicological concern which can be cleaved from azo dyes used in clothing textiles. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 69, n. 2, p. 263–272, 2014.

BUCKHOLZ, R. G.; GLEESON, M. A. G. Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. **Nature Biotechnology**, v. 9, n. 11, p. 1067–1072, 1991.

BUSTOS, C. et al. Advances in cell engineering of the *Komagataella phaffii* platform for recombinant protein production. **Metabolites**, v. 12, n. 346, p. 1–20, 2022.

CAÑAS, A. I.; CAMARERO, S. Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 694–705, 2010.

CARVALHO DA CRUZ BRAMBILLA, C. M. et al. Amido Black 10B a widely used azo dye causes DNA damage in pro- and eukaryotic indicator cells. **Chemosphere**, v. 217, p. 430–436, 2019.

CHAUHAN, J. S.; RAO, A.; RAGHAVA, G. P. S. In silico platform for prediction of N-, O- and C-Glycosites in eukaryotic protein sequences. **PLOS ONE**, v. 8, n. 6, p. 1–10, 2013.

CHIA, M. A.; MUSA, R. I. Effect of indigo dye effluent on the growth, biomass production and phenotypic plasticity of *Scenedesmus quadricauda* (Chlorococcales). **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 86, n. 1, p. 419–428, 2014.

CHIVUKULA, M.; RENGANATHAN, V. Phenolic azo dye oxidation by laccase from *Pyricularia oryzae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 12, p. 4374–4377, 1995.

CHOPRA, N. K.; SONDHY, S. Cloning, expression and characterization of laccase from *Bacillus licheniformis* NS2324 in *E. coli* application in dye decolorization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 206, n. 1, p. 1003–1011, 2022.

CHUANG, J.; BOEKE, J. D.; MITCHELL, L. A. Coupling yeast golden gate and VEGAS for efficient assembly of the violacein pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Em: JENSEN, M. K.; KEASLING, J. D. (Eds.). **Synthetic metabolic pathways: methods and protocols**. New York, NY: Springer New York, 2018. p. 211–225.

CLAUS, H. Laccases: Structure, reactions, distribution. **Micron**, v. 35, n. 1–2, p. 93–96, 2004.

COUTO, S. R.; TOCA-HERRERA, J. L. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 5, p. 500–513, 2006.

CREGG, J. M. et al. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. **Molecular and Cellular Biology**, v. 5, n. 12, p. 3376–3385, 1985.

CROCE, R. et al. Aquatic toxicity of several textile dye formulations: Acute and chronic assays with *Daphnia magna* and *Raphidocelis subcapitata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 144, n. January, p. 79–87, 2017.

DATTA, S.; MELVIN, R. V.; ETHIRAJ, S. S. Immobilization of laccases and applications for the detection and remediation of pollutants: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 19, n. 1, p. 521–538, 2021.

DE SALAS, F. et al. Engineering of a fungal laccase to develop a robust, versatile and highly-expressed biocatalyst for sustainable chemistry. **Green Chemistry**, v. 21, n. 19, p. 5374–5385, 2019.

DEARDEN, J. C.; FORBES, W. F. Light absorption studies. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 37, n. 6, p. 1145–1154, 1955.

DESHPANDE, R. S. et al. Microbial degradation of cold lake blend and western Canadian select dilbits by freshwater enrichments. **Journal of Hazardous Materials**, v. 352, n. March, p. 111–120, 2018.

DESKA, M.; KOŃCZAK, B. Immobilized fungal laccase as “green catalyst” for the decolourization process – State of the art. **Process Biochemistry**, v. 84, n. May, p. 112–123, 2019.

DITTMER, N. T.; GORMAN, M. J.; KANOST, M. R. Characterization of endogenous and recombinant forms of laccase-2, a multicopper oxidase from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 39, n. 9, p. 596–606, 2009.

D’SOUZA-TICLO, D.; SHARMA, D.; RAGHUKUMAR, C. A thermostable metal-tolerant laccase with bioremediation potential from a marine-derived fungus. **Marine Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 725–737, 2009.

DUNN, A. K. *Vibrio fischeri* metabolism: Symbiosis and beyond. Em: POOLE, R.K. **Advances in Microbial Physiology** (1st Ed). New York: Elsevier, 2012. p. 37–68.

DWIVEDI, U. N. et al. Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 2, p. 117–128, 2011.

ECK, A. et al. Improved microscale cultivation of *Pichia pastoris* for clonal screening. **Fungal Biology and Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 1–14, 2018.

EL BOURAIE, M.; EL DIN, W. S. Biodegradation of Reactive Black 5 by *Aeromonas hydrophila* strain isolated from dye-contaminated textile wastewater. **Sustainable Environment Research**, v. 26, n. 5, p. 209–216, 2016.

ENGLER, C. et al. Golden gate shuffling: A one-pot DNA shuffling method based on type II restriction enzymes. **PLoS ONE**, v. 4, n. 5, p. 1–9, 2009.

FARIAS, G. S. **Fungos basidiomicetos de solos de recuo da geleira Collins (antártica): caracterização de lacases e aplicação ambiental**. Orientadora: Lara Durães Sette. 2022. 77f. Dissertação (mestrado). Curso de Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2022.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783–791, 1985.

FLOUDAS, D. et al. The paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. **Science**, v. 336, n. 6089, p. 1715–1719, 2012.

FONTES, B. DE J. et al. Laccases produced by *Peniophora* from marine and terrestrial origin: A comparative study. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 35, p. 1–8, 2021.

FUKUSHIMA, Y.; KIRK, T. K. Laccase component of the *Ceriporiopsis subvermispora* lignin-degrading system. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 872–876, 1995.

GAO, J.; JIANG, L.; LIAN, J. Development of synthetic biology tools to engineer *Pichia pastoris* as a chassis for the production of natural products. **Synthetic and Systems Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 110–119, 2021.

GÁSPÁR, S.; BRINDUSE, E.; VASILESCU, A. Electrochemical evaluation of laccase activity in must. **Chemosensors**, v. 8, n. 4, p. 1–14, 2020.

GASSER, B.; MATTANOVICH, D. A yeast for all seasons – Is *Pichia pastoris* a suitable chassis organism for future bioproduction? **FEMS Microbiology Letters**, v. 365, n. 17, p. 1–4, 2018.

GASSLER, T. et al. The industrial yeast *Pichia pastoris* is converted from a heterotroph into an autotroph capable of growth on CO₂. **Nature Biotechnology**, v. 38, n. 2, p. 210–216, 2020.

GELLISSEN, G.; HOLLENBERG, C. P. Application of yeasts in gene expression studies: A comparison of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* and *Kluyveromyces lactis* - A review. **Gene**, v. 190, n. 1, p. 87–97, 1997.

GENÁZIO PEREIRA, P. C. et al. Lethal and sub-lethal evaluation of Indigo Carmine dye and byproducts after TiO₂ photocatalysis in the immune system of *Eisenia andrei* earthworms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 143, n. May, p. 275–282, 2017.

GHS (UNITED NATIONS). **Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS)** (9th Ed). New York: United Nations. 2021. p. 1-550.

GIARDINA, P. et al. Laccases: A never-ending story. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 3, p. 369–385, 2010.

GILLET, S.; LAWARÉE, E.; MATROULE, J.-Y. Functional diversity of bacterial strategies to cope with metal toxicity. Em: DAS, S.; DASH, H. R. **Microbial Diversity in the Genomic Era** (1st Ed). Academic Press, 2019. p. 409–426.

GIOVANELLA, P. et al. Metal and organic pollutants bioremediation by extremophile microorganisms. **Journal of Hazardous Materials**, v. 382, p. 1–14, 2020.

GLAZUNOVA, O. A. et al. Purification and characterization of two novel laccases from *Peniophora lycii*. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 1–16, 2020.

GOFFEAU, A. et al. Life with 6000 genes. **Science**, v. 274, n. 5287, p. 546–567, 1996.

GOTTLIEB, A. et al. The toxicity of textile reactive azo dyes after hydrolysis and decolourisation. **Journal of Biotechnology**, v. 101, n. 1, p. 49–56, 2003.

GU, Y. et al. Recent developments of a co-immobilized laccase-mediator system: a review. **RSC Advances**, v. 11, n. 47, p. 29498–29506, 2021a.

GU, Y. et al. Recent developments of a co-immobilized laccase – mediator system: a review. **RSC Advances**, v. 11, n. 1, p. 29498–29506, 2021b.

GÜNER, S. et al. Design of a synthetic enzyme cascade for the: In vitro fixation of a C1 carbon source to a functional C4 sugar. **Green Chemistry**, v. 23, n. 17, p. 6583–6590, 2021.

GÜRSES, A. et al. Dyes and pigments: Their structure and properties. Em: GÜRSES, A. et al. **Dyes and pigments** (Eds.). Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 13–29.

HERNÁNDEZ-GORDILLO, A. et al. Photodegradation of Indigo Carmine dye by CdS nanostructures under blue-light irradiation emitted by LEDs. **Catalysis Today**, v. 266, p. 27–35, 2016.

HONG, F.; MEINANDER, N. Q.; JÖNSSON, L. J. Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 79, n. 4, p. 438–449, 2002.

HOU, H. et al. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1415–1419, 2004.

IARK, D. et al. Enzymatic degradation and detoxification of azo dye Congo red by a new laccase from *Oudemansiella canarii*. **Bioresource Technology**, v. 289, n. June, p. 121655, 2019.

IHSSEN, J. et al. Biochemical properties and yields of diverse bacterial laccase-like multicopper oxidases expressed in *Escherichia coli*. **Scientific Reports**, v. 5, n. November 2014, p. 1–13, 2015.

IYER, G.; CHATTOO, B. B. Purification and characterization of laccase from the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 227, n. 1, p. 121–126, 2003.

JAHIC, M. et al. Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes. **Journal of Biotechnology**, v. 102, n. 1, p. 45–53, 2003.

JAHIC, M. et al. Process technology for production and recovery of heterologous proteins with *Pichia pastoris*. **Biotechnology Progress**, v. 22, n. 6, p. 1465–1473, 2006.

JOHANNES, C.; MAJCHERCZYK, A. Laccase activity tests and laccase inhibitors. **Biotechnology**, v. 78, n. 1, p. 193–199, 2000.

JORDAAN, J.; PLETSCHKE, B. I.; LEUKES, W. D. Purification and partial characterization of a thermostable laccase from an unidentified basidiomycete. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n. 7, p. 635–641, 2004.

JUTURU, V.; WU, J. C. Heterologous protein expression in *Pichia pastoris*: Latest research progress and applications. **ChemBioChem**, v. 19, n. 1, p. 7–21, 2018.

KANUNFRE, C. C.; ZANCAN, G. T. Physiology of exo laccase production by *Thelephora terrestris*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 161, n. 1, p. 151–156, 1998.

KARBALAEI, M.; REZAEI, S. A.; FARSIANI, H. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. **Journal of Cellular Physiology**, v. 235, n. 9, p. 5867–5881, 2020.

KAUR, J.; KUMAR, A.; KAUR, J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 803–822, 2018.

KAUSHIK, N. et al. Casamino acids facilitate the secretion of recombinant dengue virus serotype-3 envelope domain III in *Pichia pastoris*. **BMC Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 1–9, 2016.

KEUM, Y. S.; LI, Q. X. Fungal laccase-catalyzed degradation of hydroxy polychlorinated biphenyls. **Chemosphere**, v. 56, n. 1, p. 23–30, 2004.

KHLIFI, R. et al. Decolourization and detoxification of textile industry wastewater by the laccase-mediator system. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, n. 1, p. 802–808, 2010.

KIISKINEN, L. L.; VIIKARI, L.; KRUUS, K. Purification and characterization of a novel laccase from the ascomycete *Melanocarpus albomyces*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 2–3, p. 198–204, 2002.

KIRK, P. M. et al. **Dictionary of the Fungi** (10th Ed.). Wallingford: Ainsworth & Bisby's. 2008

KUCERA, R.; CANTOR, E. Breaking through the limitations of Golden Gate assembly: The co-evolution of test systems, engineered enzymes and understanding ligase fidelity. **New England Biolabs Technical Note**, p. 1–4, 2018.

KÜES, U.; RÜHL, M. Multiple multi-copper oxidase gene families in basidiomycetes - what for? **Current Genomics**, v. 12, n. 2, p. 72–94, 2011.

KUMAR, S. et al. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v. 35, n. 6, p. 1547–1549, 2018.

LARROUDE, M. et al. A modular Golden Gate toolkit for *Yarrowia lipolytica* synthetic biology. **Microbial Biotechnology**, v. 12, n. 6, p. 1249–1259, 2019.

LEBEDENKO, E. N. et al. Method of artificial DNA spling by directed ligation (SDL). **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 24, p. 6757–6761, 1991.

LEE, M. E. et al. A Highly Characterized yeast toolkit for modular, multipart assembly. **ACS Synthetic Biology**, v. 4, n. 9, p. 975–986, 2015.

LEGERSKA, B.; CHMELOVA, D.; ONDREJOVIC, M. Degradation of synthetic dyes by laccases: A mini-review. **Nova Biotechnologica et Chimica**, v. 15, n. 1, p. 90–106, 2016.

LELLIS, B. et al. Effects of textile dyes on health and the environment and bioremediation potential of living organisms. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 3, n. 2, p. 275–290, 2019.

LEONOWICZ, A. et al. Fungal laccase: Properties and activity on lignin. **Journal of Basic Microbiology**, v. 41, n. 3–4, p. 185–227, 2001.

LIU, N. et al. Heterologous expression of Stlac2, a laccase isozyme of *Setosphaeria turcica*, and the ability of decolorization of malachite green. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 138, p. 21–28, 2019.

LIU, W. C. et al. Fed-batch high-cell-density fermentation strategies for *Pichia pastoris* growth and production. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 258–271, 2019.

LÖÖKE, M.; KRISTJUHAN, K.; KRISTJUHAN, A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. **BioTechniques**, v. 50, n. 5, p. 325–328, 2011.

LOOSER, V. et al. Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 1177–1193, 2015.

LUCATO, W. C.; COSTA, E. M.; DE OLIVEIRA NETO, G. C. The environmental performance of SMEs in the Brazilian textile industry and the relationship with their financial performance. **Journal of Environmental Management**, v. 203, p. 550–556, 2017.

MAESTRE-REYNA, M. et al. Structural and functional roles of glycosylation in fungal laccase from *Lentinus* sp. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–28, 2015.

MAINARDI, P. H. et al. Laccase production in bioreactor scale under saline condition by the marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063. **Fungal Biology**, v. 122, n. 5, p. 302–309, 2018.

MAJOREK, K. A. et al. Double trouble - Buffer selection and his-tag presence may be responsible for nonreproducibility of biomedical experiments. **Protein Science**, v. 23, n. 10, p. 1359–1368, 2014.

MANI, S.; BHARAGAVA, R. N. Exposure to Crystal Violet, its toxic, genotoxic and carcinogenic effects on environment and its degradation and detoxification for environmental safety. Em: de VOOGT, W. P. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology** (1st Ed.). Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 71–104.

MARQUES DE SOUZA, C. G.; PERALTA, R. M. Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* on wheat bran solid state medium. **Journal of Basic Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 278–286, 1 ago. 2003.

MARTORELL, M. M.; PAJOT, H. F.; FIGUEROA, L. I. C. DE. Biological degradation of Reactive Black 5 dye by yeast *Trichosporon akiyoshidainum*. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, n. 6, p. 5987–5993, 2017.

MASSAHI, A.; ÇALIK, P. *In-silico* determination of *Pichia pastoris* signal peptides for extracellular recombinant protein production. **Journal of Theoretical Biology**, v. 364, p. 179–188, 2015.

MATE, D. M.; ALCALDE, M. Laccase: A multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. **Microbial Biotechnology**, 2016.

MEHRA, R. et al. A structural-chemical explanation of fungal laccase activity. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 2018.

MENEZES, C. B. A. et al. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. **Microbiological Research**, v. 165, n. 6, p. 466–482, 2010.

MINUSSI, R. C.; PASTORE, G. M.; DURÁN, N. Potential applications of laccase in the food industry. **Trends in Food Science and Technology**, v. 13, n. 6–7, p. 205–216, 2002.

MIYAZAKI, K. A hyperthermophilic laccase from *Thermus thermophilus* HB27. **Extremophiles**, v. 9, n. 6, p. 415–425, 2005.

MOISEENKO, K. V. et al. Laccase multigene families in Agaricomycetes. **Journal of Basic Microbiology**, v. 56, n. 12, p. 1392–1397, 2016.

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

MOTA, M. I. F. et al. Recovery of vanillin and syringaldehyde from lignin oxidation: A review of separation and purification processes. **Separation and Purification Reviews**, v. 45, n. 3, p. 227–259, 2016.

MZHEL'SKAYA, T. I. Biological functions of ceruloplasmin and their deficiency caused by mutation in genes regulating copper and iron metabolism. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 130, n. 8, p. 719–727, 2000.

NAGAI, M. et al. Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dyes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 3, p. 327–335, 2002.

NAGY, G. et al. Comparative genomics of early-diverging mushroom-forming fungi provides insights into the origins of lignocellulose decay capabilities. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 4, p. 959–970, 2015.

NIKOLAIVITS, E. et al. Functional and transcriptomic investigation of laccase activity in the presence of PCB29 identifies two novel enzymes and the multicopper oxidase repertoire of a marine-derived fungus. **Science of the Total Environment**, v. 775, n. 775, p. 1–11, 2021.

NORDBERG, H. et al. The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: 2014 updates. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 26–31, 2014.

NOVOTNÝ, Č. et al. Comparative use of bacterial, algal and protozoan tests to study toxicity of azo- and anthraquinone dyes. **Chemosphere**, v. 63, n. 9, p. 1436–1442, 2006.

OBST, U.; LU, T. K.; SIEBER, V. A modular toolkit for generating *Pichia pastoris* secretion libraries. **ACS Synthetic Biology**, v. 6, n. 6, p. 1016–1025, 2017.

OSMA, J. F.; TOCA-HERRERA, J. L.; RODRÍGUEZ-COUTO, S. Uses of laccases in the food industry. **Enzyme Research**, v. 2010, n. Table 1, p. 1–8, 2010.

OTERO, I. V. R. et al. *De novo* transcriptome assembly: A new laccase multigene family from the marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063. **AMB Express**, 2017.

PALMIERI, G. et al. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 50, p. 31301–31307, 1997.

PALMIERI, G. et al. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 3, p. 920–924, 2000.

PASSARINI, M. R. Z. et al. Induction, expression and characterization of laccase genes from the marine-derived fungal strains *Nigrospora* sp. CBMAI 1328 and *Arthopyrenia* sp. CBMAI 1330. **AMB Express**, v. 5, n. 1, p. 1–9, 2015.

PATRICK, W. M.; FIRTH, A. E.; BLACKBURN, J. M. User-friendly algorithms for estimating completeness and diversity in randomized protein-encoding libraries. **Protein Engineering**, v. 16, n. 6, p. 451–457, 2003.

PISCITELLI, A. et al. Heterologous laccase production and its role in industrial applications. **Bioengineered Bugs**, v. 1, n. 4, p. 252–262, 2010.

PRIELHOFER, R. et al. Induction without methanol: Novel regulated promoters enable high-level expression in *Pichia pastoris*. **Microbial Cell Factories**, v. 12, n. 1, p. 1, 2013.

PÜLLMANN, P.; WEISSENBORN, M. J. Improving the heterologous production of fungal peroxygenases through an episomal *Pichia pastoris* promoter and signal peptide shuffling system. **ACS Synthetic Biology**, v. 10, n. 6, p. 1360–1372, 2021.

RAMOS, M. D. N. et al. A critical analysis of the alternative treatments applied to effluents from Brazilian textile industries. **Journal of Water Process Engineering**, v. 43, n. May, p. 1–16, 2021.

RAWAT, D. et al. Ecotoxic potential of a presumably non-toxic azo dye. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, n. November 2017, p. 528–537, 2018.

RENAULT, H.; WERCK-REICHHART, D.; WENG, J. K. Harnessing lignin evolution for biotechnological applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 56, p. 105–111, 2019.

RIVA, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 5, p. 219–226, 2006.

RIVERA-HOYOS, C. M. et al. Fungal laccases. **Fungal Biology Reviews**, v. 27, n. 3–4, p. 67–82, 2013.

RODRIGUES DE ALMEIDA, E. J. et al. Azo dyes degradation and mutagenicity evaluation with a combination of microbiological and oxidative discoloration treatments. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 183, n. July, p. 109484, 2019.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. APR, p. 1–17, 2014.

RUBINOS, D. A. et al. Acute toxicity of arsenic to *Aliivibrio fischeri* (Microtox® bioassay) as influenced by potential competitive-protective agents. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 14, p. 8631–8644, 2014.

SAKAMOTO, Y. et al. Heterologous expression of Lcc1 from *Lentinula edodes* in tobacco BY-2 cells results in the production an active, secreted form of fungal laccase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 6, p. 971–980, 2008.

SALONY et al. Laccase of *Cyathus bulleri*: structural, catalytic characterization and expression in *Escherichia coli*. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1784, n. 2, p. 259–268, 2008.

SANCHEZ-AMAT, A. et al. Molecular cloning and functional characterization of a unique multipotent polyphenol oxidase from *Marinomonas mediterranea*. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1547, n. 1, p. 104–116, 2001.

SHARMA, J.; SHARMA, S.; SONI, V. Classification and impact of synthetic textile dyes on aquatic flora: A review. **Regional Studies in Marine Science**, v. 45, 2021.

SHRADDHA et al. Laccase: Microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. **Enzyme Research**, v. 2011, n. 1, 2011.

SPIZZO, T. et al. The yeast FET5 gene encodes a FET3-related multicopper oxidase implicated in iron transport. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 256, n. 5, p. 547–556, 1997.

SRIWONG, C.; WONGNAWA, S.; PATARAPAIBOOLCHAI, O. Degradation of indigo carmine by rubber sheet impregnated with TiO₂ particles. **ScienceAsia**, v. 36, n. 1, p. 52–58, 2010.

TKACZYK, A.; MITROWSKA, K.; POSYNIAK, A. Synthetic organic dyes as contaminants of the aquatic environment and their implications for ecosystems: A review. **Science of the Total Environment**, v. 717, p. 137222, 2020.

ULLRICH, R. et al. Laccase from the medicinal mushroom *Agaricus blazei*: production, purification and characterization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 3, p. 357–363, 2005.

VASCONCELOS, M. R. S. et al. Pyrene degradation by marine-derived ascomycete: process optimization, toxicity, and metabolic analyses. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 12, p. 12412–12424, 1 abr. 2019.

VELUSAMY, S. et al. A review on heavy metal ions and containing dyes removal through graphene oxide-based adsorption strategies for textile wastewater treatment. **Chemical Record**, v. 21, n. 7, p. 1570–1610, 2021.

VIEIRA, G. A. L. et al. Marine associated microbial consortium applied to RBBR textile dye detoxification and decolorization: Combined approach and metatranscriptomic analysis. **Chemosphere**, v. 267, p. 1–12, 2021.

VISWANATH, B. et al. Fungal laccases and their applications in bioremediation. **Enzyme Research**, v. 1, 2014.

VITE-VALLEJO, O. et al. The role of N-glycosylation on the enzymatic activity of a *Pycnoporus sanguineus* laccase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 3, p. 233–239, 2009.

VOGL, T. et al. A toolbox of diverse promoters related to methanol utilization: functionally verified parts for heterologous pathway expression in *Pichia pastoris*. **ACS Synthetic Biology**, v. 5, n. 2, p. 172–186, 2015.

VOGL, T. et al. Engineered bidirectional promoters enable rapid multi-gene co-expression optimization. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.

VOGL, T.; GLIEDER, A. Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. **New Biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 385–404, 2013.

WANG, W. et al. The multigene family of fungal laccases and their expression in the white rot basidiomycete *Flammulina velutipes*. **Gene**, v. 563, n. 2, p. 142–149, 2015.

WANG, X. et al. Validation of germination rate and root elongation as indicator to assess phytotoxicity with *Cucumis sativus*. **Chemosphere**, v. 44, n. 8, p. 1711–1721, 2001.

WATERHOUSE, A. et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, p. 296–303, 2018.

WEBER, E. et al. A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. 1–11, 2011.

WIKKEE, S. et al. Characterization and dye decolorization potential of two laccases from the marine-derived fungus *Pestalotiopsis* sp. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 8, p. 1–20, 2019.

XU, F. et al. A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1292, n. 2, p. 303–311, 1996.

XU, G. et al. Role of N-glycosylation on the specific activity of a *Coprinopsis cinerea* laccase Lcc9 expressed in *Pichia pastoris*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 128, n. 5, p. 518–524, 2019.

YANG, J. et al. Laccase production and differential transcription of laccase genes in *Cerrena* sp. in response to metal ions, aromatic compounds, and nutrients. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. Jan, p. 1–11, 2016.

YANG, M. et al. Extracellular expression of alkaline phytase in *Pichia pastoris*: Influence of signal peptides, promoters and growth medium. **Biotechnology Reports**, v. 6, p. 112–118, 2015.

YANG, X.; GU, C.; LIN, Y. A novel fungal laccase from *Sordaria macrospora* k-hell: expression, characterization, and application for lignin degradation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 7, p. 1133–1139, 2020.

YANG, Z.; ZHANG, Z. Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris*: A review. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 1, p. 182–195, 2018.

YAYER, D. S.; GOLIGHTLY, E. J. Cloning and characterization of three laccase genes from the white-rot basidiomycete *Trametes villosa*: Genomic organization of the laccase gene family. **Gene**, v. 181, n. 1–2, p. 95–102, 1996.

YIN, Q. et al. The first fungal laccase with an alkaline pH optimum obtained by directed evolution and its application in indigo dye decolorization. **AMB Express**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2019.

ZERVA, A. et al. A novel thermophilic laccase-like multicopper oxidase from *Thermothelomyces thermophila* and its application in the oxidative cyclization of 2',3,4-trihydroxychalcone. **New Biotechnology**, v. 49, n. April 2018, p. 10–18, 2019.

ZHANG, A. L. et al. Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*. **Molecular Biology Reports**, v. 36, n. 6, p. 1611–1619, 2009.

ZHAO, J. et al. Expression of a thermotolerant laccase from *Pycnoporus sanguineus* in *Trichoderma reesei* and its application in the degradation of bisphenol A. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 125, n. 4, p. 371–376, 2018.

ZHOU, X. S.; ZHANG, Y. X. Decrease of proteolytic degradation of recombinant hirudin produced by *Pichia pastoris* by controlling the specific growth rate. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 17, p. 1449–1453, 2002.

ZHU, T. et al. *Pichia pastoris* as a versatile cell factory for the production of industrial enzymes and chemicals: current status and future perspectives. **Biotechnology Journal**, v. 14, n. 6, p. 1–13, 2019.

ZIARANI, G. M. et al. Azo Dyes. Em: ZIARANI, G. M. et al. **Metal-Free Synthetic Organic Dyes** (1st Ed.) Ney York: Elsevier, 2018. p. 47–93.

ZIMBARDI, A. L. R. L. et al. A high redox potential laccase from *Pycnoporus sanguineus* RP15: Potential application for dye decolorization. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 5, p. 1–24, 2016.