UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA"JÚLIO DE MESQUITAFILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - RIO CLARO

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

EDUARDO CÉSAR PECORA PAES

ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE LACASES E DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DO FUNGODE ORIGEM MARINHA *Peniophora* sp. CBMAI1063

Rio Claro - SP
2023

EDUARDO CÉSAR PECORA PAES

ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE LACASES E DA EXPRESSÃO GÊNICADIFERENCIAL DO FUNGO DE ORIGEM MARINHA *Peniophora* sp.CBMAI 1063

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, daUniversidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas

Orientador: Dr. Igor Vinicius Ramos Otero

Coorientadora: Profa. Dra. Lara Durães Sette

Rio Claro

2023

P126a

Paes, Eduardo César Pecora
Análise da produção de lacases e da expressão gênica diferencial do fungo de origem marinha Peniophora sp. CBMAI 1063 / Eduardo César Pecora Paes. -- Rio Claro, 2023
36 p. : tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro
Orientador: Igor Vinicius Ramos Otero
Coorientadora: Lara Durães Sette

1. Microbiologia. 2. Biorremediação. 3. Basidiomiceto. 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.

EDUARDO CÉSAR PECORA PAES

ÁNALISE DA PRODUÇÃO DE LACASES E DA EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DO FUNGO DE ORIGEM MARINHA *Peniophora* sp.CBMAI 1063

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências – Câmpus de Rio Claro, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Igor Vinicius Ramos Otero

Dra. Patrícia Giovanella

Dr. Caio Zamuner

Aprovado em: 08 de novembro de 2023

Eduardo César Pecora Paes

Eduardo César Pecora Paes
Assinatura do discente

Dr. Igor Vinicius Ramos Otero
Assinatura do orientador

Profa. Dra. Lara Durães Sette
Assinatura da coorientadora

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos meus pais por todo apoio e confiança em todos os momentos. Meu eterno agradecimento e amor.

Ao meu orientador Dr. Igor Vinícuis Ramos Otero pelo apoio, confiança e ensinamentos, dentro e fora dos laboratórios.

A minha co-orientadora Profa. Dra. Lara Durães Sette pelos ensinamentos e colaboração.

Às agências de fomento que financiaram meu projeto de pesquisa e meu trabalho. Processo 2018/12098-9, Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), pela concessão da bolsa (Projeto 1227771/2022-2).

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial pelo acolhimento e suporte com os experimentos.

Ao meu irmão Miguel por sempre deixar as piores fases mais leves.

Aos amigos, Ágata e Caio, por sempre estarem ao meu lado e pela amizade incondicional.

RESUMO

Lacases são enzimas que pertencem ao grupo das multicobre oxidases e possuem utilidade paradiversos setores industriais e para o setor ambiental, uma vez que sua aplicação biotecnológica possibilita a catálise de uma variedade de reações que oxidam compostos aromáticos e amínicos. O fungo marinho *Peniophora* sp. CBMAI 1063 é um basidiomiceto da decomposição branca (*white-rot fungi*), capaz de produzir grandes quantidades de lacase em meio otimizado para a produção dessa enzima. Em geral, basidiomicetos da decomposição branca apresentam mais de um gene codificante para lacase. Essas cópias, não alélicas, codificam diferentes lacases no âmbito estrutural e funcional. A taxa de produção de lacases por esses fungos pode apresentar grandesdiferenças dependendo da composição do meio de cultivo, presença de indutores (e.g. compostos fenólicos e cobre), concentração de carbono e nitrogênio ou da presença de xenobióticos. O fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 apresenta uma família multigênica com 17 genes codificantes para lacases potencialmente diferentes. Considerando a ausência de dados a respeito da influência de diferentes variáveis (incluindo a salinidade) na produção e no perfil de expressão gênica de um basidiomiceto marinho, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência de diferentes variáveis (e.g. concentração de sais, presença de xenobióticos, presença de indutores derivados de lignina e diferentes razões de C:N) na produção e no perfil de expressão dos 17 genes de lacase do fungo marinho *Peniophora* sp. CBMAI 1063. O fungo foi cultivado em 50 mL de meio otimizado para produção de lacase. Os frascos foram incubados a 28 ºC e 140 RPM por 7 dias. Para os experimentos com corantes, indutores e íons metálicos, a suplementação do meio foi feita após o terceiro dia de cultivo. Para os experimentos com salinidade, o meio líquido foi produzido com 1, 2, 3 e 4% de água do mar artificial. Nos experimentos que avaliaram a influência da razão C:N, alterações na quantidade dos constituintes foram feitas de modo a obter as proporções de 12:1; 6:1; 3:1; 1,5:1 e 0,75:1 de carbono e nitrogênio, respectivamente. Foram realizadas análises de biomassa, atividade enzimática e expressão gênica para cada uma das condições avaliadas (n=12). Dentra as condições testadas a razão C:N de 0,75:1 foi a que resultou em maior produção de biomassa.Já em condição com sulfato de cobre foi obtida a maior atividade enzimática, mostrando que para o fungo de origemmarinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 a produção de biomassa não está diretamente relacionada com a produção de lacase. Todas as condições testadas influenciaram positiva ou negativamente tanto atividade de lacase quanto produção de biomassa em relação a condição controle. O perfil de expressão gênica também apresentou diferenças entre as variáveis, sendo a condição com pirocatecol a que resultou em maior taxa de expressão. Os resultados deste trabalho são relevantes para a compreensão da indução de produção da enzima lacase, bem como a expressão dos genes envolvidos no processo, do fungobasidiomiceto de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063, podendo servir como base para novos estudos que buscam otimizar a produção e aplicação dessa enzima que apresenta grande potencial biotecnológico.

Palavras-chave: Basidiomiceto marinho, multicobre-oxidases, família multigênica.

ABSTRACT

Laccases are enzymes that belong to the group of multicopper oxidases and are useful for various industrial sectors and the environmental sector since their biotechnological application allows the catalysis of a variety of reactions that oxidize aromatic and amine compounds. The marine fungus *Peniophora* sp. CBMAI 1063 is a white basidiomycete (white rot fungi), capable of producing large amounts of laccase in a medium optimized for the production of this enzyme. In general,white basidiomycetes have more than one gene coding for laccase and these non-allelic copies that encodes different structural and functional cases. The rate of laccase production by these fungican show great differences depending on the composition of the culture medium, the presenceof inducers (e.g., phenolic compounds and copper), the carbon:nitrogen ratio, or the presence of xenobiotics. The fungus *Peniophora* sp. CBMAI 1063 present a multigene family with 17 genes coding for different environmental laccases. Considering the lack of data regarding the influence of different variables (including salinity) on the production and gene expression profile of a marine basidiomycete, the present work aimed to evaluate the influence of different condition for the production and expression profile in *Peniophora* sp. CBMAI 1063 (e.g. salt concentration, presence of xenobiotics, presence of lignin-derived inducers and different C:N ratios) expression profile of the 17 laccase genes of the marine fungus *Peniophora* sp. CBMAI 1063. The fungus was cultivated in 50 mL of medium optimized for laccase production. Flasks were incubated at 28 ºC and 140 RPM for 7 days. For experiments with dyes, inducers, and metal ions, the medium was supplemented after the third day of incubation. For the salinity experiments, the liquid medium was produced with 1, 2, 3 and 4% artificial seawater. In experiments that evaluated the influence of the C:N ratio, changes in the quantity of constituents were made in order to obtain proportions of 12:1; 6:1; 3:1; 1.5:1 and 0.75:1 of carbon and nitrogen, respectively. Biomass, enzymatic activity and gene expression analysis were carried out for each of the conditions evaluated (n=12). Among the conditions tested, the C:N ratio of 0.75:1 was the one that resulted in the highest biomass production. In conditions with copper sulfate, the highest enzymatic activity was obtained, showing that for the fungus of marine origin *Peniophora* sp. CBMAI 1063 biomass production is not directly related to laccase production. All conditions tested influenced laccase activity and biomass production. The gene expression profile also showed differences between the variables, with the condition of pyrocatechol resulting in the highest expression rate. The results of this work are relevant for understanding the induction of laccase enzyme production, as well as the expression of the genes involved in the process, in the basidiomycete fungus of marine origin *Peniophora* sp. CBMAI 1063, which can serveas a basis for new studies that seek to optimize the production and application of this enzyme that has great biotechnological potential.

Keywords: Marine basidiomycete, multicopper oxidases, multigene family.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 9
2. OBJETIVOS 11
    2.1 Objetivo geral 11
    2.2 Objetivos específicos 11
3. MATERIAL E MÉTODOS 12
    3.1 Basidiomiceto de origem marinha 12
    3.2 Cultivo do fungo em meio líquido: condição controle e tratamentos 12
    3.3 Análises de biomassa 13
    3.4 Atividade enzimática de lacases 13
    3.5 Extração de RNA total, quantificação e visualização da integridade 14
    3.6 Purificação do RNA e conversão em cDNA 14
    3.7 Quantificação dos genes de lacase por PCR quantitativo (qPCR) 14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 17
5. CONCLUSÕES 32
REFERÊNCIAS 34

1. INTRODUÇÃO

Desde as civilizações antigas as enzimas são utilizadas pelo ser humano para propósitosvariados, como a fermentação e a digestão química para produção de cerveja, vinho e pão (ANDUALEMA; GESSESSE, 2012). Atualmente, os conhecimentos acerca da alta especificidade e da fácil obtenção dessas proteínas favoreceram sua consolidação no mercado industrial, podendo ser utilizadas em larga escala (BRUGNARI, 2021). Ao contrário das enzimas derivadas de animais e plantas, as produzidas por microrganismos vêm ganhando espaço na bioeconomia por serem mais estáveis e terem uma maior gama de aplicações em atividades catalíticas, além da maior facilidade de obtenção (SILVA, 2013). Um exemplo dessas enzimas são as lacases, pertencentes ao grupo das multicobre oxidases,que apresentam grande potencial adaptativo para diferentes processos oxidativos. Quanto à aplicação industrial e ambiental, são capazes de catalisar muitas reações que envolvem diferentes compostos fenólicos e amínicos (RIVA, 2006). Apesar de sua ampla distribuição na natureza, essas enzimas são principalmente relatadas em fungos da chamada decomposição branca, atuando na deslignificação do material vegetal promovida por tais fungos (CHMELOVÁ et al.,2022).

A expressão de lacases por fungos de origem marinha está relacionada com o papel de decomposição da matéria orgânica, porém essas enzimas possuem características bioquímicas e genes transcritores diferentes das produzidas por fungos terrestres (BONUGLI-SANTOS et al., 2015; OTERO et al., 2017). O habitat marinho pode proporcionar lacases com maior tolerância a salinidade, presença de íons metálicos e maior termoestabilidade. Isto devido às adaptações evolutivas para o desenvolvimento dos fungos produtores ao ambiente marinho. Portanto, esses organismos se apresentam com grande potencial para o campo biotecnológico, havendo mercado para enzimas produzidas por fungos marinhos, incluindo as lacases (BONUGLI-SANTOS et al., 2015; MAINARDI et al., 2018).

O fungo basidiomiceto de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 foi isolado daesponja marinha *Amphimedon viridis* e descrito como produtor de 709 U/L de lacases em meiosalino (BONUGLI-SANTOS et al., 2010). Em adição, o fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 foi capaz de descolorir eficientemente o corante Preto Reativo 5 com concomitante produção de lacases durante o processo de descoloração (BONUGLI-SANTOS et al., 2016). Tal potenciallevou ao processo de otimização das condições

de cultivo do fungo para produção da enzima (SETTE et al., 2023). Após o processo de otimização, a produção de lacases por esse fungo em meio salino em biorreator de bancada ultrapassou 2.900 U/L (MAINARDI et al., 2018).

Especula-se que por conta da diversidade de lignina originada principalmente após o período Carbonífero e o surgimento de fungos degradadores de material vegetal (FLOUDAS etal., 2012; RENAULT; WERCKREICHHART; WENG, 2019), tenha ocorrido a irradiação adaptativa dos genes de lacase, promovendo o surgimento de famílias multigênicas codificantespara essa enzima (OTERO, 2022). Como exemplo, no fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 existem 18 genes putativos de lacase, dos quais, 17 codificam proteínas com atividade extracelular (OTERO et al., 2017; BRENELLI et al., 2019; OTERO, 2022). Análises *in silico* demonstram que tais isoformas se diferenciam quanto ao tamanho, ponto isoelétrico, taxa e sítios de glicosilação; levando a crer que essas diferenças estruturais refletem diferenças funcionais; que por sua vez derivam de atividades desempenhadas em diferentes condições ambientais que o fungo pode ser exposto (OTERO et al., 2017; OTERO, 2022). Dentre as maisde 100 lacases purificadas relatadas por Baldrian (2006), a maioria provém de basidiomicetos de decomposição branca. Diferentes famílias gênicas de lacases já foram descritas para fungosterrestres e marinhos (RIVERA-HOYOS et al., 2013; OTERO et al., 2017).

Por conta da abundância de genes codificadores de lacases, existem diversos meios de induzir sua produção e que funcionam como variáveis que podem interferir nesse processo, sendo alguns deles a proporção de carbono e nitrogênio, presença de agentes indutores como oálcool veratrílico (COVIZZI, 2007), íons metálicos como o cobre (FONSECA et al., 2010), oucompostos aromáticos como os corantes sintéticos (FONTES, 2019).

Considerando os genes de lacase do fungo marinho *Peniophora* sp. CBMAI 1063 como um valioso recurso genético ainda a ser explorado, qual isoforma seria mais apta a ambientes salinos? Qual isoforma é mais expressa na presença de derivados de lignina? Qual isoforma seria mais expressa na presença de xenobióticos? Para responder a essas perguntas, foi realizada análise de expressão gênica diferencial dos 17 genes de lacase do fungo marinho supracitado, cultivado em diferentes condições. A atividade enzimática de lacases e a produção de biomassa nessas mesmas condições também foram avaliadas, visando a obtenção do maior número de informações a respeito da regulação desses genes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo principal avaliar a influência de diferentes variáveis na produção de lacases pelo *Peniophora* sp. CBMAI 1063, bem como avaliara influência dessas condições no perfil de expressão dos 17 genes que codificam essas enzimas(com atividade extracelular).

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influência de diferentes indutores, íons metálicos, razão C:N, presença de xenobióticos e salinidade na produção de lacases e de biomassa pelo fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063;
- Extrair o RNA total do fungo cultivado em todas as condições mencionadas ecriarbibliotecas de cDNA para posterior quantificação;
- Quantificar o nível de expressão dos 17 genes de lacase do fungo *Peniophora* sp.CBMAI 1063 em cada uma das condições avaliadas.
- Identificar os genes mais expressos em condições de cultivo de interesse biotecnológico (presença de derivados de lignina e xenobióticos).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Basidiomiceto de origem marinha

O fungo de origem marinha *Peniophora* sp. isolado e identificado pelo grupo de pesquisa da Profa. Lara Sette, encontra-se depositado na Coleção Brasileira de Microrganismos do Ambiente e Indústria (CBMAI) sob o acrônimo CBMAI 1063 e também na Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP) sob o acrônimo CRM 1241. O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial, que é associado a CRM-UNESP. A partir de um tubo de preservação em Castellani, o fungo foi reativado em placas contendo ágar malte 2% (MA 2%), a 28 ˚C por 7 dias. Após esse período de incubação, o micélio em pleno crescimento foi utilizado como inóculo nos experimentos de cultivo em meio líquido.

3.2 Cultivo do fungo em meio líquido: condição controle e tratamentos

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio para cada condição. Para os experimentos de cultivo na condição controle, bem como na presença de indutores, corantes e íons metálicos o meio de cultivo foi constituído de 0,2% de extrato de levedura, 0,27% de peptona bacteriológica de caseína, 0,14% de extrato de malte, 0,27%, de glicose, 0,06% de fosfato de potássio monobásico e 0,04% de fosfato de potássio bibásico, com pH inicial entre 6.1 e 6.3, dissolvidos em água destilada. Para o experimento de razão C:N foram utilizadas as concentrações descritas na tabela 1.

Tabela 1. Proporções de C:N que foram avaliadas e as respectivas quantidades de cada componente do meio de cultivo.

	Proporção de C:N				
Meio ou Reagente	12:1	6:1	3:1	1,5:1	0,75:1
Extrato de levedura	0,10%	0,20%	0,40%	0,80%	1,60%
Peptona	0,13%	0,27%	0,54%	1,08%	2,16%
D-glicose	0,27%	0,27%	0,27%	0,27%	0,27%
Extrato de Malte	0,14%	0,14%	0,14%	0,14%	0,14%
Fosfato de potássio monobáscio	0,06%	0,06%	0,06%	0,06%	0,06%
Fosfato de potássio bibásico	0,04%	0,04%	0,04%	0,04%	0,04%

Para os ensaios de salinidade, os meios foram preparados em 1, 2, 3 e 4% de água do mar artificial (ASW), adaptada de Bonugli-Santos et al. (2016), cuja composição é: 1,061 % de $MgCl_2$, 0,147 % de $CaCl_2$, 0,004 % de $SrCl_2$, 2,348 % de NaCl, 0,392 %, de

Na_2SO_4 0,066% de KCl, 0,019 % de $NaHCO_3$, 0,01 % de KBr e 0,003 % de H_3BO_3

Os indutores derivados de lignina utilizados foram: siringaldeído, pirocatecol, ácido p- cumárico, álcool veratrílico e guaiacol. Os íons metálicos utilizados foram o cobre ($CuSO_4$) e o zinco ($ZnSO_4$). Quanto aos xenobióticos foram utilizados os corantes Vermelho Congo (VC), Preto reativo 5 (PR5) e Azul Brilhante de Remazol R (RBBR). A concentração final dos íons metálicos foi 1 mM, a dos indutores foi 0,5 mM e a dos corantes foi de 50 mg/L. As soluções estoques dos íons metálicos, indutores e corantes foram previamente filtradas em filtro de seringa 0,22 μm e acomodadas em frascos estéreis e refrigerados até a utilização.

A partir das placas de reativação com o cultivo do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063,3 plugs (ágar + micélio) de 10 mm de diâmetro foram retirados e transferidos para os frascos contendo meio líquido. Os frascos ficaram incubados a 28 ˚C, 140 RPM por 7 dias. Para os experimentos comas variáveis indutores, corantes e íons metálicos, os suplementos foram adicionados após o terceiro dia de cultivo, nas concentrações anteriormente mencionadas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, com pelo menos dois experimentos independentes.

3.3 Análises de biomassa

Os cultivos descritos anteriormente foram transferidos para tubos de polipropileno com fundo cônico (Falcon) de 50 ml e centrifugados a 12.000 RPM por 10 min a 4 ˚C. Coma separação da biomassa e sobrenadante, duas alíquotas de 1 ml de cada Falcon foram separadas para posterior quantificação enzimática. A biomassa foi então filtrada em papel filtro qualitativo com o auxílio de bomba a vácuo.

A análise da biomassa foi realizada em papel filtro qualitativo com diâmetro de 9 cm, previamente seco em estufa. A biomassa, por sua vez, foi seca em estufa a 92 ˚C por 24 ou 48h,até a desidratação completa. Para o cálculo da biomassa foi descontada a massa do filtro seco.

3.4 Atividade enzimática de lacases

As análises de atividade enzimática foram realizadas em placas de 96 poços, lidas em leitor espectrofotômetro UV/VIS Synergy H1 da marca BioTek. 2,2’-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) foi utilizado como substrato enzimático para detectar aatividade oxidativa da enzima. Em cada poço foram adicionados 0,18 mL da

mistura contendo0,1 M de tampão acetato de sódio (pH 5), 0,5 mM de ABTS e 0,02 mL do caldo enzimático aliquotado anteriormente (totalizando 0,2 mL de meio reacional). A quantificação da atividadeenzimática das lacases foi realizada por meio da oxidação do ABTS utilizando o comprimentode onda de 420 nm, após 20 min de reação. Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 nmol de ABTS por minuto (FONTES et al., 2021)

3.5 Extração de RNA total, quantificação e visualização da integridade

A partir da biomassa obtida nos experimentos de cultivo em meio líquido, o RNA totaldo fungo foi extraído utilizando o kit RNeasyPlant Mini Kit (QUIAGEN), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Inicialmente, a biomassa foi lavada com água ultrapura, estéril, contendo Dietilpirocarbonato (DEPC), visando a remoção de possíveis endonucleases da superfície do micélio. A lise celular foi feita em nitrogênio líquido, com o auxílio de almofariz e pistilo previamente preparados para a extração (OTERO, 2016). A quantificação das extrações foi feita utilizando o espectrofotômetro para ácidos nucleicos NanoDrop (Thermofisher Scientific). A visualização da integridade e presença de DNA nasamostras foi feita utilizando gel de agarose a 0,7 % em cuba de eletroforese pequena para oito poços, após corrida a 90 v por 45 min.

3.6 Purificação do RNA e conversão em cDNA

Para a purificação do RNA foram adicionados 4 µl de tampão de DNAse (10X com $MgCl_2$) e 1 µl de DNAse (livre de RNAse) (ThermoFisher Scientific) em cada 40 µL de amostra. Em seguida, as reações foram mantidas por 35 min a 37 ˚C para reação da DNAse. Após essa etapa, foram adicionados 2 µl de EDTA (50 mM) em cada amostra, as quais foram mantidas por 10 min a 75 ˚C para a inativação da DNAse. Oligo DT_{18} foi utilizado como iniciador (*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. O cDNA proveniente de cada condição de cultivo foi considerado como uma biblioteca de transcritos diferente. Ao todo, foram obtidas 17 bibliotecas.

3.7 Quantificação dos genes de lacase por PCR quantitativo (qPCR)

Para a análise da expressão gênica diferencial dos genes de lacase do fungo

marinho *Peniophora* sp. CBMAI 1063, foi realizada a qPCR a partir das bibliotecas de cDNA (item 3.6).*Primers* específicos para todos os 18 genes de lacase do fungo marinho, bem como três genes para controle e normalização da expressão (*Cyt-c*, *β-tubulin* e *GAPDH*) (tabela 2) previamentedesenhados por Otero (2022), foram utilizados no presente trabalho.

Tabela 2. *Primers* específicos desenhados para as lacases e genes controle do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063.

Nome	Primer	Sequencia	Tamanho do amplicon	GC%
Lcc1	Lcc1_F	CTTTGGCGTCGAGGCTCTGGCA	109	58,7
	Lcc1_R	CGCTCCATTTACGAGGGAAGC		
Lcc2	Lcc2_F	CTCGCTCGGCATCCCTTGTC	111	54,1
	Lcc2_R	CAAGGGTGGTATCGTCGAGGTTA		
Lcc3B	Lcc3B_F	CGAGTCCCTCGCTGCCGTGGTGCA	106	53,8
	Lcc3B_R	GATCTCTTGGCCGTTAATAAGA		
Lcc4	Lcc4_F	CCAATTTCCAGGCCCGGTTATCACA	106	51,9
	Lcc4_R	ATGTAGCGTAGTGACGGTGTG		
Lcc5	Lcc5_F	CCTACTCCAGTTGGCGCTGTTA	105	54,6
	Lcc5_R	GCAGGTCGGTAGTACCCGTCG		
Lcc6	Lcc6_F	CACCAAATCAGCCACTCTTGTC	111	51,4
	Lcc6_R	CCGTTCGATTGGGTCAAGC		
Lcc7	Lcc7_F	CTTTGGGCTTGTCTTTGTCTG	103	50,5
	Lcc7_R	CGAGAGAGACGTTGCGGTTGAC		
Lcc8	Lcc8_F	GTACATGCGAGACACCGTCGTCGTC	100	59
	Lcc8_R	GTCCGTAAGAGCGTCGAAGAC		
Pnh_Lac1	Pnh_Lac1_F	CTGAGCAGGAGCTCCGTCCTCG	114	63,2
	Pnh_Lac1_R	CATTGTGGTGTCGGTGAGGC		
Pnh_Lac2	Pnh_Lac2_F	GCGGGACACTGTCGTTGTGAAC	110	57,3
	Pnh_Lac2_R	CGAGACTCTTGTCAGTGAG		
Pnh_Lac3	Pnh_Lac3_F	GTCTCTCCGGTTTGCACTTG	102	60,8
	Pnh_Lac3_R	GGATTCACGTCCTCGACGAAG		
Pnh_Lac5	Pnh_Lac5_F	CAAGCGAATCGGAACCTTGGTC	110	53,6
	Pnh_Lac5_R	GCTGGTCGTATGTGAGGTTGTCG		
Pnh_Lac6	Pnh_Lac6_F	CGCATGACACCATCGTAGTGA	107	47,7
	Pnh_Lac6_R	GTCTGTATCTGAGAGAAGATTC		
Pnh_Lac7	Pnh_Lac7_F	CGGTGTCACTGTCAATGGTC	101	54,5
	Pnh_Lac7_R	GAGACTCGTCTTTCAAGTCG		
Pnh_Lac8	Pnh_Lac8_F	GAGACACGACGGTCGTCAATG	100	52
	Pnh_Lac8_R	CCGTCCGTCAGAGCATCGAC		
Pnh_Lac9	Pnh_Lac9_F	CGGTCCTGTCATTACTGGAAACAAG	99	51,5
	Pnh_Lac9_R	CAGTGGACGGCGGTCACAAGGT		
Pnh_Lac10	Pnh_Lac10_F	CCTTTCTTGCCTCGACGCTTC	119	47,9

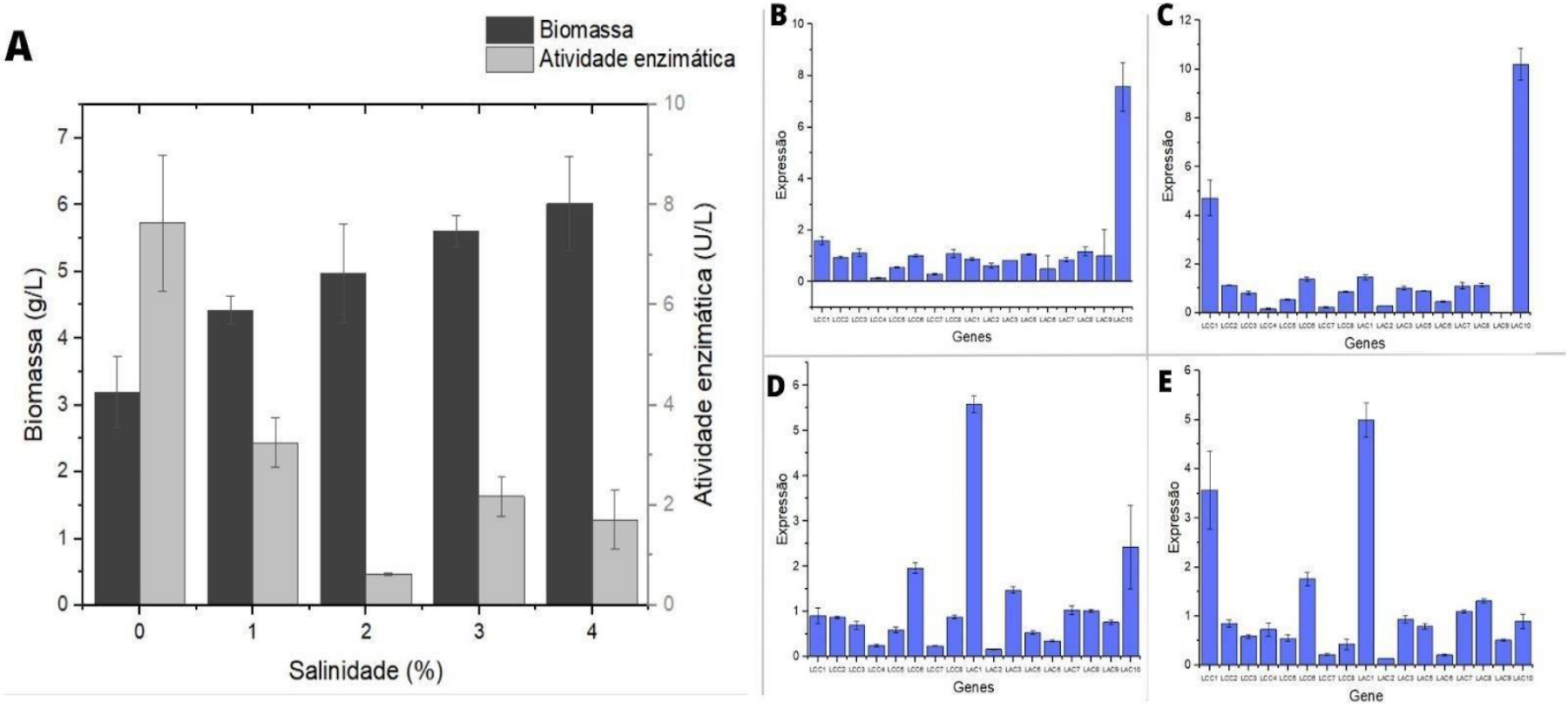
	Pnh_Lac10_R	GAGGCGCGAGAATCCATCGAGA		
B-tubulina	B-tubulin_F	CTCGCGCGGTTCTCGTCGATC	132	63,6
	B-tubulin_R	GTCCTTTCGCCCAGTTGTTAC		
Cyt-c	Cyt-c_F	GATTGGAATTATCAGCTCCAG	160	33,8
	Cyt-c_R	GCTCCTACTTGTAATGGTAAG		
GAPDH	GAPDH_F	GTTCGTCGTCGGCGTTAACCTC	112	60,7
	GAPDH_R	CTTGTCGTGGACGGCCTTGGCG		

As reações de qPCR foram realizadas no equipamento QuantStudio 3 (Life Technologies, USA) de acordo com protocolo descrito previamente por Otero (2022). Cadareação foi constituída de 5 ng de cDNA, 0,4 µL de cada *primer* (10 µM), 10 µL de SYBR Green qPCR Master Mix (ThermoFisher) e H_2O para um volume final de 20 µL. A amplificação foi realizada da seguinte forma: uma etapa inicial de desnaturação a 94 ˚C por 2 min, seguida de 40 ciclos de 94 ˚C por 30 s, 60 ˚C por 30 s e 72 ˚C por 30 s. Após a amplificação, foram realizadas análises de curva de *melting*, de 70 ˚C a 95 ˚C com rampa de1 ˚C/s, visando avaliar a especificidade dos *primers*. Todas as reações foram feitas em triplicata técnica e o controle negativo (NTC) foi aquele contendo água e Master Mix, mas sem cDNA. A expressão gênica relativa das lacases expressas em cada condição de cultivo foi quantificada através da fórmula$2^{-\Delta\Delta Ct}$ (YANG et al., 2016).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fungo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 foi submetida a diferentes condições de cultivo para avaliar o crescimento de biomassa e a produção de lacases sob a influência de diferentes variáveis. No ensaio de salinidade o fungo marinho apresentou maior produção de biomassa no cultivo com 4% de água do mar artificial (6,02 g/L),diminuindo conforme a redução da salinidade, sendo que na condição controle (sem salinidade) a média de biomassa foi de 3,2 g/L (Figura 1A). Em relação a atividade enzimática pode-se ver uma inversão dos resultados, sendo o cultivo com 0% o que mais produziu lacases (7,64 U/L) e o com 4% o que menos produziu (1,71 U/L). Dessa forma, o experimento demonstra que salinidades maiores proporcionam maior crescimento de biomassa provavelmente por conta das condições do habitat natural do fungo de origem marinha, porém a produção de lacases nas condições de salinidade testadas diminuíram com o aumento da salinidade. Em estudo realizado por Bonugli-Santos et al. (2010), o fungo marinho *Peniophora* sp. CBMAI 1063 foi cultivado em meio 2% de caldo extrato de malte, suplementado com água do mar artificial (4%) (v/v). Os autores do referido estudo obtiveram uma produção de aproximadamente 410 U/L de lacases na condição salina, após 7 dias de cultivo (BONUGLI-SANTOS et al., 2010). Em nosso trabalho o fungo marinho *Peniophora* sp. CBMAI 1063 apresentou aumento da taxa de crescimento fúngico com o aumento de salinidade no meio, porém obteve atividade enzimática reduzida conforme o aumento de salinidade, ponto este que entra em discordância com o trabalho de Bonugli-Santos et al. (2010), visto que no trabalho mencionado, a produção de lacases pelo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 no meio de cultivo contendo 2% (v/v) de extrato de malte 4% (v/v) de água do mar artificial (BONUGLI-SANTOS et al., 2010), foi superior a produção de lacases no meio utilizado em nosso trabalho. Os autores ainda ressaltam a importância da salinidade para a boa expressão de lacases pelo basidiomiceto marinho (BONUGLI-SANTOS et al., 2010). Dessa forma, fica evidenciado que a composição do meio de cultivo e a salinidade são variáveis que influenciam na produção da enzima de maneira conjunta. Ou seja, a depender do meio de cultivo, a salinidade pode ser favorável ou não para uma melhor taxa de produção de lacases.

Figura 1. Atividade enzimática de lacases, produção de biomassa e expressão gênica na condição controle e nas condições com salinidade. A - Ensaio de produção de biomassa e atividade enzimática em diferentes salinidades. B - Expressão gênica relativa na condição 1% de água do mar artificial. C - Expressãogênica relativa na condição 2% de água do mar artificial. D - Expressão gênica na condição 3% de água do mar artificial. E - Expressão gênica na condição 4%de água do marartificial.

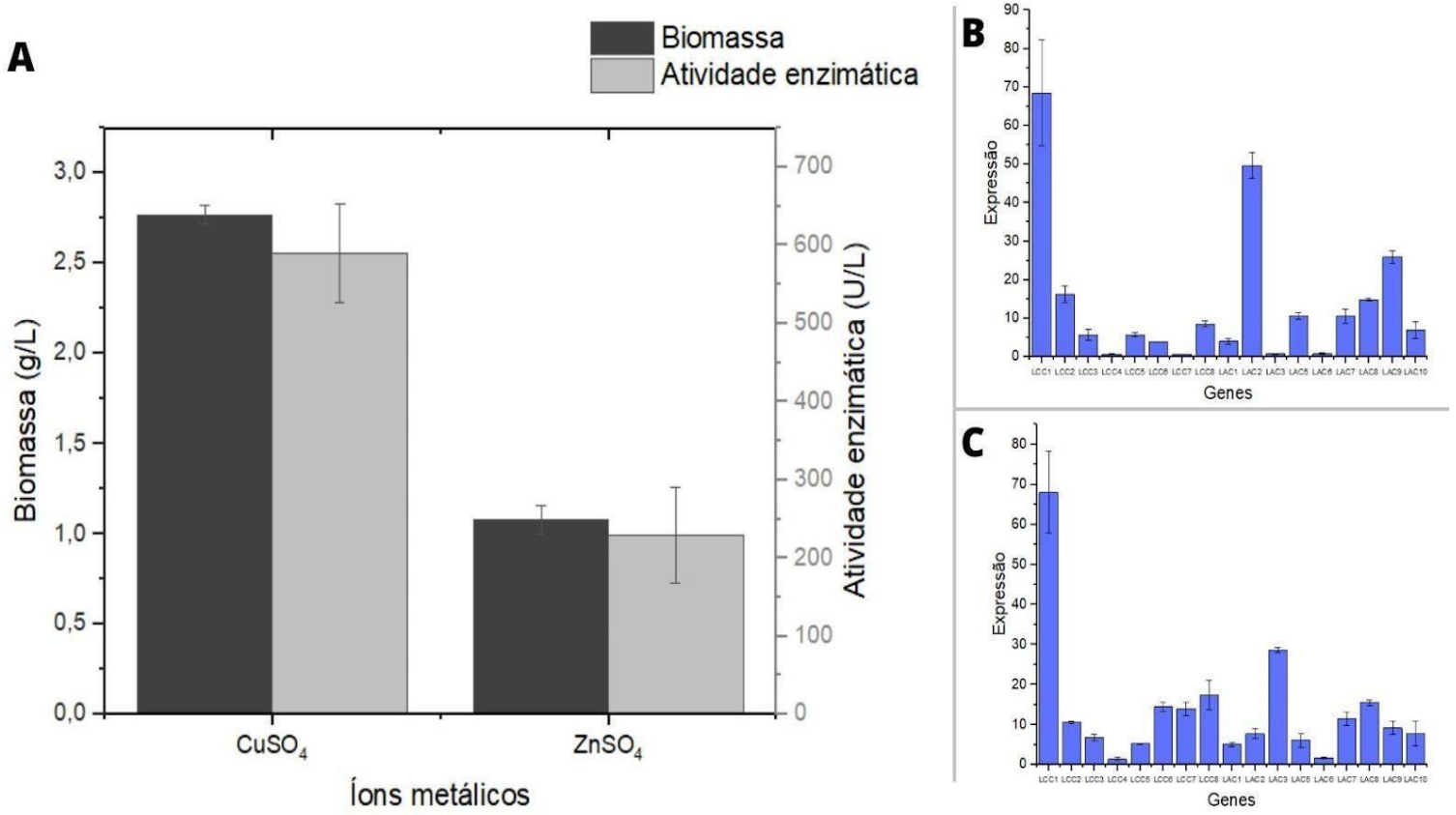


Em relação a expressão gênica, pode-se ver que nos cultivos com 1 e 2% (Figuras 1B e 1C)o gene de lacase mais expresso pelo fungo foi o Lac10 (com 7,56 e 10,2 vezes mais expresso do que a condição controle, respectivamente), já nas condições 3 e 4% (Figuras 1D e 1E) o gene mais expresso foi o Lac1 (5,58 e 4,99 vezes mais expressão do que a condição controle, respectivamente). Os mecanismos que regulam a expressão de lacases na presença desalinidadenão são claros (LI et al., 2018; LI et al., 2020) e ainda não existem estudos publicados que tenham explorado a expressão gênica diferencial de lacases em função da salinidade em microrganismos. Lacases foram inicialmente descritas há mais de 100 anos como parte constituinte da resina da planta *Rhus vernicifera* (YOSHIDA et al., 1883), e ultimamente lacases vegetais têm despertado grande interesse biotecnológico. Ao investigara expressão gênica diferencial dos 30 genes de lacase da planta de arroz (*Oryza sativa* spp. *japonica*), Liu et al. (2018) encontraram algo semelhante aos resultados do nosso estudo. Enquanto a salinidade estimula a expressão de alguns genes de lacase de *O. sativa*, a variável reprime a expressão de outros. Tanto em plantas de arroz, como de *Arabidopsis thaliana* (planta modelo), genes de lacase superexpressos parecem estar envolvidos na resistência ao estresse celular promovida pelo excesso de sais no meio (LIU et al., 2018; TURLAPATI et al., 2011), elementos responsivos a salinidade já foram descritos para a planta halófita *Suaeda fruticosa* (MYB, CAMTA, MADS-box and bZIP) (DIRAY-ARCE et al., 2019). Portanto, é possível que os genes de lacase do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 também apresentem algum tipo de regulação responsiva ao sal, porém mais estudos precisam ser conduzidos nesse sentido para a elucidação dessa hipótese.

Os cultivos do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 em condição salina na presença dosíons metálicos Cu^{2+} e Zn^{2+} foram os que mais apresentaram atividade de lacases, tendo como resultado 589 U/L e 229 U/L, respectivamente (Figura 2A), ainda que o crescimento de biomassa não tenha apresentadovalores tão expressivos (2,77 g/L e 1,08 g/L), quanto na presença de 4% de água do mar artificial. No estudo de Vasina et al. (2015), que utilizou o fungo de decomposição branca *Trametes hirsuta* 072 foram montados dois cultivos, um coma presença de íons de cobre e outro sem. Na presença de íons de cobre o fungo foi capaz de produzir 27 vezes mais lacases do que na ausência desses íons já no terceiro dia de incubação, indicando a elevada atividade desse íon como indutor na produção da enzima. Outro estudo, realizado por Yang et al (2015), utilizou o fungo de podridão branca *Cerrena* sp. HYB07 e teve como resultado a produção de 280.000U/L de lacases em meio contendo Cu^{2+} e Zn^{2+}. Nesse mesmo estudo, a atividade enzimática

foi reduzida em 31,78% no meio sem a adição de íons de zinco e em 99,95% em meio sem adição de íons de cobre (YANG et al., 2015). Nonosso trabalho, os resultados da expressão gênica de lacase em cultivo suplementado tanto com íons de cobre quanto de zinco (Figuras 2B e 2C) o gene mais expressofoi o Lcc1, sendo 68,45 vezes mais expresso quando na presença de íons de cobre e 68 vezes mais expresso, na presença de íons de zinco. Em estudo de Yang et al. (2016), utilizando o fungo basidiomicetode decomposição branca *Cerrena* sp., o gene de lacase mais expresso emmeio suplementado com íons de cobre foi o Lac7, sendo que na condição em que os íons não foram adicionados a expressão do Lac7 reduziu em 1000 vezes. Na presença de íons de zinco, o gene de lacase mais expresso pelo fungo *Cerrena* sp. também foi o Lac 7, diminuindo em cerca de 50% sua expressão na condição de cultivo sem esses íons. Era esperado que os íons de cobre fossem bons indutores da expressão gênica de lacases, isso porque as lacases são enzimas multicobreoxidases, e portanto possuem cobre em sua estrutura. Para a atividade catalítica da enzima é necessário a presença de quatro íons de cobre no sítio ativo da enzima, formando dois *clusters*, um mononuclear responsável pela oxidação inicial dos substratos e um aglomerado trinuclear ondeocorre a redução do oxigênio e formação da água (subproduto da reação enzimática) (CLAUS,2004). As lacases são frequentemente induzidas por diversos fatores fisiológicos em fungos, portanto, sua região promotora pode conter elementos que são responsáveis por responder estímulos de diferentes indutores (JANUSZ et al., 2013), sendo um desses elementos o chamado elemento responsivo de metal (MRE do inglês *metal response elements*), essencial para a transcrição induzida por íons metálicos. Portanto, nossos resultados indicam que o fungomarinho *Peniophora* sp. CBMAI 1063 possui mecanismos para responder a presença de íons metálicos no meio, muito provavelmente por conta da presença de MREs em sua região promotora.

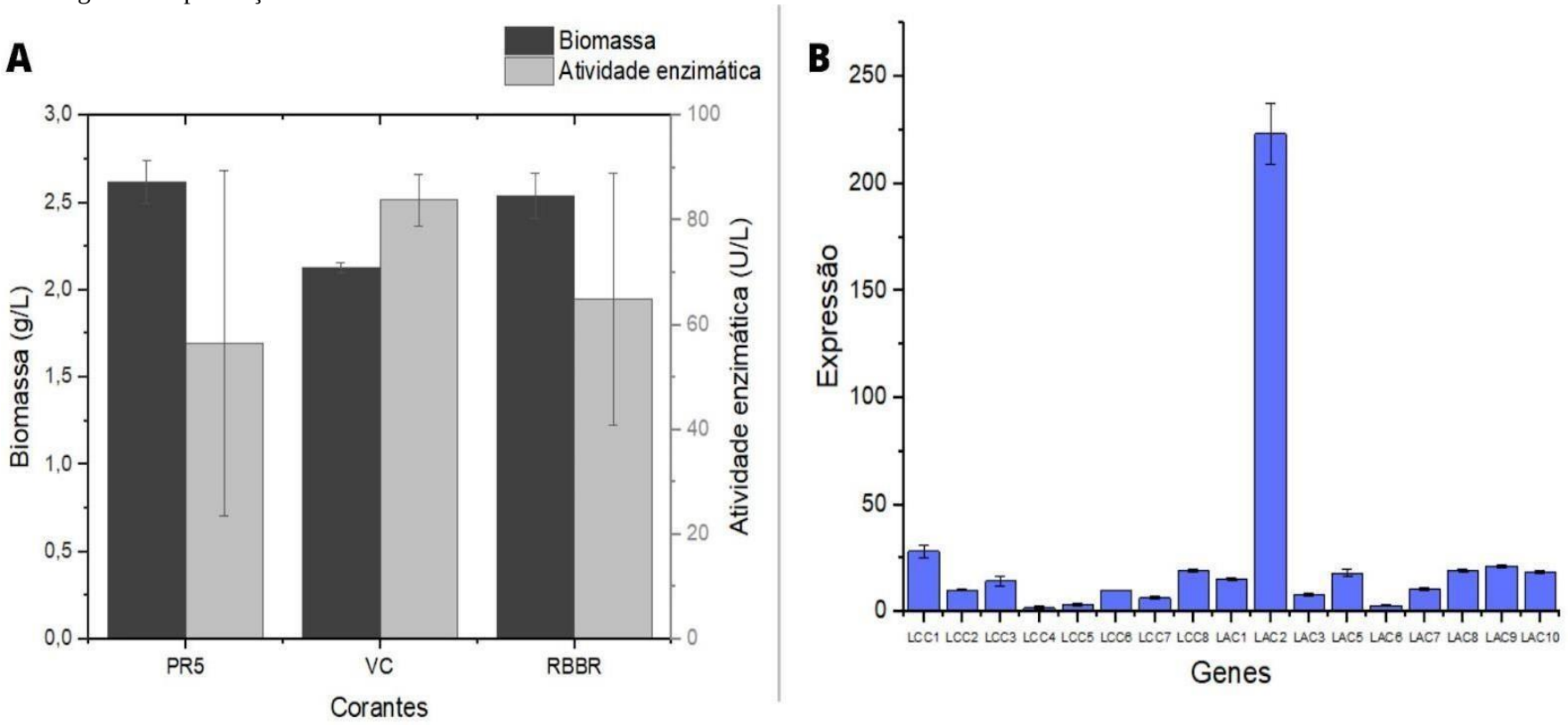
Figura 2. Atividade enzimática de lacases, produção de biomassa e expressão gênica na presença de íons metálicos. A - Ensaio de produção de biomassae atividade enzimática na influência dos íons metálicos Cu^{2+} e Zn^{2+}. B - Expressão gênica na presença de Cu^{2+}. C - Expressão gênica na presença de Zn^{2+}.



Nos experimentos realizados com cultivo do fungo marinho *Peniophora* sp. CBMAI 1063na presença de xenobióticos (corantes sintéticos), os resultados para crescimento de biomassa não foram expressivos comparados a outras condições testadas, indicando que a toxicidade dos corantes sintéticos pode ter influenciadonegativamente no crescimento do fungo. Em meio com o corante Vermelho congo a média de biomassa foi de 2,13 g/L; para o meio com RBBR de 2,54 g/L e para o Preto reativo 5 de 2,62 g/L. Atualmente, os corantes sintéticos são os mais utilizados na indústria têxtil por serem mais econômicos e terem grandevariedade de cores, portanto os corantes sintéticos são os principaispoluentes de efluentes têxteis (ROSSI et al., 2017). Grande parte dos corantes sintéticos utilizados na indústria têxtil,apresentam estrutura complexa, de difícil degradação e elevada toxicidade, variando de acordo com a composição química do grupo cromóforo e das diferentessubstituições no núcleoaromático, fornecendo compostos com estruturas diversas e versáteis, o que os torna recalcitrantes e com elevada toxicidade (KHAN et al. 2012). Alguns corantes sintéticos apresentam riscos para vários organismos aquáticos, plantas, peixes e microrganismos, além de também causar distúrbios à saúde humana ao ocasionar danos a órgãos humanos (BONUGLI-SANTOS et al., 2016; GIOVANELLA et al., 2020). Em relação a atividade de lacases, o meio com Vermelho Congo foi o que apresentou o maior produção (83,8 U/L), seguido do RBBR (64,97 U/L), e por último o meio contendo o corante Preto reativo5 (56,49 U/L). Em todos os casos a presença dos corantes pareceu induzir a produção de lacases,vistoque na condição controle (sem corantes) a produção foi de 7,64 U/L. A produção de lacases na presença de corantes sintéticos não é um fenômeno exclusivo do fungo *Peniophora*sp. CBMAI 1063, em estudo realizado por Garrido-Bazán et al (2016), o fungo *Pleurotus ostreatus* em meio de cultivo suplementado com RBBR (500 ppm) teve o pico de atividade delacases em 452.000 U/L. Outro estudo, realizado por Sharma et al (2023), mostrou que o fungode podridão branca *Trametes flavida* WTFP2 foi capaz de produzir cerca de 360.000 U/L de lacase após 24h de cultivo do fungo na presença de 100 mg/L de Vermelho Congo. Adnan et al. (2015), demonstraram em estudo que o fungo ascomiceto *Trichoderma atroviridae* F03 emmeio otimizado suplementado com o corante Preto reativo 5 teve o pico de atividade enzimáticaem 5.800 U/L, no quarto dia de incubação. Sabe-se que as enzimas ligninolíticas possuem grande capacidade de degradar compostos aromáticos, demonstrando alta eficiência na descoloração de corantes sintéticos (GIOVANELLA et al., 2020). Considerando que o fungo marinho *Peniophora* sp. CBMAI 1063 apresentou aumento na produção de lacases em meio suplementado com

corantes sintéticos mesmo não precisando recorrer ao xenobiótico como fontede macro e/ou micronutrientes, é possível que o fungo tenha produzido lacases como um mecanismo de degradar os xenobióticos e combater a toxicidade do meio gerada pelos corantes sintéticos.

Figura 3. Atividade enzimática de lacases, produção de biomassa e expressão gênica na presença de corantes sintéticos. A - Ensaio de produção de biomassa eatividade enzimática na presença dos corantes Preto reativo 5 (PR5), Vermelho congo (VC) e Azul brilhante de remazol R (RBBR). B - Expressão gênica na presença do PR5.

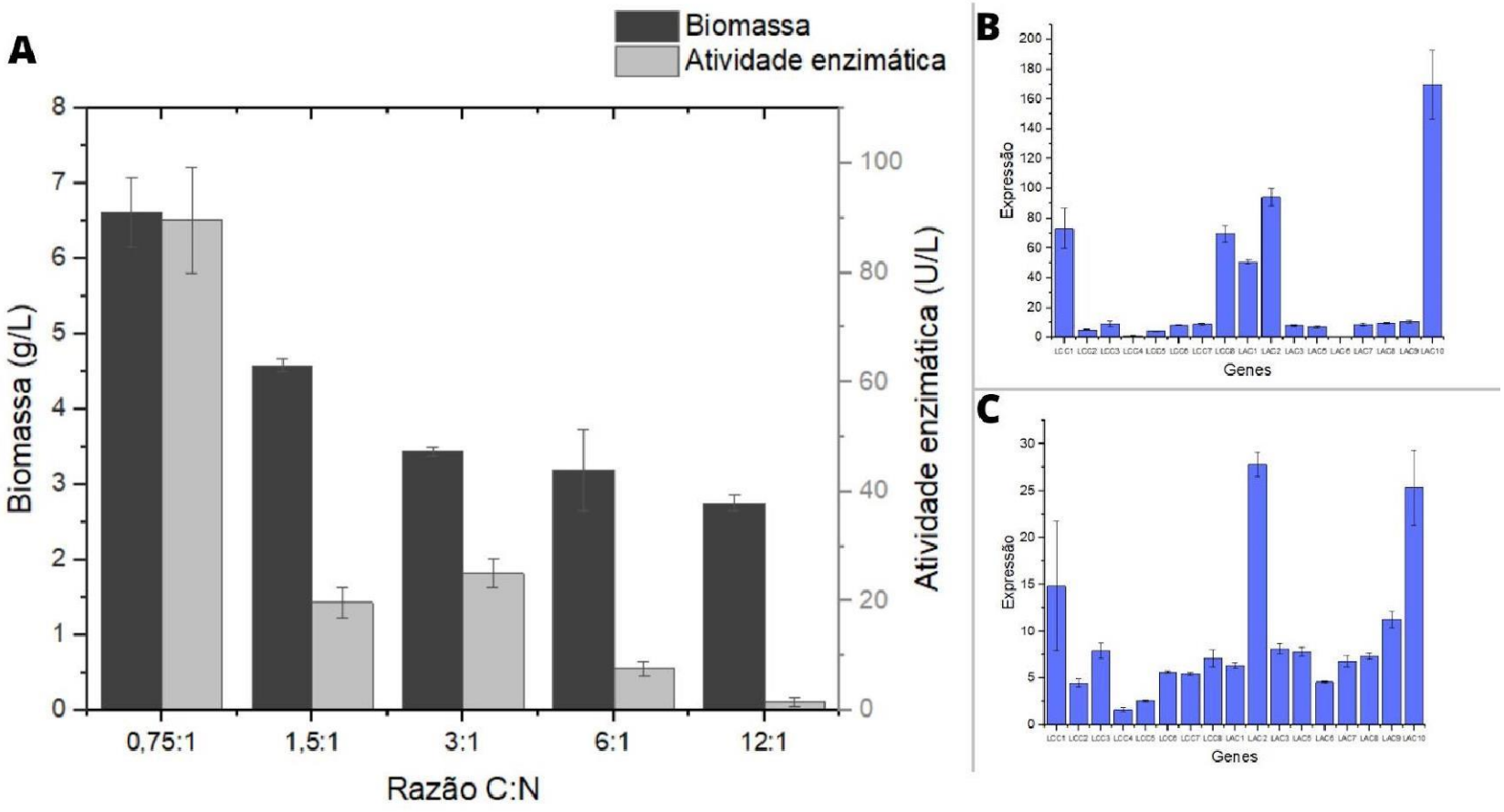


Quanto à expressão gênica de lacases na presença dos corantes, não foi possível apresentar os resultados na condição de cultivo com o RBBR e o Vermelho Congo, isso porque a taxa de expressão desses genes na presença desses corantes foi muito baixa, o que provavelmente facilitou a formação de dímeros dos *primers* específicos utilizados para cadagene e por conseguinte a maioria dos genes apresentou duas ou mais temperaturas de *melting*, quando o correto é apresentar apenas uma. Outra justificativa possível é a presença de inibidoresde PCR nas bibliotecas de cDNA (dados não apresentados), o que também pode terfavorecido nos erros do experimento. Como os dados obtidos não foram confiáveis, decidimos apresentar apenas os resultados para Preto Reativo 5, condição em que a quantificação da expressão gênicafuncionou como nas outras condições apresentadas no presente trabalho. O fungo marinho *Peniophora* sp. CBMAI 1063 em meio de cultivo com ocorante sintético Preto reativo 5 (Figura3B) teve como gene mais expresso o Lac2 (223,36 vezes mais expresso). É possível que o geneLac2 possua em sua região promotora o elemento de resposta à presença de xenobióticos (XRE - do inglês *Xenobiotic Response Elements*); esses elementos são induzidos pela presença de compostos aromáticos e fenólicos, visando a expressão de enzimas que desempenham função defensiva contra o estresse oxidativo proporcionado por radicais de oxigênio originados da reação desses compostos (PISCITELLIet al., 2011). Em estudo realizado por Bonugli-Santoset al. (2016) o fungo de origem marinha*Peniophora* sp. CBMAI 1063 foi cultivado em meio contendo extrato de malte e farelo de trigo, com salinidade de 1,2 %, suplementado com 200 mg/L de corante sintético Preto reativo 5 durante sete dias; a expressão gênica da lacase no meio foi obtida desde o primeirodia de cultivo, no entanto sua atividade extracelular teve início apenas após o quinto dia de cultivo, enquanto que a enzima ligninolítica Manganês peroxidase (também avaliada no estudo) teve pico de atividade enzimática e expressão gênica entre o segundo e o quinto dia, período em que houve a maior taxa de descoloração, levando a crer quea lacase esteja menosenvolvida no processo de descoloração, mesmo tendo genes de lacases expressos desde o primeiro dia (BONUGLI-SANTOS et al., 2016). Dessa forma é possível que a regulação daprodução de lacases pelo fungo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063, em meio contendo xenobióticos, pode ocorrer não só a nível transcricional, como também traducional. De acordo com Buccitelli e Selbach (2020), não é porque existem genes expressos que necessariamente haverá proteínas correspondentes.

Nos experimentos que envolveram o cultivo do *Peniophora* sp. CBMAI 1063 em meioscom diferentes razões de carbono e nitrogênio foram os que apresentaram a

maior média de biomassa produzida, sendo os resultados 6,62 g/L (0,75:1), 4,58 g/L (1,5:1), 3,44 g/L (3:1), e 2,75 (12:1) (Figura 4A), indicando que a condição que mais favorece a formaçãode biomassa fúngica é a em que a proporção de nitrogênio é maior em relação ao carbono. Onitrogênio desempenha papel fundamental no crescimento fúngico e na atividade enzimática, sendo que geralmente fontes inorgânicas de nitrogênio fornecem menor atividade de lacases do que fontes orgânicas (PISCITELLI et al.,2011). A maior concentração de nitrogênio em relação ao carbono (0,75:1), também foi a condição onde houve maior produção de lacases (89,63 U/L); em contrapartida, no meio coma maior razão C:N (12:1), obtivemos a menor produção de lacases (1,53 U/L) (Figura 4A). Dados da literatura demonstram que o substratoutilizado como fonte de nitrogênio, bem comosua concentração no meio, influenciam a atividade de enzimas ligninolíticas de fungos basidiomicetos (MIKIASHVILI et al., 2005). Em estudo realizado por Yang et al. (2015), o fungo de decomposição branca *Cerrena* sp. foicultivado em diferentes concentrações de carbono e nitrogênio. Nesse estudo, os cultivos que tinham altas concentrações de nitrogênio ecarbono resultaram em mais lacases (280.000 U/L) do que os cultivos que tinham baixa concentração de nitrogênio (5.300 U/L), independentemente da concentração de carbono, além disso, o experimento com alta concentração de nitrogênio e baixa de carbono produziu 91.000U/L da enzima.

Figura 4. Atividade enzimática de lacases, produção de biomassa e expressão gênica em diferentes razões de C:N. A - Ensaio de produção de biomassa eatividade enzimática nas razões 0,75:1; 1,5:1; 3:1; 6:1 e 12:1. B - Expressão gênica na condição 0,75:1. C - Expressão gênica na condição 12:1.

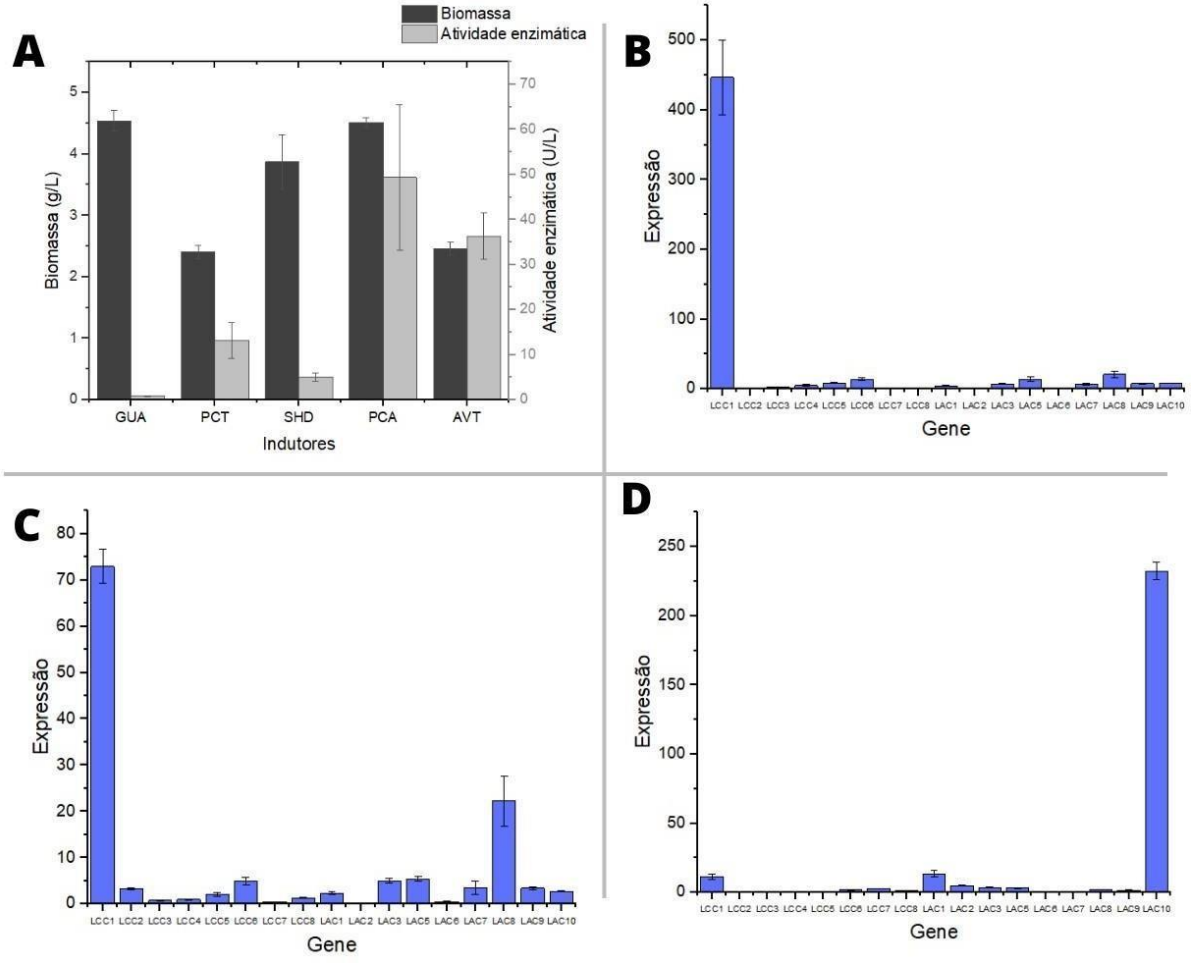


No cultivo com razão 0,75:1 o gene de lacase mais expresso foi o Lac10 (169,77 vezes mais expresso do que na condição controle), com alta expressão também dos genes Lcc1 (73,14vezes mais expresso) e Lac2 (94,24 vezes mais expresso) (Figura 4B). Já na condição 12:1 o gene de lacase mais expresso foi o Lac2 (27,79 vezes mais expresso do que na condição controle) (Figura 4C). No trabalho de Yang et al. (2016), a condição com alta concentração denitrogênio e baixa de carbono, o gene Lac2 do basidiomiceto *Cerrena* sp. foio mais expresso (117,5 vezes mais expresso); já a condição com baixa concentração de nitrogênio e alta de carbono favoreceu a expressão do gene Lac4 (86 vezes mais expresso). Nitrogênio é um macronutriente essencial para a síntese de proteínas. Tanto genes estruturais (*housekeeping*) quanto genes envolvidos no metabolismo secundário de fungos, podem estarsujeitos a regulação por nitrogênio (Tudzynski, 2014). Em condições onde há limitação de nitrogênio, elementos responsivos a esse elemento tendem a restringir a síntese de proteínas e enzimas envolvidas no metabolismo secundário (Tudzynski, 2014), lacases são enzimas ligninolíticas que até poderiam ser consideradas como pertencentes a vias do metabolismo primário, para a obtenção de carbono (lignina e seus derivados são compostos ricos em carbono), mas não de nitrogênio (lignina não é um composto nitrogenado). Dessa forma, é possível que na ausência de outros estímulos externos, a expressão e síntese de lacases pelo fungo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 fique estritamente condicionada a abundância de nitrogênio no meio.

Em relação à presença de derivados de lignina no meio de cultivo, o guaiacol foi o quemais proporcionou formação de biomassa do *Peniophora* sp. CBMAI 1063 (4,54 g/L), seguidopor ácido p-cumárico (4,51 g/L) e Siringaldeído (3,87 g/L) (Figura 5A). O ácido p-cumárico foi o principal indutor de atividade de lacases dentre os derivados de lignina testados, tendo o fungo marinho produzido 49,33 U/L da enzima sob a influência deste composto que é tambémconsiderado um indutor de lacases (TERRÓN et al. 2004) (Figura 5A). Em ensaio, realizado por Valle et al. (2015), com o fungo basidiomiceto *Agaricus blazei* a presença de guaiacol no meio resultou no aumento da atividade enzimática do fungo, porémo tempo necessário para atingir o pico de atividade de lacases aumentou de 6 para 15 dias, oque significa uma queda deprodutividade em torno de 43%, enquanto que o álcool veratrílicodiminuiu o tempo para atingiro pico de atividade enzimática de 21 para 6 dias, o que significa300% de aumento de produtividade. Tais resultados coincidem com a baixa atividadeenzimática na presença de guaiacol e alta atividade na presença do álcool veratrílico apresentado pelo fungo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 neste trabalho. Em outro trabalho, realizado por Terrónet al. (2004), o fungo basidiomiceto

Trametes sp. I-62 foi cultivado na presença de ácido p-cumárico e pirocatecol em meio líquido, tendo como resultado o aumento de atividade de lacases em 253 vezes em meio suplementado com ácidop-cumárico logo no terceiro dia de cultivo e o pequeno aumento (9 vezes) na atividade enzimática em meio suplementado com pirocatecol; o ácido p-cumárico foi o derivado de lignina que mais influenciou a atividade de lacases para o fungo *Trametes* sp. I-62, assim como também foi o principal indutor de produçãode lacases para o fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 neste trabalho.

Figura 5. Atividade enzimática de lacases, produção de biomassa e expressão gênica na presença de xenobióticos derivados de lignina. A - Ensaio de produçãode biomassa e atividade enzimática na presença de Guaiacol (GUA), Pirocatecol (PCT), Siringaldeído (SHD), Ácido p-cumárico (PCA) e Álcool veratrílico (AVT). B - Expressão gênica na condição com Pirocatecol. C - Expressão gênica na condição com Siringaldeído. D - Expressão gênica na condiçãocom Ácidop-cumárico.



A expressão gênica do fungo marinho *Peniophora* sp. CBMAI 1063 em meio de cultivo suplementado com os derivados de lignina pirocatecol, siringaldeído e ácido p-cumárico (Figuras 5B, 5C e 5D, respectivamente) favoreceu a maior expressão de um dos genes e reprimiu a expressão dos outros. Em meio com pirocatecol o gene mais expresso foio Lcc1 (446,64 vezes mais expresso), em meio com siringaldeído também foi o Lcc1 (72,95vezes mais expresso) e em meio com ácido p-cumárico foi Lac10 (232,48 vezes mais expresso). Em estudo realizado por Moiseenko et al. (2018), o basidiomiceto de podridão branca *Trametes hirsuta* 072 foi cultivado em meio contendo 2 mM de álcool veratrílico; 0,4mM de guaiacol; 0,2 mM de siringaldeído e 0,4 mM de ácido p-cumárico, para avaliar a influência desses compostos na expressão dos 8 genes de lacase do basidiomiceto. O resultado foi que o ácido p-cumárico suprimiu expressivamente a expressão de todos os genes de lacase, o guaiacol suprimiu dois dos genes, o álcool veratrílico aumentou a expressão de dois genes (em aproximadamente dez vezes) e o siringaldeído aumentou significativamente a expressão de três genes de lacase. Nos resultados do nosso trabalho nota-se que, embora os compostos aromáticos utilizados tenham estrutura molecular semelhante, a presença desses compostos induziu a expressão de genes de lacase diferentes, ou com taxa de expressão diferentes (Figuras 5B e 5C).De acordo com Terón et al. (2004), compostos aromáticos estruturalmente relacionados a lignina tem papel importante no aumento de produção de lacases em fungos basidiomicetos, porém os estudos acerca do mecanismo de indução destes compostos relacionado a transcriçãodos genes de lacase são raros. No entanto, alguns autores acreditam que a indução de lacases por substâncias fenólicas ocorre pois a enzima seria capaz de polimerizar tais compostos, diminuindo sua toxicidade (THURSTON, 1994). Outra possibilidade é que essa expressão diferencial decorrente da presença de xenobióticosdistintos possa ocorrer, no âmbito da transcrição, provavelmente em resposta a fatores de transcrição específicos que podem estar relacionados, além da indução transcricional em si, ao aumento da estabilidade da transcrição ou a fatores pós-traducionais, a fim de aumentar ameia-vida da proteína (TERÓN et al., 2004).

5. CONCLUSÕES

Todas as condições testadas neste trabalho influenciaram na formação de biomassa ea produção de lacases. A produção de biomassa foi maior quanto maior a proporção de nitrogênioem relação ao carbono (0,75:1 - C:N). Por outro lado, a maior produção de lacasesocorreu na presença de sulfato de cobre. Dessa forma, a produção de lacases no fungo*Peniophora* sp. CBMAI 1063 não está diretamente relacionada com a formação de biomassa.É possível aindaespecular que a regulação da expressão dos genes de lacase desse fungo não é coordenada por promotores constitutivos, mas sim por promotores indutivos. Contudo, estudos *in silico* utilizando o genoma do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 precisam ser realizados visando encontrar os promotores responsáveis pela regulação gênica desses genes.

O RNA total do fungo foi extraído em todas as condições com sucesso, possibilitando a criação de 12 bibliotecas de cDNA. A partir disso foi realizada quantificação e análise de expressão dos 17 genes de lacase do fungo marinho *Peniophora* sp. CBMAI 1063, que codificam lacases extracelulares.

Da mesma forma que para a biomassa e para a produção de lacases, o perfil de expressãogênica dos 17 genes avaliados também alterou conforme a variável analisada. A maior taxa deexpressão foi obtida na presença do composto fenólico pirocatecol, contudo comdestaque paraum único gene que foi superexpresso nessa condição. De maneira geral foi possível identificaros genes mais expressos em condições de interesse biotecnológico, por exemplo, em salinidadeos genes mais expressos foram Lac10 e Lac1. Na presença do corante sintético Preto Reativo 5, o gene mais expresso foi o Lac2. Na presena de diferentes compostos derivados da lignina, tanto Lcc1 quanto o gene Lac10 tiveram destaque. Importante ressaltar que esses compostos fenólicos foram os que mais inibiram a expressão dos outros genes de lacase avaliados. Comparando nossos resultados com outros trabalhos já publicados, é possível que os genes de lacase do fungo marinho estejam sob a regulação de elementos responsivos ao nitrogênio, íons metálicose xenobióticos (NIT2, MRE e XRE, respectivamente), mas, como mencionado anteriormente, estudos adicionais precisam ser realizados nesse sentido para compreender a regulação desses genes.

Os dados obtidos neste trabalho são relevantes para a compreensão da indução de produção da enzima lacase, bem como a expressão dos genes envolvidos no processo, no fungobasidiomiceto de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063, podendo servir comobase paranovos estudos que buscam otimizar a produção e aplicação dessa enzima

que apresenta grande potencial biotecnológico.

REFERÊNCIAS

ADNAN, L, A; SATHISHKUMAR, P; YUSSOF, A, R, M; HADIBARATA, T. Metabolites characterisation 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.

ANDALUEMA, B. e GESSESSE, A. Microbial lipases and their industrial applications: review. **Biotechnology**, v.11, n.3, p.100-118, 2012.

BONUGLI-SANTOS, R, C; DURRANT, L, R; SILVA, M; SETTE, L, D. Laccase activity and putative laccase genes in marine-derived basidiomycete. **Fungal Biology**, v. 110, n. 10, p.863-872, 2010.

BONUGLI-SANTOS, R, C; DURRANT, L, R; SILVA, M; SETTE, L, D. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 32-37, 2010.

BONUGLI-SANTOS, R, C; VIEIRA, A; COLLINS, C; FERNANDES, T.; MARIN-MORALES, M; MURRAY. Enhanced textile dye decolorization by marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063 using integrated statistical design. **Environmental Science and Pollution Research**, v.23, p.8659-8668, 2016.

BONUGLI-SANTOS, R. C; VASCONCELOS, M. R. S; PASSARINI, M. R. Z; VIEIRA, G.L; LOPES, V. C. P; MAINARDI, P. H; SANTOS, J. A; DUARTE, L. A; OTERO, I. V. R; YOSHIDA, A. M. S; FEITOSA, V. A; PESSOA JR, A; SETTE, L. D. Marine- derived fungi: diversity of enzymes and biotechnological applications. **Frontiers in microbiology**, v.6,n.269, 2015.

COFFMAN, J, A; RAI, R; LOPRETE, D, M; CUNNINGHAM, T; SVETLOV, V; COOPER,
T. Cross regulalation of four GATA fectors that control nitrogenic catabolic gene expression in*Saccharomyces cerevisae.* **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 11, p. 3416-3429, 1997.

BRENELLI, L. B; PERSINOTI, G. F; CAIRO, J; LIBERATO, M; GOLÇALVES, T. A;OTERO, I. V. R.; MAINARDI, P. H; FELBY, C; SETTE, L. D; SQUINA, F. M. 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.17564, 2019.

BRUGNARI, T; BRAGA, D, M; SANTOS, C, S, A; TORRES, B, H, C; MODKOVSKI, T, A;HAMINIUK, C, W, I; MACIEL, G, M. Laccases as green and versatile biocatalysts: from labto enzyme market - an overview. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 8, n. 131, 2021.

BUCCITELLI, C; SELBACH, M. mRNAs, protein and the emerging principles of gene expression control. **Nature reviews genetics**, v. 21, p. 630-644, 2020.

CHMELOVÁ, D; LEGERSKÁ, B; KUNSTOVÁ, J; ONDREJOVIC, M; MIERTUS, S. The production of laccases by white-rot fungi under solid-state fermentation conditions.

World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 38, n. 21, 2022.

CLAUS, H. Laccases and their occurrence in prokaryotes. **Archives of Microbiology**, v. 179,p. 145-150, 2004.

COVIZZI, L. **Seleção de um suporte sintético para imobilizar células do *Botryosphaeria rhodina* e comparação da produção de lacase por células livres e imobilizadas.** Dissertaçãode mestrado, 88f, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2007.

DIRAY-ARCE, J; KNOWLES, A; SUVOROV, A; O'BRIEN, J; HANSEN, C; BYBEE, S,M;
GUL, B; KHAN, M, A; NIELSEN, B, L. Identification and evolutionary characterization ofsalt-responsive transcription factors in the succulent halophyte *Suaeda fruticosa*. **PLoS One**,v.14, n. 9, 2019.

D'AGOSTINI, E, C; MANTOVANI, T, R, D; VALLE, J, S; PACCOLA-MEIRELLES, L, D; COLAUTO, N, B; LINDE, G, A. Low carbon/nitrogen ratio increases laccase production from basidiomycetes in solid substrate cultivation. **Agricultural Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 295- 200, 2011.

FERNANDES, R. **Otimização da produção de lignina peroxidase por consórcio fúngicoatravés da fermentação semissólida de bagaço de cana-de-açúcar.** Trabalho de conclusão de curso, 74f, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2017.

FONSECA, M. I; SHIMIZU, E; ZAPATA, P. D; VILLALBA, L. L. Cooper inducing effect onlaccase production of White rot fungi native from Misiones (Argentina). **Enzyme and Microbial Technology**, v.46, p.534-539, 2010.

FONTES, B. **Caracterização de lacases produzidas por fungos basidiomicetos de origem marinha e terrestre e aplicação biotecnológica na descoloração de corante têxtil.** Dissertação de mestrado, 81f, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2019.

GARRIDO-BAZÁN, V; TÉLLEZ-TÉLLEZ, M; HERRERA-ESTRELLA, A; DÍAZ-GODÍNEZ, G; NAVA-GALICIA, S; VILLA-LOBOS, M, A; ARROYO-BECERRA, A; BIBBINS-MARTÍNEZ, M. Effect of textile dyes on activity and differential regulation of laccase genes from *Pleurotus ostreatus* grown in submerged fermentation. **AMB Express**, v.6, n. 93, 2016.

GIOVANELLA, P; VIEIRA, G; OTERO, I; PELLIZZER, E; FONTES, B; SETTE, L. Metal and organic pollutants bioremediation by extremophile microorganisms. **Journal of Hazardous Materials**, v. 382, 2020.

IARK, D; BUZZO, A; GARCIA J; CÔRREA, V, G; HELM, C, V; CÔRREA, R, C; PERALTA, R, A; MOREIRA, R; BRACHT, A; PERALTA, R, M. Enzymatic degradation and detoxification of azo dye Congo red by a new laccase from *Oudemansiella canarii*. **Bioresource Technology**, v. 289, 2019.

JANUSZ, G; KUCHARZYK, K, H; PAWLIK, A; STASZCZAK, M; PASZCZYNSKI, A, J. Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: Gene expression and regulation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, n. 1, p. 1-12, 2013.

KHAN, R; BHAWANA, P; FULEKAR, M, H. Microbial decolorization and degradation ossynthetic dyes: a review. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 12, p. 75-97, 2012.

LI, J; XIE, R; FANG, Z; ZHANG, X; XIAO, Y. Mechanism of salt-induced activity enhancement of a marine-derived laccase, Lac15. **European Biophysics Journal**, v. 47, p. 225-236, 2018.

LIU, Q; LUO, L; WANG, X; SHEN, Z; ZHENG, L. Comprehensive Analysis of Rice LaccaseGene (OsLAC) Family and Ectopic Expression of OsLAC10 Enhances Tolerance toCooper Stress in Arabidopsis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, 2017.

MAINARDI, P. H; FEITOSA, V. A; PAIVA, L; BONUGLI-SANTOS, R. C; SQUINA, F. M; PESSOA JR, A; SETTE, L. D. Laccase production in bioreactor scale under saline condition by the marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063. **Fungal biology**, v.122,p.302-309, 2018.

MAINARDI, P. H. **Produção de lacases pelo fungo filamentoso de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 em biorreator de bancada produção de lacases pelo fungo filamentoso de origem marinha Peniophora sp . CBMAI 1063 em biorreator de bancada.**Dissertação de mestrado, 65f, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2015.

MIKIASHVILI, N; ELISASHVILI, V; WASSER, S; NEVO, E. Carbon and nitrogen sourcesinfluence the ligninolytic enzyme activity of *Trametes versicolor*. **Biotechnology letters**, v.27,p. 955-959, 2005.

MOISEENKO, K, V; VASINA, D, V; FARUKSHINA, K, T; SAVINOVA, O, S; GLAZUNOVA, O, A; FEDOROVA, T, V; TYAZHELOVA, T, V. Orchestration of The expression of the laccase multigene family in white-rot fungi basidiomycete *Trametes hirsuta*072: Evidences of transcription level subfunctioalization. **Fungal Biology**, v. 122, p. 353- 362,2018.

OTERO, I. V. R; FERRO, M; BACCI, M; FERREIRA, H; SETTE, L. D. De novo transcriptome assembly: a new laccase multigene family from the marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063. **AMB Express**, v.7, n.222, 2017.

OTERO, I. **Transcriptoma do fungo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063: análise dos genes de lacase, clonagem e expressão heteróloga**. Dissertação de mestrado, p.61,Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2016.

PISCITELLI, A; GIARDINA, P; LETTERA, V; PEZZELLA, C; SANNIA, G; FARACO, V. Induction and trasncriptional regulation of laccases in fungi. **Current Genomics**, v. 12, p.104-112, 2011.

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

RIVERA-HOYOS, C. M; MORALES-ÁLVAREZ, E. D; POUTOU-PINALES, R; PEDROZA-RODRÍGUEZ, A. M; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R; DELGADO-BOADA, J. M. Fungal laccases. **Fungal biology reviews**, v.27, p.67-82, 2013.

ROSSI, T; SILVA, P, M, S; MOURA, L, F; ARAÚJO, M, C; BRITO, J, O; FREEMAN, H, S. Waste from eucalyptus wood steaming as a natural dye source for textile fibers. **Journal of Cleaner Production**, v. 143, p. 303-310, 2017.

SILVA, J. **Produção e avaliação da estabilidade de enzimas fúngicas. Trabalho de conclusão de curso**, 62f, Universidade Estadual Paulista Câmpus de Araraquara, Araraquara, 2013.

TERÓN, M, C; GONZÁLEZ, T; CARBAJO, J, M; YAGUE, S; ARANA-CUENCA, A; TELLEZ, A; DOBSON, A, D; GONZÁLEZ, A, E. Structural close-related aromatic compounds have different effects on laccase activity and on lcc gene expression in the ligninolytic fungus *Trametes* sp. I-62. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, n. 10, p. 954-962,2004.

THEERACHAT, M; GUIEYSSE, D; MOREL, S; REMAUD-SIMÉON, M; CHULALAKSANANUKUL, W. Laccases from Marine Organisms and Their Applications in the Biodegradation of Toxic and Environmental Pollutants: a Review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 187, p. 583-611, 2019.

TURLAPATI, P, V; KIM, K; DAVIN, L, B; LEWIS, N, G. The laccase multigene family inArabidopsis thaliana: towards addressing the mystery of their gene function(s). **Planta**, v. 233,p. 439-470, 2010.

VASINA, D, V; MUSTAFAEV, O, N; MOISEENKO, K, V; SADOVSKAYYA, N, S; GLAZUNOVA, O, A; TYURIN, A, A; FEDOROVA, T, V; PAVLOV, A, R; TYAZHELOVA,T, V; GOLDENKOVA-PAVLOVA, I, V; KOROLEVA, O, V. The trametes hirsuta 072 laccase multigene family: Genes identification and transcriptional analysis under copper ionsinduction. **Biochimie**, v. 116, p. 154-164, 2015.

VALLE, J, S; VANDERBERGHE, L, P, S; OLIVEIRA, A, C, C; TAVARES, M, F; LINDE, G, A; COLAUTO, N, B; SOCCOL, C, R. Effect of different compounds on the induction oflaccase production by *Agaricus blazei*. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 15882-15891, 2015.

YANG, J; LI, W; NG, T; DENG, X; LIN, J; YE, X. Laccases: Production, Expression, Regulation, and Applications in Pharmaceutical Biodegradation. **Frontiers in Microbiology**, v.8, n.832, 2017.

YANG, J; WANG, G; NG, T, B; LIN, J; YE, X. 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, 20