

RESSALVA

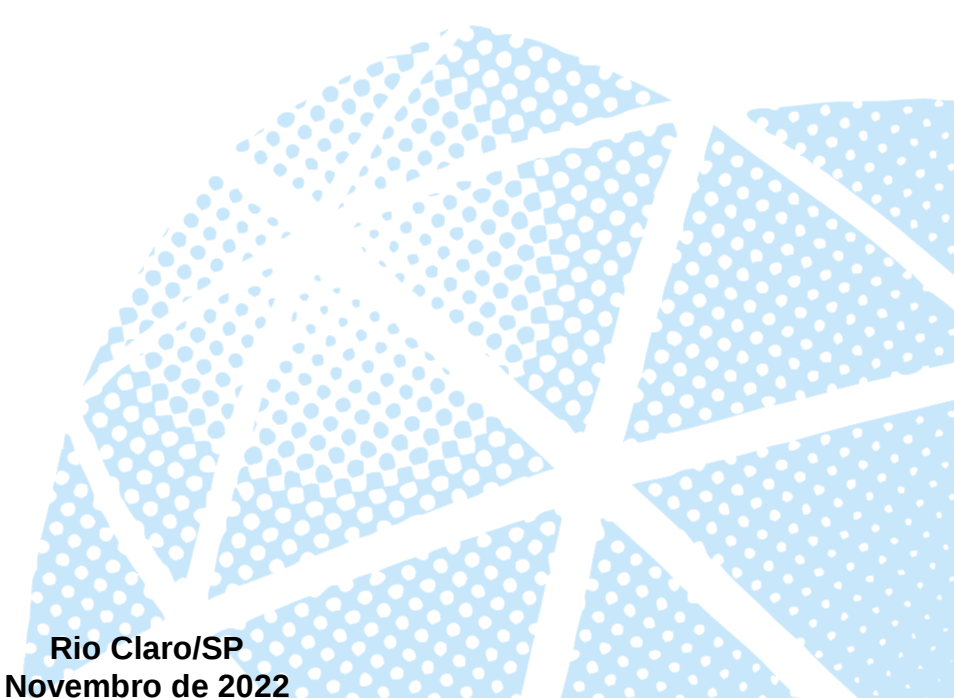
Atendendo solicitação do autor,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 24/11/2024.

**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).

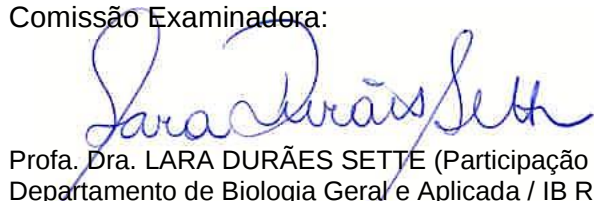
Essa ficha não pode ser modificada.

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.

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.; SONDHI, 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.