

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 29/06/2018.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

TRANSCRIPTOMA DO FUNGO DE ORIGEM MARINHA *Peniophora* sp. CBMAI
1063: ANÁLISE DOS GENES DE LACASE, CLONAGEM E EXPRESSÃO
HETERÓLOGA

IGOR VINICIUS RAMOS OTERO

Junho - 2016



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
RIO CLARO



**TRANSCRIPTOMA DO FUNGO DE ORIGEM MARINHA *Peniophora* sp. CBMAI
1063: ANÁLISE DOS GENES DE LACASE, CLONAGEM E EXPRESSÃO
HETERÓLOGA**

IGOR VINICIUS RAMOS OTERO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Rio Claro, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada)

Orientadora: Profa. Dra. Lara Durães Sette
Coorientador: Prof. Dr. Henrique Ferreira

Junho - 2016

576
O87t

Otero, Igor Vinicius Ramos

Transcriptoma do fungo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063 : análise dos genes de lacase, clonagem e expressão heteróloga / Igor Vinicius Ramos Otero. - Rio Claro, 2016

61 f. : il., figs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientadora: Lara Durães Sette

Coorientador: Henrique Ferreira

1. Microorganismos. 2. Biotecnologia. 3. Enzimas. 4. Fungos. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: TRANSCRIPTOMA DO FUNGO DE ORIGEM MARINHA *Peniophora* sp. CBMAI 1063: ANÁLISE DOS GENES DE LACASE, CLONAGEM E EXPRESSÃO HETERÓLOGA

AUTOR: IGOR VINICIUS RAMOS OTERO

ORIENTADORA: LARA DURÃES SETTE

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. LARA DURÃES SETTE
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro



Prof. Dr. MAURICIO BACCI JUNIOR
CEIS / IB Rio Claro



Profa. Dra. PAULA MARIA MOREIRA MARTINS
Centro de Citricultura Sylvio Moreira / Centro de Citricultura Sylvio Moreira

Rio Claro, 29 de junho de 2016

Aos meus pais Elizabete e

Carlos Arturo.

Pelo total apoio a todos os meus objetivos.

Pela fé no meu sucesso.

Pelo amor incondicional.

Com amor,

dedico.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Profa. Dra. Lara Durães Sette e Prof. Dr. Henrique Ferreira, que me aceitaram em seus respectivos grupos de pesquisa, e dentro de cada especialidade, me auxiliaram na condução dos experimentos, na revisão dos manuscritos, e mostraram-se sempre disponíveis e solícitos durante os dois anos de mestrado. Verdadeiros mestres, apaixonados pelo ensinar e que se tornaram fonte de inspiração para o jovem biólogo autor deste trabalho.

A Dra. Milene Ferro, pela colaboração com as análises de bioinformática do transcriptoma, e pela paciência e preocupação ao explicar todos os métodos e processos das análises realizadas.

Ao Me. Pedro Henrique Mainardi, pela amizade e auxílio com o cultivo do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063.

Ao Dr. Giordanni C. Dantas e a Me. Lilian A. Lacerda, pela amizade e pelo constante auxílio na montagem dos experimentos realizados no Laboratório de Genética de Bactérias.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial, pela amizade e pelo auxílio com os experimentos realizados naquele laboratório.

Ao Prof Dr. Maurício Bacci e a Dra. Paula Maria M. Martins pelas correções e contribuições no Exame Geral de Qualificação.

Aos meus pais Elizabete e Carlos Arturo, pela motivação, pelo apoio financeiro, e por absolutamente tudo.

Aos amigos do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, por terem me recebido de braços abertos e por terem contribuído diariamente para o meu bem-estar durante as jornadas de trabalho.

Aos amigos da Nemelés, que me auxiliaram na adaptação à Rio Claro e transformaram a república no meu novo lar.

Aos amigos de Campo Grande/MS, pelo apoio e pelas constantes tentativas de se fazerem presentes na minha vida, de uma forma ou de outra.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida (Processo 159488/2014-1); e à Fapesp pelo apoio financeiro ao Projeto 2013/19486-0, ao qual o presente trabalho está vinculado.

RESUMO

As lacases pertencem ao grupo das multicobre oxidases e o interesse biotecnológico por essas enzimas se deve ao fato delas catalisarem reações envolvendo diferentes compostos fenólicos e amínicos. A utilização diversificada dessas enzimas na indústria estimula a busca por lacases capazes de se adaptar aos diferentes processos industriais visando encontrar a relação de ótimo custo-benefício. O basidiomiceto de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063, já demonstrou capacidade de secretar quantidades significativas de lacase sob condições otimizadas (salinas) para produção da enzima. As lacases desse organismo podem apresentar características diferenciadas devido a origem marinha do basidiomiceto. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo a obtenção das sequências de lacase do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 através da análise do transcriptoma, afim de realizar a caracterização *in silico* dessas sequências, análises filogenéticas, clonagem e expressão heteróloga. Foram obtidas 13 isoformas de lacase correspondente a 8 genes putativos para a enzima, das 13 isoformas, 11 foram referentes a lacases extracelulares e 2 intracelulares. Todas as isoformas apresentaram-se ricas em conteúdo GC (> 52 %) sendo os aminoácidos Valina, Leucina, Serina, Ácido aspártico e Treonina os mais representativos na composição polipeptídica. A massa das lacases variou entre 53,5 e 64,6 kDa. Nove isoformas apresentaram o aminoácido Leucina e 4 isoformas apresentaram o aminoácido Fenilalanina na posição variável ligado ao cobre tipo 1 que possui atividade regulatória sobre a enzima. Nenhuma das isoformas apresentou similaridade maior a 57% em relação à outras sequências de lacases depositadas no NCBI e, portanto, demonstraram ser potencialmente diferentes das lacases originárias de outros basidiomicetos marinhos e terrestres. A clonagem de um fragmento codificante de lacase do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 possibilitou a montagem de sistemas de expressão baseado em 3 linhagens diferentes de *Escherichia coli*. Os resultados de expressão da enzima recombinante não foram conclusivos, contudo, o presente trabalho traz contribuições significativas ao estudo das lacases produzidas pelo fungo basidiomiceto de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063, demonstrando a capacidade desse organismo de produzir diferentes lacases com potencial para aplicação biotecnológica.

ABSTRACT

Laccases belong to the group of multicobalt oxidases and the biotechnological interest in these enzymes is due to the fact that they catalyze reactions involving different phenolic and amine compounds. The diverse use of these enzymes in the industry stimulates the search for laccases able to adapt to different industrial processes seeking to find the optimum cost-benefit ratio. The marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063, has demonstrated ability to secrete significant amounts of laccase under optimized conditions (salt) for the enzyme production. Laccases from this organism could present different characteristics due to its marine origin. The present study aimed to obtain the laccase sequences from the fungus *Peniophora* sp. CBMAI 1063 by transcriptome analysis in order to perform characterization of these sequences *in silico*, phylogenetic analysis, cloning and heterologous expression. A total of 13 laccase isoforms were obtained corresponding to eight putative genes for the enzyme. Among the 13 isoforms, eleven were related to extracellular laccases and two to intracellular. All isoforms showed abundance in GC content (> 52 %) with the amino acid Valine, Leucine, Serine, Threonine Aspartic Acid as the most representative in the polypeptide composition. The mass of laccases varied between 53.5 and 64.6 kDa. Nine isoforms showed the amino acid Leucine and four isoforms showed the amino acid Phenylalanine in the variable position on the copper type 1 which has regulatory activity on the enzyme. None of the isoforms showed a similarity over to 57% compared to other laccases sequences deposited in the NCBI and therefore shown to be potentially different from laccases from other marine and terrestrial basidiomycetes. The cloning of a DNA fragment that encodes laccase from *Peniophora* sp. 1063 CBMAI allowed the assembly of expression systems based on three different strains of *Escherichia coli*. The results of recombinant enzyme expression were inconclusive. However, this study brings significant contributions to the study of laccases produced by the marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063, demonstrating the ability of this organism to produce different laccases with potential for biotechnological application.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Demonstração dos 3 domínios <i>cupredoxin</i> em lacase do fungo <i>Trametes versicolor</i>	5
Figura 2. Representação esquemática do sítio ativo de lacases.....	8
Figura 3. Gráfico gerado pelo programa FASTQC mostrando a qualidade <i>Phred</i> por base.....	24
Figura 4. Gráfico gerado pelo programa FASTQC mostrando a qualidade <i>Phred</i> por sequência.	25
Figura 5. Gráfico gerado pelo programa FASTQC após <i>trimming</i> no Trimmomatic, mostrando a qualidade <i>Phred</i> por base nas sequências.....	25
Figura 6. E-value referente ao BLAST na base de dados NR do NCBI.....	27
Figura 7. Resultados de BLAST com a porcentagem de homologia do transcriptoma do fungo <i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063 com outros basidiomicetos.	27
Figura 8. Distribuição dos termos de GO 2.....	29
Figura 9. Distribuição dos unigenes com <i>Commission Enzyme</i> (E.C) atribuído. A) Principais grupos enzimáticos. B) Distribuição das oxidoredutases.	30
Figura 10. Alinhamento dos transcritos com outras lacases fúngicas recuperadas do GenBank: demonstração das regiões conservadas.	32
Figura 11. Divisão dos transcritos de lacase, baseado no aminoácido variável que flanqueia o cobre T1.....	33
Figura 12. Distribuição percentual de aminoácidos pelas sequências de transcritos de lacase.....	34
Figura 13. Árvore filogenética agrupando os transcritos do fungo <i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063 a lacases de outros basidiomicetos.....	39
Figura 14. Ensaio de <i>single colony</i> demonstrando a confirmação para presença do gene no vetor.....	42
Figura 15. A) Clonagem <i>in silico</i> demonstrando o tamanho dos fragmentos esperados utilizando as enzimas de restrição <i>DraIII</i> , <i>XhoI</i> e <i>EcoRI</i> . B) Gel de agarose 0,7% demonstrando ensaio de restrição enzimática confirmando o padrão de bandas esperado para o transcrito Lac15071B.....	43
Figura 16. Gel de agarose 0,7% demonstrando a amplificação do fragmento Lac15071B para correção utilizando diferentes polimerases.....	44
Figura 17. Gel de agarose 0,7% demonstrando a restrição enzimática do vetor pJET 1.2 utilizando as enzimas <i>EcoRI</i> e <i>HindIII</i>	45
Figura 18. Ensaio qualitativo para presença de lacase em placa ágar-guaiacol. A) linhagem Rosetta_L3. B) linhagem L21(DE3).....	47

Figura 19. Gel de SDS-poliacrilamida com as proteínas totais expressas pelas três linhagens transformadas. 48

Figura 20. Gel de SDS-poliacrilamida com as proteínas totais das linhagens Rosetta e BL21(DE3), transformadas e não transformadas 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Amostras enviadas para sequenciamento na MACROGEN com suas respectivas concentrações de RNA..... 23

Tabela 2. Quantidade de cisteínas por lacase, em sequências recuperadas do GeneBank relativas a diferentes basidiomicetos 35

Tabela 3. Característica dos transcritos de lacase do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 36

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS: 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid).

ASW: Artificial Sea Water

CBMAI: Coleção Brasileira de Micro-organismos do Ambiente e Indústria

FDA: Food and Drugs Administration

GRAS: Generally Recognized As Safe

HTS: High Troughput Screening

INPI: Instituto Nacional da Propriedade Industrial

LB: Luria Bertani

OGM: Organismo geneticamente modificado

ORF: Open Reading Frame

pb: pares de bases

h: hora

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	4
2.1 Multicobre oxidases.....	4
2.2 Lacases	5
2.2.1 Isoformas de lacases e suas famílias gênicas.....	6
2.2.2 Estrutura das lacases	7
2.2.3 Interesse biotecnológico e aplicação das lacases.....	8
2.3 Fungos derivados do ambiente marinho	10
2.3.1 <i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063.....	11
2.4 Expressão heteróloga de lacases.....	12
2.5 Sequenciamento de transcriptomas	13
3. Objetivos	15
3.1 Objetivos específicos	15
4. Material e métodos	16
4.1 Condições de cultivo e extração de RNA do fungo <i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063.....	16
4.2 Quantificação e verificação da integridade do RNA.....	16
4.3 Sequenciamento.....	16
4.4 Pré-processamento dos <i>reads</i>	16
4.5 Montagem dos <i>contigs</i> e anotação	17
4.6 Obtenção dos transcritos de lacase, análises e seleção da sequência para clonagem.....	17
4.7 Desenho dos <i>primers</i> para obtenção do transcrito selecionado.....	18
4.8 Amplificação, isolamento e purificação do cDNA codificante para lacase.....	18
4.9 Clonagem, preservação e confirmação.....	18
4.10 Sequenciamento dos vetores de clonagem	19
4.11 Correção e adequação do cDNA clonado.....	20
4.12 Montagem do sistema de expressão em <i>Escherichia coli</i>	21
4.13 Análise da expressão da lacase recombinante através de ensaio de SDS-PAGE.....	21
4.14 Avaliação qualitativa de atividade enzimática da lacase recombinante.....	22
5. Resultados e discussão	23
5.1 Extração de RNA e sequenciamento do transcriptoma do fungo <i>Peniophora</i> sp. CBMAI 1063	23

5.2 Anotação do transcriptoma	26
5.3 Análise e caracterização dos transcritos de lacase.....	31
5.4 Seleção do transcrito para clonagem e expressão heteróloga em <i>Escherichia coli</i>	41
5.5 Clonagem do fragmento Lac15071B, transformação em <i>E. coli</i> DH10B do transcrito e correção.....	42
5.6 Ensaio de atividade enzimática da lacase recombinante.....	46
5.7 Ensaio de expressão da lacase recombinante em três linhagens de <i>E. coli</i>	47
6. Conclusões	51
7. Referências Bibliográficas	52
8. Anexo 1 - Sequências dos <i>primers</i> desenhados	61

1. INTRODUÇÃO

As lacases (Benzenediol: oxigênio oxi-redutase) [EC 1.10.3.2], são enzimas de estrutura glicoproteica amplamente distribuídas na natureza. Tendo sido relatada sua presença em plantas, bactérias, insetos, mas principalmente em fungos, e expressamente nos denominados fungos de decomposição branca (RIVERA-HOYOS *et al.*, 2013). Essas enzimas estão relacionadas a diferentes funções fisiológicas nos grupos de organismos onde podem ser encontradas, como por exemplo, na formação de estruturas de resistência bacteriana, no caso de esporos do gênero *Bacillus* (ENGUITA *et al.*, 2003); no metabolismo da lignina em plantas; no enrijecimento da cutícula em insetos, e na deslignificação promovida por fungos da decomposição branca (MAYER; STAPLES, 2002).

Capazes de catalisar reações envolvendo um vasto número de compostos fenólicos e amínicos (alifáticos e aromáticos), as lacases promovem a oxidação do substrato, utilizando o oxigênio molecular como acceptor final de elétrons, reduzindo-o a água ao final do processo (CLAUS, 2004). Essas características fizeram das lacases, um alvo de intensa investigação biotecnológica pela chamada “Química Verde” (RIVA, 2006), essa área da química busca a obtenção de produtos e/ou processos que minimizem a produção de resíduos e reduzam o impacto ambiental causado pela utilização de substâncias químicas na indústria (LENARDÃO *et al.*, 2003).

Como reflexo do seu potencial, estas enzimas tem sido amplamente utilizadas na indústria (KUNAMNENI *et al.*, 2008), mais comumente na indústria de papel e celulose para o tratamento de polpa Kraft (KIRK *et al.* 2002) e na indústria têxtil para a biorremediação de corantes (RODRIGUEZ COUTO; TOCA HERRERA, 2006; BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2015). Apesar das lacases não serem reconhecidas como GRAS (*Generally Recognized as Safe*), essas enzimas já foram relatadas para utilização na indústria alimentícia, em processos de clarificação de bebidas e retirada de compostos fenólicos que possam provocar sabor indesejado (OSMA *et al.* 2010).

Diferentes aplicações demandam enzimas com características específicas que se adequem a cada situação e finalidade (NOVOZYMES, 2013). A busca por enzimas com características singulares estimula a prospecção de micro-organismos capazes de produzir tais enzimas almejando um ótimo custo-benefício. Nesse sentido, justifica-se o interesse por micro-organismos derivados de diferentes ambientes, bem como a utilização da

engenharia genética e mutação sítio dirigida visando suprir as necessidades de demanda de mercado (KIRK *et al.*, 2002; JONES; PANG, 2012).

A exploração da biotecnologia marinha, através da prospecção de micro-organismos derivados desse ambiente, mostra-se promissora (BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2015). Segundo os autores dessa revisão, enzimas produzidas por micro-organismos de origem marinha, demonstram características distintas daquelas produzidas por correlatos terrestres, devido a condições intrínsecas ao ambiente, como: salinidade, pressão, temperatura e luminosidade.

Como resultado dos trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa coordenado pela Profa. Dra. Lara Durães Sette, o fungo basidiomiceto derivado de ambiente marinho *Peniophora* sp. CBMAI 1063, foi isolado da esponja *Amphimedon viridis* (coletado na cidade de São Sebastião na costa norte do estado de São Paulo, Brasil, MENEZES *et al.*, 2010), e demonstrou a habilidade de produzir lacase sob condições salinas e não salinas (BONUGLI-SANTOS *et al.*, 2010).

A condição salina relacionada ao cultivo do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 refere-se à presença de água do mar preparada artificialmente (*Artificial Sea Water* - ASW). Mas, tendo em vista que o preparo de ASW envolve ao menos nove sais sob diferentes concentrações, e que o pico de produção da enzima se dá após cinco dias de cultivo, a obtenção de lacases recombinantes seria uma forma eficiente de tornar a produção independente dessa condição, bem como possibilitar a obtenção de lacases em menor tempo de cultivo e com características diferenciadas que favoreçam, por exemplo, sua purificação, ou que tenham expressão controlada por ação de um forte regulador gênico.

O primeiro micro-organismo utilizado como hospedeiro para produção industrial de proteína recombinante foi a bactéria *Escherichia coli* em 1977, e desde então permanece como o sistema procarioto para expressão heteróloga de proteínas mais utilizado (RAI; PADH, 2001). Considerando que essa bactéria foi amplamente estudada, hoje existem diferentes linhagens disponíveis para serem utilizadas na expressão heteróloga, cada uma apresentando características singulares e permitindo a adequação do sistema a diferentes condições e necessidades (CHEN, 2012).

Estudos de estrutura, caracterização e atividade enzimática de lacases bacterianas já foram realizadas utilizando *E. coli* como hospedeiro (BENTO *et al.*, 2005; BRISSOS

et al., 2009). Lacases fúngicas também já foram expressas utilizando esse mesmo sistema. Salony *et al.* (2008), em trabalho pioneiro expressaram uma lacase do basidiomiceto *Cyathus bulleri*, com relativo sucesso. Contudo devido a problemas na sequência clonada a enzima recombinante apresentou aminoácidos adicionais e massa diferente da lacase nativa.

O amplo conhecimento sobre o sistema de expressão, associado à facilidade de manipulação, e a possibilidade de otimização da produção de lacases recombinantes, reduzindo tempo e os custos, incentivam a utilização da bactéria *Escherichia coli*, para a expressão dessas enzimas (KHOW; SUNTRARACHUN, 2012). Contudo, a obtenção de lacases fúngicas expressas nesse sistema, e que ainda mantenham boa atividade enzimática, permanece como uma barreira que necessita ser superada.

É vasto o número de trabalhos com clonagem e expressão heteróloga de lacases utilizando *primers* inespecíficos, desenhados a partir da análise de diferentes sequências dessa enzima. Esses *primers* baseiam-se em 4 regiões conservadas presentes no sítio ativo das lacases e que estão diretamente relacionadas aos íons de cobre presentes nessa enzima (ENGUIITA *et al.*, 2003; CLAUS, 2004; RIVERA-HOYOS *et al.*, 2013).

Contudo, a utilização de *primers* inespecíficos para clonagem e expressão heteróloga podem resultar em proteínas recombinantes que não correspondem àquelas esperadas (ver SALONY *et al.*, 2008). Nesse sentido, o emprego de novas tecnologias, como o sequenciamento de genomas e transcriptomas possibilitam a obtenção de genes e transcritos de um organismo fornecendo sequências completas que podem ser utilizadas para exploração biotecnológica (MOREIRA, 2013).

Biblioteca de transcritos, ou transcriptoma, representam uma grande fonte de informações a respeito de um organismo, permitindo reconhecer por exemplo, quais genes estão sendo ativamente expressos num dado momento (RODOVALHO, 2011). A análise dessas bibliotecas possibilita ainda, a elucidação de processos biológicos de um organismo; relativos ao conteúdo gênico, aos níveis de expressão sob uma determinada condição de cultivo, e a análise diferencial de expressão gênica (SURGET-GROBA; MONTOYA-BURGOS, 2010; WANG *et al.*, 2015).

Atualmente, com o advento dos sequenciamentos de nova geração (NGS), e aprimoramento da bioinformática, com o desenvolvimento de novos softwares (MANFRED *et al.*, 2013), tornou-se possível a montagem de bibliotecas de transcritos

sem a necessidade de um genoma como referência (técnica chamada de *de Novo assembly*) (SURGET-GROBA; MONTOYA-BURGOS, 2010; LI *et al.*, 2014). Essa nova técnica tem expandido a possibilidade de análise dessas bibliotecas para organismos menos estudados ou recém descobertos (SURGET-GROBA; MONTOYA-BURGOS, 2010).

O presente trabalho teve como objetivo a análise do transcriptoma do fungo de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063, visando fornecer informações a respeito da expressão gênica desse organismo sob condição otimizada para produção de lacase, bem como identificar e caracterizar os transcritos desta enzima para ao final, realizar a clonagem e expressão heteróloga de uma lacase recombinante em *Escherichia coli*.

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho traz contribuições significativas ao estudo das lacases produzidas pelo fungo basidiomiceto de origem marinha *Peniophora* sp. CBMAI 1063.

A montagem da biblioteca de transcritos, utilizando o método *de Novo Assembly* e anotação do transcriptoma utilizando o software Blast2GO, foi útil para obtenção das sequências de lacase, permitindo uma visão geral da expressão gênica do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063, quando cultivado em condições otimizadas para produção de lacase.

O fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063 expressa pelo menos 10 lacases diferentes sob condições otimizadas para produção dessa enzima.

As sequências de lacases analisadas codificam enzimas com composição peptídica, tamanho e atividade enzimática diferentes.

A bactéria *E. coli* DH10B foi eficiente para clonagem da lacase recombinante do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063.

Novos ensaios precisam ser realizados afim de determinar se os sistemas construídos, e baseados no vetor pLac2a e nas linhagens *E. coli* DH10B, BL21(DE3) e Rosetta, são capazes de expressar a lacase recombinante do fungo *Peniophora* sp. CBMAI 1063.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADULLA, E.; TZANOV, T.; COSTA, S.; ROBRA, K.-H.; CAVACO-PAULO, A.; GUBITZ, G. M. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3357–3362, 2000.

ARAGONA, M.; MINIO, A.; FERRARINI, A.; VALENTE, M. T.; BAGNARESI, P.; ORRÙ, L.; TONONI, P.; ZAMPERIN, G.; INFANTINO, A.; VALÈ, G.; CATTIVELLI, L.; DELLEDONNE, M. De novo genome assembly of the soil-borne fungus and tomato pathogen *Pyrenochaeta lycopersici*. **BMC genomics**, v. 15, p. 313, 2014.

ARAND, M.; HEMMER, H.; DÜRK, H.; BARATTI, J.; ARCHELAS, A.; FURSTOSS, R.; OESCH, F. Cloning and molecular characterization of a soluble epoxide hydrolase from *Aspergillus niger* that is related to mammalian microsomal epoxide hydrolase. **The Biochemical journal**, v. 344 Pt 1, p. 273–280, 1999.

ARCHIBALD, F. .; BOURBONNAIS, R.; JURASEK, L.; PAICE, M. .; REID, I. . Kraft pulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor*. **Journal of Biotechnology**, v. 53, n. 2-3, p. 215–236, 1997.

BALDRIAN, P. Fungal laccases-occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 215–242, 2006.

BENTO, I.; MARTINS, L. O.; GATO LOPES, G.; ARMENIA CARRONDO, M.; LINDLEY, P. F. Dioxygen reduction by multi-copper oxidases; a structural perspective. **Dalton Transactions**, n. 21, p. 3507–3513, 2005.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.

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.; VASCONCELOS, M. R. dos S.; PASSARINI, M. R. Z.; VIEIRA, G. A. L.; LOPES, V. C. P.; MAINARDI, P. H.; SANTOS, J. A. dos; DUARTE, L. de A.; OTERO, I. V. R.; YOSHIDA, A. M. da S.; FEITOSA, V. A.; PESSOA, A.; SETTE, L. D. Marine-derived fungi: Diversity of enzymes and biotechnological applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. MAR, p. 1–15, 2015.

BONUGLI-SANTOS, R. C.; VIEIRA, G. A. L.; COLLINS, C.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A.; MURRAY, P.; SETTE, L. D. 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.

BORATYN, G. M.; SCHÄFFER, A. A; AGARWALA, R.; ALTSCHUL, S. F.; LIPMAN, D. J.; MADDEN, T. L. Domain enhanced lookup time accelerated BLAST.

Biology Direct, v. 7, n. 1, p. 12, 2012.

BRENNA, O.; BIANCHI, E. Immobilised laccase for phenolic removal in must and wine. **Biothecnology Letters**, v. 16, n. 1, p. 35–40, 1994.

BRISSOS, V.; PEREIRA, L.; MUNTEANU, F. D.; CAVACO-PAULO, A.; MARTINS, L. O. 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.

BUCHER, V. V. C.; POINTING, S. B.; HYDE, K. D.; REDDY, C. A. Production of wood decay enzymes, loss of mass, and lignin solubilization in wood by diverse tropical freshwater fungi. **Microbial Ecology**, v. 48, n. 3, p. 331–337, 2004.

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.

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

CONESA, A.; GOTZ, S.; GARCÍA-GÓMEZ, J. M.; TEROL, J.; TALÓN, M.; ROBLES, M. Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, n. 18, p. 3674–3676, 2005.

COURTY, P. E.; HOEGGER, P. J.; KILARU, S.; KOHLER, A.; BUÉE, M.; GARBAYE, J.; MARTIN, F.; KUES, U. Phylogenetic analysis, genomic organization, and expression analysis of multi-copper oxidases in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. **New Phytologist**, v. 182, n. 3, p. 736–750, 2009.

DURRENS, P. The phenoloxidases of the ascomycete *Podospira anserina*: The three forms of the major laccase activity. **Archives of Microbiology**, v. 130, n. 2, p. 121–124, 1981.

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

EGGERT, C.; LAFAYETTE, P. R.; TEMP, U.; DEAN, J. F. D.; EGGERT, C.; FAYETTE, P. R. L. A.; TEMP, U.; ERIKSSON, K. L. Molecular Analysis of a Laccase Gene from the White Rot Fungus *Pycnoporus cinnabarinus* **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 5, p. 1766–1772, 1998.

ENGUITA, F. J.; MARTINS, L. O.; HENRIQUES, A. O.; CARRONDO, M. A. Crystal structure of a bacterial endospore coat component: A laccase with enhanced thermostability properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 21, p. 19416–19425, 2003.

FARACO, V.; GIARDINA, P.; PALMIERI, G.; SANNIA, G. Metal-activated laccase promoters. **Biotechnology in the Pulp and Paper Industry**, n. 6, p. 105–111, 2002.

FIETO, J.L.R.; MACIEL, T.E.F. Sequenciando genomas. In: MOREIRA, L. M. (Org.). *Ciencias genômicas: fundamentos e aplicações*. São Carlos, Sociedade Brasileira de Genética, 2015. 403 f. Disponível em: < <http://moreiralab.net/Livro/>>. Acesso em: 01 de maio de 2016, 13:00:00. p. 27-64.

FIETO, L.G.; LAMEGO, M.R.A. História e importância da genômica. In: MOREIRA, L. M. (Org.). *Ciencias genômicas: fundamentos e aplicações*. São Carlos, Sociedade Brasileira de Genética, 2015. 403 f. Disponível em: < <http://moreiralab.net/Livro/>>. Acesso em: 01 de maio de 2016, 13:00:00. p. 21-26.

GAO, Z.; LI, B.; ZHENG, C.; WANG, G. Molecular detection of fungal communities in the hawaiian marine sponges *Suberites zeteki* and *Mycale armata*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 19, p. 6091–6101, 2008.

GARBELOTTO, M.; GONTHIER, P. Biology, epidemiology, and control of *Heterobasidion* species worldwide. **Annual review of phytopathology**, v. 51, p. 39–59, 2013.

GIARDINA, P.; FARACO, V.; PEZZELLA, C.; PISCITELLI, A.; VANHULLE, S.; SANNIA, G. Laccases: A never-ending story. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 3, p. 369–385, 2010.

GRABHERR, M. G.; HAAS, B. J.; YASSOUR, M.; LEVIN, J. Z.; THOMPSON, D. A.; AMIT, I.; ADICONIS, X.; FAN, L.; RAYCHOWDHURY, R.; ZENG, Q.; CHEN, Z.; MAUCELI, E.; HACOEN, N.; GNIRKE, A.; RHIND, N.; PALMA, F. di; W., B.; FRIEDMAN, N.; REGEV, A. Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 7, p. 644–652, 2013.

GUZMAN, L. L. M.; BELIN, D.; CARSON, M. J.; BECKWITH, J. Tight Regulation, Modulation, and High-Level Expression by Vectors Containing the Arabinose PBAD Promoter. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 14, p. 4121–4130, 1995.

HO, C.-L.; TAN, Y.-C.; YEOH, K.-A.; GHAZALI, A.-K.; YEE, W.-Y.; HOH, C.-C. De novo transcriptome analyses of host-fungal interactions in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 66, 2016.

HOU, H.; ZHOU, J.; WANG, J.; DU, C.; YAN, B. 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.

HUANG, Y.; WU, X.; JIAN, D.; ZHAN, Y.; FAN, G. De novo transcriptome analysis of a medicinal fungi *phellinus linteus* and identification of SSR markers. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 395–403, 2015.

HUNTLEY, R. P.; SAWFORD, T.; MARTIN, M. J.; O'DONOVAN, C. Understanding how and why the Gene Ontology and its annotations evolve: the GO within UniProt. **GigaScience**, v. 3, n. 1, p. 4, 2014.

JOLIVALT, C.; MADZAK, C.; BRAULT, A.; CAMINADE, E.; MALOSSE, C.;

MOUGIN, C. Expression of laccase IIIb from the white-rot fungus *Trametes versicolor* in the yeast *Yarrowia lipolytica* for environmental applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 4, p. 450–456, 2005.

JONES, E.B.G.; PANG, K.-L. Marine fungi and fungal-like organisms. Berlin, De Gruyter, 2012. 532f.

KESTER, D. R.; DUEDALL, I. W.; CONNORS, D. N.; PYTKOWICZ, R. M. Preparation of artificial seawater. **Limnology and Oceanography**, v. 12, n. 1, p. 176–179, 1967.

KHORER, K.; DOMDEY, H. Preparation of High Molecular Weight RNA. **Methods in enzymology**, v.194, p.398-405, 1991.

KHOW, O.; SUNTRARACHUN, S. Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 2, p. 159–162, 2012.

KILARU, S.; HOEGGER, P. J.; KUES, U. The laccase multi-gene family in *Coprinopsis cinerea* has seventeen different members that divide into two distinct subfamilies. **Current Genetics**, v. 50, n. 1, p. 45–60, 2006.

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

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

KO, E.-M.; LEEM, Y.-E.; CHOI, H. Purification and characterization of laccase isozymes from the white-rot basidiomycete *Ganoderma lucidum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, n. 1, p. 98–102, 2001.

KUMAR, S. V. S.; PHALE, P. S.; DURANI, S.; WANGIKAR, P. P. Combined sequence and structure analysis of the fungal laccase family. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 83, n. 4, p. 386–394, 2003.

KUNAMNENI, A.; BALLESTEROS, A.; PLOU, F. J.; ALCALDE, M. Fungal laccase – a versatile enzyme for biotechnological applications. **Applied Microbiology**, p. 233–245, 2007.

KUNAMNENI, A.; PLOU, F. J.; BALLESTEROS, A.; ALCALDE, M. Laccases and their applications: a patent review. **Recent patents on biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 10–24, 2008.

LARRONDO, L. F.; AVILA, M.; SALAS, L.; CULLEN, D.; VICUÑA, R. Heterologous expression of laccase cDNA from *Ceriporiopsis subvermispora* yields copper-activated apoprotein and complex isoform patterns. **Microbiology**, v. 149, n. 5, p. 1177–1182, 2003.

LEE, N. L.; GIELOW, W. O.; WALLACE, R. G. Mechanism of araC autoregulation and the domains of two overlapping promoters, Pc and PBAD, in the L-arabinose regulatory region of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 2, p. 752–6, 1981.

LEITNER, C.; HESS, J.; GALHAUP, C.; LUDWIG, R.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D.; HALTRICH, D. Purification and characterization of a laccase from the white-rot fungus *Trametes multicolor*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 98-100, p. 497–507, 2002.

LENARDÃO, E.J.; FREITAG, R.A.; DABDOUB, M.J.; BATISTA A.C.F.; SILVEIRA, C.C. "Green chemistry" - Os 12 princípios da química verde e suas inserções nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, p. 123-129, 2003.

LEONOWICZ, A.; CHO, N.; LUTEREK, J.; WILKOLAZKA, A.; WOJTAS-WASILEWSKA, M.; MATUSZEWSKA, A.; HOFRICHTER, M.; WESENBERG, D.; ROGALSKI, J. Fungal laccase: Properties and activity on lignin. **Journal of Basic Microbiology**, v. 41, n. 3-4, p. 185–227, 2001.

LI, B.; FILLMORE, N.; BAI, Y.; COLLINS, M.; THOMSON, J. a.; STEWART, R.; DEWEY, C. Evaluation of *de novo* transcriptome assemblies from RNA-Seq data. **Genome biology**, v. 15, n. 15, p. 553, 2014.

LUNDBERG, K. S.; SHOEMAKER, D. D.; ADAMS, M. W. W.; SHORT, J. M.; SORGE, J. A.; MATHUR, E. J. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. **Gene**, v. 108, n. 1, p. 1–6, 1991.

LUO, W.; VRIJMOED, L. L. P.; GARETH JONES, E. B. Screening of marine fungi for lignocellulose-degrading enzyme activities. **Botanica Marina**, v. 48, n. 5-6, p.379-386, 2005.

MA, K.; BAO, L.; HAN, J.; JIN, T.; YANG, X.; ZHAO, F.; LI, S.; SONG, F.; LIU, M.; LIU, H. New benzoate derivatives and hirsutane type sesquiterpenoids with antimicrobial activity and cytotoxicity from the solid-state fermented rice by the medicinal mushroom *stereum hirsutum*. **Food Chemistry**, v. 143, p. 239–245, 2014.

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

MAESTRE-REYNA, M.; LIU, W. C.; JENG, W. Y.; LEE, C. C.; HSU, C. A.; WEN, T. N.; WANG, A. H. J.; SHYUR, L. F. Structural and functional roles of glycosylation in fungal laccase from *Lentinus* sp. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–28, 2015.

MAGRINI, M.J. Degradação de HPAs e produção de enzimas ligninolíticas por fungos basidiomicetos derivados de esponjas marinhas. Campinas, 2012. Dissertação de mestrado, 91f. Universidade Estadual de Campinas, 2012.

MAINARDI, P. H. Produção de lacases pelo fungo filamentosso de origem marinha *peniophora* sp . cbmai 1063 em biorreator de bancada produção de lacases pelo fungo filamentosso de origem marinha *Peniophora* sp . CBMAI 1063 em biorreator de

bancada. Rio Claro, 2015. Dissertação de mestrado, 65f. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2015.

MARGULIES, M.; EGHOLM, M.; ALTMAN, W. E.; ATTIYA, S.; BADER, J. S.; BEMBEN, L. a; BERKA, J.; BRAVERMAN, M. S.; CHEN, Y.-J.; CHEN, Z.; DEWELL, S. B.; DU, L.; FIERRO, J. M.; GOMES, X. V; GODWIN, B. C.; HE, W.; HELGESEN, S.; HO, C. H.; HO, C. H.; IRZYK, G. P.; JANDO, S. C.; ALENQUER, M. L. I.; JARVIE, T. P.; JIRAGE, K. B.; KIM, J.-B.; KNIGHT, J. R.; LANZA, J. R.; LEAMON, J. H.; LEFKOWITZ, S. M.; LEI, M.; LI, J.; LOHMAN, K. L.; LU, H.; MAKHIJANI, V. B.; MCDADE, K. E.; MCKENNA, M. P.; MYERS, E. W.; NICKERSON, E.; NOBILE, J. R.; PLANT, R.; PUC, B. P.; RONAN, M. T.; ROTH, G. T.; SARKIS, G. J.; SIMONS, J. F.; SIMPSON, J. W.; SRINIVASAN, M.; TARTARO, K. R.; TOMASZ, A.; VOGT, K. a; VOLKMER, G. a; WANG, S. H.; WANG, Y.; WEINER, M. P.; YU, P.; BEGLEY, R. F.; ROTHBERG, J. M. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, v. 437, n. 7057, p. 376–80, 2005.

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

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: New functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, v. 60, n. 6, p. 551–565, 2002.

MENEZES, C. B. A.; BONUGLI-SANTOS, R. C.; MIQUELETTO, P. B.; PASSARINI, M. R. Z.; SILVA, C. H. D.; JUSTO, M. R.; LEAL, R. R.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; OLIVEIRA, V. M.; BERLINCK, R. G. S.; SETTE, L. D. 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.

MESSERSCHMIDT, A.; HUBER, R. The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. Modelling and structural relationships. **European Journal of Biochemistry**, v. 187, n. 2, p. 341–352, 1990.

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.

MOLDES, D.; LORENZO, M.; SANROMÁN, M. A. Different proportions of laccase isoenzymes produced by submerged cultures of *Trametes versicolor* grown on lignocellulosic wastes. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 4, p. 327–330, 2004.

MOREIRA, L. M. (Org.). Ciências genômicas: fundamentos e aplicações. São Carlos, Sociedade Brasileira de Genética, 2015. 403 f. Disponível em: <<http://moreiralab.net/Livro/>>. Acesso em: 01 de maio de 2016, 13:00:00.

MOROZOVA, O.; HIRST, M.; MARRA, M. a. Applications of new sequencing technologies for transcriptome analysis. **Annual Review of Genomics and Human**

Genetics, v. 10, p. 135–51, 2009.

MOSHKOV, K. A.; ZAITSEV, V. N.; GRISHINA, T. V.; STEFANOV, V. E. Multinuclear blue copper-proteins: the evolutionary design. **Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology**, v. 50, n. 3, p. 189–205, 2014.

MUTZ, K.-O.; HEILKENBRINKER, A.; LÖNNE, M.; WALTER, J.-G.; STAHL, F. Transcriptome analysis using next-generation sequencing. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 22–30, 2013.

NOVOZYMES. **Enzymes at work** (H. S. Damhus, T; Kaasgaard, S.; Olsen, Ed.), 2013. O'NEILL, C.; HAWKES, F. R.; HAWKES, D. L.; LOURENÇO, N. D.; PINHEIRO, H. M.; DELÉE, W. Colour in textile effluents – sources, measurement, discharge consents and simulation: a review. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 74, n. 11, p. 1009–1018, 1999.

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.

PASSARINI, M. R. Z.; OTTONI, C. A.; SANTOS, C.; LIMA, N.; SETTE, L. D. Induction, expression and characterisation 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.

PASSARINI, M. R. Z.; RODRIGUES, M. V. N.; DA SILVA, M.; SETTE, L. D. Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, n. 2, p. 364–370, 2011.

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

RAGHUKUMAR, C. Marine fungal biotechnology: an ecological perspective. **Fungal Diversity**, v. 31, p. 19–35, 2008.

RAGHUKUMAR, C.; D'SOUZA, T. M.; THORN, R. G.; REDDY, C. A. Lignin-modifying enzymes of *Flavodon flavus*, a basidiomycete isolated from a coastal marine environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 5, p. 2103–2111, 1999.

RAI, M.; PADH, H. Expression systems for production of heterologous proteins. **Corrent Science**, v. 80, n. 9, p. 1121–1128, 2001.

RATEB, M. E.; EBEL, R. Secondary metabolites of fungi from marine habitats. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 2, p. 290–344, 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-PIÑALES, R. A.;

- PEDROZA-RODRÍGUEZ, A. M.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; DELGADO-BOADA, J. M. Fungal laccases. **Fungal Biology Reviews**, v. 27, n. 3-4, p. 67–82, 2013.
- RODOVALHO, C. de M. Caracterização do transcriptoma de genoma mitocondrial da formiga cortadeira *atta laevigata* (formicidae: attini). Rio Claro, 2011. Tese de doutorado, 83f. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2011.
- RODRIGUEZ COUTO, S.; TOCA HERRERA, J. L. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. **Biotechnology Advances**, 2006.
- 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.
- SAKURAI, T.; KATAOKA, K. Basic and applied features of multicopper oxidases, cueo, bilirubin oxidase, and laccase. **Chemical Record**, v. 7, n. 4, p. 220–229, 2007.
- SALONY; GARG, N.; BARANWAL, R.; CHHABRA, M.; MISHRA, S.; CHAUDHURI, T. K.; BISARIA, V. S. 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.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York, 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 957f.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, a R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463–7, 1977.
- SINGH, P.; WANG, X.; LENG, K.; WANG, G. Diversity and ecology of marine-derived fungi. In: JONES, E.B.G.; PANG, K.-L. (Eds.). Marine fungi and fungal-like organisms. Berlin, De Gruyter, 2012. p. 383-408.
- SRIDHAR, K.R. Decomposition of materials in the sea. In: JONES, E.B.G.; PANG, K.-L. (Eds.). Marine fungi and fungal-like organisms. Berlin, De Gruyter, 2012. p. 475-500.
- SURGET-GROBA, Y.; MONTOYA-BURGOS, J. I. Optimization of de novo transcriptome assembly from next-generation sequencing data. **Genome Research**, v. 20, n. 10, p. 1432–1440, 2010.
- ULLRICH, R.; HUONG, L. M.; DUNG, N. L.; HOFRICHTER, M. 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. Prospecção de fungos derivados de esponjas marinhas na degradação/descoloração de poluentes ambientais. São Paulo, 2015. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo, 2015.
- VERMA, A. K.; RAGHUKUMAR, C.; VERMA, P.; SHOUCHE, Y. S.; NAIK, C. G.

Four marine-derived fungi for bioremediation of raw textile mill effluents.

Biodegradation, v. 21, n. 2, p. 217–233, 2010.

VITE-VALLEJO, O.; PALOMARES, L. A.; DANTÁN-GONZÁLEZ, E.; AYALA-CASTRO, H. G.; MARTÍNEZ-ANAYA, C.; VALDERRAMA, B.; FOLCH-MALLOL, J. 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.

WANG, W.; LIU, F.; JIANG, Y.; WU, G.; GUO, L.; CHEN, R.; CHEN, B.; LU, Y.; DAI, Y.; XIE, B. 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.

WEI, C.; TAO, X.; LI, M.; HE, B.; YAN, L.; TAN, X.; ZHANG, Y.; De novo transcriptome assembly of *Ipomoea nil* using Illumina sequencing for gene discovery and SSR marker identification. **Molecular Genetics and Genomics**, v.290, p. 1873-1884, 2015.

WU, J.; KIM, K.; LEE, J.; LEE, Y. Cloning , expression in *Escherichia coli* , and enzymatic properties of laccase from *Aeromonas hydrophila* WL-11. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, n. 4, p. 635–640, 2010.

XU, F.; BERKA, R. M.; WAHLEITHNER, J. a; NELSON, B. a; SHUSTER, J. R.; BROWN, S. H.; PALMER, a E.; SOLOMON, E. I. Site-directed mutations in fungal laccase: effect on redox potential, activity and pH profile. **The Biochemical journal**, v. 334, p. 63–70, 1998.

XU, F.; PALMER, A. E.; YAVER, D. S.; BERKA, R. M.; GAMBETTA, G. A.; BROWN, S. H.; SOLOMON, E. I. Targeted Mutations in a *Trametes villosa* Laccase. **Biochemistry**, v. 274, n. 18, p. 12372–12375, 1999.

YANG, J.; NG, T. B.; LIN, J.; YE, X. A novel laccase from basidiomycete *Cerrena* sp.: Cloning, heterologous expression, and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 77, p. 344–349, 2015.