

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA LACASE
AMARELA RECOMBINANTE DE *Leucoagaricus
gongylophorus*”**

JULIANA GOMES RODRIGUES*

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de
MESTRE EM QUÍMICA, área de
concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientador(a): Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza

*** bolsista CNPq**

**São Carlos - SP
2018**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Juliana Gomes Rodrigues, realizada em 26/04/2018:

Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza
UFSCar

Profa. Dra. Andrea Natri de Luca Batista
UFSCar

Profa. Dra. Mônica Rosa da Costa Iemma
UNIARA

Dedico este trabalho aos meus pais,

Ana e João.

“O maior inimigo do conhecimento não é a ignorância, é a ilusão do conhecimento”.

Stephen Hawking

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela oportunidade de conseguir realizar esse grande sonho, por me guiar até aqui e não deixar que eu desistisse de nada.

À Prof^a Dr^a. Dulce Helena Ferreira de Souza por me receber tão bem quando cheguei em São Carlos, pelo apoio, paciência, os ensinamentos, conselhos e todos os momentos compartilhados.

À Prof^a Dr^a Quezia Bezerra Cass pela colaboração, todas as discussões, os ensinamentos transmitidos e pela disponibilização do seu laboratório.

Aos meus amigos Ariele Moreira e Bruno Amaral pelas inúmeras conversas científicas ao longo desse tempo, por toda colaboração, pelos conhecimentos transmitidos, pela boa vontade e paciência sempre. Por compartilharmos tantos momentos e pela amizade construída.

Aos amigos do laboratório de Produtos Naturais, pelas conversas, apoio, risadas e todos os momentos: Jéssica Amaral, Marina Zequin, Marília Pires, Luciano (Bia), Luciano Pinto, Maria Clara Aguiar, Bárbara Denadae e Michelli Massaroli.

Aos amigos do laboratório Separare, pela ajuda e amizade: Welma (Bia), Alessandra Valverde, Juliana de Oliveira, Bianca (Bibi), Cleiton Leandro e Romário Pereira.

Aos amigos e colegas do do grupo LBFE Adriana Miranda, Kelli Miccoci, Mariana Fracola, Bruna Dionizio, Kátia Celina, Evandro Pietro e Paulo Adalberto por todas as discussões, pela convivência e pelos diversos momentos compartilhados.

À Prof^a Dr^a Elaine Rosechrer Carbonero, pelos conselhos, conversas, pelo incentivo, amizade e todos os ensinamentos transmitidos.

Aos meus pais Ana e João pela compreensão, apoio, incentivo, paciência, pelo amor e carinho, por nunca medirem esforços para me ajudar, por dizerem que nada é impossível e ao meu irmão pelo apoio.

Ao João Gabriel Junqueira, por todos os momentos compartilhados, pela paciência, carinho, amor, apoio nos momentos difíceis, compreensão, por acreditar em mim, por contribuir no meu crescimento pessoal e profissional, pelos conselhos e por tudo mesmo, muito obrigada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFSCar.

Aos professores do Departamento de Química da UFSCar pela convivência e conhecimento transmitido.

Às secretárias da pós-graduação: Ariane, Cristina e Luciani pelo apoio.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. 1: Representação do sítio ativo de uma lacase, com os sítios T1 a T3 e seus respectivos átomos de cobre.	5
FIGURA 1. 2: Representação do sítio ativo de uma MCO, com fluxo de elétrons.	6
FIGURA 1. 3: Estruturas químicas de alguns HPA's que são mais comumente estudados na literatura.....	12
FIGURA 1. 4: Jardim de fungo em branco de <i>L. gongylophorus</i> em ninho de <i>A. sexdens</i>	14
FIGURA 3. 1: Proposta de interação molecular entre proteína e os grupos funcionais da resina.....	30
FIGURA 3. 2: Mecanismo de reação da oxidação do ABTS	31
FIGURA 3. 3: Mecanismo de oxidação da seringaldazina.....	32
FIGURA 4.1: Alinhamento das sequências de aminoácidos das lacases LacRLg e LgLcc7.....	39
FIGURA 4. 2: Análise em gel de agarose 1% - Confirmação do clone através de amplificação do DNA.....	40
FIGURA 4. 3: Análise em gel de agarose 1%	41
FIGURA 4. 4: Descrição da inserção do plasmídeo recombinante na região específica 5' AOX no genoma de <i>Pichia pastoris</i>	42
FIGURA 4. 5: Análise em gel de agarose 1%.	43
FIGURA 4. 6: Colônias selecionadas com alta concentração do antibiótico zeocina.....	44
FIGURA 4. 7: Análise em SDS-PAGE da expressão de 24 horas das linhagens KM71H e X-33.....	46
FIGURA 4. 8: Atividade enzimática (U) da LacRLg, das colônias	46
FIGURA 4. 9: Análise em SDS-PAGE das eluições obtidas da purificação. LAC- extrato bruto aplicado na coluna.....	48

FIGURA 4. 10: Cromatograma obtido da eluição do extrato bruto enzimático aplicado em coluna Superdex 200.....	49
FIGURA 4. 11: SDS-PAGE de algumas frações eluídas da cromatografia de exclusão molecular	49
FIGURA 4. 12: Cromatograma obtido da eluição do <i>pool</i> enzimático aplicado em coluna Hidroxiapatita	50
FIGURA 4. 13: SDS-PAGE das frações eluídas da cromatografia de troca iônica, que apresentaram atividade para lacase	51
FIGURA 4. 14: Espectro de absorvância da LacRLg	52
FIGURA 4. 15: Membrana de nitrocelulose das amostras de LacRLg na presença dos detergentes Tween 20 e triton.....	53
FIGURA 4. 16: Cromatogramas dos experimentos para tempo de retenção de antraceno (A) e controle de antraceno (B).....	55
FIGURA 4. 17: Cromatogramas dos experimentos para tempo de retenção de fenantreno (A) e controle de fenantreno (B).....	56
FIGURA 4. 18: Cromatogramas dos experimentos para tempo de retenção de pireno (A) e controle de pireno (B).....	56
FIGURA 4. 19: Cromatogramas do experimento de decaimento de antraceno por 12 horas.....	57
FIGURA 4. 20: Cromatogramas do experimento de decaimento de fenantreno por 12 horas.....	57
FIGURA 4. 21: Cromatogramas do experimento de decaimento de pireno por 12 horas.	58
FIGURA 4. 22: Cromatogramas do experimento com 24 h de reação para antraceno e extração do produto de degradação	59
FIGURA 4. 23: Cromatogramas do experimento com 24 h de reação para fenantreno e extração do produto de degradação.....	60
FIGURA 4. 24: Cromatogramas dos experimentos com 24 h de reação com pireno e extração do produto de degradação.....	60

FIGURA 4. 25: Formação da 9,10-antraquinona através da oxidação por lacases fúngicas do antraceno.....	61
FIGURA 4. 26: Formação do fenantreno 9,10-quinona através da oxidação por lacases fúngicas do fenantreno.....	61
FIGURA 4. 27: Formação da 1,6-pirenoquinona e/ou a 1,8-pirenoquinona pela oxidação por lacases fúngicas do pireno.....	62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. 1: Lacases amarelas e seus organismos de origem.....	9
TABELA 3. 1: Programa do termociclador para as reações de amplificação da lacase.	20
TABELA 3. 2: Programa do termociclador para as reações de amplificação da lacase com oligonucleotídeos 5' e 3' AOX.	25
TABELA 3. 3: Composição do meio de crescimento de <i>P. pastoris</i> (BMGY).	26
TABELA 3. 4: Composição do meio de indução de expressão de <i>P. pastoris</i> (BMMY).....	26
TABELA 4. 1: Análise do rendimento das etapas de purificação da LacRLg, usando o substrato ABTS.....	52

RESUMO

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA LACASE AMARELA RECOMBINANTE DE *Leucoagaricus gongylophorus* - Lacases são enzimas que têm ampla gama de aplicações incluindo seu uso em biorremediação e têm sido descritas como multicobre oxidases que reduzem oxigênio à água enquanto oxidam compostos. Algumas lacases não apresentam absorvância a 600 nm e coloração azul, comum nessas enzimas e, por este motivo, são conhecidas como lacases amarelas. Uma característica importante das lacases amarelas é a capacidade de degradarem substratos não fenólicos na ausência de mediadores químicos. Contudo, a origem das diferenças entre lacases azuis e amarelas não é bem compreendida. Os objetivos deste trabalho foram expressar, purificar e caracterizar uma lacase amarela recombinante (LacRLg) a partir de uma biblioteca de cDNA de *Leucoagaricus gongylophorus*, o fungo simbiote de formigas cortadeiras. Partindo do clone da biblioteca de cDNA, a ORF referente a lacase foi clonada no vetor de expressão pPICZ α A, obtendo-se o clone pPICZ α A-Lac que foi transformado em três linhagens da levedura *Pichia pastoris*, X-33, KM71H e GS115. Este sistema mostrou-se eficiente para expressar a enzima na sua forma solúvel e ativa, sendo que uma colônia da linhagem X-33, apresentou-se mais efetiva na expressão da enzima. LacRLg foi expressa no meio extracelular e purificada em coluna de exclusão molecular, seguida de coluna de troca iônica. A enzima recombinante tem massa molecular aparente de aproximadamente 66 kDa, como avaliada por SDS-PAGE. LacRLg não absorve luz a 600 nm e, conseqüentemente, não apresenta coloração azul, podendo ser classificada como uma lacase amarela. A enzima apresentou atividade catalítica frente ao substrato seringaldazina, específico para lacases. O extrato enzimático foi utilizado para avaliar o potencial de degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPA's) na ausência de mediadores. Os HPA's são poluentes orgânicos persistentes e sua degradação tem importância na manutenção do meio ambiente. A capacidade de degradação dos HPA's pela LacRLg foi avaliada frente aos compostos antraceno, fenantreno e pireno em sistema LC com detector de UV-Vis e SPD M10A. LacRLg foi capaz de degradar, em 24 horas, 95% do antraceno, 87% do fenantreno e 88% do pireno. Os resultados sugerem que esta enzima, por apresentar capacidade de degradar HPA's na ausência de mediadores, possui potencial uso em processos de biorremediação.

Palavras-Chave: Lacase amarela, *Leucoagaricus gongylophorus*, biorremediação, enzima recombinante, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.

ABSTRACT

OBTENTION AND CHARACTERIZATION OF A RECOMBINANT YELLOW LACCASE FROM *Leucoagaricus gongylophorus* - Laccases are enzymes that have a wide range of applications including their use in bioremediation. These enzymes have been described as multi copper oxidases that reduce oxygen to water while oxidizing compounds. Some laccases not present absorbance at 600 nm and blue color which are common in these enzymes and, for this reason, they have been denominated yellow laccases. An important feature of yellow laccases is the ability to degrade non-phenolic substrates in the absence of chemical mediators. However, the origin and structural factors that differentiate the blue and yellow laccases are not well understood. The objectives of this work were to express, purify and characterize a recombinant yellow laccase (LacRLg) from a cDNA library of *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiont fungus of leaf cutting ants. From the clone of the fungus cDNA library, the laccase ORF was cloned into the pPICZ α A expression vector, resulting in the clone pPICZ α A-Lac which was transformed into three strains of the yeast *Pichia pastoris*, X-33, KM71H and GS115. This system proved to be efficient in expressing the enzyme in soluble and active form, and a colony of the X-33 lineage was more effective in the expression of the enzyme. LacRLg was expressed in the extracellular medium and purified on a molecular exclusion column, followed by an ion exchange column. The recombinant enzyme has an apparent molecular mass of approximately 66 kDa as assessed by SDS-PAGE. LacRLg does not absorb light at 600 nm and therefore does not show blue coloration and can be classified as a yellow laccase. The enzyme presented catalytic activity against syringaldazine, considered a specific substrate for laccases. The enzymatic extract was used in to evaluate the potential of degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (HPA's) in the absence of mediators. HPA's are organic pollutants of persistence and their degradation plays a role in maintaining the environment. The degradability of HPA's by LacRLg was evaluated against the anthracene, phenanthrene and pyrene in a LC system to UV-Vis detector and SPD M10A. LacRLg was able to degrade, in 24 hours, 95% of anthracene, 87% of phenanthrene and 88% of pyrene. These results suggest that this enzyme, due to its ability to degrade HPA's in the absence of chemical mediators, has potential use in bioremediation processes.

Keywords: Yellow laccase, *Leucoagaricus gongylophorus*, bioremediation, recombinant enzyme, polycyclic aromatic hydrocarbons.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO	1
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 LACASES.....	2
1.2 LACASES AMARELAS.....	7
1.3 APLICAÇÃO DAS LACASES EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS E INDUSTRIAIS	10
1.4 HPA's.....	11
1.5 BIORREMEDIAÇÃO	13
1.6 O FUNGO <i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	14
OBJETIVOS.....	16
2. OBJETIVOS	17
METODOLOGIA	18
3. METODOLOGIA	19
3.1. OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DA LACRLG	19
3.1.1 Transformação do clone pPICZ α A-Lac nas linhagens KM71H, GS115 e X-33 de <i>P. pastoris</i>	20
3.1.2 Seleção das colônias transformantes com boa expressão da LacRLg.....	23
3.1.3 Expressão em pequena escala da LacRLg	25
3.1.4 Expressão em maior escala da LacRLg	27
3.1.5 Purificação da LacRLg.....	27
3.2. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL.....	29
3.2.1 Ensaio de atividade catalítica	29
3.2.2 Análises de imunoensaio (<i>western blotting</i> e <i>dot blot</i>)	32
3.2.3 Determinação da massa molecular e concentração	33
3.2.4 Caracterização espectroscópica	33
3.2.5 Estudo do potencial de degradação frente a Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos	33
RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38

4.1 OBTENÇÃO, ANÁLISE E CONFIRMAÇÃO DO CLONE PPICZAA-LAC.....	38
4.2 TRANSFORMAÇÃO E EXPRESSÃO DA LACRLG NAS LINHAGENS X-33, KM71H E GS115	41
4.2.1 Expressão da LacRLg em pequena e maior escala.....	43
4.3 PURIFICAÇÃO DA ENZIMA LACRLG	47
4.3.1 Cromatografia de afinidade contendo níquel.....	47
4.3.2 Cromatografia de exclusão molecular	48
4.3.3 Cromatografia de troca iônica.....	50
4.3.4 Caracterização espectroscópica	53
4.3.5 Análises de imunoenaios (<i>western blotting</i> e <i>dot blot</i>).....	53
4.4 ESTUDOS DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO FRENTE A HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS	54
CONCLUSÕES	64
5. CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos há uma preocupação com a grande e crescente concentração de poluentes e produtos químicos disseminados no meio ambiente, como metais pesados, pesticidas, HPA's, corantes orgânicos, entre outros. Os mesmos vêm sendo liberados das mais diversas fontes e geralmente são tóxicos, carcinogênicos e comumente tem duração estável, sendo acumulativos.

Atualmente a erradicação desses poluentes, bem como seu tratamento, consistem em um grande problema para os cientistas ambientais. Os métodos atuais de tratamento, por exemplo a incineração, não têm sido eficazes, possuem um alto custo e podem formar numerosos derivados (SHARMA, DANGI e SHUKLA, 2018). Diante desse contexto, diversas técnicas vêm sendo desenvolvidas para amenização e remoção desses poluentes. Uma delas é a biorremediação, a qual se baseia no uso de microrganismos e suas enzimas para transformar e/ou remover esses contaminantes.

Dentre as várias enzimas envolvidas em processos de biorremediação, SHARMA, DANGI e SHUKLA (2018) citam as lacases como já sendo utilizadas com esta finalidade. Com o uso destas enzimas, obtêm-se a água como único subproduto da reação e, por esse motivo, as lacases são consideradas uma das enzimas mais verdes do século 21 (PEZZELLA et al., 2017).

1.1 LACASES

As lacases (*p*-difenol-dioxigênio oxidoredutases; EC 1.10.3.2) são um dos grupos de enzimas mais antigas já descritas (DAROCH et al., 2014). Pertencem a classe das enzimas oxidativas, sendo do grupo das polifenol-

oxidases as quais acoplam a oxidação de um extenso espectro de substratos orgânicos e alguns substratos inorgânicos, simultaneamente com a redução do oxigênio molecular a água (KUNAMNENI et al., 2008; PEZZELLA, 2017; RIVERA-HOYOS et al., 2013). São normalmente distribuídas em plantas e fungos, sendo também encontradas em alguns insetos e bactérias (BABU, PINNAMANENI e KOONA 2012; KUNAMNENI et al., 2008; MADHAVI e LELE, 2009) e suas funções variam de acordo com o organismo de origem.

Considerando a ampla distribuição das lacases na natureza, sugere-se o envolvimento dessas enzimas em variados processos biológicos importantes, dentre os quais se destaca a reciclagem da matéria orgânica através da construção e degradação da lignina. Diante desse contexto, tem-se proposto que as lacases produzidas por plantas atuam nas etapas iniciais de formação da lignina (BAO et al., 1993). Para as lacases fúngicas, têm-se atribuído o papel de deslignificação, formação do corpo de frutificação, a produção de pigmentos e o envolvimento nos mecanismos de detoxificação (THURSTON, 1994). Em insetos, as lacases têm sido relacionadas à síntese de quitina. Nas bactérias, têm-se atribuído às lacases funções relacionadas à pigmentação e resistência à patogênese (CAÑAS e CAMARERO, 2010; CLAUS, 2003).

Das lacases descritas na literatura, a maior parte é do reino fungi e dentro deste reino o filo dos basidiomicetos são os produtores mais relevantes (MADHAVI e LELE, 2009).

Mesmo possuindo estruturas semelhantes, as lacases descritas variam em relação à sua temperatura e pH ótimos e também apresentam uma extensa gama de potencial redox. O potencial redox está diretamente relacionado com a degradação do substrato pela lacase, ou seja, sua particularidade e capacidade de degradar diferentes substratos. Quanto mais elevado o potencial redox de uma lacase, maior será a variedade de substratos oxidados (PEZZELLA et al., 2017). As lacases com os maiores valores de

potencial redox, ou seja, as mais eficientes, são descritas em fungos (AVELAR et al., 2017).

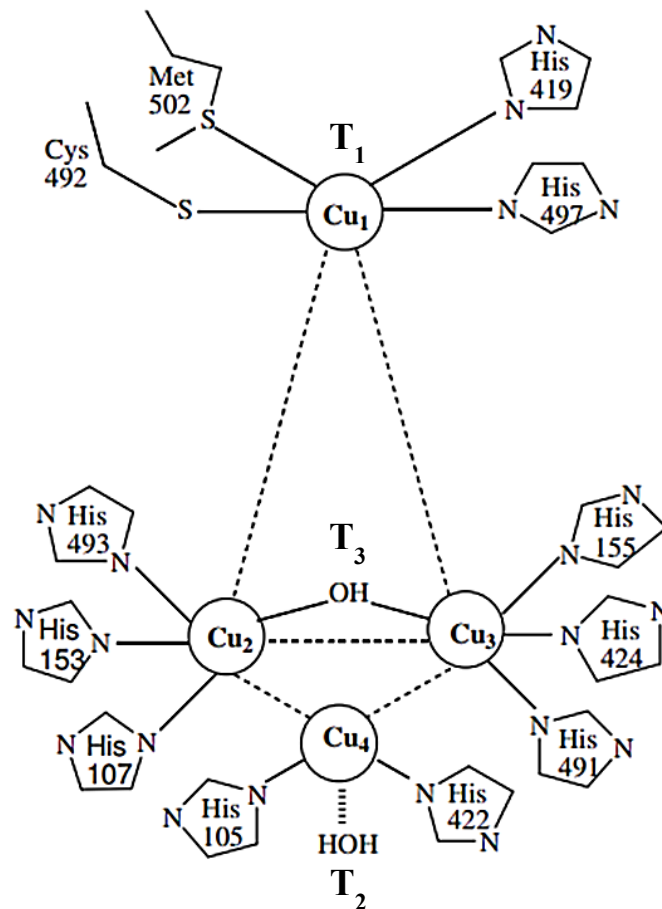
A grande maioria das lacases de origem fúngica apresenta massa molecular variando de 60 a 100 kDa e geralmente são monoméricas (BALDRIAN, 2006). São glicoproteínas nas quais entre 10 e 50 % do seu peso molecular é devido a glicosilação, a qual depende da sua espécie ou seu hospedeiro heterólogo (KUNAMMENI et al., 2008). A glicosilação, entre outros fatores, é o fator responsável pela estabilidade térmica e retenção de cobre da enzima. Geralmente, essas enzimas são extracelulares, sendo assim estáveis e de fácil purificação (BABU, PINNAMANENI e KOONA, 2012; MADHAVI e LELE, 2009).

De acordo com IHSEN e colaboradores (2015), as lacases são o maior subgrupo da superfamília das multicobre oxidases (MCOs). As MCOs contêm geralmente quatro átomos de cobre por molécula. Os átomos de cobre são classificados em três sítios distintos os quais são denominados como T1, T2 e T3 e estão diretamente relacionados com a atividade catalítica da enzima. A presença do átomo de cobre localizado no sítio T1 (Cu1) é responsável pela coloração azul, que é característica de algumas lacases e por este motivo essas enzimas são denominadas lacases azuis. O sítio T2 abriga um átomo de cobre (Cu4) e o T3 abriga dois átomos sendo eles (Cu2) e (Cu3), exemplificados na FIGURA 1.1.

Através de espectros UV/Visível e de ressonância paramagnética eletrônica (EPR), é possível classificar os átomos de cobre e, conseqüentemente, o tipo de lacase. O cobre tipo I localizado em T1, apresenta uma forte absorção eletrônica em UV/Visível em 600 nm; o tipo II localizado em T2 não contribui para cor e o cobre tipo III localizado em T3, que é constituído por um par de átomos de cobre, apresenta uma fraca absorção perto do espectro de UV. Os átomos de cobre localizados em T1 e T2 são detectados por EPR, mas o par presente em T3 não apresenta sinal (BADU,

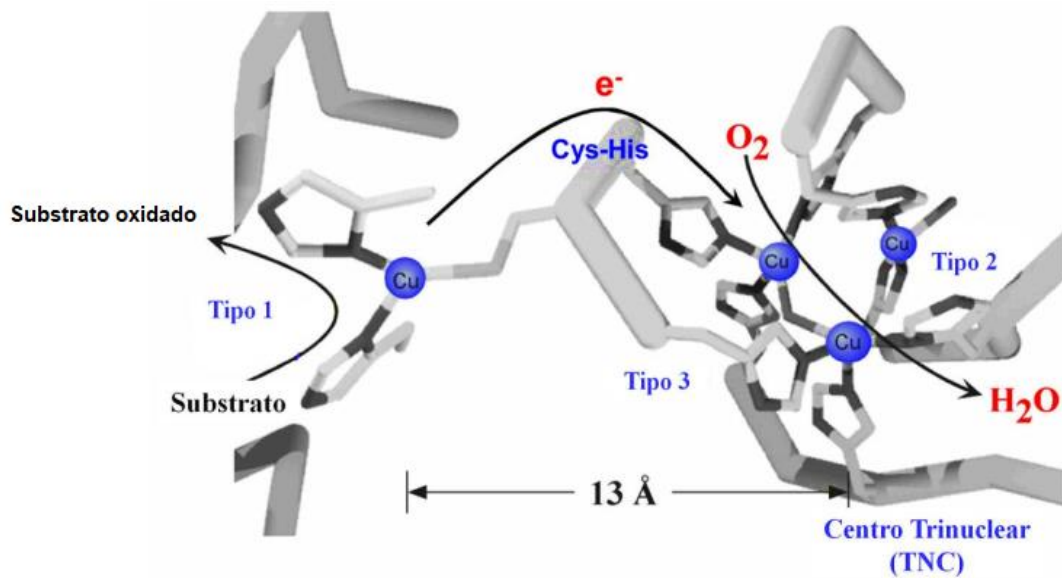
PINNAMNENI e KOONA 2012; BALDRIAN, 2006; MADHAVI e LELE, 2009).

FIGURA 1. 1: Representação do sítio ativo de uma lacase, com os sítios T1 a T3 e seus respectivos átomos de cobre. Figura extraída e adaptada de KUNAMMENI e colaboradores (2008).



A oxidação do substrato no sítio catalítico da enzima ocorre primeiramente no sítio T1, pelo átomo Cu1. O mesmo atua comoceptor primário de elétrons, sendo então reduzido pelo substrato, que, portanto, é oxidado. O elétron então é transferido internamente para o centro trinuclear (T2 e T3), através do peptídeo His-Cys-His altamente conservado nas MCOs. A molécula de O₂ ligada ao *cluster* trinuclear com os átomos de cobre, é então reduzida à água, como está representado na FIGURA 1.2 (KUNAMMENI et al., 2008; IHSEN et al., 2015; BALDRIAN, 2006).

FIGURA 1. 2: Representação do sítio ativo de uma MCO, com fluxo de elétrons. Figura extraída e modificada de SOLOMON e colaboradores (2010).



A variedade de compostos que podem ser oxidados pelas lacases é muito ampla sendo que, em sua grande maioria, são compostos fenólicos como polifenóis, fenóis metoxi-substituídos e aminas aromáticas (RIVERA-HOYOS et al., 2013).

Entretanto, sabe-se que alguns substratos de relevância não conseguem ser oxidados diretamente pelas lacases, seja pelo seu excessivo tamanho não sendo introduzidos efetivamente no sítio catalítico da enzima, ou por apresentarem um elevado potencial redox. Apesar disso, estes e outros substratos podem ser oxidados pela inclusão dos chamados mediadores químicos (mediadores redox), como o 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolino ácido-6-sulfônico), o ABTS, os quais são compostos orgânicos de baixa massa molecular.

Os mediadores, como o próprio nome sugere, são capazes de atuar como substratos intermediários, que nas suas formas oxidadas interagem com os substratos não oxidados diretamente pelas lacases. Assim, através do uso destes mediadores é possível aumentar a abrangência das substâncias oxidadas (KUNAMNENI et al., 2008; MADHAVI e LELE, 2009; RIVERA-HOYOS et al., 2013).

Contudo, é conhecido que algumas lacases são capazes de degradar substratos mesmo na ausência dos mediadores e essas enzimas têm sido chamadas de lacases amarelas.

1.2 LACASES AMARELAS

Além da capacidade de oxidar substratos não fenólicos mesmo na ausência de mediadores, as lacases amarelas não possuem absorção a 600 nm e, conseqüentemente, não apresentam a coloração azulada (ADEMAKINWA e AGBOOLA, 2016; CHAURASIA, YADAV e YADAVA, 2014; DAROCH et al., 2014; MOT et al., 2012).

Ao contrário das lacases azuis, que são estudadas há muitos anos, ainda há poucos estudos sobre lacases amarelas, sendo estas ainda não totalmente compreendidas. A TABELA 1.1, mostra um levantamento bibliográfico dos trabalhos reportados na literatura sobre lacases amarelas e seus organismos de origem, até o presente momento.

TABELA 1. 1: Lacases amarelas e seus organismos de origem.

Lacase amarela - Origem	Referência
<i>Panus tigrinus</i>	Leontievsky et al. 1997.
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Pozdnyakova, Rodakiewics-Nowak e Turkovskaya 2004.
<i>Trametes hirsuta</i>	Haibo et al. 2009.
<i>Ganoderma fornicatum</i> expressa em <i>Pichia pastoris</i>	Huang et al. 2011.
<i>Scletotinia sclerotiorum</i>	Mot et al. 2012.

<i>Lentinus squarrosulus</i>	Mukhopadhyay e Banerjee 2014.
<i>Stropharia aeruginosa</i>	Daroch et al. 2014.
<i>Trametes hirsuta</i>	Chaurasia, Yadav e Yadava 2014.
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Chen et al. 2015.
<i>Leucoagaricus gongylophorus</i>	Ike et al., 2015.
<i>Aureobasidium pullulans</i>	Ademakinwa e Agboola, 2016.
<i>Daedalea flavida</i>	Sharma et al. 2016.
<i>Leucoagaricus naucinus</i>	Ning et al. 2016.
<i>Cyathus bulleri</i>	Vats e Mishra 2018.
<i>Staphylococcus arlettae</i>	Chauhan, Goradia e Jha 2018.
<i>Trametes trogii</i>	Wang et al. 2018.

A principal diferença conhecida entre as duas enzimas é a ausência de absorbância a 600 nm sempre encontrada nas lacases azuis, referente ao átomo de Cu1 no sítio T1, como já descrito, além da sua capacidade de degradar substratos na ausência dos mediadores químicos (ADEMAKINWA e AGBOOLA, 2016).

Os primeiros estudos acerca dessas enzimas postularam que uma lacase amarela poderia ser oriunda da ligação de produtos de degradação de lignina no sitio ativo de uma lacase azul, o que modificaria a esfera de coordenação do Cu 1 afetando a absorbância a 600 nm. Além disso, essas moléculas (produtos de degradação da lignina) poderiam atuar como

mediadores químicos eliminando, portanto, a necessidade de adição de outro mediador (LEONTIEVSKY et al., 1997).

No entanto, quando houve a expressão da primeira lacase amarela recombinante em *Pichia pastoris* a mesma foi expressa em um meio de cultura livre de lignina e/ou compostos aromáticos e não apresentou absorção a 600 nm, sendo neste trabalho caracterizada com uma lacase amarela (HUANG et al., 2011). Diante disso, a lacase amarela expressa de forma heteróloga deixou indefinida a hipótese de que era necessário algum tipo de lignina (ou mediador) no sítio catalítico para existência de lacases amarelas (DAROCH et al., 2014).

Em uma publicação de MATE et al. (2013), lacases recombinantes, selvagem (azul) e mutante (amarela), do basidiomiceto PM1 foram caracterizadas. Os autores sugerem que a mutação A461T na lacase amarela pode dar origem a uma ligação de hidrogênio com Phe 460, a qual está ligada à Cys 450. Sugere-se que esta mudança pode afetar a geometria global do Cu1 e, conseqüentemente, sua absorbância em 600 nm. Propõe-se também que a mutação S426N pode ocasionar a quebra de uma ligação de hidrogênio com Gly 428 e estabelecer uma nova ligação de hidrogênio com o aminoácido adjacente Trh 427. Do mesmo modo, isso também pode alterar a esfera de coordenação do Cu1 e a coloração azul.

No entanto, DAROCH et al. (2014) analisaram diversas sequências de lacases azuis e amarelas, incluindo as lacases estudadas por MATE e colaboradores (2013), e verificaram que as mutações citadas ocorrem tanto em lacases amarelas como em azuis. Portanto, esse fator não implicaria nas diferenças entre as duas classes de lacases. Estudos de alinhamentos de sequências depositadas em banco de dados de lacases azuis e amarelas (DAROCH et al., 2014; IKE et al., 2015) apontam que não há diferenças significativas na estrutura primária dessas enzimas que possam explicar suas diferenças espectroscópicas e de especificidade enzimática.

Como já discutido, verifica-se que ainda não existe um consenso sobre a origem e fatores estruturais que diferenciem as lacases amarelas das lacases azuis. Os estudos disponíveis acerca deste assunto ainda são escassos, sendo que até o presente momento não há nenhuma estrutura tridimensional de lacase amarela depositada em banco de dados. Deste modo, mais estudos são necessários para que se estabeleçam os fatores que dão origem às diferenças observadas entre as lacases azuis e amarelas.

1.3 APLICAÇÃO DAS LACASES EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS E INDUSTRIAIS

As enzimas são, em geral, catalisadores muito eficientes sendo que a velocidade das reações pode aumentar cerca de 10^8 vezes devido à catálise. Ademais, diferente de outros catalisadores, os metais pesados por exemplo, enzimas são biocatalisadores completamente degradados no meio ambiente (DAS e ROSAZZA, 2006).

A baixa especificidade das lacases oferece grande interesse em diversas aplicações com potencial biotecnológico. Propósitos promissores incluem o uso dessas enzimas na oxidação de compostos fenólicos clorados, na remoção de cor de corantes sintéticos industriais, na degradação de pesticidas, de HPA's, e também no tratamento de águas residuais (BABU, PINNAMANENI e KOONA, 2012; RIVERA-HOYOS et al., 2013). Além disso, as lacases têm aplicações industrialmente importantes como branqueamento de celulose, melhoria de alimentos, síntese de polímeros, desenvolvimento de biossensores e biocombustíveis, dentre outras aplicações (BALDRIAN, 2006; KUNAMNENI et al., 2008; MADHAVI e LELE, 2009).

É descrito que as lacases amarelas apresentam um alto potencial redox e que isso lhes permitem oxidar compostos na ausência dos mediadores (CHAURASIA, YADAV e YADAVA, 2014; MOT et al., 2012).

KADRI et al. (2017) cita que, de maneira geral, os fungos são capazes de degradar HPA's, principalmente por produzirem enzimas hidrolíticas extracelulares com baixa especificidade de substrato. As últimas pesquisas realizadas mostram que as enzimas extracelulares destes fungos, como lacases, são responsáveis pela degradação dos HPA's.

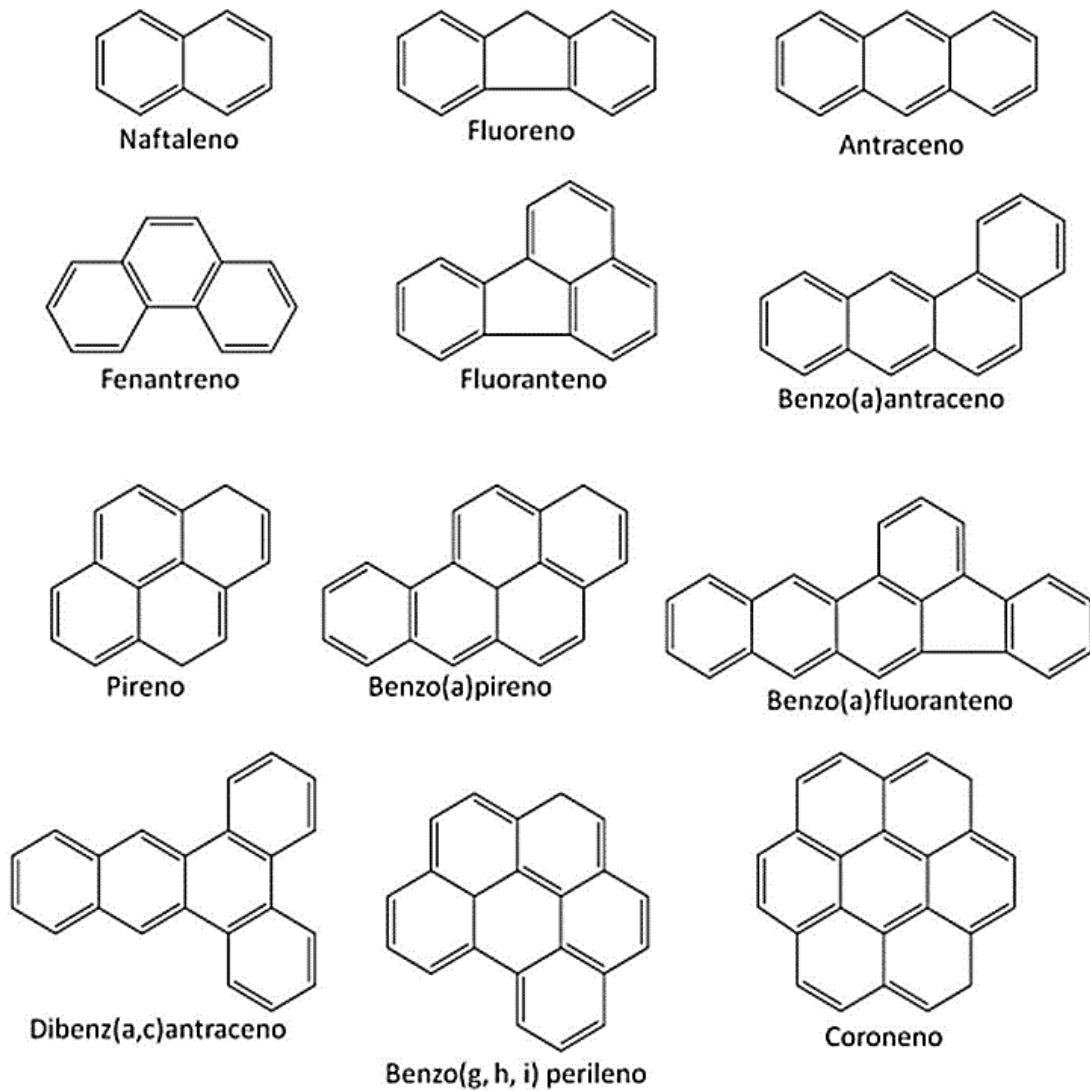
1.4 HPA's

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPA's) são um grande grupo de compostos orgânicos que consistem em dois ou mais anéis de benzeno fundidos em arranjos lineares, angulares ou agrupados. Originam-se principalmente da combustão incompleta de combustíveis fósseis, como o carvão e petróleo e outros materiais orgânicos. Os HPA's são hidrofóbicos, com pouca ou nenhuma solubilidade aquosa e por isso tendem a se associar com partículas e se adsorver em diversos materiais. Existem vários estudos relatando a presença dos mesmos em solos, águas, produtos petrolíferos e até em amostras de alimentos (KADRI et al., 2017; LAN et al., 2016; NCUBE et al., 2018).

Segundo LAN e colaboradores (2016) os HPA's são poluentes ambientais persistentes e estão relacionados a carcinogenicidade, mutagenicidade e toxicidade. Os HPA's são lipossolúveis, sendo assim prontamente absorvidos pelas células no organismo humano, seja por inalação, exposição oral ou dermal. Casos de câncer no pulmão, intestino e outros já foram relatados, devido à presença desses compostos no organismo.

Existem mais de 100 HPA's reconhecidos pela IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). A FIGURA 1.3 ilustra alguns dos HPA's comumente estudados na literatura (ARAUJO et al., 2016; JACQUES et al., 2007).

FIGURA 1. 3: Estruturas químicas de alguns HPA's que são mais comumente estudados na literatura



Uma maneira de remover os HPA's do meio ambiente é através da biorremediação. Esta ferramenta biotecnológica vem sendo amplamente utilizada e já é bastante implementada em diversos países. Como exemplo, a BioRangers, Inc. criada em 1998 no Japão, é uma empresa que utiliza microrganismos para remediar solos e águas subterrâneas contaminadas com petróleo ou compostos orgânicos voláteis.

1.5 BIORREMEDIAÇÃO

Ultimamente, a remoção ou a degradação de poluentes é um grande problema para cientistas ambientais. Os métodos químicos, físicos e biológicos existentes como despejo ou incineração, não se mostram muito efetivos, tem alto custo, menor eficácia e formação de derivados persistentes (SHARMA, DANGI e SHUKLA, 2018).

A biorremediação proporciona uma forma muito menos tóxica de degradação desses contaminantes para o meio ambiente. É uma técnica que se baseia no uso de microrganismos ou suas enzimas para transformar e/ou remover poluentes. Segundo DZIOŃEK, WOJCIESZYŃSKA e GUZIK (2016), a biorremediação é um método menos dispendioso que os convencionais, ecológico, eficaz e seguro sendo um processo mais inofensivo para o meio ambiente.

Dos diferentes tipos existentes, a biorremediação microbiológica se utiliza de fungos ou bactérias enquanto que o uso de plantas é conhecido como fitorremediação. Atualmente, também é empregada a biorremediação enzimática, baseada em enzimas isoladas de células, sendo uma abordagem fácil, rápida, eco amigável e socialmente aceitável (SHARMA, DANGI e SHUKLA, 2018).

Várias enzimas estão envolvidas nesses processos, como as lacases, hidrolases e peroxidases. No entanto, a disponibilidade dessas enzimas no seu organismo natural pode ser escassa. Os avanços na tecnologia do DNA recombinante como organismos geneticamente modificados (OGMs), que produzem proteínas recombinantes, podem acelerar os processos de biorremediação (SHARMA, DANGI e SHUKLA, 2018).

1.6 O FUNGO *Leucoagaricus gongylophorus*

Leucoagaricus gongylophorus é um fungo que vive em simbiose com as formigas cortadeiras *Atta sexdens* (saúva) e *Acromyrmex* (quenquéns). A simbiose entre essas espécies de formiga e seu fungo foi objeto de muitos estudos, entre os quais os aspectos bioquímicos estão em relevância porque uma das razões para a interação é o suprimento de enzimas fúngicas às formigas, incluindo enzimas digestivas (SILVA et al., 2006). A FIGURA 1.4 mostra o “jardim de fungo” (em branco) em um ninho de *A. sexdens*.

FIGURA 1. 4: Jardim de fungo em branco de *L. gongylophorus* em ninho de *A. sexdens*. Extraído e modificado de: <http://waynesword.palomar.edu/ww0504.htm>, acesso em: 31/03/2016.



A relação simbiótica entre *A. sexdens* e *L. gongylophorus* tem sido bastante estudada e algumas características desta relação já são conhecidas. As formigas proporcionam para o fungo simbiótico uma variedade de substratos que estimulam o crescimento do fungo (SILVA et al., 2003). As formigas também têm um papel essencial na proteção do fungo contra parasitas microbianos e potenciais competidores. Por outro lado, o fungo é uma fonte essencial de alimento para as formigas e a única fonte de nutrientes para as larvas de todas as espécies de formigas cortadeiras (RICHARD et al., 2005).

O grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica Funcional e Estrutural (LBFE) tem desenvolvido, em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Odair Correa Bueno (Centro de Estudos de Insetos Sociais do Instituto de Biociências de Rio Claro da UNESP), estudos com enzimas das classes das xilanases, poligalacturonases e lacases oriundas do fungo *L. gongylophorus* (ADALBERTO et al., 2012; ADALBERTO et al., 2016; IKE et al., 2015; MOREIRA et al., 2014, MOREIRA et al., 2017).

Com o objetivo de avaliar os transcritos do fungo, foi construída uma biblioteca de cDNA e do seu sequenciamento foi verificado um clone com identidade sequencial para lacase (GOLFETO, 2014). Paralelamente, foram desenvolvidos estudos de isolamento de lacases nativas do fungo e duas lacases foram isoladas (IKE, 2015). Uma dessas enzimas foi caracterizada como uma lacase amarela, possuindo a capacidade de oxidar antraceno à antraquinona mesmo na ausência de mediadores químicos (IKE et al., 2015). Portanto, motivados pela ausência de informação estrutural de lacases amarelas e munidos dessas informações, propomos neste trabalho a obtenção da lacase recombinante, oriunda do clone da biblioteca de cDNA do *L. gongylophorus*.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Os objetivos do projeto de mestrado foram produzir, purificar e caracterizar a enzima recombinante LacRLg, uma possível lacase amarela do fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, simbiote de formiga cortadeira. Também foi objetivo deste trabalho verificar sua aplicação com potencial biotecnológico na degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos.

METODOLOGIA

3. METODOLOGIA

3.1. OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DA LACRLG

A partir de uma biblioteca de cDNA de *L. gongylophorus* foi obtido no Laboratório de Bioquímica Funcional e Estrutural do Departamento de Química da UFSCar um clone com identidade sequencial para uma lacase (IKE, 2015). Partindo-se deste clone, a ORF foi subclonada no vetor pPICZ α A, gerando o vetor pPICZ α A-Lac (IKE, 2015), que foi utilizado no presente trabalho.

As células DH5 α de *Escherichia coli* anteriormente transformadas com o plasmídeo pPICZ α A-Lac, armazenadas no freezer a - 80 °C foram plaqueadas em 25 mL de meio LB (Luria-Bertani) *low salt agar* (triptona 1 % (m/v), extrato de levedura 0,5 % (m/v), cloreto de sódio 0,5 % (m/v), ágar 1,5 % (m/v) com pH 7,5), acrescido com o antibiótico zeocina (100 μ g mL⁻¹) e incubadas por 16 horas a 37°C. Em seguida, colônias selecionadas foram inoculadas no mesmo procedimento em meio LB (Luria-Bertani) *low salt* sem ágar (10 mL) a 250 rpm, na presença do antibiótico zeocina 100 μ g mL⁻¹, por 16 horas a 37°C.

Os inóculos gerados foram centrifugados a 6.700 g, por 10 minutos a 25°C para posterior extração do DNA plasmidial das células crescidas, de acordo com o manual *Illustra plasmidPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare) e as amostras recolhidas foram analisadas em gel de agarose 1%. A confirmação dos clones positivos foi feita por reação da polimerase em cadeia (PCR – *Polymerase chain reaction*), a qual foi montada conforme as especificações da enzima *Taq DNA polymerase* (Thermo Scientific). Essas reações foram realizadas em um termociclador da marca Eppendorf, o qual foi programado de acordo com a TABELA 3.1, onde as etapas marcadas se repetem trinta vezes por ciclo. O DNA molde utilizado na reação foi o DNA plasmidial extraído

(pPICZ α A-Lac) utilizando os mesmos oligonucleotídeos empregados anteriormente na amplificação do inserto (IKE, 2015):

5'gcgGAATTCTCGACTTGTTCTCAAACCTCTCACTGTCGCGAACGCG3'
 3'gcgGCGGCCGCggatccacgcggaaccagCGCAGAGGTTGAGTTCGGATGTG 5'

Posteriormente à amplificação da ORF da lacase, cerca de 0,1 μ g do clone selecionado foi digerido com as endonucleases de restrição *EcoR* I com sítio de restrição (G↓AATTC) sublinhado na fita sense (5'→3') e *Not* I (GC↓GGCCGC) sublinhado na fita antisense (3'→5') (Thermo Scientific), de acordo com o protocolo do fabricante.

TABELA 3. 1: Programa do termociclador para as reações de amplificação da lacase.

Etapa	Temperatura	Tempo
Início	94 °C	5 minutos
* Desnaturação	94 °C	1 minuto
* Anelamento	68 °C	1 minuto
* Extensão	72 °C	1 minuto
Finalização	72 °C	10 minutos

*30 vezes por ciclo

3.1.1 Transformação do clone pPICZ α A-Lac nas linhagens KM71H, GS115 e X-33 de *P. pastoris*.

Após os experimentos anteriores, foi possível selecionar o melhor clone de pPICZ α A-Lac, onde a amostra selecionada foi inoculada em 1 L de meio LB (Luria-Bertani) *low salt*, de acordo com o procedimento citado previamente. Em seguida, prosseguiu-se com a extração de DNA plasmidial em maior escala de acordo com o protocolo *PureYield Plasmid Maxiprep*

System (Promega). A fim de ser utilizado como controle negativo, o mesmo procedimento foi realizado para o vetor de expressão em *P. pastoris*, pPICZ α A.

O vetor de expressão pPICZ α A proporciona a expressão e secreção de uma proteína de interesse na levedura anaeróbica facultativa e metilotrófica *P. pastoris*, ou seja, que é capaz de metabolizar metanol como única fonte de carbono. Esta levedura utiliza uma via específica para o metabolismo do metanol, onde as enzimas álcool oxidase (AOX), catalase e di-hidroxiacetona sintase estão envolvidas no processo. A enzima AOX é codificada pelos genes AOX 1 e AOX 2, (SILVA, PERES e GATTÁS, 2009) sendo que o principal promotor, altamente regulado e essencial responsável pela atividade da enzima álcool oxidase, é o AOX 1 (FEITOSA, 2014).

Segundo PENNELL e ELDIN (1998), cerca de 95% da atividade da enzima álcool oxidase em *P. pastoris* é devido ao promotor AOX1. Esta enzima catalisa a oxidação do metanol a formaldeído e peróxido de hidrogênio. Posteriormente, a catalase degrada o peróxido em oxigênio e água. O formaldeído é oxidado para formiato e dióxido de carbono, através de enzimas desidrogenases e é usado tanto para obtenção de energia, quanto para obtenção de biomassa (SILVA, PERES e GATTÁS, 2009; SILVA, 2010).

Com o intuito de expressar a proteína recombinante em células de *P. pastoris*, o clone selecionado pPICZ α A-Lac, bem como o controle negativo pPICZ α -A, foram linearizados com a enzima de restrição *Sac* I. Nesse método 8 μ g do DNA plasmidial de ambos vetores foram incubados com 9 U da enzima *Sac* I (Thermo Scientific) durante 16 horas à 37°C.

Após serem linearizados, ambos o clone e controle foram purificados através da adição de clorofórmio (1:1, v/v), sendo homogeneizados com agitação e, em seguida, centrifugados por 2 minutos a 15000 g. A fase superior foi transferida para um tubo de 1,5 mL e o DNA foi então precipitado

com 1 volume de acetato de sódio 3 M gelado para cada 10 volumes de DNA. Neste precipitado foram adicionados 2,5 volumes de etanol 100% gelado e a amostra foi mantida a -20°C por 16 horas. Decorrido este tempo, a mistura foi centrifugada por 20 minutos, a 4°C e 15000 g. O sobrenadante formado foi então descartado e 1 mL de etanol 70% gelado foi adicionado e centrifugado no mesmo procedimento por 2 minutos. Novamente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado encubado por 30 minutos a 37°C para que o solvente fosse evaporado. Após esse processo, o DNA então linearizado e purificado por ressuspensão em 10 µL de água deionizada e autoclavada.

Desse modo, o clone pPICZαA-Lac e o vetor pPICZαA estavam aptos para serem transformados por recombinação gênica em células de três linhagens diferentes de *P. pastoris* sendo elas KM71H, GS115 e X-33. Segundo CREGG e colaboradores (1989), o DNA linearizado é usado no processo de transformação de *P. pastoris* através de recombinação homóloga entre o DNA transformante e as regiões de homologia com o genoma da levedura, gerando assim transformantes estáveis.

Existem diversas linhagens de *P. pastoris* disponíveis e as mesmas diferem quanto as características genotípicas e/ou fenotípicas. A estirpe X-33 é do tipo selvagem “*wild type*”, sem alterações gênicas. As linhagens KM71H e GS115 possuem diferenças no gene *AOX 1*. A estirpe GS115 tem o fenótipo Mut⁺ e possui os genes *AOX 1* e *2* íntegros, sendo capaz de crescer e consumir metanol semelhante a linhagens selvagens. Entretanto, a estirpe KM71H tem o fenótipo Mut^s com uma interrupção no gene *AOX 1*, mas possui o gene *AOX 2* funcional. Dessa maneira, essa linhagem possui um consumo de metanol (*slow*) e crescimento lentos (MACAULEY-PATRICK et al., 2005).

Células eletrocompetentes de *P. pastoris* das linhagens citadas foram preparadas de acordo com o manual *Easy Select Pichia Expression Kit* (Invitrogen) e a transformação com o clone e controle linearizados e purificados

foi realizado pelo procedimento de eletroporação. Neste procedimento, 10 μL de DNA (contendo de 5-10 μg de DNA linearizado) foram adicionados à 80 μL de células eletrocompetentes. Após a homogeneização, a mistura foi transferida para uma cubeta de 0,2 cm previamente resfriada e esta foi mantida no gelo por 5 minutos. As células foram submetidas à eletroporação utilizando-se um eletroporador *GenePulser* (BioRad). Este equipamento foi configurado de acordo com os parâmetros sugeridos pelo manual do vetor pPICZ α -A (Invitrogen): 2.000 V, 200 Ω , 25 μF e tempo de choque de 4,9 ms.

Em seguida, após a eletroporação foi adicionado à cubeta 1 mL de sorbitol 1 M estéril e gelado e esta mistura foi homogeneizada lentamente. Esta mistura foi transferida para um tubo de 15 mL estéril e este incubado por 1 hora e meia a 30°C, sem agitação. Posteriormente, volumes de 50, 100 e 150 μL de células transformadas foram semeadas em placas de Petri contendo 25 mL de meio YPDS sólido (1% de extrato de levedura, 2% peptona bacteriológica, 2% dextrose, 2% ágar bacteriológico e 1 M de sorbitol) contendo 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de zeocina. As placas foram incubadas por um período de 3 a 10 dias, a 30 °C, de acordo com a aparecimento de colônias.

3.1.2 Seleção de colônias transformantes com boa expressão da LacRLg

As colônias crescidas no procedimento anterior, foram numeradas e repicadas em placas com YPD (1% de extrato de levedura, 2% peptona bacteriológica, 2% dextrose, 2% ágar bacteriológico) contendo zeocina em alta concentração (1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Posteriormente a formação de colônias nas placas com alta concentração de zeocina, o DNA genômico foi extraído de algumas dessas

colônias e utilizado como molécula molde em PCR para análise do DNA amplificado. Neste procedimento, 600 µL de tampão de extração (0,5 M NaCl, 0,05 M de EDTA, 0,1 M Tris, 0,2% v/v β-mercaptoetanol, pH 8,0) foi inoculado com células das colônias selecionadas, homogeneizado e, então, 50 µL de SDS 20% foi adicionado e a amostra agitada por 1 minuto. A reação foi incubada a 60°C por 15 minutos e conseguinte 300 µL de acetato de potássio 5 M foi adicionado e a mistura homogeneizada por agitação durante 1 minuto. A amostra então foi centrifugada a 15000 g por 10 minutos e 700 µL do sobrenadante formado foi transferido para um tubo de 1,5 mL e a este acrescentado 700 µL de isopropanol. Após breve agitação, a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 15000 g. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* adicionou-se 500 µL de etanol 70%. Esta reação foi centrifugada a 15000 g por 5 minutos e o sobrenadante foi vertido. O precipitado foi seco por 20 minutos a 60°C. O DNA precipitado foi ressuscitado em 50 µL de água ultrapura autoclavada e o DNA analisado em gel de agarose 1%.

Assim, o DNA genômico extraído foi utilizado como molde para confirmar a recombinação gênica em *P. pastoris* através da técnica de PCR, onde utilizou-se os oligonucleotídeos 5' e 3' *AOX* para a amplificação do DNA da lacase. Para as reações, o termociclador foi programado de acordo com a TABELA 3.2.

TABELA 3. 2: Programa do termociclador para as reações de amplificação da lacase com oligonucleotídeos 5' e 3' AOX.

Etapa	Temperatura	Tempo
Início	94 °C	5 minutos
*Desnaturação	94 °C	1 minuto
*Anelamento	55 °C	1 minuto
*Extensão	72 °C	1 minuto
Finalização	72 °C	10 minutos

*30 vezes por ciclo

3.1.3 Expressão em pequena escala da LacRLg

Para a expressão da proteína recombinante, foram seguidas as instruções descritas no manual *Easy Select Pichia Expression Kit* (Invitrogen). Na expressão de proteínas heterólogas em *P. pastoris* de acordo com o manual, são utilizados dois meios de cultura, um para crescimento das células (BMGY – *Buffered Glycerol - complex Medium*) e outro para indução da expressão da proteína heteróloga (BMMY – *Buffered Methanol - complex Medium*).

Em relação a expressão em pequena escala, com a finalidade de analisar o maior *screening* de colônias possível, as colônias das três linhagens foram cultivadas em placas de expressão contendo 24 poços, sendo que em cada poço foi colocado 3 mL de meio de cultura. As composições dos meios de cultura estão descritas na TABELA 3.3 e na TABELA 3.4. Devido a dependência de cobre para atividade de lacase, também foi adicionado CuSO₄ 0,2 mM ao meio de indução.

TABELA 3. 3: Composição do meio de crescimento de *P. pastoris* (BMGY).

Componente	Quantidade
Extrato de levedura	1% (m/v)
Peptona	2% (m/v)
Fosfato de potássio 1M, pH 6,0	10% (v/v)
YNB	1,34% (m/v)
Biotina	0,0004% (m/v)
Glicerol	1% (v/v)

TABELA 3. 4: Composição do meio de indução de expressão de *P. pastoris* (BMMY).

Componente	Quantidade
Extrato de levedura	1% (m/v)
Peptona	2% (m/v)
Fosfato de potássio 1M, pH 6,0	10% (v/v)
YNB	1,34% (m/v)
Biotina	0,0004% (m/v)
Metanol	0,5% (v/v)
CuSO ₄	0,2 mM

As células transformadas das linhagens de *P. pastoris* foram crescidas em meio BMGY a 30°C, sob agitação de 250 rpm. Após o meio de cultura ter atingido uma DO₆₀₀ de 2 a 6, as células foram precipitadas através de centrifugação e ressuspensas em meio BMMY. Após, iniciada a indução, o meio de cultura foi suplementado com metanol 1% (v/v) a cada 24 horas, durante 7 dias. No último dia da expressão em cada uma das linhagens, os meios de cultura foram centrifugados a 1500 g por 20 minutos, onde o extrato

enzimático (sobrenadante) foi posteriormente utilizado para testes de análise e o *pellet* formado foi descartado.

Um segundo tipo de experimento de expressão da proteína recombinante foi realizado neste trabalho. Neste procedimento, algumas colônias selecionadas das três linhagens de *P. pastoris* das expressões do experimento anterior, foram crescidas em meio BMGY 5 mL (tubo falcon – 50 mL) a 30°C, 250 rpm. Após o meio de cultura ter atingido uma DO₆₀₀ de 15 a 29, este mesmo meio foi suplementado com metanol 1% (v/v) a cada 24 horas, durante 7 dias e também foi adicionado CuSO₄ 0,2 mM ao meio de indução.

Para os dois diferentes tipos de expressões da proteína recombinante neste trabalho, as culturas foram avaliadas em relação à atividade catalítica frente ao ABTS (descrito no tópico 3.2.1) a cada 24 horas durante 7 dias. A cada 24 horas também foi retirada uma alíquota do meio de cultura a qual foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições denaturantes, SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970).

3.1.4 Expressão em maior escala da LacRLg

Com os resultados obtidos no experimento anterior foi possível selecionar a melhor linhagem de *P. pastoris*, juntamente com a colônia mais promissora frente aos resultados experimentais. Essa colônia foi submetida a expressão em maior escala, sendo utilizado 100 mL de meio BMGY. Após o meio de cultura ter atingido uma DO₆₀₀ de 15 a 29, este mesmo meio foi suplementado com metanol 1% (v/v) a cada 24 horas, durante 7 dias e também foi adicionado CuSO₄ 0,2 mM ao meio de indução. O controle negativo da linhagem X-33, contendo somente o vetor pPICZαA, também foi submetido as mesmas condições para que fosse obtido o extrato bruto do controle negativo.

Os resultados obtidos foram avaliados da mesma maneira que a expressão da proteína em pequena escala.

No último dia de expressão, o meio foi centrifugado e o *pellet* descartado, obtendo-se assim o extrato bruto de LacRLg e o extrato bruto controle negativo com pPICZ α A.

3.1.5 Purificação da LacRLg

Cromatografia de afinidade: Para a purificação da LacRLg, num primeiro momento foi utilizada uma coluna de afinidade contendo níquel (Ni-NTA – Qiagen), devido a presença da cauda de histidina (His-tag) na porção C-terminal da LacRLg. Para isso uma coluna de 1 mL foi equilibrada com tampão fosfato 50 mM pH 7,0 onde foi adicionado 30 mL de meio de cultura contendo 1% de Triton. A resina permaneceu em contato com o extrato bruto em procedimento *overnight*, 4°C com leve agitação. A eluição ocorreu pela aplicação de solução contendo diferentes concentrações do eluente imidazol (10, 50, 100, 150 e 200 mM). As frações eluídas da coluna foram avaliadas por SDS-PAGE e ensaios de atividade frente ao ABTS.

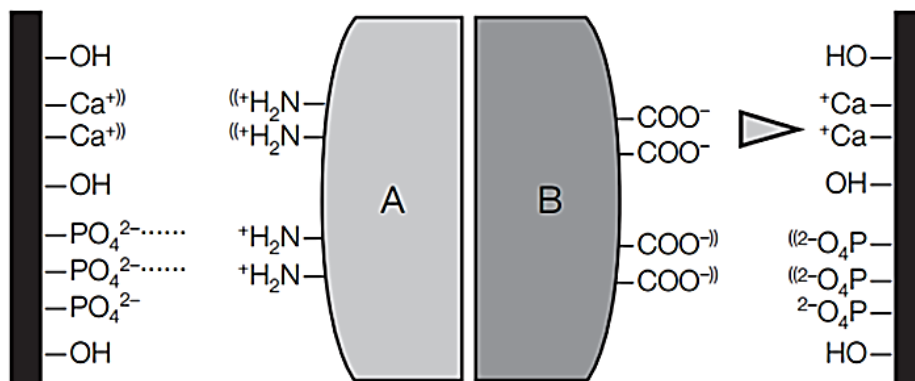
Cromatografia de exclusão molecular: O extrato bruto obtido da lacase foi concentrado cerca de 10 vezes com dispositivo de ultrafiltração com MWCO de 10 kDa (Amicon[®] Ultra-15 MERCK-Millipore). Então 1 mL dessa amostra foi aplicada em coluna de exclusão molecular Superdex 200 (GE Healthcare) de 120 mL, acoplada a um cromatógrafo tipo AKTA. A coluna foi previamente equilibrada com tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 contendo NaCl 150 mM, PMSF 0,5 mM, pepstatina 1 μ M e leuptina 1 μ M. O fluxo aplicado foi de 0,5 mL min⁻¹ para eluição da amostra. As amostras eluídas da coluna foram coletadas em frações de 1 mL e concentradas 10 vezes em

speed vac e analisadas por SDS-PAGE e ensaios de atividade frente ao ABTS e seringaldazina.

Cromatografia de troca iônica: As frações que apresentaram resultados promissores no experimento anterior foram reunidas e dialisadas contra tampão fosfato de sódio 10 mM pH 5,8 contendo CaCl_2 0,2 mM, PMSF 0,5 mM, pepstatina 1 μM e leptina 1 μM por ultrafiltração MWCO de 10 kDa (Amicon[®] Ultra-15 MERCK-Millipore). Nesta etapa de purificação, foi utilizada uma coluna cromatográfica de troca iônica (Bio Rad), hidroxiapatita tipo I de 1 mL. A mesma foi equilibrada com tampão fosfato de sódio 10 mM pH 5,8 contendo CaCl_2 0,2 mM, PMSF 0,5 mM, pepstatina 1 μM e leptina 1 μM (Tampão A). O tampão de eluição (B) foi fosfato de sódio 400 mM pH 5,8. Foram injetados 2 mL das frações preparadas de acordo com o parágrafo anterior. O fluxo de aplicação e eluição da amostra foi de 1 mL min^{-1} . As eluições foram obtidas através de um gradiente linear de 0-100% de tampão B em tampão A, em 20 CV (*column volume*).

A fórmula molecular da hidroxiapatita é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, onde os grupamentos amino da proteína são atraídos pelos sítios – P (íons fosfato carregados negativamente) e repelidos pelos sítios – C (íons cálcio carregados positivamente). Em contrapartida os grupos carboxila são atraídos pelos sítios – C e repelidos pelos sítios – P, de acordo com a FIGURA 3.1 (GAGNON et al., 2009).

FIGURA 3. 1: Proposta de interação molecular entre proteína e os grupos funcionais da resina. Duplo parêntese – repulsão, linhas pontilhadas – ligação iônica e ligações triangulares – ligações coordenadas. (Extraído e modificado de GAGNON et al., 2009).

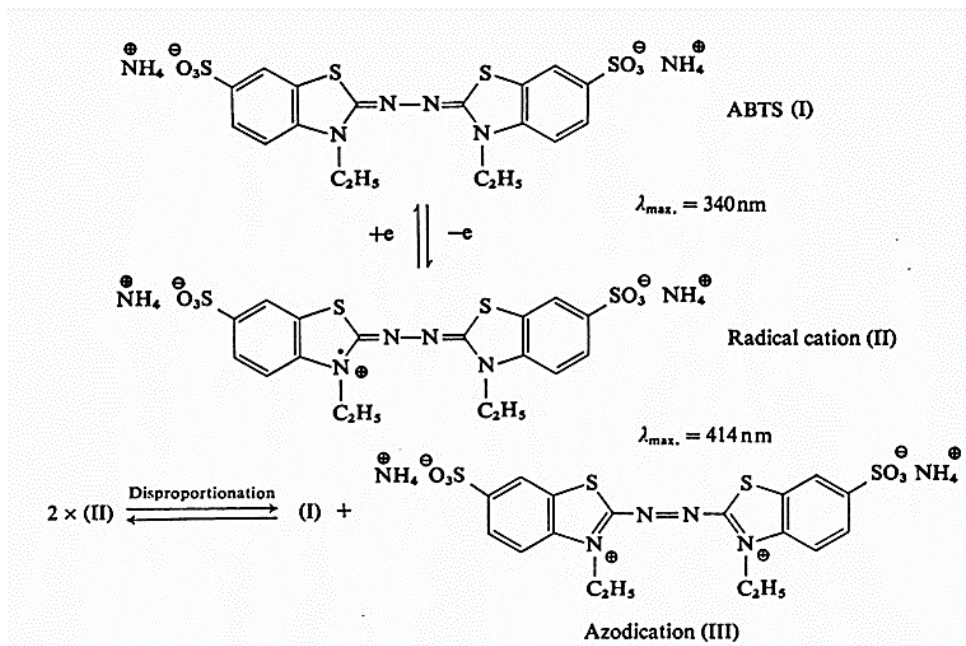


3.2. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E FUNCIONAL DA LacRLg

3.2.1 Ensaios de atividade catalítica

O ensaio para detecção de atividade oxidativa foi realizado utilizando-se 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6-sulfonato) (ABTS). A reação enzimática foi realizada em tampão acetato de sódio 20 mM pH 5,0 acrescido de ABTS 1 mM solução de Mn²⁺ 20 mM e H₂O₂ 0,1 mM. A reação foi incubada por 10 minutos a 25°C. A FIGURA 3.2 mostra o mecanismo de reação envolvido na degradação do substrato ABTS. Nesta reação, a enzima promove a retirada de um elétron do ABTS (I), formando assim um cátion radicalar ABTS^{•+} (II), o qual apresenta uma coloração verde. Esse cátion apresenta um espectro de absorção característico em torno de 420 e 730 nm e por ser relativamente estável pode ser detectado pela medida de sua absorbância. Depois da formação do cátion radicalar (II), o mesmo lentamente forma o composto (I) e um azodicátion (III) (CHILDS e BARDSLEY, 1975).

FIGURA 3. 2: Mecanismo de reação da oxidação do ABTS (extraído e adaptado de CHILDS e BARDSLEY (1975)).



A quantidade de ABTS oxidado produzido foi determinada pela medida da absorvância a 420 nm, considerando-se o coeficiente de extinção molar do ABTS ($\epsilon = 3,6 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (JORDAAN, 2005; WOLFENDEN E WILSON, 1982)).

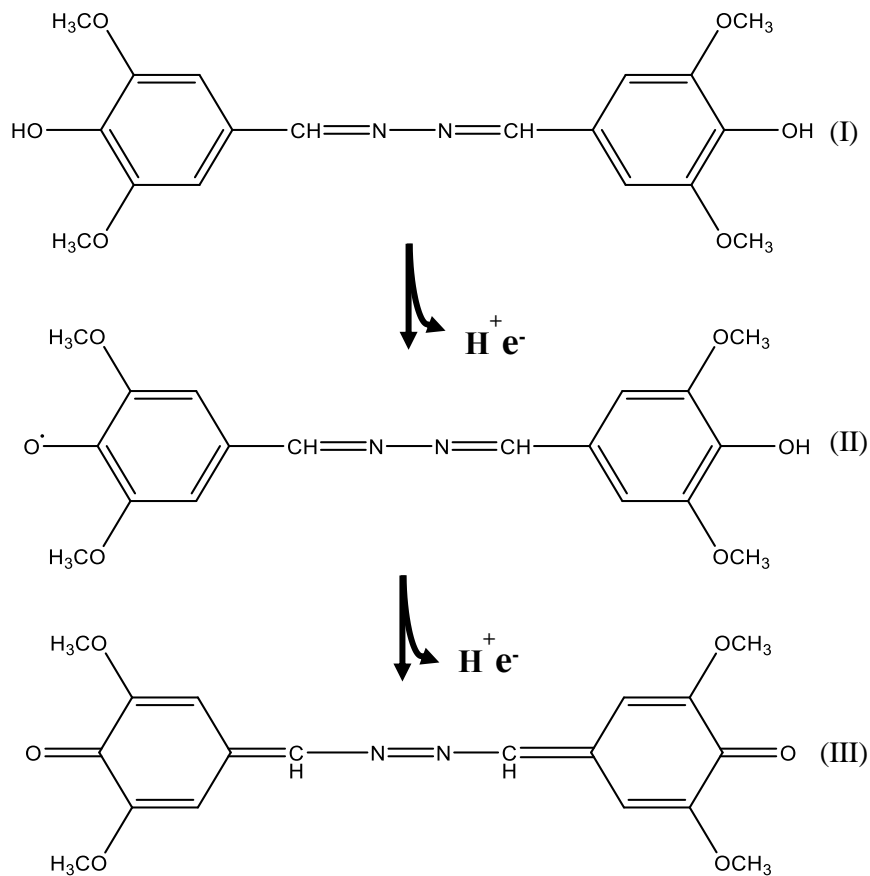
Além do substrato ABTS também foi utilizado o substrato seringaldazina (Syr) (Sigma). A reação enzimática foi realizada em tampão acetato de sódio 20 mM pH 5, contendo seringaldazina 10 μM (a partir de uma solução estoque de seringaldazina 0,5 mM dissolvida em etanol). A reação foi incubada por 10 minutos a 25°C. A oxidação da seringaldazina produz uma solução de coloração rosa e a quantidade de seringaldazina oxidada pode ser determinada pela medida da absorvância a 525 nm, considerando-se $\epsilon = 6,5 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (HOLM et al., 1998).

De acordo com a FIGURA 3.3, pode-se perceber que a seringaldazina (N, N' – bis (3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzilidenohidrazina) (I), que possui uma cor amarela, perde um elétron, ocorrendo a formação de um radical livre (II) o qual sofre desproporcionamento dando origem a uma

quinona (tetrametoxi azo-bis-metileno quinona) (III). Esta quinona então formada, apresenta a coloração rosa com absorvância em torno de 525 nm (THURSTON, 1994).

Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de seringaldazina ou ABTS oxidado por minuto.

FIGURA 3. 3: Mecanismo de oxidação da seringaldazina (extraído e modificado de THURSTON, 1994).



3.2.2 Análises de imunoensaios (*western blotting e dot blot*)

O extrato bruto da lacase foi avaliado pelos imunoensaios *western blotting e dot blot*.

Para o experimento de *western blotting* o extrato de LacRLg foi aplicado em gel desnaturante de poliacrilamida. As proteínas então separadas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, onde neste procedimento é montado um “sanduíche”, no qual o gel está em contato com a membrana de nitrocelulose em ambos os lados, um pedaço de papel filtro e um pedaço de esponja, todos imersos em tampão de transferência (Tris 200 mM, glicina 50 mM, metanol 15%). Este “sanduíche” foi transferido para uma cuba de transferência (Mini V8 – GIBCO BRL – Life Technologies) e submetido a uma voltagem de 150 V e 80 mA, durante 1 hora e 30 minutos. Posteriormente, a membrana foi corada com solução de Ponceau (0,5% Ponceau em ácido acético 0,1%) por 2 minutos e descorada com ácido acético 1%. A membrana foi incubada com solução de bloqueio – TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) acrescido de leite em pó desnatado 5% por 12 horas a 4°C. No dia seguinte, a membrana foi lavada 3 vezes com TBS na presença de Tween 20 0,3% e em seguida, incubada com o anticorpo anti-His diluído na proporção 1:1000 em TBS, por 2 horas. Subsequentemente, a membrana foi lavada 3 vezes por 5 minutos com tampão TBS e depois colocada em uma solução reveladora onde foi usado o reagente SIGMA FASTTM BCIP/NBT *tablet* (RENART, et al., 1979).

Na metodologia de *dot blot*, uma gota (10 µL) de extrato foi aplicada sobre uma membrana de nitrocelulose. O extrato foi homogeneizado com concentrações de 0,1%, 0,5% e 1% de Tween 20 e Triton, para que a estrutura da enzima se tornasse flexível, liberando assim a cauda de histidina presente na região C terminal da mesma. Após repouso de 10 minutos, a mesma foi lavada por 60 minutos com solução de bloqueio e assim seguiram-se os mesmos procedimentos utilizados anteriormente no *western blotting*, de incubação com anticorpo, lavagem e revelação.

3.2.3 Determinação da massa molecular e concentração

A massa molecular da enzima foi estimada por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) e por cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex 200 (GE Healthcare), acoplada a um cromatógrafo tipo AKTA, calibrada com a proteína padrão BSA (*Bovine Serum Albumin*). A enzima foi quantificada pelo método de BRADFORD (1976), usando uma curva padrão de BSA.

3.2.4 Caracterização espectroscópica

A LacRLg foi submetida a ampla varredura de absorvância (200-800 nm), em um espectrofotômetro UV-Vis da marca Beckman Coulter, onde foi obtido assim o seu espectro de absorvância.

3.2.5 Estudo do potencial de degradação frente a Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

Os experimentos realizados para avaliar o potencial de degradação de HAP's pela LacRLg, foram feitos em colaboração com a Profa Dra Quézia Bezerra Cass (Departamento de Química - UFSCar), com o auxílio de seu aluno de doutorado Bruno Sergio do Amaral, co-orientado pela Prof.(a) Dr.(a) Dulce Helena Ferreira de Souza (Departamento de Química - UFSCar).

As análises dos HAP's, bem como seus possíveis produtos de degradação foram realizadas por um sistema de LC (*Líquid Chromatography*) (Shimadzu) consistindo em duas bombas LC 20AD, autoinjeter SIL-20A, degaseificador DGU-20A5, controladora CBM-20A e detector UV-VIS e SPD M10A a 334 e 254 nm. As análises foram realizadas utilizando-se uma coluna

Phenomenex C₁₈ (3 µm; 150 x 4.60 mm), onde o volume injetado de amostra foi de 20 µL com um gradiente linear de 60-100% de acetonitrila em água com fluxo de 0,8 mL min⁻¹ de 0 a 25 minutos.

Os HAP's avaliados foram antraceno, fenantreno e pireno e, para tanto, os compostos foram dissolvidos em DMSO na concentração de 1 mg/mL, formando soluções aqui chamadas de estoque. A partir das soluções estoque, foram preparadas novas soluções diluídas dos HPA's. O volume final desta solução foi 1 mL contendo 1 µg do HPA em tampão fosfato 20 mM pH 6 e Tween-20 0,25% (v/v). As amostras então foram injetadas, separadamente, na coluna em sistema LC de acordo com as condições citadas anteriormente, para análise do tempo de retenção de cada HPA estudado.

Para as reações de degradação dos HAPs pela lacase, ao extrato de LacRLg (5 U) foi adicionado cada HPA na concentração final de 1 µg, em tampão fosfato 20 mM pH 6,0 e Tween-20 (Sigma) 0,25% (v/v). O volume total da reação foi de 1 mL. O experimento foi mantido a 30 °C com agitação de 105 rpm por 24 horas. A cada 2 horas durante 12 horas, foram retiradas alíquotas desses experimentos que foram centrifugadas a 10.000 g, 4 °C por 10 minutos. Os sobrenadantes foram injetados separadamente na coluna em sistema LC de acordo com o procedimento citado anteriormente, para análise do decaimento da concentração dos HPA's. O mesmo experimento foi realizado com o extrato bruto oriundo de *P. pastoris* transformado com o vetor pPICZαA sem a clonagem com o inserto da lacase e este foi o controle negativo de atividade do experimento.

Para avaliar a formação dos produtos de degradação, os HPA's foram incubados com a LacRLg nas mesmas condições do parágrafo anterior por 24 horas. Decorrido este tempo, foi realizado um procedimento de extração, adicionando-se 1 mL de acetato de etila ao meio reacional. Após a separação

de fase, a fase orgânica foi recolhida separadamente e o processo foi repetido por 3 vezes. As fases orgânicas foram reunidas e submetidas a evaporação em *speed vac*. Posteriormente à evaporação do solvente, as amostras foram ressuspensas em 200 µL de acetonitrila e analisadas, separadamente, por LC de acordo com o procedimento citado previamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OBTENÇÃO, ANÁLISE E CONFIRMAÇÃO DO CLONE pPICZ α A-LAC

Este presente trabalho de mestrado trata-se de uma continuação de trabalhos desenvolvidos anteriormente pelo grupo de pesquisa LBFÉ.

Anteriormente, em nosso laboratório, foi isolada e purificada uma lacase de *L. gongylophorus* denominada Lac1Lg, que não tem coloração azul, não apresentou absorvância em torno de 600 nm e apresentou atividade catalítica frente a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPA's) mesmo na ausência de mediadores químicos (IKE, 2015). Portanto, Lac1Lg apresentou todas as características para classificá-la como uma enzima pertencente à classe das lacases amarelas.

Devido ao interesse nessa classe de lacases com potencial aplicação em processos tecnológicos, foi feita uma análise na biblioteca de cDNA do fungo *L. gongylophorus* (construída no grupo de pesquisa) e encontrado um clone de uma 'lacase putativa' (chamado de pDONR-Lac) (GOLFETO, 2014). A ORF ('*open reading frame*') desta lacase foi clonada no vetor de expressão pPICZ α A, obtendo-se o clone pPICZ α A-Lac e assim, a partir deste clone foi obtida a enzima recombinante denominada LacRLg a qual foi avaliada no presente trabalho (IKE, 2015).

DE FINE LICHT e colaboradores (2013) publicaram o sequenciamento do genoma do fungo *L. gongylophorus*, o qual vive em simbiose com a formiga cortadeira *Acromyrmex*, onde nesse genoma foram identificados 9 genes de lacases putativas (Lcc1 - Lcc9).

A sequência de aminoácidos de LacRLg apresentou 98% de identidade com a sequência de LgLcc7, a qual está depositada no NCBI com número de acesso NCBI 409151746. A FIGURA 4.1 mostra o alinhamento das sequências de aminoácidos de LacRLg com LgLcc7.

FIGURA 4.1: Alinhamento das sequências de aminoácidos das lacases LacRLg e LgLcc7 (DE FINE LICHT et al., 2013) usando o programa Clustal Omega. (*) resíduos idênticos em ambas sequencias, (:) resíduos de alta similaridade nas sequencias. Em amarelo, sítio de clivagem para trombina. Em verde, a cauda de histidinas.

LacRLg	-----EAEAEFSTCSQTLTVANADI	20
LgLcc7	MLVCQAPTDFVLFYSYILFDPVVTRGNASSCFLASILSLASLAVASTCSQTLTVANADI	60
	: * *****	
LacRLg	SPDGFSTRKASVVNGGTVGPVIWAKKGEQLKLNVVNNLTDPGQIRVTTMHWHGILQRGTNF	80
LgLcc7	SPDGFSTRKASVVNGGTVGPVIWAKKGEQLKLNVVNNLTDPGQIRVTTMHWHGILQRGTNF	120

LacRLg	MDGTAGVTQCPIAPGDSFLYNFKADVAGTYWYHSHIGLQYCDGVRGALIVQDPADHLAIL	140
LgLcc7	MDGTAGVTQCPIAPGDSFLYNFKADVAGTYWYHSHIGLQYCDGVRGALIVQDPADHLAIL	180

LacRLg	YDVDESTIITISEWYHKSVLVLAQGPVSPDATLINGRGRFPGGNADLSVVNVQQGKRYR	200
LgLcc7	YD---ESTIITISEWYHKSVLVLAQGPVSPDATLINGRGRFPGGNADLSVVNVQQGKRYR	237
	** *****	
LacRLg	LRIISMCEPNYIFSIDGHNLTIETDATPTSPHTVNAIQIFAGQRYSLVLNANQRVDNY	260
LgLcc7	LRIISMCEPNYIFSIDGHNLTIETDATPTSPHTVNAIQIFAGQRYSLVLNANQRVDNY	297

LacRLg	WIRALSNMRNLSTTFENGIDSAILRYRGAPIAEPKSIQPTTAKMLEEKDLHPLAYPFPFG	320
LgLcc7	WIRALSNMRNLSTTFENGIDSAILRYRGAPIAEPKSIQPTTAKMLEEKDLHPLAYPFPFG	357

LacRLg	LPGPNGADMTFNLTFSADLATGFFVNNNSYVSPTVPVLLQILSGAHSADLLPHGSVFTI	380
LgLcc7	LPGPNGADMTFNLTFSADLATGFFVNNNSYVSPTVPVLLQILSGAHSADLLPHGSVFTI	417

LacRLg	ERNKVVQVMQTLNIAGPHPMHLHGHTFSVVKSA GALPNYLNP IGRDVVSLGTIEGDYVS	440
LgLcc7	ERNKVVQVMQTLNIAGPHPMHLHGHTFSVVKSA GALPNYLNP IGRDVVSLGMIEGDYVS	477

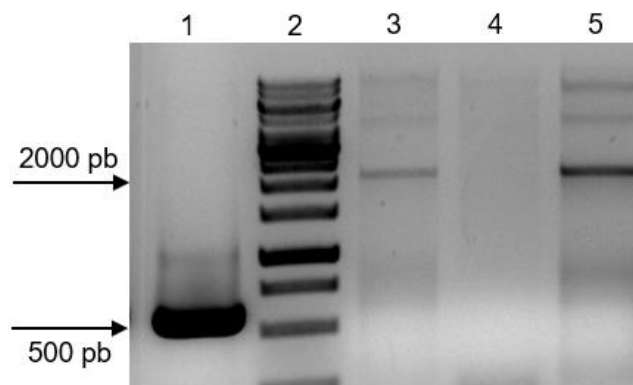
LacRLg	IRFRDNP GPWILHCHINPHLDLGFVAVFAEAEQTPFVDKPPKNWDQLCPTWDSLDPDI	500
LgLcc7	IRFRDNP GPWILHCHINPHLDLGFVAVFAEAEQTPFVDKPPKNWDQLCPTWDSLDPDV	537

LacRLg	KTTHPNSTSA LVPRGSA AASFLEQKLI SEEDLNSAVD HHHHHH	543
LgLcc7	KTTHPNSTSA-----	547

O clone pPICZ α A-Lac que estava armazenado a -80°C e o plasmídeo pPICZ α A para ser utilizado como controle negativo nos experimentos, no presente trabalho foram submetidos a extração e

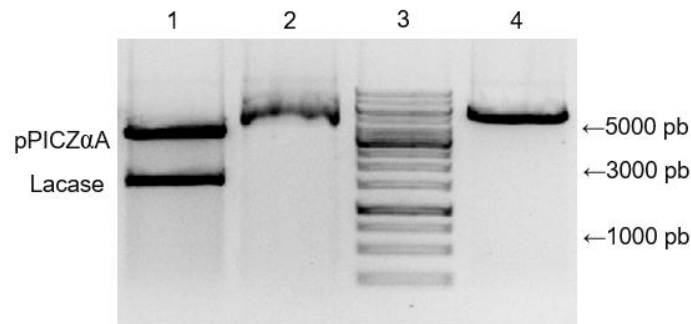
quantificação do DNA. O clone pPICZ α A-Lac extraído, foi utilizado como molécula molde na reação de PCR, onde os oligonucleotídeos flanqueadores do gene 5' AOX e 3' AOX foram utilizados. De acordo com a FIGURA 4.2, o gel de agarose 1% mostra banda referente à amplificação dos *primers* 5' AOX e 3' AOX, pouco acima de 500 pb e a banda referente ao inserto da lacase (1500 pb) que somada com os oligonucleotídeos utilizados na reação, tem o tamanho esperado com cerca de 2000 pb.

FIGURA 4. 2: Análise em gel de agarose 1% - Confirmação do clone através de amplificação do DNA. 1) amplificação dos *primers* 5' AOX e 3' AOX sem o gene da lacase (controle negativo); 2) Padrão de peso molecular 1000 pb DNA *ladder* (Thermo Scientific), 3) e 5) Produto de PCR referente a lacase somada com os oligonucleotídeos utilizados. 4) Controle



O clone pPICZ α A-Lac também foi digerido pelas endonucleases de restrição *EcoR* I e *Not* I e linearizado com a enzima *Sac* I para ser posteriormente integrado ao genoma de *P. pastoris*. O clone digerido e linearizado foi analisado por gel de agarose 1% de acordo com a FIGURA 4.3. Neste gel, é possível visualizar as bandas esperadas para o vetor pPICZ α A (3600 pb) que somado ao inserto da lacase (1500 pb) apresenta cerca de 5000 pb de pPICZ α A-Lac.

FIGURA 4. 3: Análise em gel de agarose 1%. 1) Plasmídeo pPICZ α A (3600 pb), inserto da lacase (1500 pb); 2) pPICZ α A-Lac não linearizado; 3) Padrão de peso molecular 1000 pb DNA ladder (Thermo Scientific) e 4) pPICZ α A-Lac linearizado pela enzima *Sac* I.



4.2 TRANSFORMAÇÃO E EXPRESSÃO DA LacRLg NAS LINHAGENS X-33, KM71H E GS115.

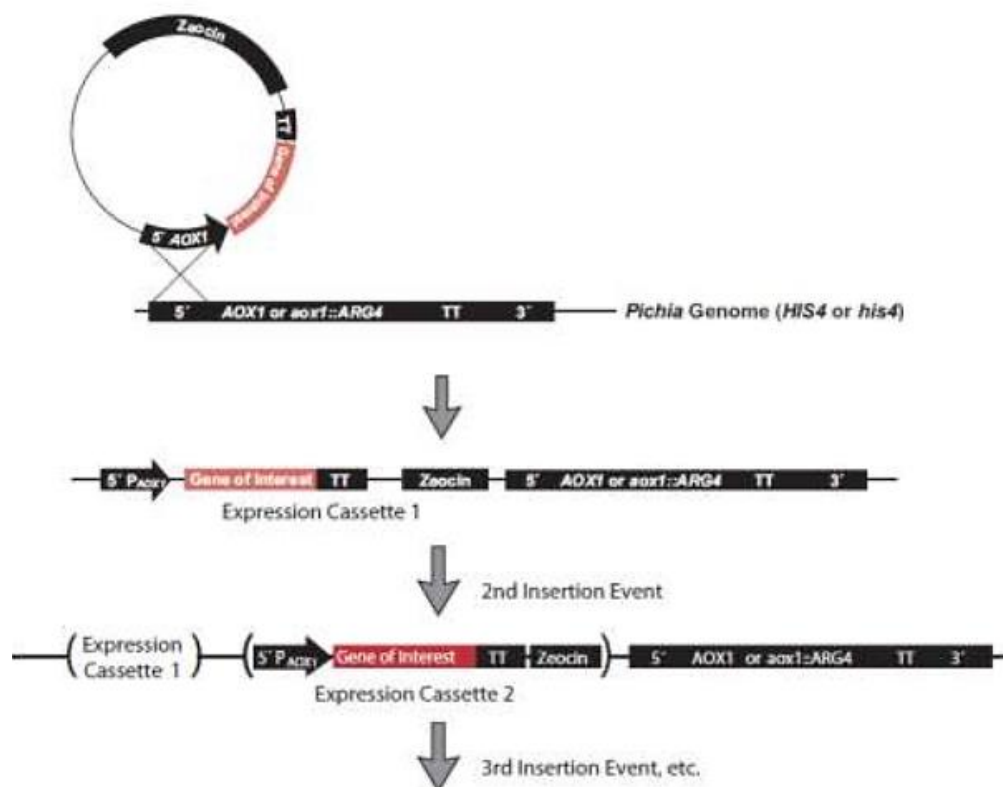
A escolha do plasmídeo pPICZ α A, levou em consideração a possibilidade de expressar a proteína de interesse em um organismo eucarioto, a levedura *P. pastoris*. Esta levedura possui uma maquinaria celular que permite a glicosilação das proteínas expressas, o que é uma característica considerada importante para a atividade de lacases (BALDRIAN, 2006).

P. pastoris possui grande popularidade para produção de proteínas recombinantes, apresentando diversas vantagens como sistema de expressão, sendo capaz de crescer com alta densidade celular, utilizando procedimentos simples, modificações pós-traducionais e emprega o metanol como fonte de carbono e indutor.

Com a transformação do clone em linhagens de *P. pastoris*, é possível obter integrantes altamente estáveis, sendo que o cassete de expressão que abriga o inserto de interesse é integrado por recombinação homóloga no DNA genômico da levedura em *locus* específicos, garantindo uma alta estabilidade genética (SCHWARZHANS et al., 2017).

O plasmídeo pPICZ α A possui a região 5' AOX1 que é homóloga a região do AOX1 do genoma de *P. pastoris*. O plasmídeo após ser linearizado com a enzima *Sac* I, através do procedimento de eletroporação, é inserido por recombinação homóloga no *locus* cromossômico AOX1 ou *aox1::ARG4* das linhagens de *P. pastoris* utilizadas. É esperado que ocorra múltiplos eventos de inserção de uma ou múltiplas cópias do vetor na região AOX1 ou *aox1::ARG4*, de acordo com a FIGURA 4.4.

FIGURA 4. 4: Descrição da inserção do plasmídeo recombinante na região específica 5' AOX no genoma de *Pichia pastoris* (*locus* AOX1 ou *aox1::ARG4*) (figura extraída e modificada da Invitrogen).

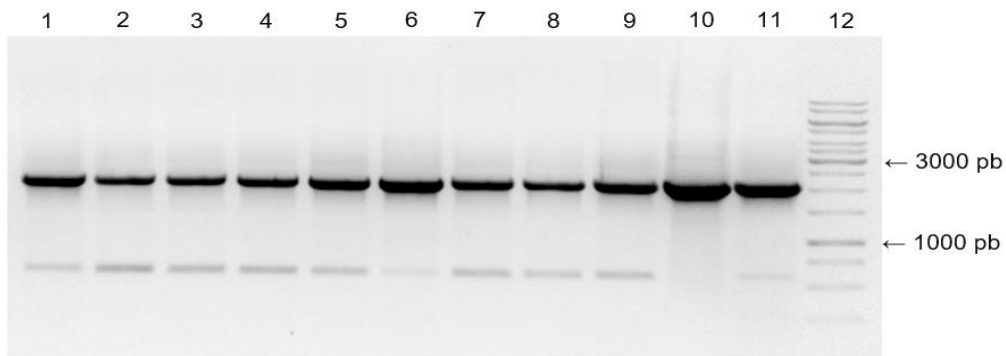


Além disso, também é esperado que a maquinaria celular mais sofisticada dos organismos eucariotos aumente a probabilidade de se obter proteínas com enovelamento correto. O plasmídeo pPICZ α A possui ainda o fator α , que permite a secreção das proteínas expressas para o meio de cultura,

o que constitui significativa vantagem quanto a probabilidade de se obter proteínas solúveis.

Algumas colônias obtidas da placa de YPDS com alta concentração do antibiótico zeocina (1000 µg/mL), das três linhagens de *P. pastoris* foram submetidas a análise de PCR para confirmação da integração ao genoma do fungo. No entanto, pode-se perceber de acordo com a FIGURA 4.5 que utilizando os oligonucleotídeos 5' AOX e 3' AOX, não foi possível distinguir as bandas esperadas, já que houve uma sobreposição das mesmas. De acordo com o protocolo, é esperado a amplificação do genoma de *P. pastoris* em torno de 2200 pb e o inserto da lacase juntamente com os *primers* utilizados, em torno de 2100 pb. Portanto pela proximidade, houve uma sobreposição das bandas e não foi possível confirmar a recombinação por esse método.

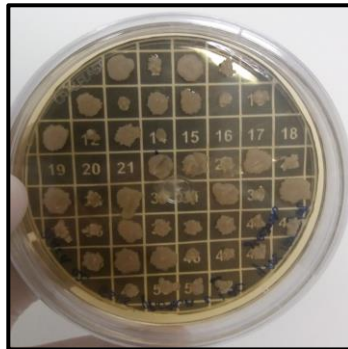
FIGURA 4. 5: Análise em gel de agarose 1%. 1 a 11) Extração do DNA de colônias da linhagem GS115. 12) Marcador de peso molecular.



4.2.1 Expressão da LacRLg em pequena e maior escala

De acordo com o experimento anterior, não foi possível comprovar a integração do gene responsável pela produção de lacase no genoma de *P. pastoris*. No entanto, como apresentado na FIGURA 4.6, as colônias selecionadas (dados não apresentados) das três linhagens de *P. pastoris*, conseguiram crescer em placa de YPDS, mesmo com alta concentração do antibiótico zeocina (1000 µg/mL).

FIGURA 4. 6: Colônias selecionadas com alta concentração do antibiótico zeocina.



O vetor pPICZ α A, possui uma região que confere resistência ao antibiótico zeocina. Assim, com o crescimento dessas colônias os resultados sugeriram a hipótese que o vetor juntamente com o inserto da lacase foram inseridos ao genoma da levedura.

Em vista disso, optou-se por realizar experimentos de expressão da proteína recombinante e posteriormente com testes específicos como atividade enzimática e análises da expressão em SDS-PAGE, ser possível comprovar a presença da enzima, que tem massa esperada em torno de 66 kDa.

Para que fossem testados o maior número de colônias possíveis, as colônias transformantes da placa com alta concentração de zeocina, das linhagens X-33, GS115 e KM71H (dados não mostrados) foram cultivadas em placas de 24 poços contendo 3 mL de meio BMGY em cada poço. O crescimento celular e expressão da enzima foram realizados de acordo com o manual de expressão para *P. pastoris* da Invitrogen.

Após as células serem ressuspensas em meio BMMY e adicionado metanol 1% (v/v) a cada 24 horas para sua expressão, foram retiradas alíquotas de todos os poços (a cada 24 horas) e essas amostras foram submetidas ao teste de atividade frente ao ABTS (Descrito no tópico 3.2.1, página 29) e analisadas por SDS-PAGE (dados não apresentados). O experimento de expressão de LacRLg em microplaca apresentou alguns

problemas. Algumas colônias não resistiram até o último dia de expressão (144 horas), ou apresentaram baixa expressão da enzima. No entanto, a partir desse experimento foi possível selecionar 2 colônias promissoras de cada linhagem, juntamente com seus controles negativos sendo as colônias 17 e 18 para linhagem X-33, 6 e 15 para GS115, 2 e 8 para KM71H e os controles 1 de cada linhagem.

Essas colônias foram submetidas a inóculo e expressão, porém nesse procedimento foi utilizado 5 mL de meio em tubo tipo falcon de 50 mL, considerada também uma expressão da enzima em pequena escala.

Todavia, diferentemente do que sugere o manual da Invitrogen seguido anteriormente, nesta expressão as colônias foram inoculadas em meio BMGY até a DO_{600} atingir um valor entre 15 e 29. Posteriormente, neste mesmo inóculo foi adicionado $CuSO_4$ 0,2 mM, devido a dependência do íon Cu^{2+} para as lacases e adicionado metanol 1% (v/v) por 7 dias. Durante a expressão, a cada 24 horas foram retiradas alíquotas que foram submetidas a teste de atividade frente ao ABTS e análise por SDS-PAGE.

A FIGURA 4.7 mostra o resultado do SDS-PAGE referente a expressão após 24 horas das linhagens KM71H (colônias 2 e 8) e X-33 (colônias 17 e 18). Como pode-se observar, na região destacada no gel, há uma banda ausente no controle negativo, e nessa mesma região aparece uma banda principalmente para a colônia transformante 18 da linhagem X-33. A FIGURA 4.8 traz o gráfico com as colônias de LacRLg que melhor apresentaram atividade enzimática de cada linhagem após os 7 dias de expressão, frente ao substrato ABTS.

FIGURA 4. 7: Análise em SDS-PAGE da expressão de 24 horas das linhagens KM71H e X-33, com as colônias 8 e 2, 18 e 17 respectivamente. Controle da linhagem X-33 – pPICZαA.

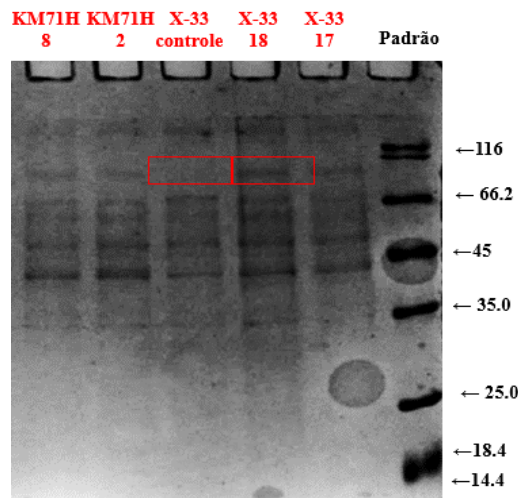
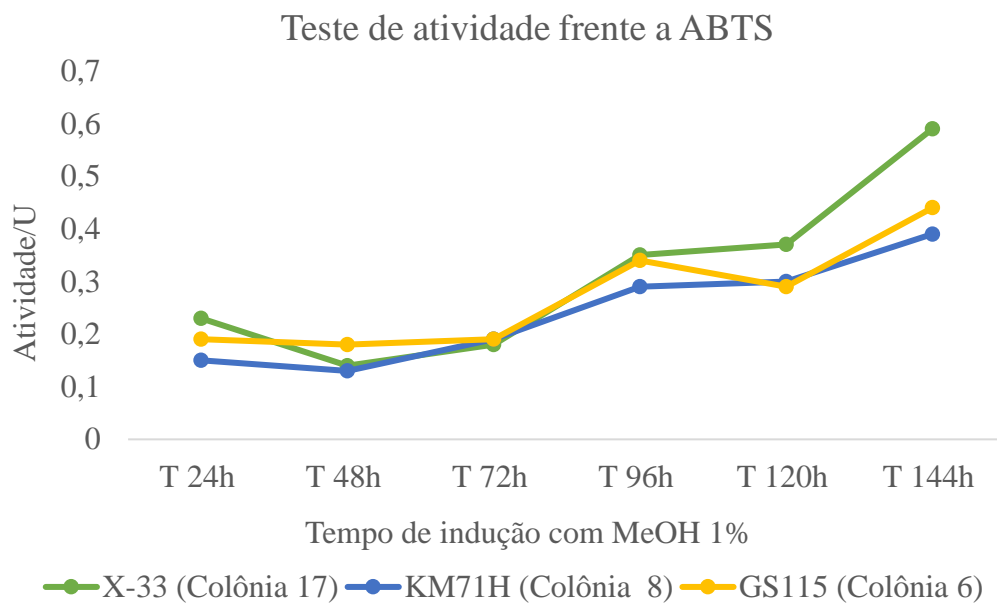


FIGURA 4. 8: Atividade enzimática (U) da LacRLg, das colônias 17 – X-33, 8 – KM71H, 6 – GS115, após 144 horas de expressão (7 dias), frente ao substrato ABTS.



Com a análise dos resultados obtidos, foi definido que a linhagem e colônia que melhor apresentaram resultados foi a X-33 com a colônia 17. Essa colônia foi então submetida a expressão em maior escala no mesmo procedimento de expressão usado em tubo falcon (sem trocar o meio BMGY por BMMY).

4.3 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA LacRLg

4.3.1 Cromatografia de afinidade contendo níquel

A enzima recombinante LacRLg foi expressa com fusão His-tag na região C-terminal (FIGURA 4.1, página 38). Por esse motivo, o primeiro procedimento de purificação realizado foi em cromatografia de afinidade contendo níquel. A enzima, através da cauda de histidina possui afinidade pelo metal Ni^{2+} , sendo em seguida, desligada da resina por um tampão contendo imidazol que compete com a cauda de histidina pela ligação com os íons de Ni^{2+} da resina. Essa interação permite, então, a eluição da enzima.

Neste experimento, vários testes de otimização foram necessários (dados não apresentados), sendo que as melhores condições para que a enzima se ligasse na resina, foi a presença de 1% de triton no extrato enzimático e o mesmo foi colocado em contato com a resina por um procedimento denominado *in batch*, por 12 horas com leve agitação a 4°C.

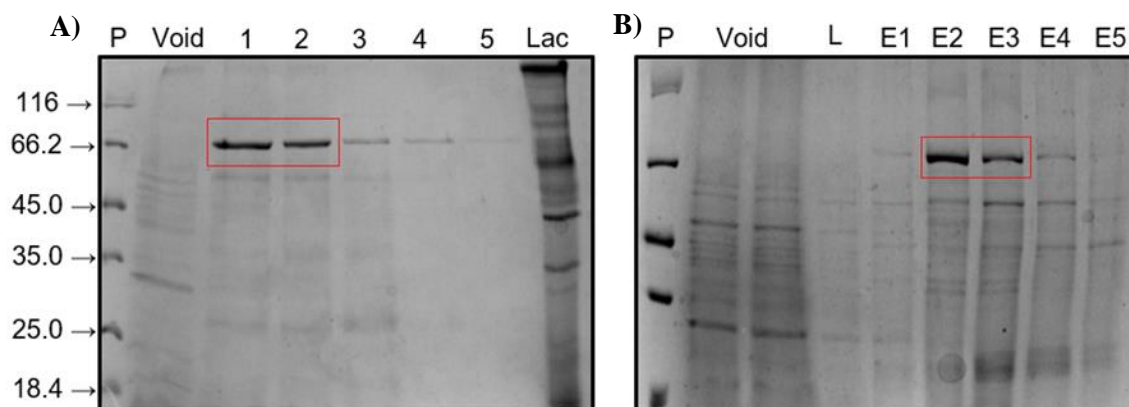
Os experimentos realizados, sugeriram a hipótese de que a cauda de histidina se encontrava encoberta pela estrutura tridimensional da enzima, sendo necessário a presença de um detergente como o triton para tornar a estrutura da enzima mais maleável, para que a cauda ficasse então, disposta. Na ausência do detergente e com menos tempo de contato do extrato enzimático com a resina, não foi observado a interação da mesma com íons de Ni^{2+} .

De acordo com a FIGURA 4.9, as análises por SDS-PAGE A) e B), mostram a presença de uma banda aparente com massa molecular em torno de 66 kDa, esperada para lacase. No entanto, ao submeter as frações eluídas da coluna ao teste de atividade catalítico frente ao ABTS (Descrito no tópico 3.2.1, página 29), não foi observada atividade. De acordo com os resultados

encontrados, supõe-se que possivelmente os resíduos de histidina presentes no sítio catalítico da enzima também se ligaram aos íons de Ni²⁺ da resina. Dessa maneira, ao realizar a eluição com o imidazol, a enzima se encontrava sem os seus átomos de cobre no sítio catalítico, necessários para atividade da enzima.

Assim, como os resultados apresentados não foram satisfatórios, esse procedimento de purificação foi descartado no presente trabalho.

FIGURA 4. 9: Análise em SDS-PAGE das eluições obtidas da purificação. LAC- extrato bruto aplicado na coluna; (1 – 5 eluições seguidas com 100 mM de imidazol); Void – eluição do que não se ligou na resina, com tampão de equilíbrio; L – lavagem da resina com tampão de equilíbrio; E1 – 10 mM de imidazol, E2 – 50 mM, E3 – 100 mM, E4 – 150 mM e E5 – 200 mM;



4.3.2 Cromatografia de exclusão molecular

Com o extrato enzimático da lacase concentrado e aplicado na coluna de exclusão molecular Superdex 200 (120 mL) o mesmo foi então eluído com fluxo de 0,5 mL⁻¹/min, onde obteve-se o cromatograma disposto na FIGURA 4.10.

A região destacada no cromatograma, apresenta as frações que foram reunidas e apresentaram atividade catalítica da lacase frente aos substratos ABTS e seringaldazina (Descrito no tópico 3.2.1, página 29). Algumas destas frações, juntamente com o extrato bruto aplicado na resina,

foram analisadas por SDS-PAGE, apresentado na FIGURA 4.11. Como pode-se perceber, há a presença de algumas bandas em torno da massa que é esperada para lacase, de 66 kDa, juntamente com outras bandas. Portanto, essa purificação ainda não permitiu a aquisição da proteína com bom grau de pureza.

As frações recolhidas (64 a 73) foram então reunidas e submetidas a uma segunda etapa de purificação, com os resultados descritos a seguir.

FIGURA 4. 10: Cromatograma obtido da eluição do extrato bruto enzimático aplicado em coluna Superdex 200 (GE Healthcare – 120 mL).

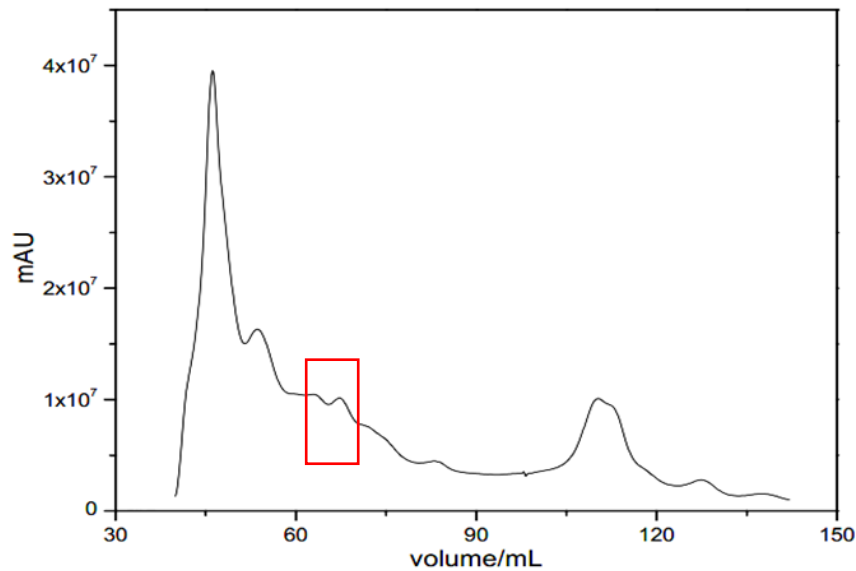
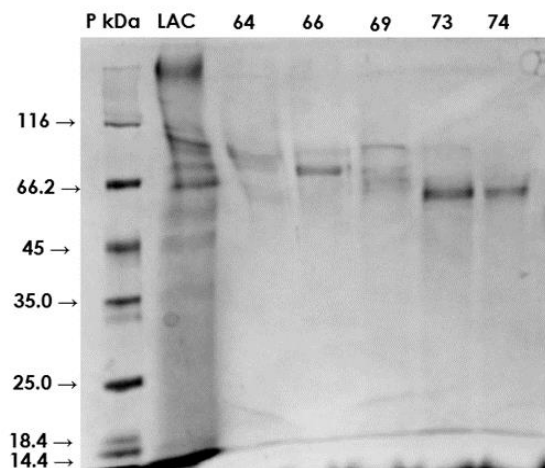


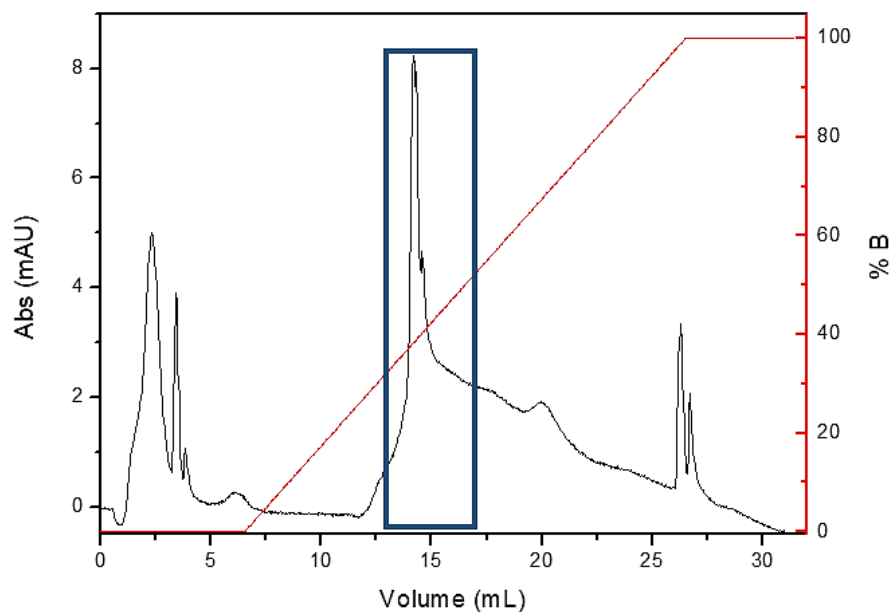
FIGURA 4. 11: SDS-PAGE de algumas frações eluídas da cromatografia de exclusão molecular. As amostras foram concentradas cinco vezes em *speed vac* e posteriormente aplicadas. LAC – extrato bruto concentrado aplicado na Superdex 200. 64 – 74: Frações eluídas e aplicadas.



4.3.3 Cromatografia de troca iônica

Nesta segunda etapa de purificação, as frações parcialmente purificadas selecionadas da cromatografia de exclusão molecular foram então reunidas e esse *pool* foi dialisado contra o tampão de equilíbrio da Hidroxiapatita Tipo I (Bio Rad): tampão fosfato de sódio 10 mM pH 5,8, com CaCl_2 0,2 mM por 10 minutos. O *pool* obtido da diálise foi aplicado (2 mL) na coluna acoplada ao cromatógrafo AKTA e com fluxo de 1 mL^{-1} , obtendo-se o cromatograma disposto na FIGURA 4.12.

FIGURA 4. 12: Cromatograma obtido da eluição do *pool* enzimático aplicado em coluna Hidroxiapatita Tipo I (Bio Rad – 1 mL), com gradiente linear de 0 – 100% do tampão de eluição (Fosfato 400 mM) em tampão fosfato 10 mM.



A coluna Hidroxiapatita possui um caráter aniônico e catiônico, e as interações com a enzima são consideradas complexas, sendo assim difícil prever o comportamento da proteína com a resina, apenas pelo ponto isoelétrico da mesma.

Como pode-se observar, uma parte do *pool* aplicado passa pela coluna sem interagir com a mesma. Contudo, uma banda cromatográfica se

iniciou em torno de 20% do tampão de eluição, apresentando uma absorção mais relevante com a formação de um pico com 40% do tampão de eluição (região destacada no cromatograma). As frações recolhidas na região dessa absorção, apresentaram atividade catalítica da lacase frente ao substrato ABTS e seringaldazina (Descrito no tópico 3.2.1, página 29). As mesmas também foram analisadas por SDS-PAGE (FIGURA 4.13). De acordo com o resultado observado no gel, essa purificação foi eficaz apresentando uma banda intensa na região com a massa molecular esperada para lacase (66 kDa). Uma amostra foi selecionada e quantificada pelo método de BRADFORD (1976).

A TABELA 4.1 traz os valores obtidos de atividade catalítica (U) de LacRLg frente ao substrato ABTS desde o extrato bruto até as posteriores etapas de purificação nas colunas Superdex200 e Hidroxiapatita, bem como o rendimento obtido de cada etapa.

FIGURA 4. 13: SDS-PAGE das frações eluídas da cromatografia de troca iônica, que apresentaram atividade para lacase. As amostras foram concentradas cinco vezes em *speed vac* e posteriormente aplicadas. P – Marcador molecular.

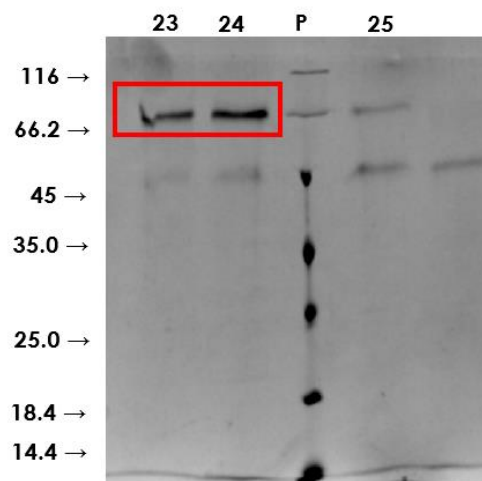


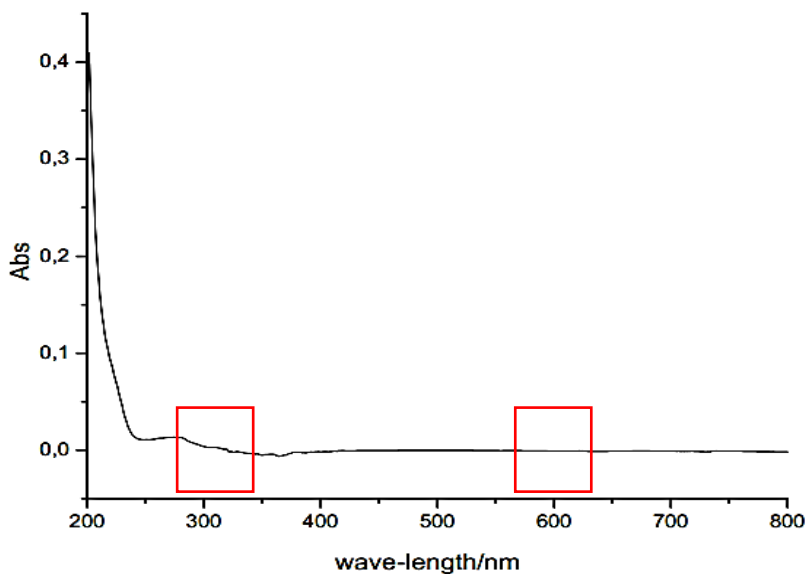
TABELA 4. 1: Análise do rendimento das etapas de purificação da LacRLg, usando o substrato ABTS.

	Atividade total (U)	Concentração de proteína mg/mL	Atividade específica U mg/mL	Rendimento (%)
Extrato Bruto	2,10	92,2	0,02	100
Superdex 200	1,10	4,5	0,24	4,8
Hidroxiapatita	0,05	3,7	0,01	4,0

4.3.4 Caracterização espectroscópica

Como foi citado anteriormente o átomo de cobre no sítio T1 característico das lacases azuis fornece uma absorção em torno de 610 nm. A FIGURA 4.14 é referente ao espectro de ultravioleta-visível (UV-Vis) da amostra LacRLg, na varredura de 200 a 800 nm. A amostra não apresentou absorbância a 610 nm, podendo assim ser classificada como uma lacase amarela, de acordo com a literatura (CHAURASIA et al., 2014). O “ombro” com absorção em torno de 300 nm é referente aos átomos de cobre do sítio T3.

FIGURA 4. 14: Espectro de absorbância da LacRLg no intervalo de 200 a 800 nm.

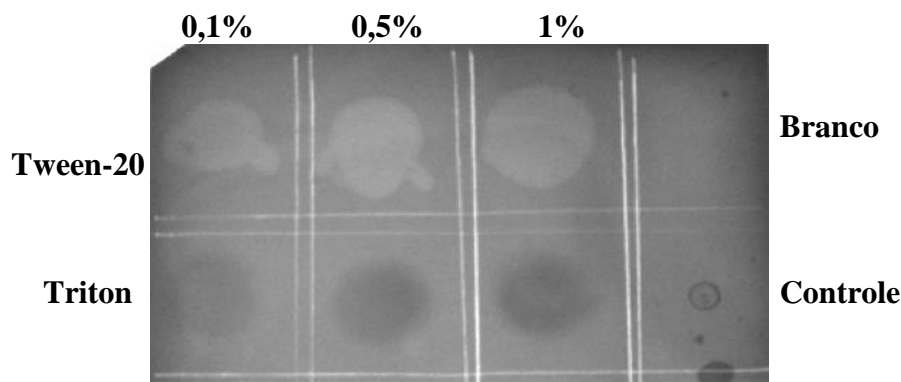


4.3.5 Análises de imunoenaios (*western blotting* e *dot blot*)

O extrato concentrado de LacRLg foi submetido ao ensaio com anticorpo anti-His (*western blotting*). No entanto, não foi possível detectar nenhuma banda após o procedimento de revelação com o anticorpo.

A amostra também foi submetida a análise de imunoensaio *dot blot* na presença de diferentes concentrações dos detergentes Tween 20 e triton. A FIGURA 4.15 mostra a membrana de nitrocelulose após a revelação com o anticorpo específico para cauda de histidina. Através dos resultados obtidos, pode-se concluir que a cauda de histidina se encontrava imersa na estrutura da enzima, onde a marcação só foi observada nas amostras homogeneizadas com os detergentes.

FIGURA 4. 15: Membrana de nitrocelulose das amostras de LacRLg na presença dos detergentes Tween 20 e triton (0,1, 0,5 e 1%) após revelação com anticorpo anti-His. Branco – membrana sem aplicação de amostra. Controle – extrato de LacRLg na ausência dos detergentes.



4.4 ESTUDOS DO POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO FRENTE A HIDROCARBONETOS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

O processo envolvido nas etapas de isolamento, produção e principalmente purificação de uma enzima, na grande maioria das vezes pode

ser dispendioso, complicado e ainda pode levar a redução da atividade da enzimática. Dessa forma, a utilização do microrganismo inteiro, ao invés da enzima purificada, é uma escolha considerável para processos de bioconversão e aplicação biotecnológica (HOLLAND, 1991; ZHOU et al., 2007). Portanto, no presente trabalho, para os testes frente a degradação dos HPA's, utilizou-se o extrato bruto da lacase concentrada.

CAJTHAML et al. (2002), citam que uma maneira de remover eficientemente os HPA's do meio ambiente é através da técnica de biorremediação. Visto que a enzima recombinante LacRLg possui características de uma lacase amarela foram realizados, então, experimentos para avaliar sua capacidade de degradação frente aos HPA's na ausência de mediadores químicos, com uma possível aplicação em processos de biorremediação no controle desses poluentes ambientais persistentes.

A escolha das melhores condições de reação, analisando fatores como pH, temperatura, concentração de substrato e enzima para os experimentos de degradação dos HPA's, foram baseados em relatos na literatura somados com as condições que foram estabelecidas anteriormente pela aluna de doutorado (2015) do presente grupo de pesquisa, Dra. Priscila Tomie Ike, a qual avaliou o potencial de degradação dos HPA's, frente a lacase amarela isolada de *L. gongylophorus*.

Os dados dispostos na literatura mostram que, no geral, lacases não apresentam atividade catalítica em pH alcalino. Assim, os experimentos foram realizados em tampão fosfato pH 6,0 a 30 °C na presença de Tween-20 (matriz) que é utilizado com surfactante para aumentar a disponibilidade do substrato hidrofóbico para a enzima (POZDNYAKOVA et al., 2004).

Inicialmente, foram avaliados o tempo de retenção dos HPA's antraceno, fenantreno e pireno na presença da matriz (Tampão e *Tween*). Para

isso, os HPA's (1 µg) foram solubilizados em tampão e Tween-20, no volume de final de 1 mL. Foram injetados 20 µL da solução e através de um gradiente linear de 60-100 % de acetonitrila em água, foi encontrado o tempo de retenção de 13,0 minutos para o antraceno (FIGURA 4.16-A), 12,5 minutos para o fenantreno (FIGURA 4.17-A) e 16,0 minutos para o pireno (FIGURA 4.18-A).

Nas FIGURAS 4.16-B, 4.17-B e 4.18-B, estão apresentados os cromatogramas dos experimentos que foram considerados como controle negativo, onde cada HPA foi colocado em contato com o extrato bruto de *P. pastoris* transformada com o plasmídeo pPICZαA, o qual contém todas as enzimas expressas pela levedura *P. pastoris*, exceto a lacase. Como pode ser observado, os cromatogramas apresentaram os mesmos sinais, com os respectivos tempos de retenção encontrados nos experimentos anteriores mostrando que as enzimas presentes no extrato bruto de *P. pastoris* não transformada não foram capazes de degradar os HPA's.

FIGURA 4. 16: Cromatogramas dos experimentos para tempo de retenção de antraceno (A) e controle de antraceno (B).

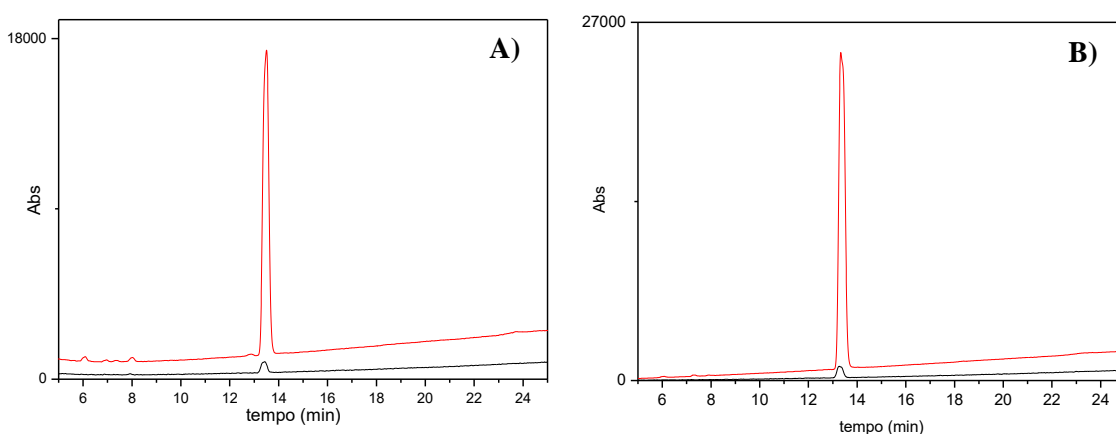


FIGURA 4. 17: Cromatogramas dos experimentos para tempo de retenção de fenantreno (A) e controle de fenantreno (B).

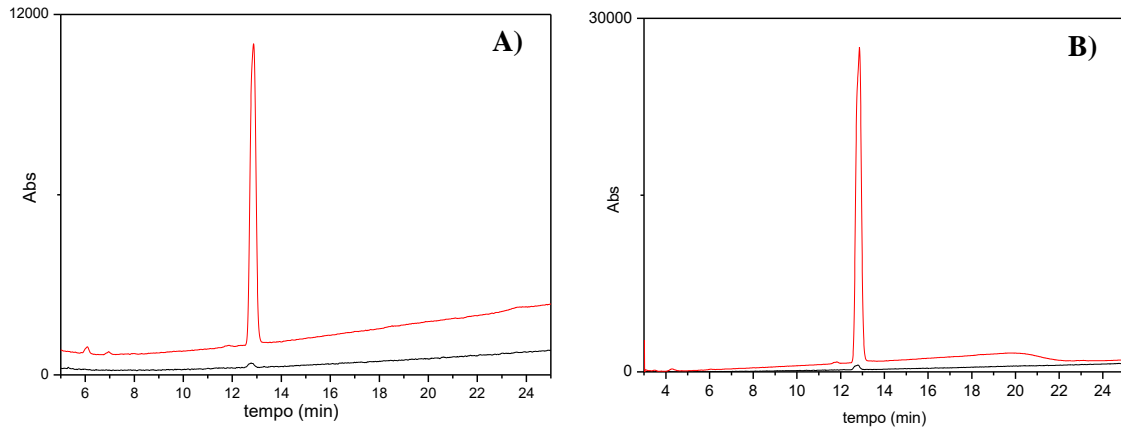
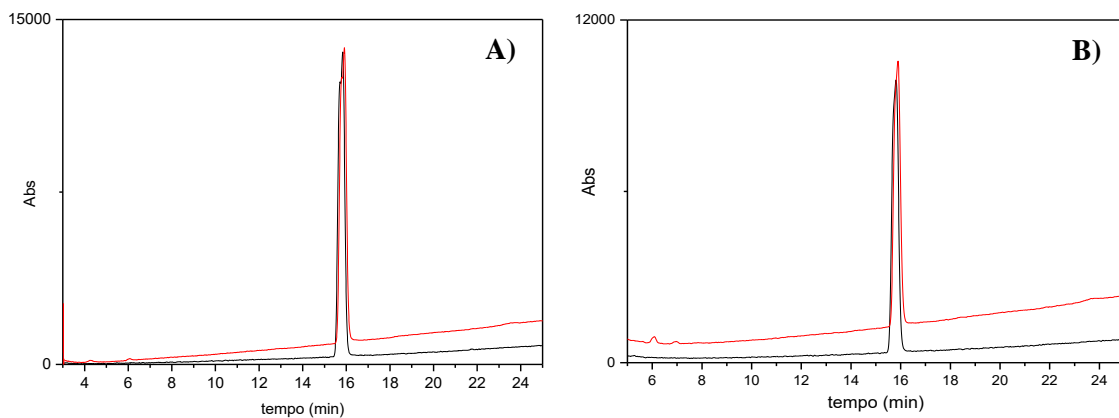


FIGURA 4. 18: Cromatogramas dos experimentos para tempo de retenção de pireno (A) e controle de pireno (B).



A degradação dos HPA's pela lacase em função do tempo foi avaliada solubilizando os HPA's ($1 \mu\text{g}$) em tampão e *tween-20*, na presença de 5 U de lacase (presente no extrato bruto de *P. pastoris*) com volume final de 1 mL. A cada 2 horas até 12 horas de experimento, uma alíquota de $20 \mu\text{L}$ desta solução foi injetada no sistema LC e as FIGURAS 4.19, 4.20 e 4.21 mostram os picos de retenção dos HPA's de 0 (começo do experimento) até 12 horas de reação. Observa-se que há um decaimento do pico correspondente a cada HPA avaliado ao longo do tempo indicando que os HPA's estavam, então, sendo degradados pela lacase.

FIGURA 4. 19: Cromatogramas do experimento de decaimento de antraceno por 12 horas.

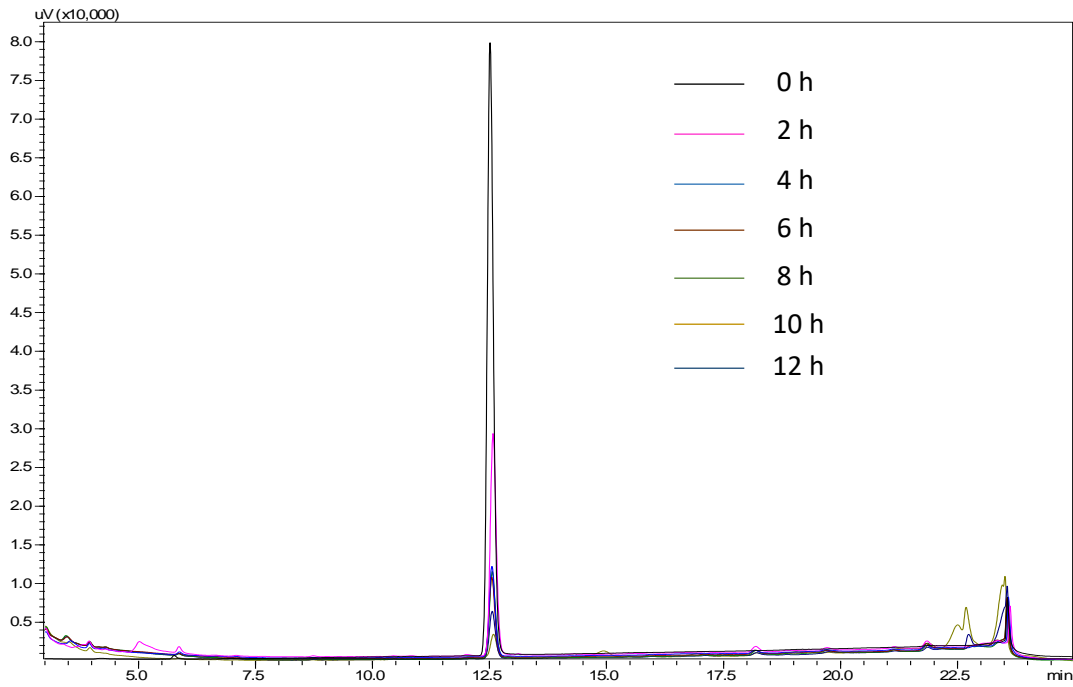


FIGURA 4. 20: Cromatogramas do experimento de decaimento de fenantreno por 12 horas.

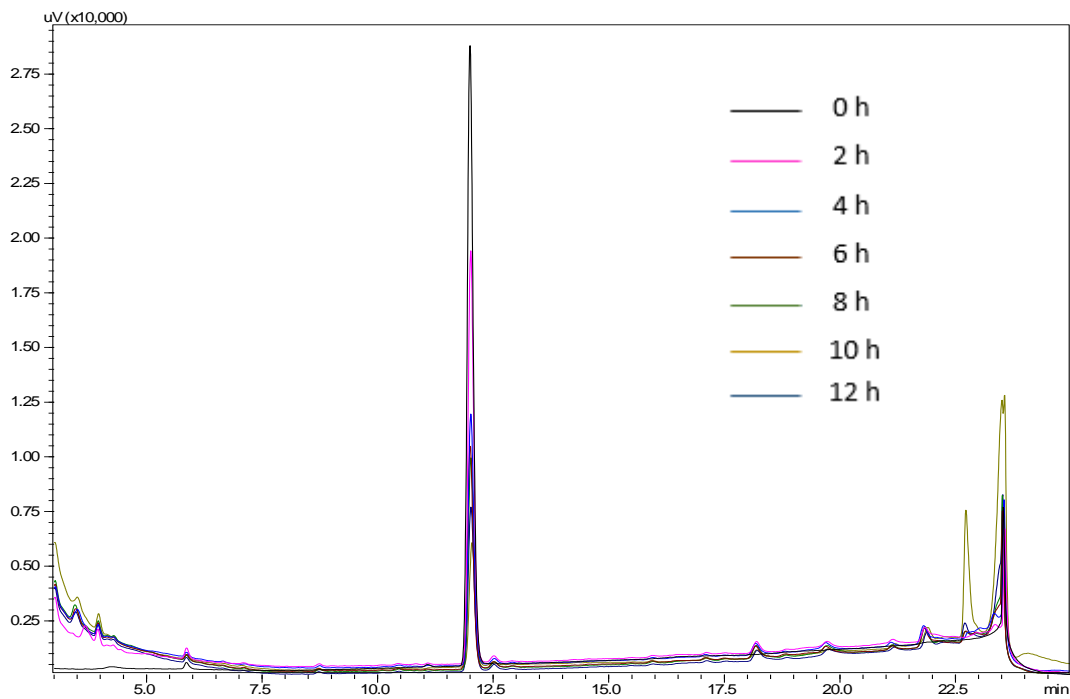
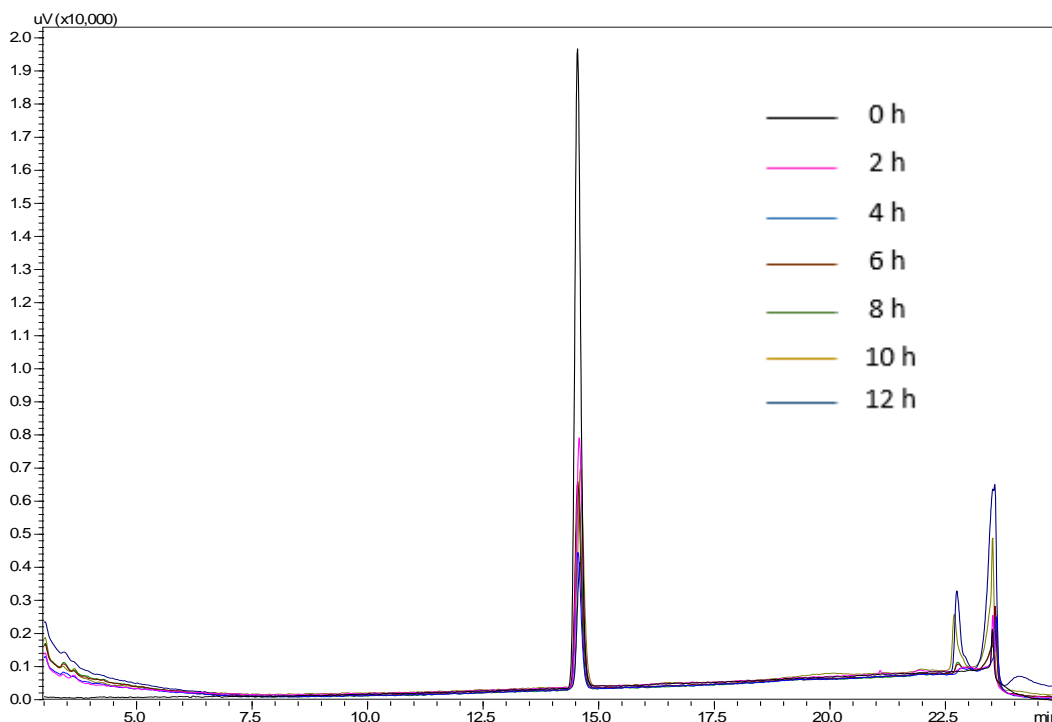


FIGURA 4. 21: Cromatogramas do experimento de decaimento de pireno por 12 horas.



Após 24 hs de reação dos HPA's com a lacase, o produto de degradação formado de cada HPA foi extraído com acetato de etila, posteriormente concentrado por evaporação e avaliado por sistema LC. Nas FIGURAS 4.22, 4.23 e 4.24 são mostradas a sobreposição dos cromatogramas obtidos para o antraceno, fenantreno e pireno com 24 hs de reação com a lacase, e seu produto de degradação concentrado, respectivamente. É possível observar nesses cromatogramas o decaimento do pico de cada HPA até uma intensidade muito baixa e após a extração e concentração do meio reacional, novos picos com tempo de retenção de 13,5, 12,8 e 15,7 minutos para antraceno, fenantreno e pireno, respectivamente. A diferença de área do pico de cada HPA permitiu calcular os valores de degradação de 91 % para antraceno, 85 % para fenantreno e 86 % para pireno, para a reação realizada em 24 hs.

POZDNYAKOVA et al., relataram que a lacase amarela de *Pleurotus ostreatus* conseguiu oxidar os compostos perileno (~100%), antraceno (~95%), fluoreno (~95%) e pireno (~39%) em 48 hs, sem a adição de mediadores. Com 10 dias, sem a adição de mediadores, foi possível observar a degradação de (~87%) de fenantreno e (49%) de fluoranteno (POZDNYAKOVA et al., 2004; POZDNYAKOVA et al., 2006).

Portanto, a lacase amarela LacRLg do presente trabalho, apresentou uma degradação com valores acima de 80% para os HPA's antraceno, fenantreno e pireno com apenas 24 hs de reação, quando comparada com a lacase amarela de POZDNYAKOVA e colaboradores, a qual necessitou de um tempo maior para degradar os mesmos HPA's.

FIGURA 4. 22: Cromatogramas do experimento com 24 h de reação para antraceno e extração do produto de degradação.

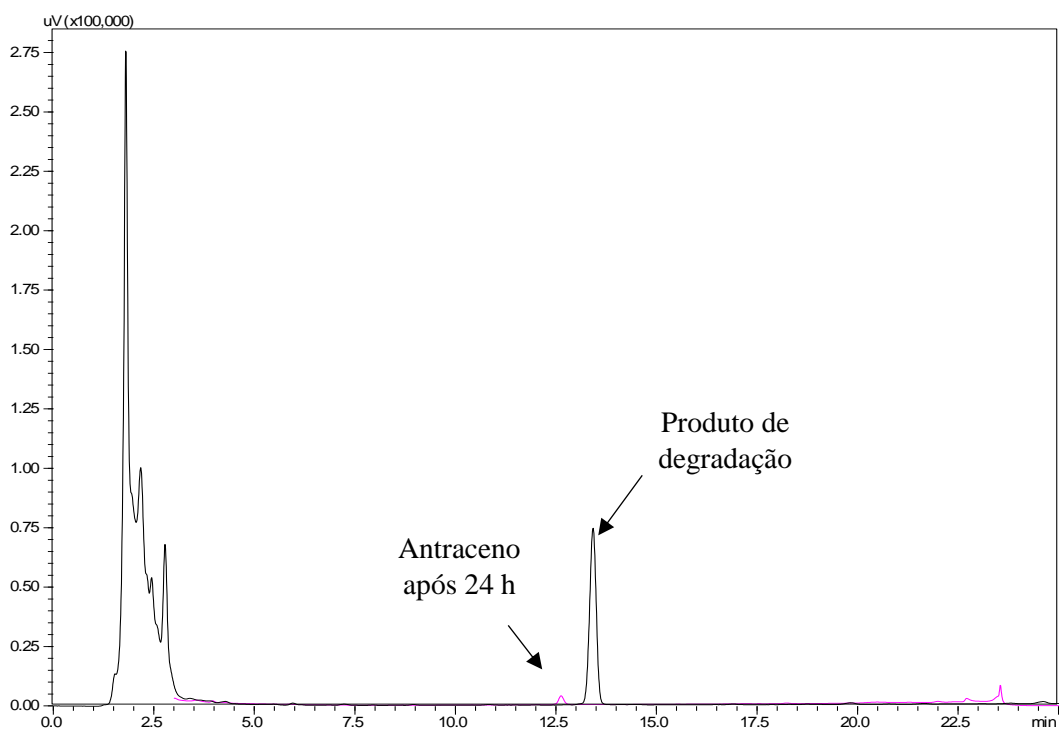


FIGURA 4. 23: Cromatogramas do experimento com 24 h de reação para fenantreno e extração do produto de degradação.

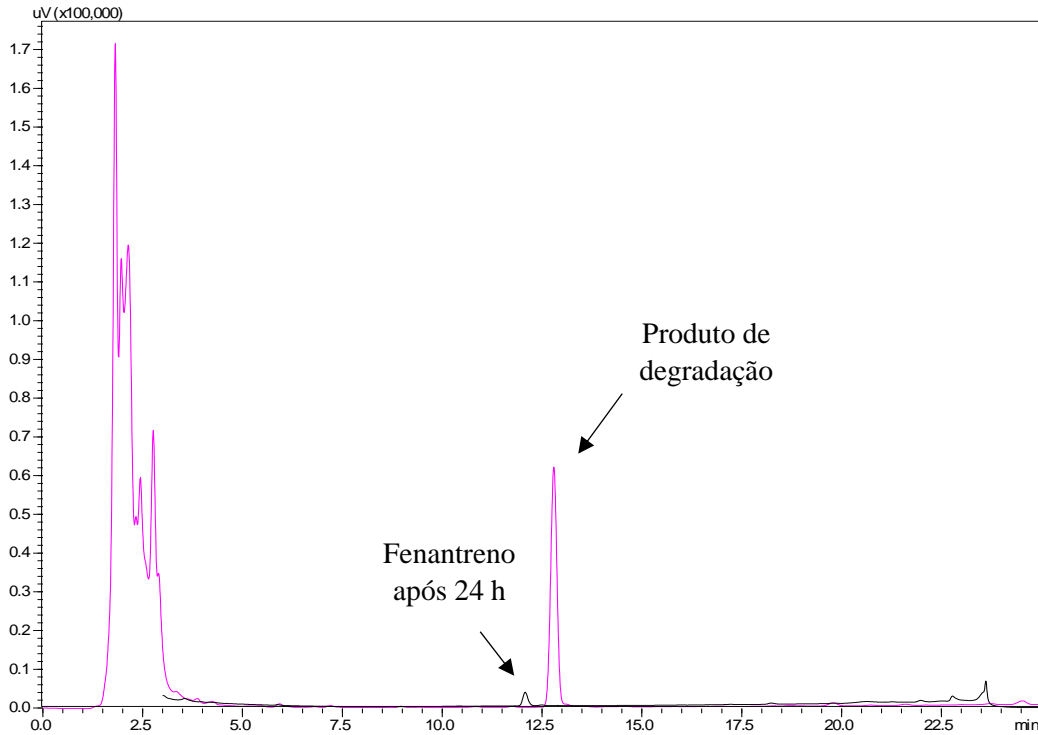
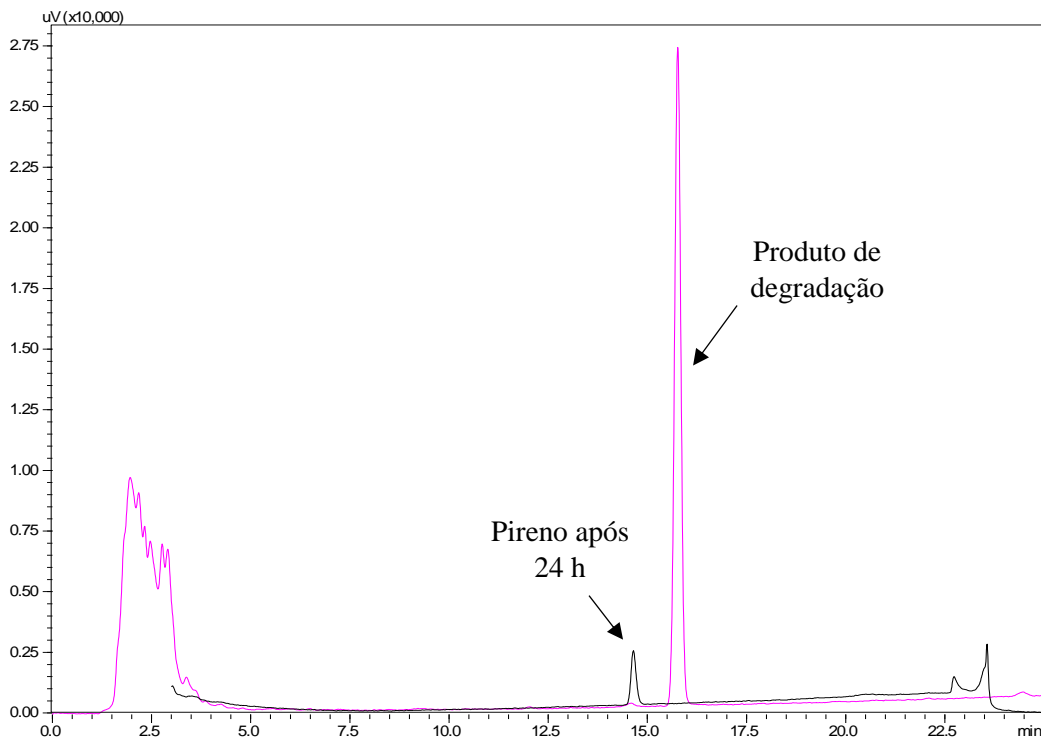


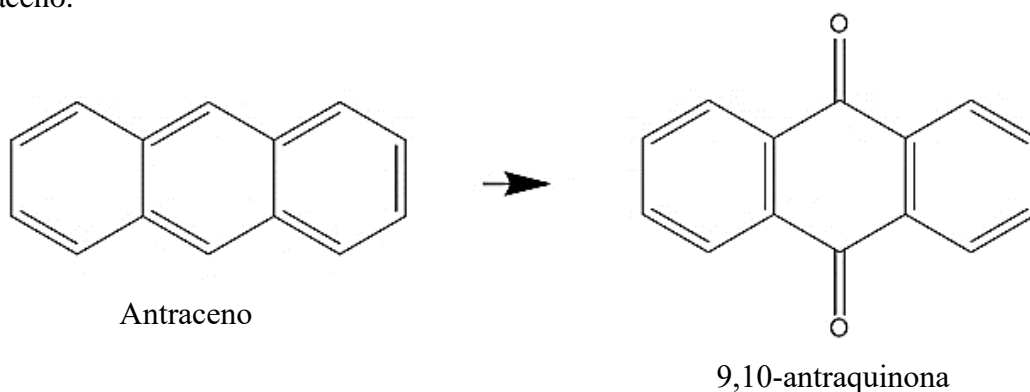
FIGURA 4. 24: Cromatogramas dos experimentos com 24 h de reação com pireno e extração do produto de degradação.



Baseado nos dados da literatura que mostram que as lacases de origem fúngica oxidam o antraceno para a 9,10 antraquinona, como

apresentado na FIGURA 4.25 (KADRI et al., 2017), considera-se que este produto pode estar sendo formado. No entanto, é necessária a realização de outros experimentos para a confirmação.

FIGURA 4. 25: Formação da 9,10-antraquinona através da oxidação por lacases fúngicas do antraceno.



Para o fenantreno os resultados sugerem, de acordo com a literatura, a formação do fenantreno 9,10 –quinona através da oxidação do fenantreno (FIGURA 4.26). A oxidação do pireno pode formar um ou dois produtos de degradação sendo eles: a 1,6-pirenoquinona e a 1,8-pirenoquinona (KADRI et al., 2017). Como foi observada a presença de um único sinal para o experimento de 24 horas com o pireno, o resultado sugere a formação de um único produto de degradação para este HPA (FIGURA 4.27).

FIGURA 4. 26: Formação do fenantreno 9,10-quinona através da oxidação por lacases fúngicas do fenantreno.

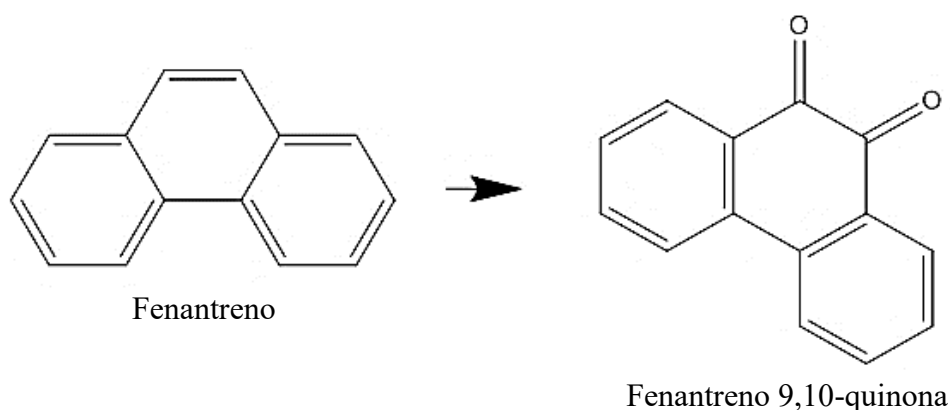
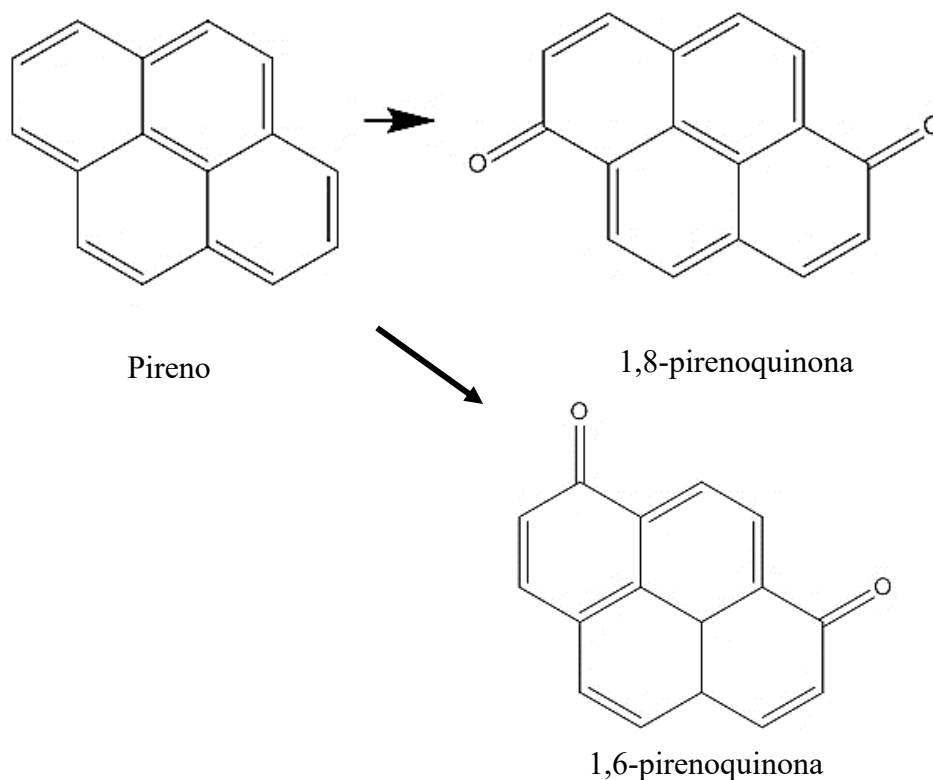


FIGURA 4. 27: Formação da 1,6-pirenoquinona e/ou a 1,8-pirenoquinona pela oxidação por lacases fúngicas do pireno.



Esses resultados mostram que a lacase amarela recombinante de *L. gongylophorus* obtida neste trabalho apresenta, portanto, potencial capacidade de uso em processos biotecnológicos, uma vez que é capaz de degradar os HPA's testados acima de 80 % em 24 horas, mesmo na ausência de mediadores químicos.

A primeira lacase amarela descrita na literatura foi no ano de 1997 por Leontievsky e colaboradores. Depois, passaram-se cerca de 6 anos sem publicações sobre novas lacases amarelas. O levantamento bibliográfico disposto nesse trabalho sobre as lacases amarelas evidencia a escassez sobre estudos realizados acerca dessas enzimas.

Do nosso conhecimento, esta é a segunda lacase amarela obtida de forma heteróloga. A primeira descrita na literatura é a enzima denominada rLac1 oriunda de *Ganoderma fornicatum* expressa em *P. pastoris* (HUANG et

al., 2011). rLac1 não absorve luz a 600 nm e catalisa a degradação de ABTS, DMP e guaiacol.

As metodologias de obtenção da enzima desenvolvidas neste trabalho contribuirão para o futuro estudo estrutural da mesma o que poderá levar a identificação de fatores estruturais envolvidos nas suas características.

CONCLUSÕES

5. Conclusões

Neste trabalho foi obtida uma lacase amarela recombinante (LacRLg) do fungo *L. gongylophorus*, simbiote de formiga cortadeira. Essa enzima mostrou eficiência na degradação dos três HPA's testados (acima de 80% em 24 horas) na ausência de mediadores químicos.

Do nosso conhecimento, até o momento, não há estrutura tridimensional de lacases amarelas conhecidas e a falta de informação estrutural dificulta o entendimento das diferenças existentes entre as lacases azuis e amarelas. Assim, nosso trabalho, o segundo a descrever a expressão de uma lacase amarela recombinante, abre caminhos para a obtenção de quantidades necessárias de enzima para estudos estruturais.

A grande maioria dos trabalhos e estudos realizados com o fungo *L. gongylophorus* é focado na relação simbiótica entre o mesmo com a formiga cortadeira *A. sexdens* objetivando o controle de pragas. No presente trabalho o fungo mostrou ser, também, uma fonte valiosa na exploração de moléculas com aplicações biotecnológicas.

**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADALBERTO, P. R.; DOS SANTOS, F. J.; GOLFETO, C. C.; IEMMA, M. R. C.; SOUZA, D. H. F. & CASS, Q. B. “Immobilization of Pectinase from *Leucoagaricus gongylophorus* on magnetic particles”. *Analyst*, **137**: 4855-4859, 2012.

ADALBERTO, P. R.; GOLFETO, C. C.; MOREIRA, A. C.; ALMEIDA, F. G.; FERREIRA, D.; CASS, Q. B. & SOUZA, D. H. F. “Characterization of an Exopolygalacturonase from *Leucoagaricus gongylophorus*, the Symbiotic Fungus of *Atta sexdens*. *Advances in Enzyme Research*, **04**: 7-19, 2016.

ADEMAKINWA, A. N. & AGBOOLA, F. K. “Biochemical characterization and kinetic studies on a purified yellow laccase form newly isolated *Aureobasidium pullulans* NAC8 obtained from soil containing decayed plant matter”. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, **14**(1): 143, 2016.

ARAUJO, J.; YEGRES, F.; BARRETO, C. G.; ANTEQUERA, A. A.; DEPOOL, B. & ROJAS, Y. “Biocatalizadores fúngicos hidrocarbonoclasticos del genero *Aspergillus* para la descontaminación de agua com hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs)”. *Revista Cubana de Química*, **28**(2): 703, 2016.

AVELAR, M.; OLVERA, C.; ACEVES-ZAMUDIO, D.; FOLCH, J. L. & AYALA, M. “Recombinant expression of a laccase from *Coriopsis gallica* in *Pichia pastoris* using a modified α -factor preproleader”. *Protein Expression and Purification*, **136**: 14, 2017.

BABU, P. R. & PINNAMANENI, R. & KOONA, S. “Occurrences, Physical and Biochemical Properties of Laccase”. *Universal Journal of Environmental Research and Technology*, **2**(1): 1-13, 2012.

BALDRIAN, P. “Fungal laccases-occurrence and properties”. *FEMS Microbiology Reviews* **30**(2): 215–242, 2006.

BAO, W.; O'MALLEY, D. M.; WHETTEN, R. & SEDEROFF, R. R. “A laccase associated with lignification in loblolly pine xylem”. *Science*, **260** (5108): 672, 1993.

BRADFORD, M.M. “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”. *Analytical Biochemistry*, **72**: 248, 1976.

CAJTHAML, T.; MÖDER, M.; KAČER, P.; ŠAŠEK, V. & POPP, P. “Study of fungal degradation products of polycyclic aromatic hydrocarbons using gas chromatography with ion trap mass spectrometry detection”. *Journal of Chromatography A*, **974**: 213-222, 2002.

CAÑAS, A.I. & CAMARERO, S. “Laccases and their natural mediators: biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes”. *Biotechnology Advances*, **28**(6): 694, 2010.

CHAUHAN, S.P.; GORADIA, B. & JHA B. “Optimization and up scaling of ionic liquid tolerant and thermo-alkali stable laccase from a marine *Staphylococcus arlettae* S1-20 using tea waste”. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, **8**: 59, 2018.

CHAURASIA, P. K.; YADAV, R. S. S. & YADAVA, S. “Purification and characterization of yellow laccase from *Trametes hirsute* MTCC-1171 and its application in synthesis of aromatic aldehydes”. *Process Biochemistry*, **49** (10): 1647, 2014.

CHEN, B.; XU, W-Q.; PAN, X-R. & LU, L. “A novel non-blue laccase from *Bacillus amyloliquefaciens*: Secretory expression and characterization”. *International Journal of Biological Macromolecules*, **76**: 39-44, 2015.

CHILDS, R. E. & BARDSLEY, W. G. “The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen”. *Biochemical Journal*, **145**: 93, 1975.

CLAUS, H. “Laccases and their occurrence in prokaryotes”. *Archives of Microbiology*, **179**: 145, 2003.

CREGG, J. M.; MADDEN, K. R.; BARRINGER, K. J.; THILL, G. P. & STILLMAN, C. A. “Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*”. *Molecular and Cellular Biology*, **9**(3): 1316, 1989.

DAROCH, M.; HOUGHTON, C. A.; MOORE, J. K.; WILKINSON, M. C.; CARNELL, A. J.; BATES, A. D. & IWANEJKO, L. A. “Glycosylated yellow laccases of the basidiomycete *Stropharia aeruginosa*”. *Enzyme and Microbial Technology*, **58**: 1, 2014.

DAS, S. & ROSAZZA, J. P. N. “Microbial and enzymatic transformations of flavonoids”. *Journal of Natural Products*, **69**(3): 499, 2006.

DE FINE LICHT, H. H.; SCHIØTT, M.; ROGOWSKA-WRZESINSK, A.; NYGAARD, S.; ROEPSTORFF, P. & BOOMSMA, J. J. “Laccase detoxification mediates the nutritional alliance between leaf-cutting ants and fungus-garden symbionts”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110**(2): 583, 2013.

DZIOŃEK, A.; WOJCIESZYŃSKA, D. & GUZIK, U. “Natural carriers in bioremediation: a review”. *Electronic Journal of Biotechnology*, **23**: 28, 2016.

FEITOSA, V. A. “Produção de Fragmento Recombinante de Anticorpo em *Pichia pastoris*”. São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica – USP, 2014. Dissertação de Mestrado, 84p.

GAGNON, P.; FROST, R.; OGAWA, T. “CHTTM Ceramic Hydroxyapatite - A New Dimension in Chromatography of Biological Molecules”. Biosystems, Validated Laboratories, Bio-rad Laboratories, Inc., Bulletin 2156, 2009.

GOLFETO, C. C. “Estudos Funcionais de Pectinases do Fungo *Leucoagaricus gongylophorus* Simbionte de Formigas Cortadeiras”. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2014. Tese de Doutorado, 87p.

HAIBO, Z.; YINGLONG, Z.; FENG, H.; PEIJI, G. & JIACHUAN, C. “Purification and characterization of a thermostable laccase with unique oxidative characteristics from *Trametes hirsuta*”. Biotechnology Letters, **31**: 837-843, 2009.

HOLLAND, P. M.; ABRAMSON, R. D.; WATSON, R. & GELFAND, D. H. “Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' → 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase”. Biochemistry, **88**: 7276, 1991.

HOLM, K.A.; NIELSEN, D.M. & ERIKSEN, J. “Automated colorimetric determination of recombinant fungal laccase activity in fermentation samples using syringaldazine as chromogenic substrate”. Journal of Automatic Chemistry, **20**(6): 199, 1998.

HUANG, W-T; TAI, R.; HSEU, R-S & HUANG, C-T “Overexpression and characterization of a thermostable, pH-stable and organic solvent-tolerant *Ganoderma fornicatum* laccase in *Pichia pastoris*”. Process Biochemistry **46**: 1469-1474, 2011.

IHSSEN, J.; REISS, R.; LUCHSINGER R.; THÖNY-MEYER L. & RICHTER, M. “Biochemical properties and yields of diverse bacterial laccase-like multicopper oxidases expressed in *Escherichia coli*”. Scientific Reports, **5**: 10465, 2015.

IKE, P. T. L. “Produção, Caracterização e Aplicação Biotecnológica de Lacases do Fungo *Leucoagaricus gongylophorus*”. São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química - UFSCar, 2015. Tese de Doutorado, 159 p.

IKE, P. T. L.; MOREIRA, A. C.; DE ALMEIDA, F. G.; FERREIRA, D.; BIROLI, W. G.; PORTO, A. L. M. & SOUZA, D. H. F. “Functional characterization of a yellow laccase from *Leucoagaricus gongylophorus*”. SpringerPlus, **4**: 654, 2015.

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I. & CAMARGO, F. A. DE OLIVEIRA. “Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos”. *Ciência Rural*, **37**: 4, 2007.

JORDAAN, J. “Isolation and characterization of a novel thermostable and catalytically efficient laccase from *Peniophora sp.* Strain UD4”. PhD Thesis. Rhodes University, 2005.

KADRI, T.; ROUISSI, T.; BRAR, S. K.; CLEDON, M.; SARMA, S. & VERMA, M. “Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: A review”. *Journal of Environmental Sciences*, **51**: 52-74, 2017.

KUNAMNENI, A.; PLOU, F. J.; BALLESTEROS, A. & ALCALDE, M. “Laccases and their applications: A patent review”. *Recent Patents on Biotechnology*, **2**: 10-24, 2008.

LAEMMLI, U.K. “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4”. *Nature*, **227**: 680, 1970.

LAN, J.; SUN, Y.; XIAO, S. & YUAN D. “Polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in a highly vulnerable underground river system in Chongqing, Southwest China”. *Journal of Geochemical Exploration*, **168**: 64-71, 2016.

LEONTIEVSKY, A.; VARES, T.; LANKINEN, P.; SHERGILL, J. K.; POZDNYAKOVA, N. N.; MYASOEDOVA, N. M.; KALKKINEN, N.; GOLOVLEVA, L.; CAMMACK, R.; THURSTON, C. F. & HATAKKA, A. “Blue and yellow laccases of ligninolytic fungi”. *FEMS Microbiology Letters*, **156**(1): 9, 1997.

MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M. L.; MCNEIL B. & HARVEY L. M. “Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system”. *Yeast*, **22**: 249-270, 2005.

MADHAVI, V. & LELE, S. S. “Laccase: properties and applications”. *BioResources* **4**:1694–1717, 2009.

MATE, D. & GARCIA-RUIZ, E. “Switching from blue to yellow: altering the spectral properties of a high redox potential laccase by directed evolution”. *Biocatalysis and Biotransformation*, **21**: 8, 2013.

MOREIRA, A. C.; FERREIRA, D.; ALMEIDA, F. G.; RODRIGUES-FILHO, E.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F.; VIEIRA, P. C.; PAGNOCCA, F. C. & SOUZA, D. H. F. “Molecular and Kinetic Characterization of Two Extracellular Xylanases Isolated from *Leucoagaricus gongylophorus*”. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **173**: 694-704, 2014.

MOREIRA, A. C.; DOS SANTOS, A. M.; CARNEIRO, R. L.; BUENO, O. C. & SOUZA, D. H. F. “Validation of reference genes in leaf-cutting ant *Atta*

sexdens rubropilosa in different developmental stages and tissues”. International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology, **2**: 743-755, 2017.

MOT, A. C.; PÂRVU, M.; DAMIAN, G.; IRIMIE, F. D.; DARULA, Z.; MEDZIHRADESKY, K. F.; BREM, B. & SILAGHI-DUMITRESCU, R. “A “yellow” laccase with “blue” spectroscopic features, from *Sclerotinia sclerotiorum*”. Process Biochemistry, **47**: 968-975, 2012.

MUKHOPADHYAY, M. & BANERJEE, R. “Purification and biochemical characterization of a newly produced yellow laccase from *Lentinus squarrosulus* MR13”. 3 Biotech, **5**: 227-236, 2014.

NING, Y-J; WANG, S-S; CHEN, Q-J; LING, Z-R; WANG, S-N; WANG, W-P; ZHANG, G-Q & ZHU, M-J “An extracellular yellow laccase with potent dye decolorizing ability from the fungus *Leucoagaricus naucinus* LAC-04”. International Journal of Biological Macromolecules, **93**: 837-842, 2016.

NCUBE, S.; MADIKIZELA, L.; CUKROWSKA, E. & CHIMUKA, L. “Recent advances in the adsorbents for isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from environmental sample solutions”. Trends in Analytical Chemistry, **99**: 101-116, 2018.

PENNELL, C. A. & ELDIN, P. “In vitro production of recombinant antibody fragments in *Pichia pastoris*”. 74th Forum in Immunology, 1998.

PEZZELLA, C.; GIACOBELLI, V. G.; LETTERA, V.; OLIVIERI, G.; CICATIELLO, P.; SANNIA, G. & PISCITELLI, A. “A step forward in laccase exploitation: Recombinant production and evaluation of techno-economic feasibility of the process”. Journal of Biotechnology, **259**: 175-181, 2017.

POZDNYAKOVA, N. N., RODAKIEWICZ-NOWAK, J. & TURKOVSKAYA, O. V. “Catalytic properties of yellow laccase from *Pleurotus ostreatus* D1”. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, **30**(1): 19, 2004.

RENART, J.; REISER, J. & STARK, G. R. “Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure.” Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **76**(7): 3116, 1979.

RICHARD, F. J.; MOURA, P.; ERRARD, C. & ROULAND, C. “Digestive capacities of leaf-cutting ants the contribution of their fungal cultivar to the degradation of plant material”. Journal Comparative Physiology B, **175**: 297, 2005.

RIVERA-HOYOS, C.; MORALES-ÁLVAREZ, E. D.; POUTOU-PIÑALES, R. A.; PEDROZA-RODRÍGUEZ, A. M.; RODRÍGUES-VÁZQUEZ, R. & DELGADO-BOADA, J. M. “Fungal laccases”. *Fungal Biology Reviews*, **27**: 67-82, 2013.

SCHWARZHANS, J.-P.; LUTTERMANN T.; GEIER, M.; KALINOWSKI, J. & FRIEHS, K. “Towards systems metabolic engineering in *Pichia pastoris*”. *Biotechnology Advances*, **35**: 681-710, 2017.

SHARMA, M.; CHAURASIA, P. K.; YADAV, A.; YADAV, R. S. S.; YADAVA, S. & YADAV K. D. S. “Purification and Characterization of a Thermally Stable Yellow Laccase from *Daedalea flavida* MTCC-145 with Higher Catalytic Performance towards Selective Synthesis of Substituted Benzaldehydes”. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, **42**(1): 59-68, 2016.

SHARMA, B.; DANGI, A. K. & SHUKLA, P. “Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: A review”. *Journal of Environmental Management* **210**: 10-22, 2018.

SILVA, A.; BACCI JR. M.; SIQUEIRA, C. G.; BUENO, O. C.; PAGNOCCA, F. C. & HEBLING, M. J. A. “Survival of *Atta sexdens* workers on different food sources”. *Journal of Insect Physiology*, **49**: 307, 2003.

SILVA, A.; MAURÍCIO, B. JR.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C. & HEBLING, M. J. A. “Production of polysaccharidases in different carbon sources by *Leucoagaricus gongylophorus* Möller (Singer), the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta sexdens* Linnaeus”. *Cellulose*, **53**: 68, 2006.

SILVA, V. C.; PERES, M. F. S. & GATTÁS E. A. L. “Application of methylotrophic yeast *Pichia pastoris* in the field of food industry – A review”. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, **7**(2): 268-273, 2009.

SILVA, J. R. S. N. “Construção de vetores para superexpressão da proteína L1 do HPV16 em *Pichia pastoris*”. São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica – USP, 2010. Dissertação de Mestrado, 104p.

SOLOMON, E.I.; AUGUSTINE, A.J. & YOON, J. “O₂ reduction to H₂O by the multicopper oxidases”. *NIH Public Access*, **14**(30): 3921, 2010.

THURSTON, C.F. “The structure and function of fungal laccases”. *Microbiology*, **140**: 19, 1994.

VATS, A. & MISHRA, S. “Identification and evaluation of bioremediation potential of laccase isoforms produced by *Cyathus bulleri* on wheat bran”. *Journal of Hazardous Materials*, **334**: 446-479, 2018.

WANG, S-N; CHEN, Q-J; ZHU, M-J; XUE, F-Y; LI, W-C; ZHAO, T-J, LI G-D & ZHANG, G-Q “An extracellular yellow laccase from white rot fungus

Trametes sp. F1635 and its mediator systems for dye decolorization”. *Biochimie*, **148**: 46-54, 2018.

WOLFENDEN, R. S. & WILSON, R. L. “Radical-cations as reference chromogens in the kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)”. *Journal Chemical Society*, **2**: 805, 1982.

ZHOU, G.; ZHANG, M.; JI, D. H. & ZHU, Q. “Tree Kernel-based Relation Extraction with Context-Sensitive Structured Parse Tree Information”. *Joint Conference on Empirical Methods in Natural Language Processing and Computational Natural Language Learning*, pp. 728-736, Prague, 2007.