



MINISTÉRIO DE EDUCAÇÃO E DESPORTO – MEC
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**CLONAGEM, EXPRESSÃO HETERÓLOGA E
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
UM GENE DE LACASE DE *PYCNOPORUS SANGUINEUS***

Discente: Priscila da Silva Lima
Orientador: Dr. Carlos Roberto Félix
Co-Orientadora: Dra.: Eliane Ferreira Noronha

**BRASÍLIA/DF
JULHO/2009**



MINISTÉRIO DE EDUCAÇÃO E DESPORTO – MEC
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA – UnB
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MOLECULAR

**CLONAGEM, EXPRESSÃO HETERÓLOGA E
CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE
UM GENE DE LACASE DE *PYCNOPORUS SANGUINEUS***

Priscila da Silva Lima

Dissertação de Mestrado - Programa de
Pós-Graduação em Biologia Molecular
da Universidade de Brasília-UnB.

**BRASÍLIA/DF
JULHO/200**

PRISCILA DA SILVA LIMA

ORIENTAÇÃO

Orientador Dr. Carlos Roberto Félix

Co-Orientadora Dra. Eliane Ferreira Noronha

BANCA EXAMINADORA

Dr. Carlos Roberto Félix (UnB)
(Titular)

Dr. Tatsuya Nagata (Unb)
(Titular)

Dra. Betania Ferraz Quirino (EMBRAPA- Agroenergia)
(Titular)

Dra. Lídia Maria Pepe de Moraes
(Suplente)

Brasília ____/____/____

Resultado _____

Soneto de Fidelidade

*De tudo ao meu amor serei atento
Antes, e com tal zelo, e sempre, e tanto
Que mesmo em face do maior encanto
Dele se encante mais meu pensamento.*

*Quero vivê-lo em cada vão momento
E em seu louvor hei de espalhar meu canto
E rir meu riso e derramar meu pranto
Ao seu pesar ou seu contentamento*

*E assim, quando mais tarde me procure
Quem sabe a morte, angústia de quem vive
Quem sabe a solidão, fim de quem ama*

*Eu possa me dizer do amor (que tive):
Que não seja imortal, posto que é chama
Mas que seja infinito enquanto dure.*

Vinicius de Moraes

DEDICATÓRIA

Ao meu querido Celso pelo incentivo constante e por estar sempre ao meu lado durante esta jornada e à minha querida mãe por sempre lutar por mim não importasse a situação ou ocasião.

AGRADECIMENTOS

Ao Querido Professor Carlos Roberto Félix por aceitar participar deste trabalho;

A minha querida Professora Eliane Ferreira Noronha por acompanhar meus passos curtos desde a graduação estimulando-me e ensinando-me a alargar os meus passos e alcançar minhas conquistas;

Ao Professor Tatsuya Nagata, surpreendentemente generoso e prestativo ajudando-me e ensinando-me do início ao fim no meu trabalho de mestrado, graças a esta benevolência estou alcançando mais esta vitória;

A Professora Lídia Maria Pepe de Moraes por ensinar-me sua técnica única no país de manipulação de leveduras metilotróficas;

A CAPES por financiar minha bolsa de mestrado durante 48 meses;

Aos colegas de trabalho da Universidade Católica de Brasília e da Universidade de Brasília, que foram fundamentais em cada etapa do meu trabalho, dentre eles: Simone, Michelle, Idacuí, Luciana, Nídia, Jackeline, Abdalla, Luis e Bruno.

Aos amigos que amo e que espero que continuem ao meu lado nesta vida: Camila, Isis, Viviane, Marcelo, Antônio, Cláudia e Kellen;

A toda minha família que sempre incentivou e elogiou minha postura acadêmica e a luta por um sistema educacional melhor;

Ao meu querido pai Pedro da Silva Lima e minha mãe Guiomar Dutra Lima e ao meu irmão Pedro Henrique, vocês são tudo para mim;

E a você, Celso Nunes Dias.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
Introdução.....	12
2. Justificativa.....	36
3. Objetivos	36
4. Material e Métodos	37
4.1. Microorganismos: origem e manutenção	37
4.2. Desenho dos iniciadores (“primers”)	38
4.3. Extração do RNA de <i>P. sanguineus</i>	40
4.4. Reação de Transcrição Reversa e amplificação do cDNA	41
4.5. Ligação ao vetor pGEM-T.....	41
4.6. Transformação de células de <i>Escherichia coli</i>	42
4.7. Análise dos clones transformantes	42
4.8. Construção 1	43
4.9. Construção 2	46
4.10. Seqüenciamento do cDNA de lacase ligado ao pGEM-T	50
4.11. Análises <i>in silico</i>	50
5. Resultados e Discussão	51
5.1. Amplificação do cDNA da lacase de <i>P. sanguineus</i>	51
5.2. Clonagem no vetor pGEM-T	52
5.3. Construção 1	53
5.4. Construção 2	55
5.5. Análise <i>in silico</i>	60
6. Conclusão	63
7. Perspectivas	64
8. Referências	65

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1 Estrutura química do corante “Lysotracker” vermelho.
- Figura 1.2. Estrutura globular de uma lacase de *T. versicolor* contendo folhas beta em amarelo e alfa-hélices em vermelho.
- Figura 1.3. Dois possíveis modelos espectroscopicamente de ligações entre diferentes tipos de cobre em um sítio ativo de uma lacase.
- Figura 1.4. Representação do Ciclo Catalítico das tirosinases.
- Figura 1.5. Movimentação dos elétrons pelos íons de cobres durante uma reação enzimática da lacase.
- Figura 4.1. Seqüência completa do gene de uma lacase do fungo filamentosso *P. sanguineus*.
- Figura 4.2. Mapa do vetor de clonagem do produto da RT-PCR, pGEM-T.
- Figura 4.3. Mapa do vetor de clonagem pPICZ α A.
- Figura 4.4. Mapa do vetor de expressão pPIC 9.
- Figura 5.1. Análise eletroforética em gel de agarose das reações da RT-PCR. RNA poliA⁺ extraído do micélio de *P. sanguineus*.
- Figura 5.2. Análise eletroforética em gel de agarose.
- Figura 5.3. Análise Eletroforética em gel de agarose.
- Figura 5.5. Análise Eletroforética em gel de agarose.
- Figura 5.6. Análise eletroforética em gel de agarose.
- Figura 5.7. Análise Eletroforética em gel de agarose.
- Figura 5.8. Análise eletroforética em gel de agarose.
- Figura 5.9. Placa contendo células de *P. pastoris* cultivadas em meio de cultura seletivo (MD) contendo metanol e o substrato de lacase AzBTS.
- Figura 5.10. Esquema ilustrativo dos domínios de cobre oxidase presentes na seqüência predita da lacase de *P. sanguineus*.
- Figura 5.11. Alinhamento da seqüência de aminoácidos da lacase predita com a seqüência de aminoácidos utilizada como molde para obter a estrutura tridimensional.
- Figura 5.12. Modelo da estrutura tridimensional da lacase de *P. sanguineus*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Lista de algumas enzimas utilizadas para degradar PAHs.

Tabela 1.2 Relação de aplicações da enzima lacase com os respectivos fungos produtores desta enzima e os autores que realizaram as pesquisas de aplicabilidade de lacase.

Tabela 4.1. Iniciadores utilizados para amplificação do cDNA de uma lacase de *P. Sanguineus*.

Tabela 4.2. Iniciadores utilizados para seqüenciamento completo do gene da lacase de *P. sanguineus*, senso e anti-senso.

Tabela 4.3. Iniciadores utilizados para obtenção da construção 2.

RESUMO

Lacases são enzimas de ampla aplicação biotecnológica, como na remoção de lignina da polpa de celulose e biorremediação de compostos fenólicos de indústrias farmacêuticas e têxteis. Em um estudo iniciado por Garcia e colaboradores (2006), o fungo filamentoso *Pycnoporus sanguineus* foi descrito como produtor de lacases aplicadas no tratamento de efluentes fenólicos industriais. Dando continuidade a este estudo, um gene de lacase de *P. sanguineus* foi isolado, clonado e expresso na levedura metilotrófica *Pichia pastoris*, visando a produção desta enzima em larga escala para aplicação na biorremediação de efluentes fenólicos industriais, assim como, no branqueamento de papel e delignificação de biomassa lignocelulósica para produção de bioetanol. O cDNA da lacase foi obtido através de uma reação de RT-PCR utilizando “primers” específicos desenhados com base na seqüência de uma lacase de *P. sanguineus* depositada no banco de dados de seqüências no Genbank. Como produto da RT-PCR foi amplificado um segmento de DNA com 1500 pb. O cDNA foi, clonado no vetor PGEM-T e utilizado na transformação de células de *Escherichia coli*, sendo obtidos 18 clones positivos. Destes o clone denominado PGLac 1 foi utilizado para a obtenção das construções 1 e 2. Na construção 1 o inserto obtido na clonagem em pGEM-T foi subclonado em pPICZ α A e utilizado na transformação de *Pichia pastoris*. Para esta construção, não foram detectados clones de *P. pastoris* produtores de lacases. Na construção 2, o cDNA foi subclonado utilizando-se o vetor de expressão pPIC9. Em seguida, foi realizada a transformação de *P. pastoris* GS115. Os transformantes foram plaqueados em meio seletivo sólido (MD) contendo o substrato AzBTS, sendo observados clones com a atividade enzimática de interesse. O cDNA clonado no vetor pPICZ α A10 foi seqüenciado. A seqüência obtida apresentou identidade de 97% com as lacases de *P. sanguineus* e *P. cinnabarinus* e 79% com uma lacase de *Trametes* sp. Além disto, a seqüência protéica predita possui 502 aminoácidos, 3 domínios conservados de cobre-oxidases, massa molecular de 58,8 KDa e ponto isoelétrico de 5,7. A seqüência predita foi modelada utilizando-se a ferramenta SPDBV, tendo como base a estrutura de uma lacase de *C. cinereus*. A lacase heteróloga tem 57% de identidade com a seqüência molde e uma estrutura semelhante a de outras lacases de fungos da podridão branca.

Palavras-Chave: Lacase, *Pycnoporus sanguineus*, *Pichia pastoris* e Biorremediação

ABSTRACT

Lacases are enzymes with potential application in a set of industrial processes. Some authors described their use in bioremediation of phenolic compounds of pharmaceutical and dyes industries and in the removal of lignin of the cellulose pulp. In this study a laccase from *Pycnoporus sanguineus* previously described by Garcia and co-workers 2006), was expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, aiming their production for biotechnological purposes. The laccase cDNA was obtained by RT-PCR and cloned using the vector PGEM-T. *Escherichia coli* harbouring the construction were selected and the clone called PGLac 1 was used for further experiments (subcloning and sequencing). Two different vectors were used for *P. pastoris* transformation, pPIC9 e pPICZ- α A. The laccase activity was detected only for *P. pastoris* harbouring the construction 2 (pPIC9/laccase cDNA). The heterologous laccase presents identity with lacases from *P. sanguineus*, *P. cinnabarinus* (97%) and *Trametes* sp. (79%). Moreover, the predicted protein has 502 amino acids, 3 cupric-oxidase conserved-domains, molecular mass of 58,8 KDa and isoelectric point of 5,7. The molecular modelling revealed a globular protein with a active site containing copper atoms, coordinated by histidin and cistein residues.

Word-Keys: Laccase, *Pycnoporus sanguineus*, *Pichia pastoris* and Biorremediation.

Introdução

A humanidade tem passado por diversos problemas ambientais tais como a contaminação de lençóis freáticos por agrotóxicos, em áreas que não são apropriadas para a agricultura (SANTOS, 2008). A poluição atmosférica tem sido foco de estudo de diversos pesquisadores, no intuito de encontrar possíveis soluções para minimizar os problemas ambientais (RUBIO, VALVERDE *et al.*, 2009). O bioacúmulo de poluentes nas bacias hidrográficas também é um tipo de devastação ambiental preocupante à população, principalmente àquela que estiver presente nas margens desta bacia, visto que a água utilizada por tal população possivelmente causará danos à saúde das pessoas (FROEHNER *et al.*, 2009).

Efluentes fenólicos, em particular os corantes, liberados por indústrias têxteis e farmacêuticas, têm sido freqüentemente depositados em reservas aquíferas, causando sérios danos ambientais. Estes corantes são formados por moléculas aromáticas em geral prejudiciais à saúde humana e ambiental. Em função disto, é de grande valia a pesquisa em técnicas de remanejamento, tratamento e descontaminação destes poluentes, com vistas a um meio ambiente ecologicamente equilibrado (POINTING *et al.*, 2000).

Outro contaminante muito nocivo à saúde humana e que o homem persiste em depositar em reservatórios aquíferos é o mercúrio. Este metal pesado é de fácil bioacúmulo e se consumido por seres humanos, mesmo que em pequenas doses pode ser letal (SCHNEIDER, BELGER *et al.*, 2009). Outros metais pesados também são indevidamente alocados na natureza, em recantos naturais aquosos ou no solo; e assim entram no ecossistema, sendo absorvidos ou adsorvidos na natureza por microrganismos, plantas ou até mesmo animais (OLIVARES-RIEUMONT, DE LA ROSA *et al.*, 2005). Desta forma, estes metais desestabilizam a pirâmide ecológica, desencadeando, por exemplo, na extinção de algumas espécies, no surgimento de pragas, na contaminação da água, tornando-a inadequada para o consumo tanto do homem quanto dos outros seres vivos, e em danos graves à saúde do homem (CALDERON, ORTIZ-PEREZ *et al.*, 2003).

Uma estratégia para descontaminação de efluentes fenólicos e de metais pesados é o uso de microrganismos capazes de tornar estes contaminantes menos tóxicos ou até mesmo totalmente inofensivos. O tratamento destes compostos tóxicos utilizando microrganismos é denominado biorremediação. Em geral, este processo ocorre por meio de enzimas provenientes dos microrganismos, que por algum mecanismo, seja por desestabilização das

camadas eletrônicas ou por quebra do substrato, minimiza o nível de contaminação do rejeito em questão (POINTING *et al.*, 2000)

A estrutura química dos poluentes orgânicos tem uma profunda influência na habilidade dos microrganismos metabolizarem estas moléculas, especialmente com respeito às taxas e extensão da biodegradação. Alguns compostos orgânicos são rapidamente biodegradados enquanto outros são recalcitrantes, ou seja, de difícil degradação. Hidrocarbonetos com baixa a média massa molecular e álcoois são exemplos de compostos facilmente biodegradáveis. No entanto, compostos xenobióticos (compostos químicos fabricados pelo homem), especialmente hidrocarbonetos halogenados, tendem a ser resistentes à biodegradação (POINTING *et al.*, 2000).

Os fungos têm sido utilizados para a produção de enzimas que possam auxiliar no processo de detoxificação ou descontaminação de poluentes; dentre os fungos utilizados para este fim, estão os fungos da podridão branca, os quais tem sido foco de estudo de muitos pesquisadores (POINTING *et al.*, 2000).

Devido à sua elevada especificidade, baixos custos de investimento e à sua origem natural, as enzimas produzidas pelos fungos da podridão branca da madeira (entre eles os dos gêneros *Pycnoporus* e *Trametes*) têm-se tornado uma potente ferramenta de pesquisa na caracterização de fibras. Estas enzimas são biocatalisadores competitivos que podem reduzir ou substituir o uso de compostos químicos agressivos, que tornam esta indústria poluente em muitas operações do fabrico da pasta e do papel. Deste modo, estas enzimas constituem uma alternativa ecológica potencial a biorremediação de poluentes e ao branqueamento químico da pasta de papel (GARCIA *et al.*, 2006).

1.1. O uso de microorganismos na biotecnologia

A biotecnologia expandiu nos últimos 20 a 30 anos, gerando novos produtos e processos aplicáveis em diversos setores, tais como: na medicina, agricultura, produção de fármacos e na geração de bioenergia (MARCELINO *et al.*, 2004). Esta ciência faz uso de sistemas celulares de diversos organismos, como: bactérias, fungos e plantas para o desenvolvimento de processos e produtos de interesse econômico, social e/ou ambiental (AZEVEDO, 1997) e baseia-se na busca e descoberta de recursos biológicos industrialmente exploráveis. Uma abordagem clássica das etapas do processo de busca e descoberta biotecnológica passa pela coleta de material biológico adequado, seguida da seleção e triagem de materiais com os atributos desejados, seleção final do(s) melhor (es) candidato(s)

a partir de uma lista reduzida de opções e culmina com o desenvolvimento de um produto comercial ou processo industrial (BULL *et al.*, 2000).

Os microrganismos são largamente utilizados em processos biotecnológicos, como fonte de compostos de interesse e hospedeiros de genes heterólogos, dentre esses microrganismos estão os fungos (WAMMER *et al.*, 2005).

Os fungos são eficientes produtores e secretores de enzimas e por isto são capazes de degradar um largo espectro de substratos naturais e sintéticos. Esta adaptabilidade metabólica faz com que os fungos sejam largamente utilizados em processos biotecnológicos, como biorreatores ou como fonte de enzimas, proteínas ou peptídeos de interesse industrial (HURST *et al.*, 2002).

Os fungos filamentosos também podem ser utilizados no tratamento e remoção de compostos poluentes de solo e água, através de sua degradação, modificação química ou interação com o composto contaminante. Como por exemplo, o fungo *Trametes sanguinea* produtor de cinco isoformas de lacases e biorremediador de rejeitos de origem fenólica (HOSHIDA *et al.*, 2001). Corantes de composição fenólica provenientes de indústrias têxteis e farmacêuticas são de difícil degradação, e quando descartados no ambiente são prejudiciais ao equilíbrio ambiental. Assim a biorremediação é uma alternativa para a degradação destes compostos e minimização de problemas ambientais (KEHARIA e MADAMWAR, 2003).

Há muitos anos o uso de enzimas extracelulares, em muitas indústrias, tem sido um padrão no tratamento de compostos, com diversas finalidades, porém somente recentemente têm sido estudados os mecanismos de ação destas enzimas e o potencial das mesmas para o tratamento de resíduos. Tais enzimas podem ser utilizadas no tratamento de efluentes industriais como Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos e organoclorados (HWANG *et al.*, 2007).

Os Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (PAHs) estão entre os poluentes mais comuns do mundo, provenientes de processos tais como a gaseificação do carvão, na redução dos íons do ferro na presença de compostos voláteis, e na delignificação da madeira. Os PAHs podem ser degradados facilmente com muitos microrganismos, tais como: *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Beijerinckia*, *Nocardia*, *Vibrio* e *Flavobacterium* (RUGGABER E TALLEY, 2006).

PAHs com quatro ou mais anéis aromáticos tendem a ser recalcitrantes, ou seja, de difícil degradação, e tóxicos (YOUNG *et al.*, 1993). A degradação destes compostos pode

ser facilitada com a adição de algumas enzimas tais como: Lignina Peroxidase (LiP), Manganês Peroxidase (MnP) e lacases (RUGGABER E TALLEY, 2006).

Organoclorados também são efluentes liberados por indústrias e são, em geral, altamente tóxicos, de difícil degradação natural e tendem a se bioacumular no meio ambiente, e por isso são grandes responsáveis pelos problemas de contaminação ambiental; deste modo, faz-se necessário uma estratégia ecologicamente correta para o tratamento e deposição correta deste rejeito (DISTEFANO, 1999).

Dioxinas e furanos clorados, por exemplo, podem ser liberados no meio ambiente em processos de combustão incompleta. Existem evidências sobre a alta toxicidade e persistência destes tipos de compostos, de potente ação carcinogênica (HARNLY, 1995). Grande parte da ação tóxica destas espécies pode ser constatada em microorganismos aquáticos, nos quais é comum o aparecimento de anormalidades no sistema reprodutivo e imunológico (LOGANATHAN *et al.*, 1995)

Uma grande parte das substâncias químicas halogenadas presentes na atmosfera são compostos orgânicos voláteis provenientes de ação antrópica. Embora uma grande diversidade de compostos halogenados seja produzida industrialmente, os mais referidos são os CFC's (clorofluorcarbonos) pelo seu efeito sobre a camada de ozônio (HUMANES *et al.*, 1995).

Usados desde a década de 50 em geladeiras, refrigeradores, aerossóis, extintores de incêndio e outros, os CFC's têm uma larga utilização devido ao seu custo reduzido e às suas interessantes propriedades físico-químicas. A alta volatilidade dos CFC's permite que eles alcancem as camadas mais elevadas da atmosfera, onde podem reagir com o ozônio, diminuindo a capacidade natural da atmosfera de filtrar a radiação ultravioleta (HUMANES *et al.*, 1995)

A indústria de papel e celulose é uma das que mais contribui ao processo de contaminação do meio ambiente por compostos organoclorados, principalmente com uma grande gama de compostos originados nos processos de branqueamento da polpa. Nestes processos, normalmente realizados com cloro, é produzido um grande número de compostos organoclorados, muitos dos quais são considerados altamente tóxicos, como dioxinas, clorofenóis, clorocatecóis e cloroguaiacóis (DURÁN, 2002). Embora muitos esforços tenham sido dedicados à substituição do cloro como insumo de branqueamento, com o objetivo de minimizar o teor de compostos organoclorados nos

efluentes, o seu impacto ambiental continua sendo bastante preocupante. A detecção de compostos organoclorados em sedimentos marinhos de regiões próximas a indústrias papelerias é um fato bastante freqüente (YOUNG e TABAKI, 1993)

Os tratamentos baseados em processos biológicos são os mais freqüentemente utilizados, uma vez que permitem o tratamento de grandes volumes de efluente transformando compostos orgânicos tóxicos em CO_2 e H_2O (ou CH_4 e CO_2), com custos relativamente baixos. A capacidade de certos microorganismos para degradar substâncias orgânicas tóxicas é um fato bem documentado (BUITRÓN, 1996). Em essência, o tratamento biológico fundamenta-se na utilização dos compostos tóxicos de interesse como substrato para o crescimento e a manutenção de microorganismos. Dependendo da natureza do acceptor de elétrons, os processos biológicos podem ser divididos em aeróbios ou anaeróbios. Nos aeróbios, que levam à formação de CO_2 e H_2O , o acceptor de elétrons é o oxigênio molecular. Nos anaeróbios, que degradam CO_2 e CH_4 , o oxigênio molecular está ausente, sendo que algumas formas de carbono, enxofre e nitrogênio participam como aceptores de elétrons tais como NO_3^- , SO_4^{2-} e CO_2 (BUITRÓN, 1996).

A principal aplicação deste tipo de processo está orientada na remoção da matéria orgânica presente nos rejeitos industriais, usualmente medida na forma de demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO) ou carbono orgânico total (COT)³⁴. Nos últimos anos, o grande desenvolvimento da microbiologia tem propiciado muitas alternativas que viabilizam o tratamento biológico de efluentes industriais (OTHON *et al.*, 2009)

As enzimas estão envolvidas neste processo de tratamento biológico, e por meio delas se pode manipular o processo de transformação do rejeito (tóxico), em uma outra substância (não tóxica ou menos tóxica), e este produto formado em alguns casos, pode ser reaproveitado, beneficiando assim a indústria que fizer uso deste tipo de tratamento. Este é o caso do tratamento de metais pesados, onde a recuperação do metal pode ser útil à indústria e mutuamente benéfica ao meio ambiente (CANTU-MEDELLIN, *et al.*, 2009)

No caso do tratamento de biomassa vegetal como o amido e a celulose, a adição de enzimas pode permitir a delignificação deste material e assim dispor a celulose para a produção de papel. A celulose e o amido são hoje as principais matérias-primas para este fim. Ambos os processos requerem a pré-hidrólise da matéria-prima que é eficientemente realizada por enzimas lignocelulolíticas microbianas, principalmente fungos da podridão branca, tais como: as xilanases, celulasas e lacases. A principal fonte de celulose e amido é o solo (YAMANE *et al.*, 2002).

O solo contém um alto nível de biodiversidade de microrganismos e para identificação dos microrganismos existentes e descoberta de novos microrganismos utiliza-se técnicas de biblioteca metagenômica, desenho de iniciadores que flanqueiem genes específicos de determinadas espécies; para identificação de organismos específicos tais como aqueles que são capazes de degradar poluentes orgânicos, faz-se a identificação de genes catabólicos envolvidos do processo de degradação dos contaminantes presentes no solo e na água (GENTRY *et al.*, 2006).

Alguns microrganismos podem ser utilizados na degradação de resíduos do fruto da banana, em particular os fungos *Phylosticta* spp. MPS-001 e *Aspergillus* spp. MPS-002. Estes fungos são capazes de produzir enzimas ligninolíticas e celulolíticas tais como: lacases, peroxidases, xilanases e glucanases. E por meio destas enzimas é possível realizar a degradação da parte residual das colheitas da banana. O produto gerado pela degradação destes resíduos pode ser utilizado na produção do bioetanol, visto que, a celulose, componente em maior escala deste tipo de resíduo, é composta por moléculas de glicose, fonte primordial para obtenção de bioetanol (SHA *et al.*, 2005).

É possível produzir bioetanol a partir da celulose, uma vez que a celulose é formada por moléculas de glicose, utilizando-se enzimas hidrolíticas para a disposição destas moléculas e assim produção de bioetanol por meio de leveduras tal como a mais utilizada *Saccharomyces cerevisiae*, que é capaz de fermentar diversos tipos de matéria orgânica com eficiência, este tipo de obtenção do bioetanol ainda é laboratorial, mas com o intuito de produção industrial (HAHAN-HÄGERDAL *et al.*, 2007).

O etanol é normalmente produzido por meio da conversão da sacarose (açúcar derivado da cana-de-açúcar) em etanol, isto utilizando-se principalmente a levedura *S. cerevisiae*. Além da levedura *S. cerevisiae*, a bactéria *Zymomonas mobilis* também é capaz de oxidar a glicose formando o ácido glicônico e concomitantemente reduzindo frutose a sorbitol através da ação da enzima glicose-frutose-oxidoreductase, quando crescida em meio rico em sacarose ou mistura de glicose mais frutose. O sorbitol tem grande aplicação nas indústrias farmacêuticas e de alimentos como adoçante e também como componente polifuncional, devido às numerosas propriedades organolépticas, (ERZINGER e VITOLLO, 2006; REBROS, ROSENBERG *et al.*, 2008).

1.2 Biorremediação

1.2.1 Conceitos

A biorremediação é um processo mediado por organismos que visa a degradação ou modificação química de compostos poluentes em produtos menos tóxicos podendo ser espontâneo ou controlado. E depende do conhecimento prévio de espécies passíveis de utilização como biorremediadores, bem como de sua fisiologia e ecologia, para que se tenha uma remediação eficiente do local contaminado. Microrganismos e plantas já foram descritos como eficientes em processos de biorremediação de solos e efluentes industriais (MORENO *et al.*, 2004).

Quando ocorre contaminação de um determinado lençol freático, os contaminantes se dispersam em forma de pluma e se deslocam, entretanto, o movimento da pluma pode ser atenuado por processos de diluição, dispersão, adsorção, volatilização e biodegradação. O processo que envolve as reações químicas promovidas por microrganismos é chamado de biorremediação intrínseca ou natural, cujo conceito básico é o uso da capacidade de microrganismos autóctones em degradar contaminantes que tenham sido derramados em subsuperfície sem qualquer interferência de tecnologias ativas de remediação (BORDEN *et al.*, 1995).

Dependendo das condições hidrogeológicas do local contaminado, a taxa da reação de biodegradação será mais rápida ou mais lenta, assim, a determinação da taxa de transformação é de grande importância para se prever até onde a pluma irá se deslocar (BORDEN *et al.*, 1995).

O monitoramento da biorremediação é baseado em um acompanhamento da evolução temporal e espacial da concentração de indicadores geoquímicos (p.e., pH, Eh, OD, temperatura, aceptores de elétrons) na água subterrânea. Resultados desse monitoramento podem ser usados para identificar fatores que podem controlar a taxa de biodegradação bem como identificar o processo microbiológico de respiração (aeróbia ou anaeróbia) em diferentes porções da pluma de hidrocarbonetos dissolvidos. A diminuição da concentração de oxigênio dissolvido (OD) na água e um aumento da concentração de dióxido de carbono são indicativos de um processo aeróbio de biodegradação, enquanto que a produção de íons Fe^{2+} ou diminuição de íons nitrato indicam a presença de processos anaeróbios. Um declínio do potencial redox (Eh) de valores positivos para negativos reflete a mudança de condições oxidantes (favoráveis aos microrganismos aeróbios) para condições

reductoras (melhores condições aos processos anaeróbios, que são mais lentos que os aeróbios). Um aumento nos valores de pH pode ser creditado ao consumo de íons H⁺ durante a redução de íons férricos ou do nitrato (BORDEN et al., 1995).

Os parâmetros mais utilizados para definir o grau de contaminação de solos são: biodegradabilidade, distribuição da contaminação, gradiente de lixiviação, reatividade química dos contaminantes, propriedades e tipo do solo, oxigênio disponível e ocorrência de substâncias inibitórias (BISHNOI, SAIN *et al.*, 2009).

A tecnologia da biorremediação é baseada em processos nos quais ocorrem reações bioquímicas mediadas por microrganismos. Em geral, um composto orgânico quando é oxidado perde elétrons para um acceptor final de elétrons, que é reduzido (ganha elétrons). O oxigênio comumente atua como acceptor final de elétrons quando presente e a oxidação de compostos orgânicos, com a redução do oxigênio molecular, é chamada de respiração aeróbia heterotrófica. No entanto, quando o oxigênio não está presente, microrganismos podem usar compostos orgânicos ou íons inorgânicos como aceptores finais de elétrons alternativos, condições estas chamadas de anaeróbias. A biodegradação anaeróbia pode ocorrer pela desnitrificação, redução do ferro, redução do sulfato ou condições metanogênicas (CORDAZZO, 2000).

Além dos microorganismos, as plantas em geral têm a capacidade de absorver metais pesados, tais como: cobre, cobalto, ferro, molibdênio, manganês, níquel e zinco, e, portanto podem ser utilizadas no tratamento e retirada destes metais de áreas contaminadas, como solo e rejeitos industriais (LASAT, 2002; EVANGELOU, *et al.*, 2007). Este processo é denominado fitorremediação e já é utilizado industrialmente (RASKIN *et al.*, 1997).

A remediação natural para a descontaminação de solos e águas subterrâneas tem ganhado aceitação como uma estratégia eficiente de biorremediação, principalmente em locais contaminados por derramamentos de derivados de petróleo. Esta estratégia baseia-se na utilização dos processos naturais de atenuação para remover ou conter os contaminantes dissolvidos na água e se refere aos processos físicos, químicos e biológicos que facilitam o processo de remediação de maneira global (WIEDEMEIR, 1996).

Biorremediação “*ex situ*” é aquela onde é retirado o material contaminado para posterior tratamento. Biorremediação “*in situ*” é realizada no próprio local, sem que haja remoção de material contaminado. Isto evita custos e distúrbios ambientais associados com o movimento de solos e águas que estão contaminados para outros locais destinados ao tratamento. Os produtos finais de uma biorremediação efetiva são água e gás carbônico, que

não apresentam toxicidade e podem ser incorporados ao ambiente sem prejuízo aos organismos vivos (FETTER, 1993)

1.2.2 Microorganismos biorremediadores

Nas condições subsuperficiais do solo, ou seja, na zona situada abaixo da superfície topográfica encontram-se populações de microrganismos, as quais geralmente são formadas por bactérias, fungos, algas e protozoários (GHORSE e WILSON, 1988). As bactérias presentes na zona saturada, ou seja, a zona constituída por diferentes níveis ou camadas de solo ou formações rochosas, onde todos os espaços porosos ou fraturas existentes estão completamente preenchidos por água; onde o limite superior desta zona é designado nível freático; variam com as características específicas geoquímicas e hidrogeológicas do aquífero, sendo que, de maneira geral, embora existam bactérias anaeróbias, as que predominam são as bactérias aeróbias (CHAPELLE, 1993). Os principais mecanismos de biotransformação de contaminantes orgânicos em água subterrânea são efetuados nos biofilmes, que são bactérias e polímeros extracelulares aderidos à subsuperfície e que obtêm energia e nutrientes durante o fluxo da água subterrânea (BITTON e GERBA, 1984).

A comunidade microbiana envolvida na degradação de compostos xenobióticos pode ser dividida em dois grupos: os microrganismos primários e os secundários. Os primários são aqueles capazes de metabolizar o substrato principal fornecido ao sistema, enquanto os secundários não utilizam o substrato principal, porém, os produtos liberados pelos microrganismos primários. Este processo é denominado co-metabolismo (BULL *et al.*, 2000).

Foi demonstrado por Mozhaev *et al.* (2002) que o fungo *Clostridium innocuum* é capaz de biorremediar fenóis com alto nível de descontaminação deste poluente. No caso de Triclofenóis também foram alcançados resultados positivos de descontaminação deste poluente, fazendo uso dos fungos *Coroulus versicolor* e *Panus trigrinus*, os quais secretam as enzimas lacases, maganês peroxidases e ligninina peroxidases, as quais são as responsáveis por tal biorremediação (LEONTIEVSKY *et al.*, 2002), *C. versicolor* também é capaz de biorremediar pentaclofenóis e 2,4 diclofenóis em até 80% e 100% respectivamente, por intermédio da ação de lacases secretadas por este fungo (ULLAH *et al.*, 2000).

No caso do poluente 2,6 dimetoxifenol, foi apresentado 100% de descontaminação utilizando-se o fungo *Pleorotus ostratus* que também secreta a enzima lacase capaz de biorremediar este tipo de contaminante (HUBLIK E SHINNER, 2002).

A atrazine (2-cloro-4-etilamina-6-isopropilamina-triazina) - ATZ é um herbicida da classe dos triazínicos, usada intensivamente no controle de ervas daninhas. Sua estrutura química é representada por um anel triazínico substituído com cloro, etilamina e isopropilamina, que a torna recalcitrante para a degradação biológica no ambiente. A atrazine é um contaminante potencial da água em virtude de características como alto potencial de escoamento, elevada persistência em solos, hidrólise lenta, baixa pressão de vapor, solubilidade baixa para moderada em água, adsorção moderada à matéria orgânica e argila (HALLBERG,1989). Algumas espécies microbianas isoladas de solo são capazes de metabolizar parcialmente os compostos triazínicos, tais como *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Rhodococcus* NI86/21, TE1 e B-30, *Aspergillus fumigatus* e *Rhizopus stolonifer* (BEKHI *et al.*, 1993). A mineralização total desses compostos pode ser realizada por consórcios microbianos ou culturas mistas com 2 ou mais microrganismos (LEVANON, 1993).

O fungo *Fusarium oxysporum* isolado de solo contaminado é capaz de utilizar o fenol como recurso de carbono e produção de energia. Porém, esta degradação do fenol sómente pode ser realizada se estiver a uma concentração inferior a 2mM e se houver adição no meio de cultura de íons de cobre (PARK *et al.*, 2009).

O cobre, embora seja um elemento essencial para as plantas e para alguns microorganismos, sob determinada concentração pode atingir níveis de toxicidade, contribuindo negativamente ao estabelecimento e desenvolvimento das plantas. Este comportamento tem sido observado em regiões de mineração de cobre e também em regiões vinícolas do sul do Brasil. Desse modo, alternativas para a descontaminação, ou que representem um favorecimento ao estabelecimento de novas espécies vegetais nesses locais, torna-se necessário como alternativa de produção e rentabilidade dessas áreas (PAIVA *et al.*, 2003).

Nesse sentido, os fungos ectomicorrízicos podem ser uma valiosa alternativa, pois fornecem benefícios ao crescimento da planta hospedeira (SMITH *et al.*, 1997). Certos fungos podem ainda, apresentar elevada tolerância a metais pesados (MEDVE *et al.*, 1994). Este efeito tem sido atribuído a habilidade dessas associações em reter os metais no micélio fúngico, evitando a translocação destes para a parte aérea da planta, aumentando sua tolerância (MEDVE *et al.*, 1994). Moreira e Siqueira (2002), atribuem essa habilidade a mecanismos que incluem processos externos às hifas, ligação a polímeros da parede celular e processos internos nas células dos fungos, onde os metais podem ser complexados, compartimentalizados ou volatilizados. Segundo Doelman (1986), alguns fungos ectomicorrízicos podem acumular mais de 30 vezes a concentração de Cádmiio presente no solo de sua ocorrência.

Foi apresentado por Ray e Adholeya, 2009 que os fungos *Pisolithus tinctorius* e *Scleroderma veruculosum* formam micélios capazes de acumular Alumínio (Al), Arsênio (As), Cádmio (Cd), Cromo (Cr), Níquel (Ni) e Chumbo (Pb).

1.2.3. Tratamento de corantes industriais

As indústrias têxteis e farmacêuticas utilizam diversos corantes sintéticos que causam sérios danos ambientais e são de difícil degradação (KEHARIA e MADAMWAR, 2003). Alguns exemplos destes são: “Amarelo” 2-(4'-acetamidofenilazo)-4-metilfenol], “Azul Reativo”, “Laranja Reativo”, “Preto de Remazol”, “Oregon” verde 488-X, éster succinimidil (OG-SE), “Oregon” verde 488 ‘cadaverine 5-isomer’ (OG-CAD), texas “Red-N-hydroxysuccinimide” ester (TxR-SE), “lysotracker” verde (DnD26), “lysotracker” vermelho (Figura 1.1), Texas vermelho (TxR) ou Marina azul (MB, C6-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl (NBD), indocianina verde e infracianina (PENHA *et al.*, 2008 e SCHLESINGER, 2000). Em função disto, o interesse pela descrição e estabelecimento de métodos aplicados à remoção de rejeitos que contém corantes sintéticos tem aumentado, uma das estratégias é a biodegradação destes compostos (ABADULLA *et al.*, 2000 e ZILLE *et al.*, 2003).

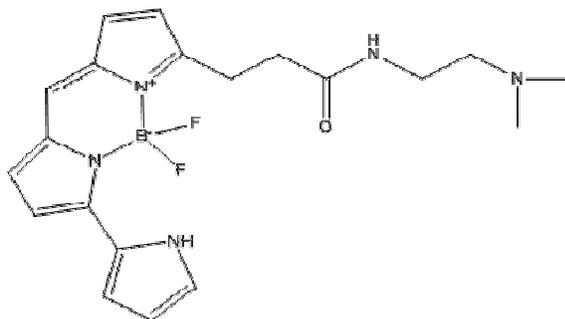


Figura 1.1 Estrutura química do corante “Lysotracker” vermelho (NAYLOR *et al.*, 2009)

A biodegradação de corantes industriais já foi descrita para fungos do gênero *Trametes*, *Pycnoporus* e *Aspergillus* e está em parte associada à produção de enzimas da classe das polifenol oxidases (SCHERER e FISHER, 1998; MOREIRA *et al.*, 2004; GARCIA *et al.*, 2006). Foi demonstrado por Zille *et al.*, 2003 que o fungo *Trametes villosa* é capaz de degradar corantes do tipo azo, sob condições oxidativas e de longa duração. Moreira *et al* (2004) demonstraram que *Trametes versicolor* é capaz de descolorir o corante sintético Poli R-478, uma poliantaquinona. A espécie *Trametes hirsuta*, assim como *T.*

versicolor, também apresenta atividade de descoloração de corantes antaquinônicos e provenientes de indústrias têxteis (ABADULLA *et al.*, 2000).

O corante amarelo 3 [2-(4'-acetamidophenylazo)-4-methylphenol] é um corante muito utilizado industrialmente e o fungo da podridão-branca *Phanerochaete chrysosporium* é capaz de degradar este corante até a formação de CO₂. A degradação deste corante pode ser realizada por meio das enzimas lignina peroxidase e manganês peroxidase (SPARADO, 1992).

Os corantes “Azul Reativo”, “Laranja Reativo”, “Preto de Remazol” e “Vermelho Congo” provenientes das indústrias têxteis podem ser tratados com o fungo *Polyporus rubidus*. Este tratamento consiste na secreção de lacases por este fungo em um reator com condições adequadas para a atividade dessa enzima. A degradação destes corantes foi alcançada em mais de 80% e a atividade máxima da enzima contou com até 17.1 unidades da mesma (DAYARAN e DASGUPTA, 2008)

Trametes hirsuta e *T. hirsuta*, são fungos produtores de lacases, esta enzima está diretamente ligada no processo de descoloração e conseqüente diminuição do nível de toxicidade do corante “Azul direto 71”, um tipo de corante antaquinônico (ABADULLA, *et al.*, 2000).

O fungo *Coroulus versicolor* tem a capacidade de descolorir o corante Violeta Brilhante de Remazol, e assim, diminui o nível de toxidez deste corante. Esta capacidade de descoloração acontece pela presença de lacases, as quais também participam do processo de descontaminação do corante “Índigo Carmine”. (SANGHI *et al.*, 2005).

O corante “Índigo Carmine” é facilmente descolorido utilizando lacase, proveniente do fungo *Trametes modesta*, e imobilizada utilizando alumínio. A imobilização da enzima é um processo que tem sido adotado para descoloração de corantes e tem alcançado sucesso nos resultados de diminuição do nível de toxicidade dos poluentes (KANDERBAUER, *et al.*, 2004)

O fungo da podridão branca *Pycnoporus sanguineus* tem forte potencial para a descoloração de corantes largamente utilizados na indústria farmacêutica e têxtil, bem como adsorve metais pesais, e por isto, é um dos objetos de estudo deste trabalho e tem sido estudado como biorremediador de rejeitos e resíduos de indústrias têxteis e farmacêuticas (ARANDA *et al.*, 2007 e GARCIA *et al.*, 2007).

Geralmente os corantes industriais são formados, ou contêm a presença de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) os quais são produzidos durante a combustão incompleta de combustíveis e resíduos orgânicos, como resultado de vários

processos industriais e estão presentes no meio ambiente como poluentes (ALCADE *et al.*, 2002), este formato de vários anéis presentes na estrutura das moléculas dos corantes é o que lhes dá característica de serem prejudiciais ao meio ambiente, como é o caso do “Lysotacker vermelho” como visto na Figura 1.1, (BAMFORTH e SINGLETON, 2005). Estes compostos são despejados no oceano ou descartados em aterros. A sua baixa solubilidade e sua característica lipofílica leva ao seu acúmulo e persistência no meio ambiente, assim, sua eliminação é considerada uma prioridade em muitos países (BAMFORTH e SINGLETON, 2005).

Geralmente, compostos ramificados e polinucleados, que é o caso de muitos corantes industriais, são mais difíceis para degradar que moléculas monoaromáticas ou com cadeias simples, e aumentando o grau de halogenação da molécula, diminui-se a biodegradabilidade (MARIANO, 2006).

A biodegradação de hidrocarbonetos, tais como os corantes industriais, é essencialmente uma reação de oxi-redução onde o hidrocarboneto é oxidado (doador de elétrons) e um aceptor de elétrons é reduzido. Há vários compostos que podem agir como aceptores de elétrons, tais como o oxigênio (O_2), nitrato (NO_3^-), óxidos de ferro (p.e. $Fe(OH)_3$), sulfato (SO_4^{2-}), água (H_2O) e dióxido de carbono (CO_2) (DALHE *et al.*, 2003).

O tratamento enzimático é muito utilizado na biorremediação de corantes, na maioria dos casos, diluídos em diversas soluções diferentes e na presença de substâncias recalcitrantes. Além disso, utiliza-se a ação de diversos microorganismos potencialmente biorremediadores de corantes para auxiliar no processo de biorremediação. A adição de mediadores com potencial redox também é feita, aumentando assim a escala de substrato tratado e a eficiência da degradação de compostos recalcitrantes. Vários mediadores redox são reportados na literatura, porém, ao que parece, poucos destes são utilizados no tratamento de poluentes, sendo que os mais utilizados são: 1-hidroxibenzotriazol, álcool veratril, ácido violúrico, 2-metoxi-fenotiazin” (HUSAIN, 2006).

Entre os diversos tipos de efluentes despejados pelas indústrias produtoras de papel, estão também presentes os corantes, os quais são um dos responsáveis pelo aumento das mudanças climáticas, formação de camadas superficiais aquíferas de poluição (espuma), coloração das águas dos rios, perda da beleza ambiental dos ecossistemas, principalmente aqueles que contêm sistemas aquíferos (POKHREL e VIRARAGHAVAN, 2004).

As indústrias de papel produzem efluentes que contêm altos níveis de teor de corantes, que prejudicam o meio ambiente. Estes efluentes contêm muitos compostos orgânicos, derivados da lignina, os quais são responsáveis pela cor marrom e também o

aumento da temperatura da água e diminuição da razão de fotossíntese da comunidade de fitoplânctons. Os organoclorados de baixo peso molecular presentes nos resíduos, gerados pelas indústria de polpa de papel, são os maiores contribuintes para mutagenicidade e bioacúmulo, devido à sua hidrofobicidade e habilidade de penetrar na membrana plasmática (PEDROZA *et al.*, 2007). Todos esses compostos orgânicos são tóxicos aos organismos aquáticos e resistentes a degradação microbiológica, resultando na diminuição do valor ecológico dos sistemas naturais vizinhos de fábricas de polpa e papel (ESPOSITO *et al.*, 1991).

Tratamentos biológicos são particularmente interessantes para o tratamento de sistemas aquíferos, contaminados por corantes provenientes da indústria do papel (BAJPAI e BAJPAI, 1994). O fungo da podridão-branca é promissor para o tratamento de efluentes fenólicos e ligninolíticos, pois produzem enzimas tais como: lignina peroxidase, MnP-peroxidase dependente e lacases (CONESA *et al.*, 2002).

1.3 Lacases

1.3.1 Classificação e mecanismos de ação da enzima

As lacases (p-difenol: dioxigênio oxidoreduases, EC 1.10.3.2) são polifenol oxidases extracelulares pertencentes ao grupo das proteínas azuis (CLAUS, 2003 e BALDRIAN, 2006), que catalisam a oxidação de compostos aromáticos, polifenóis, fenóis com metoxilações e aminas aromáticas, com a concomitante redução do oxigênio a uma molécula de água (BALDRIAN, 2006). Contêm átomos de cobre no sítio ativo, sendo que o seu arranjo varia em função do organismo de origem. As lacases fúngicas em sua maioria contêm 4 átomos de cobre em 3 sítios de ligação específicos no sítio ativo ligados à enzima por três resíduos de histidina, em um arranjo triangular plano (DECKER *et al.*, 2000 e SANCHEZ-FERRER *et al.*, 1995).

As lacases são enzimas amplamente distribuídas entre os organismos, sendo produzidas principalmente por plantas e fungos, e como estes são grandes produtores destas enzimas em geral são utilizados como fonte de lacases para aplicação biotecnológica (HARVEY e WALKER, 1999).

Os átomos de cobre das lacases têm sido classificados de acordo com fatores referentes a sua ressonância eletrônica paramagnética: Tipo 1 ou azul, Tipo 2 ou normal e Tipo 3 (SUNDARAN *et al.* 1997).

O sítio ativo das lacases produzidas pelo fungo *T. versicolor* possuem quatro íons de cobre conforme apresentado na Figura 1.2., os íons de Cobre de Tipo 1 atuam como aceptores de elétrons de substâncias que possuem principalmente anéis aromáticos e aminas (substratos típicos de lacases); e os de Tipo 2 são os que fazem a transferência de elétrons até o acceptor final, o oxigênio molecular, o qual é ainda reduzido a água. O íon de cobre Tipo 3 atua como intermediário na via de transferência de elétrons que também inclui um resíduo de cisteína e dois resíduos de histidina. O cobre Tipo 1 da lacase produzida naturalmente no meio ambiente é utilizado para regular o potencial redox desta enzima (PIONTEK *et al.*, 2002).

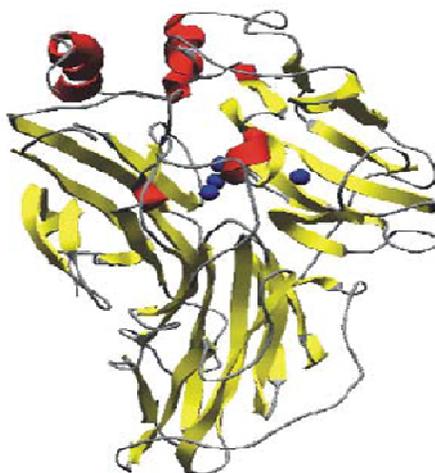


Figura 1.2. Estrutura globular de uma lacase de *T. versicolor* contendo folhas beta em amarelo e alfa-hélices em vermelho. Ao centro os íons de cobre são destacados em azul (Piontek *et al.*, 2002).

Dicroísmo Circular Magnético e espectroscopia de absorção de raios-X são técnicas que foram utilizadas para mostrar que os centros de cobre das lacases de Tipos 2 e 3 combinados formam um grupo de cobres trinuclear com respectivos ligantes exógenos incluindo o oxigênio molecular (COLE *et al.*, 1990). O centro de cobre tipo 2 é coordenado por duas histidinas ligantes e a água também interage com o íon de cobre. O Tipo 3 tem 3 histidinas ligantes e uma ligação com uma hidroxila. O modelo estrutural da ligação entre o tipo 2 e 3 (Figura 1.3.) é na realidade o responsável pela redução do oxigênio até a formação de água (SUNDARAN *et al.*, 1997)

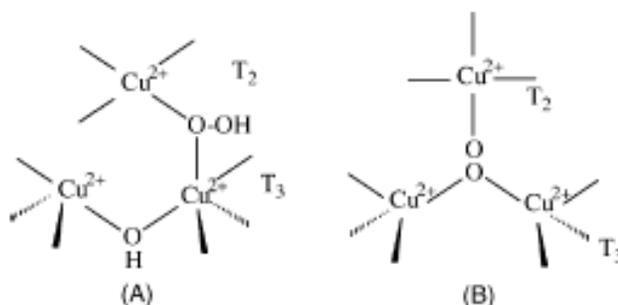


Figura 1.3. Dois possíveis modelos espectroscopicamente de ligações entre diferentes tipos de cobre em um sítio ativo de uma lacase. (A) Ligação entre Cobre Tipo 2 e um cobre Tipo 3, formando um hidrox-peróxido. (B) Ligação entre dois Cobre Tipo 3 por meio de uma ligação entre dois oxigênios com um Cobre Tipo 2 (DURÁN *et al.*, 2002).

As lacases são enzimas largamente distribuídas em fungos da podidão-branca, além de poder ser encontradas também em insetos, plantas e bactérias. Esta enzima tem diversos papéis biológicos, como a degradação da lignina, oxidação de estruturas aromáticas, reações de polimerização e formação de pigmentos em células microbianas ou esporos. Além disso lacases são capazes de realizar a junção de duas moléculas, criando assim uma nova molécula em larga escala. Elas podem catalizar a ligação de um substrato aromático hidroxilado (apropriado para ação de lacases) com um outro tipo de substrato, criando assim moléculas híbridas ou heteromoléculas. (MIKOLASCH e SCHAUER, 2009)

Lacases têm estrutura geralmente globular com aproximadamente 500 aminoácidos e contêm no sítio ativo domínios de cobre geralmente ligados a resíduos de histidina e/ou cisteína (DURÁN, 2002).

As lacases foram as primeiras enzimas ligninolíticas a serem estudadas, e eram conhecidas somente em plantas. A primeira estrutura molecular de uma lacase fúngica completa foi publicada em 2002, onde a estrutura cristalográfica das lacases do basidiomiceto *T. versicolor* e do ascomiceto *Melanocarpus albomyces* foram apresentadas (PIONTEK *et al.*, 2002).

As lacases são um tipo de um grande grupo de enzimas denominado tirosinases, as quais são fenol oxidases encontradas em todos os domínios de organismos vivos. Elas são pertencentes a um grupo de enzimas que contém um centro de cobre do tipo 3. Elas contém 2 átomos de cobre no sítio ativo, CuA e CuB, dos quais são coordenados por três resíduos de histidina, daí o fato de terem o centro de cobre do tipo 3 (DECKER *et al.*, 2000 e SANCHEZ-FERRER *et al.*, 1995).

O ciclo catalítico das tirosinases em substratos monofenólicos, está apresentado na Figura 1.4. onde se pode observar a transferência de elétrons por meio dos íons de cobre e a redução do oxigênio até a formação da água. Este mecanismo de ação das tirosinases se dá por meio de hidroxilações (ULRICH e HOFRICHTER, 2007). Desde 1952, quando ocorreu a primeira biotransformação por meio do fungo zigomiceto *Rhizopus arrhizus*, envolvendo a hidroxilação de esteróides, há um forte interesse neste tipo de reação e nos organismos responsáveis por tais oxidações. Sabe-se que a hidroxilação de compostos trata-se da transferência de oxigênio, introduzindo um grupo hidroxil (OH) em moléculas orgânicas, primariamente por via da substituição de grupos funcionais ou átomos de hidrogênio (PETERSON *et al*, 1952).

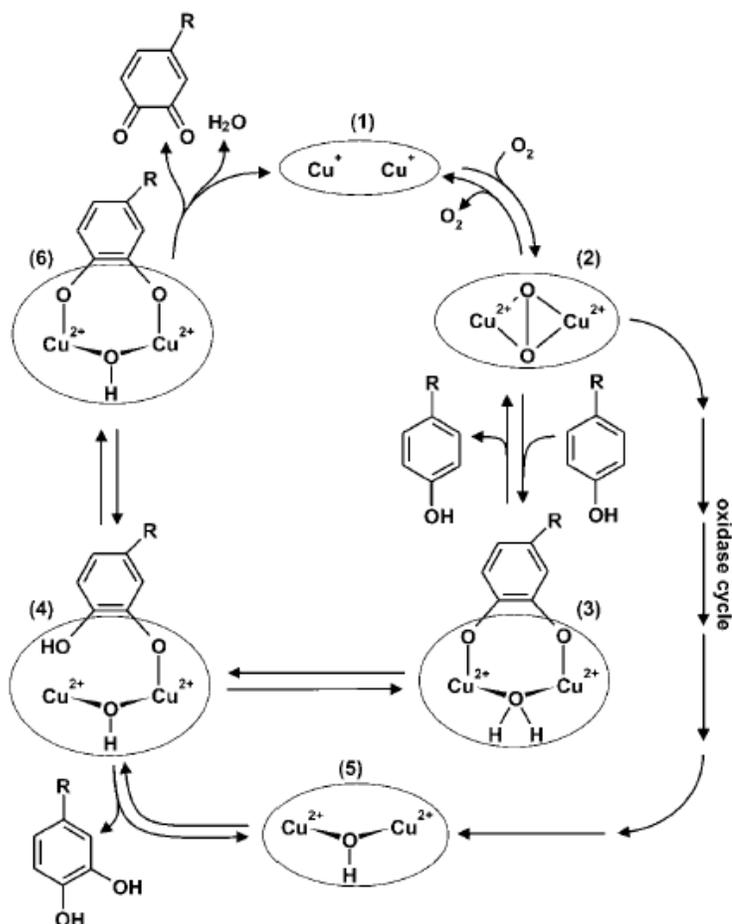


Figura 1.4. Representação do Ciclo Catalítico das tirosinases, mostrando a participação dos íons de cobre na transferência de elétrons e a redução do oxigênio até a formação de água (H₂O), (ULRICH e HOFRICHTER, 2007).

As lacases são um tipo diferente de tirosinase, elas não podem introduzir diretamente o oxigênio dentro de anéis fenólicos mas são capazes de iniciar uma cascata que pode indiretamente, via radicais fonoxílicos, cátions ciclodienônicos, e a adição de H₂O até a formação de p-quinonas e p-hidroquinonas. (ULRICH e HOFRICHTER, 2007)

As lacases catalizam a oxidação de uma grande variedade de substâncias aromáticas e deste modo propiciam a redução do oxigênio até a formação de água, como é mostrado no ciclo catalítico da lacase na Figura 1.5. As lacases além de oxidar os compostos fenólicos e ácidos metoxifenólicos, elas também descarboxilam e atacam grupos metoxi ou seja realizam demetilação (WESENBERG *et al.*, 2003).

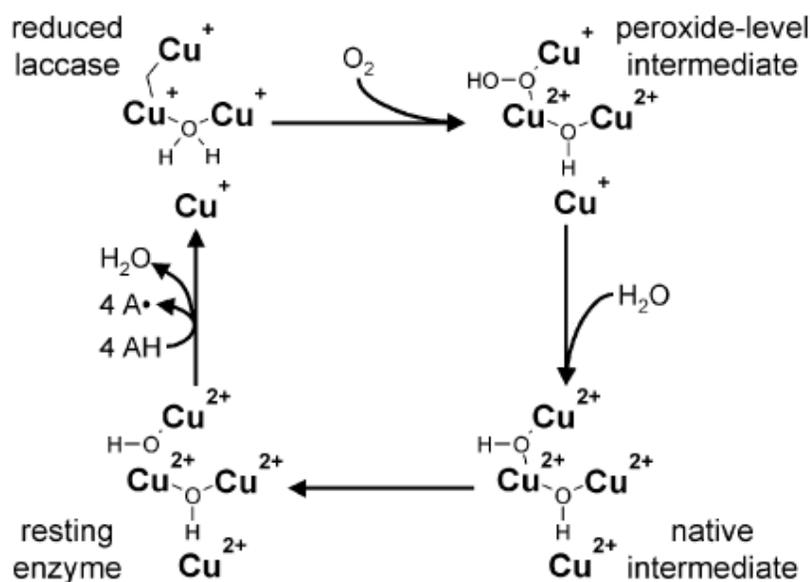


Figura 1.5. Movimentação dos elétrons pelos íons de cobres durante uma reação enzimática da lacase. A esquerda no canto inferior é mostrado os íons de cobre da enzima sem atividade, logo acima temos a lacase reduzida onde ocorre a perda de uma molécula de água, na etapa seguinte no canto superior direito a enzima está no nível intermediário formando um peróxido ligado aos íons de cobre, para enfim ganhar mais uma molécula de água e voltar ao seu estado nativo (WESENBERG *et al.*, 2003).

Estas enzimas estão envolvidas em vários processos em diferentes organismos. Em plantas, estão envolvidas na formação da parede celular e, juntas com peroxidases, na lignificação: não há dúvida que lacases estão entre as principais enzimas envolvidas em processos de delignificação por meio do fungo da podridão branca. Além disto, essas enzimas podem proteger os patógenos fúngicos de toxinas da planta, deste modo são fatores importantes na virulência em doenças fúngicas (MAYER e STAPLES, 2002).

O uso das lacases como biocatalisadores na síntese orgânica foi negligenciado no passado, provavelmente por não haver interesse comercial na época. Novas pesquisas, em processos benignos ao meio ambiente, como em indústrias têxteis e produtoras de papel, têm aumentado o interesse dos pesquisadores (RAYOL, 2000).

1.3.2. Aplicação biotecnológica e industrial das lacases

Foi relatado por Couto e Herrera (2006) que as aplicações biotecnológicas e industriais das lacases são diversas. Estas são: nas indústrias alimentícias, papelarias e têxteis; na nanobiotecnologia; na biorremediação do solo, na química sintética e na produção de cosméticos. Em análise de fármacos, um novo método baseado na lacase foi desenvolvido para distinguir morfina de codeína em amostras de medicamentos (Bauer *et al.*, 1999). Lacase imobilizada tem sido utilizada com sucesso na remoção de fenóis da uva branca para a clarificação de vinhos (POINTING, 2001).

- Biorremediação

Em biorremediação, as lacases fúngicas tem-se mostrado muito eficazes na degradação de uma variedade de poluentes ambientais. A lacase tem aumentado a eficiência de processos de biorremediação para a degradação de triclorofenol (LEONTIEVSKY, 2002), alcenos (NIKU *et al.*, 2004), efluentes industriais descoloração de pigmentos e degradação de herbicidas (PALONEN *et al.*, 2004).

Conforme já relatado, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) juntamente com outros xenobióticos são os maiores contaminantes do solo, deste modo sua degradação é de grande importância para o meio ambiente. As propriedades catalíticas das lacases podem ser usadas para degradar tais compostos. As lacases são capazes de mediar a ligação do 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) reduzido a matriz do solo orgânico o que resulta na detoxificação deste resíduo (DURÁN e ESPOSITO, 2000).

Os corantes provenientes das indústrias têxteis, tal como o “Índigo Carmine” é facilmente descolorido utilizando lacase, proveniente do fungo *Trametes modesta*. As indústrias produtoras de papel também produzem corantes tóxicos ao meio ambiente que podem ser tratadas utilizando lacases (KANDERBAUER, *et al.*, 2004).

Assim, lacases tem um importante papel na biorremediação, principalmente na descoloração de corantes e na degradação de xenobióticos; provenientes da matriz industrial, seja têxtil, farmacêutica ou de produção de papel (COUTO E HERRERA, 2006).

- Biobranqueamento

A indústria da pasta e do papel processa anualmente grandes quantidades de biomassa lignocelulósica. O processo de branqueamento da pasta é necessário para o melhoramento das propriedades do papel e também por razões estéticas. Este é, dentro da indústria do papel, a maior fonte de poluentes, devido, principalmente à utilização de compostos químicos clorados produzindo assim, efluentes líquidos de elevada toxicidade, persistentes e mutagênicos em sistemas biológicos (MUYZER *et al.*, 1999).

A remoção da lignina é um processo que tem desencadeado uma grande quantidade de investigações, especialmente devido à sua importância na indústria da pasta do papel. As lacases são capazes de degradar lignina bem como ligninas ligadas ao cloro, encontradas em efluentes derivados do branqueamento do papel (LANDETE *et al.*, 2007).

As enzima lignolítica lacase é efetiva neste processo uma vez que degrada especificamente a lignina sem perdas na qualidade da pasta. As lacases são enzimas versáteis capazes de degradar na lignina, as unidades fenólicas e também, na presença de moléculas mediadoras, as unidades não fenólicas. Nos estudos fundamentais e nas aplicações biotecnológicas correntes são utilizadas lacases provenientes de fungos (MUYZER *et al.*, 1999).

- Produção de Bioetanol

Espécies de *Pleurotus* sp. são relatados como sendo eficientes colonizadores e degradadores de lignoceluloses. Estes fungos realizam a degradação enzimática da porção lignocelulósica dos substratos pela elaboração das enzimas como celulases, β -glicosidase, xilanases, lacases, manganês-peroxidases e lignina peroxidases que estão envolvidas na degradação de lignoceluloses (HAHAN-HÄGERDAL *et al.*, 2007).

A celulose pode ser utilizada como fonte para produção de bioetanol, visto que ela é formada por moléculas glicose. A lacase pode auxiliar este processo delignificando a biomassa, seja cana-de-açúcar ou outro material lignocelulósico, e assim disponibilizando

a celulose para que fique livre para ser hidrolisada e enfim dispor as moléculas de glicose para formação de bioetanol (HAHAN-HÄGERDAL *et al.*, 2007).

Para se aumentar a produção do combustível etanol, lacase obtida pelo *T. versicolor* foi expressa em *Saccharomyces cerevisiae* de modo a aumentar a sua resistência à inibidores fenólicos nos hidrolisados ligninocelulósicos (LANDETE *et al.* 2007).

A presença de compostos mediadores expande o espectro do substrato de fenoxidases para incluir vários derivados de ácidos benzóicos (COUTO e HERRERA, 2006).

A via clássica da oxidação dos substratos, através das lacases, envolve a transferência de elétrons do oxigênio resultando na polimerização de fenóis e a formação de quinonas (COUTO e HERRERA, 2006).

Vários estudos demonstram a capacidade das lacases, principalmente as fúngicas, de oxidar compostos aromáticos xenobióticos presentes em rejeitos industriais, e por isto, possuem potencial para utilização em processos de biorremediação. Como por exemplo, no tratamento de efluentes de indústrias produtoras de polpa de papel e celulose, petroquímicas, têxtil, assim como no tratamento de solos contaminados com herbicidas e pesticidas

O sistema enzimático dos fungos inclui várias enzimas extracelulares as quais catalisam a degradação da lignina, cloroligninas e compostos aromáticos e halogenados (BENOIT *et al.*, 2006). As enzimas secretadas por fungos da podridão-branca catalisam a despolimerização da lignina e têm um papel crucial na degradação deste polímero (BLIECK *et al.*, 2007). Os fragmentos resultantes com baixo peso molecular são metabolizados no ambiente intra-celular até água e dióxido de carbono. Essas enzimas são responsáveis pela formação de radicais livres altamente reativos que se submetem a séries complexas de reações espontâneas de clivagem as quais têm atraído considerável interesse às diversas aplicações industriais tais como o branqueamento do papel e também o tratamento de efluentes (COUTO e HERRERA, 2006).

1.3.2 Lacases fúngicas

O fungo saprofítico *P. sanguineus* pertence à classe dos Basidiomicetos e à família Poliporaceae (SMÂNIA *et al.*, 1995), esse tipo de fungo possui grande potencial na aplicação biotecnológica e este gênero ainda é pouco estudado. As lacases já purificadas e caracterizadas para esta espécie possuem potencial de aplicação tanto na indústria alimentícia como na descoloração de corantes.

IT *et al.* (2007), demonstraram o potencial deste gênero em secretar tirosinases passíveis de utilização na indústria alimentícia. Ludovic *et al.*, 2000, isolaram e purificaram uma lacase de *P. sanguineus* aplicada à descoloração do corante “Remazol Brilliant Blue-R” (RBBR, C.I. 61200; Sigma, St. Louis, MO, USA) que é um corante do grupo antraquinona utilizado pelas indústrias têxteis, que apresenta como característica: alta solubilidade em água. Esta enzima purificada foi capaz de descolorir mais de 80% do corante sem a adição de agentes redutores.

Foi relato por FJERBAEK *et al.* (2009) que *Pycnoporus cinnabarinus* secreta fenoloxidades quando colocado sob condições que estimulam a degradação de lignina.

IT *et al.*, 2007 sugeriram que a combinação de tratamentos enzimáticos e microbiológicos podem degradar intermediários tóxicos de compostos policíclicos tais como 1,6-benzo[a]pireno quinona (1,6Baq). Além disso, mostraram que o tratamento com lacase de *Trametes versicolor* diminui a citotoxicidade destes compostos aromáticos.

Duas lacases de *P. sanguineus* com atividade de descoloração sobre corantes farmacêuticos foram descritas por Garcia e colaboradores (2006). A sua produção é induzida pelo composto fenólico 2,5-xilidina, sendo que a maior atividade é detectada após 72 horas de crescimento. As isoformas obtidas têm massa molecular de 72,8 e 69,0 kDa, respectivamente LAC1 e LAC2.

Além da aplicação biotecnológica a lacase fúngica possui também papel crucial na fisiologia destes organismos. Com relação as plantas, estão envolvidas na formação da parede celular. Em fungos como os da podridão branca estão entre as principais enzimas envolvidas em processos de delignificação. Além disso, essas enzimas podem proteger os patógenos fúngicos de toxinas da planta, deste modo são fatores importantes na virulência em doenças fúngicas (MAYER e STAPLES, 2002).

1.4 Expressão heteróloga em *Pichia pastoris*

Pichia pastoris é uma levedura metilotrófica, capaz de metabolizar metanol como única fonte de carbono. A primeira fase no metabolismo do metanol é a oxidação do mesmo a formaldeído utilizando oxigênio molecular por meio da enzima álcool-oxidase. Além do formaldeído esta reação gera peróxido de hidrogênio. Para evitar a toxicidade do peróxido de hidrogênio, o metabolismo do metanol tem um local dentro de uma organela celular, ligada ao peroxissomo, o qual seqüestra produtos tóxicos ao longo do restante da célula. A álcool-oxidase tem baixa afinidade por O₂, e *P. pastoris* compensa isso gerando uma grande

quantidade desta enzima. O promotor regulador da produção de álcool-oxidase é o único usado para direcionar a expressão da proteína heteróloga em *Pichia* (ELLIS *et al.*, 1985)

Dois genes em *Pichia pastoris* codificam as duas formas da álcool oxidase, *AOX1* e *AOX2*. A maior parte da atividade de álcool oxidase na célula é atribuída ao produto do gene *AOX1*. A expressão de *AOX1* é rigorosamente controlada e induzida pelo metanol a altos níveis, tipicamente $\geq 30\%$ do total de proteína solúvel nas células crescidas em metanol. O gene *AOX1* foi isolado e uma versão do plasmídeo de suporte do promotor de *AOX1* é usada para direcionar a expressão do gene de interesse codificando a proteína heteróloga desejada. Embora *AOX2* tenha 97% de homologia com *AOX1*, o crescimento em metanol é mais lento do que com *AOX1*. Este crescimento lento em metanol permite o isolamento de cepas Mut^s (*aox1*) (DUCROS *et al.*, 1998).

A expressão de *AOX1* é controlada em nível de transcrição. No crescimento em metanol das células aproximadamente 5% de poli-A⁺ RNA é do gene *AOX1*. A regulação do gene *AOX1* é um processo de duas fases: um mecanismo de repressão/derepressão mais um mecanismo de indução (Por ex. o gene *GALI* de *Saccharomyces*). Brevemente, o crescimento em glicose reprime a transcrição, sempre na presença de metanol. Por essa razão, o crescimento em glicerol somente (derepressão) não é suficiente para gerar sempre níveis mínimos de expressão do gene *AOX1*. O indutor metanol é necessário para detectar níveis constantes de expressão de *AOX1*. (ELLIS *et al.*, 1985; KOUTZ *et al.*, 1989; TSCHOPP *et al.*, 1987a).

A perda do gene *AOX1*, e assim uma perda da atividade de álcool oxidase nas células, resulta em uma cepa que é fenotipicamente Mut^s (Baixa utilização de Metanol). Antes referida como Mut⁻. Mut⁺ (Maior uso de metanol) se refere a uma cepa selvagem com habilidade de metabolizar metanol como único recurso de carbono. Esses dois fenótipos são usados na análise de *Pichia*, transformadas através da integração no seu gene (TSCHOPP *et al.*, 1987b).

A expressão heteróloga em *Pichia pastoris* pode ser intracelular ou secretada. A secreção requer a presença de uma seqüência sinal na proteína expressa para levá-la à via de secreção. Embora várias seqüências sinais de via de secreção sejam utilizadas freqüentemente, incluindo o sinal para secreção nativa, o sucesso da expressão utilizando estas seqüências é variável. A seqüência sinal de secreção de *Saccharomyces cerevisiae* α factor é a que alcança maior sucesso (CREGG *et al.*, 1993; SCORER *et al.*, 1993).

A maior vantagem da expressão de proteínas heterólogas secretadas é que *Pichia pastoris* secreta baixos níveis de proteínas nativas. Assim, combinada a baixa quantia de

proteína no meio mínimo de crescimento de *Pichia*, significa que a secreção de proteínas heterólogas compreende a vasta maioria do total de proteínas no meio e serve como a primeira fase na purificação da proteína. Entretanto, se houver sítios de glicosilação (Asn-X-Ser/Thr) em sua seqüência primária de proteína pode ocorrer glicosilação nesses sítios (TSCHOPP *et al.*, 1987a).

Em comparação a *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia* pode ter uma vantagem na glicosilação de proteínas secretadas, pois ela não proporciona hiperglicosilação. Ambas *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia pastoris* são propícias a glicosilação no N terminal, entretanto, o comprimento das cadeias de oligosacarídeos adicionadas pós-traducionalmente às proteínas de *Pichia* (em média de 8-14 resíduos de manose por lado de cadeia) é mais curta do que em *Saccharomyces cerevisiae* (50-150 resíduos de manose) (GRINNA e TSCHOPP, 1989; TSCHOPP *et al.*, 1987b).

Em adição, *Saccharomyces cerevisiae* tem oligosacarídeos centrais com terminal α 1,3 glicano ligados enquanto *Pichia pastoris* não. É comprovado que α 1,3 glicano ligados nas proteínas glicosiladas produzidas por *Saccharomyces cerevisiae* são primariamente responsáveis pela natureza hiper-antigênica dando a elas a particularidade imprópria ao uso terapêutico. Embora não tenha sido provado, isso é predito ser menos de um problema de glicoproteínas geradas em *Pichia pastoris*, porquê ela pode parecer-se com a estrutura glicoprotéica de eucariotos superiores (CREGG *et al.*, 1993).

Foi demonstrado por ALBERTINI (2007) que *Saccharomyces cerevisiae*, uma levedura extensivamente utilizada na biotecnologia industrial, é capaz de adsorver determinadas quantidades de sulfato de cádmio, apresentando um forte potencial a biorremediação de metais. No entanto, esta levedura é também de fácil manipulação para a biotransformação, servindo de meio para a produção, em larga escala, de proteínas e enzimas de interesse biotecnológico e industrial.

Muitas proteínas humanas podem ser expressas com sucesso na levedura *S. cerevisiae*, esta levedura tem sido utilizada como um sistema modelo para a expressão heteróloga de proteínas, como exemplo, a enzima galactose-1-fosfato uridililtransferase, associada a galactosemia foi expressa com sucesso (WELLS, 1996).

Colao, 2006 encontrou alta atividade da lacase purificada da expressão heteróloga em *Pichia pastoris*, na descoloração de corantes e conversão de solventes orgânicos em produtos menos poluentes, comprovando a viabilidade da expressão heteróloga nesta levedura da enzima lacase para fins de biorremediação de corantes.

2. Justificativa

O fungo *P. sanguineus* faz parte do grupo de fungos da podridão branca, altamente eficientes na degradação de biomassa lignocelulósica, por sua atividade de delignificação. Além disto, estes fungos são muito estudados em função de sua atividade remediadora sobre efluentes fenólicos industriais. Esta atividade está associada à produção de enzimas, com atividade oxirredutora, denominadas lacases. Duas lacases de *Pycnoporus sanguineus* foram purificadas e caracterizadas por Garcia e colaboradores (2006). Estas enzimas apresentaram atividade de descoloração sobre corantes largamente utilizados na indústria farmacêutica, e, portanto, representam uma importante ferramenta na biorremediação de efluentes destas indústrias e na redução do impacto ambiental pelo seu descarte. Estudos com lacases fúngicas demonstraram que a conversão de compostos fenólicos em substâncias não tóxicas por estas enzimas independe da presença do microrganismo produtor da enzima, e resultados promissores já foram descritos pela utilização direta da enzima na sua forma imobilizada ou não.

Considerando o potencial industrial destas enzimas de *P. sanguineus*, e dando continuidade ao trabalho iniciado com a purificação e caracterização de lacases deste fungo. Neste trabalho, propõe-se a clonagem e expressão do cDNA de uma lacase de *P. sanguineus* na levedura metilotrófica *P. pastoris* visando a sua obtenção em escala industrial. Visando a sua utilização em processos de biorremediação de efluentes fenólicos industriais, bem como, na delignificação de celulose e biomassa lignocelulósica, para produção de papel e bioetanol, respectivamente.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Clonar o cDNA de uma lacase de *P. sanguineus* e expressá-lo em células da levedura metilotrófica *Pichia pastoris*, visando a sua obtenção em escala industrial e aplicação na biorremediação de efluentes fenólicos industriais e na delignificação de celulose e biomassa lignocelulósica, para produção de papel e bioetanol, respectivamente.

3.2. Objetivos Específicos

- Extrair o RNA de *P. sanguineus* cultivado em meio líquido indutor da produção de lacases;
- Obter o cDNA codificante de uma das lacases de *P. sanguineus* pela técnica de RT-PCR;
- Clonar o cDNA de uma das lacases de *P. sanguineus*;
- Determinar a seqüência completa do cDNA da lacase de *P. sanguineus*;
- Analisar a seqüência obtida;
- Predizer a estrutura terciária da lacase de interesse por modelagem molecular baseada na comparação com modelos de estrutura disponíveis em bancos de dados de estruturas;
- Expressar o cDNA da lacase na levedura *Pichia pastoris*;
- Avaliar a produção da atividade de lacase pelos clones recombinantes selecionados.

4. Material e Métodos

4.1. Microorganismos: origem e manutenção

O fungo *P. sanguineus* CCT-4518 obtido da coleção de microrganismos da Fundação André Tosello em Campinas-SP foi mantido com repiques periódicos em meio BDA [caldo de batata 20% (v/v), dextrose 2% (m/v) e ágar 1,5% (m/v)] a temperatura ambiente e estocado a 4°C. Alternativamente, discos de meio BDA inoculados com o fungo foram estocados a -80°C em solução de glicerol a 20% (v/v). As células de *Escherichia coli* DH5 α , *Pichia pastoris* SMD 1168 (pep4, his4) e GS115 foram obtidas comercialmente. Para o crescimento da bactéria *E. coli*, foi utilizado o meio de cultura Luria Bertani (LB)-líquido e sólido (10g.L⁻¹ de bactotripton, 5g.L⁻¹ de extrato de levedura, 5g.L⁻¹ de cloreto de sódio (NaCl) e para o LB-Ágar, 15 g.L⁻¹ de ágar). Para manutenção e indução da expressão de proteínas da levedura *P. pastoris* (SMD 1168 e GS115), foram utilizados os meios de cultura recomendados no manual “Easy Select™ *Pichia* Expression Kit” – K1740-01 (Invitrogen, Carlsbad-CA, EUA).

4.2. Desenho dos iniciadores (“primers”)

Os iniciadores utilizados na amplificação do cDNA de interesse foram desenhados utilizando-se a seqüência completa do gene de uma lacase de *Pycnoporus sanguineus* depositada no banco de dados, “GenBank”, do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI), código de acesso: AY458017. (Figura 4.1). Os iniciadores senso e anti-senso com 21 e 22 nucleotídeos, respectivamente, foram desenhados de forma a amplificar apenas a região codificadora da proteína, a partir do códon de iniciação da tradução, como mostrado na Figura 4.1. Estes iniciadores foram denominados PFE e PRX. Foram adicionados também aos iniciadores, seqüências referentes aos sítios de restrição das enzimas EcoR I e Xba I, necessários para a clonagem do cDNA (Tabela 4.1). Os iniciadores foram desenhados utilizando o programa de computador SMART 6, Simple Modular Architecture Research Tool, (SCHULTZ *et al.*, 1998). O iniciador PFE foi desenhado de forma que não foi flanqueado o peptídeo sinal, ou seja, em uma região após o códon ATG. Esta construção foi denominada: construção 1 e utilizada na transformação da levedura *P. pastoris* utilizando o vetor pPICZ α A.

>gi|38455527|gb|AY458017.1| *Pycnoporus sanguineus* lacase mRNA seqüência completa

GGCCAGCCCACCCACTTCTCTCTTTGCCTCGGTCGTCGCGCAGAATCAGC**ATG**GGCTCCGGTCTATTCA
 GCCTCTTCGTCGCCATCGCGGCCATCTCTGGCAGTCTCGCT**GCCATCGGGCCCAAGGCGGAC**CTCGTCAT
 CTCCGATGCTGTTGTCAATCCCGATGGCAGCCTCGAGCTGCTGTTGTCGTGAATGGTGACTTCCCTGGA
 CCTCTCATCTCTGGGAAGAAGGGGGATCACTTCCAGCTCAACGTGATCAACAAGTTGACCAACCACACCA
 TGCTGAAGACGACCAGTATACTGGCAGGACTCTTCCAGGAACACACTAACTGGGCCGACGGTCCCGC
 ATTCGTCAATCAGTGTCCCATTTGCTTCTGGACACTCCTTCTATACTGACTTCCATGTGCCGATCAAGCC
 GGCACGTACTGGTATCACAGCCATCTGTCCACGCAGTACTGCGACGGATTGCGAGGACCGCTTGTCTGT
 ACGACCCCCACGATCCTCAGGCGCATCTGTATGATGTTGACAACGATGACACTGTCATTACCTTGGCGGA
 TTGGTACCATGTGCGGGCAAGCTGGGCCCGCAATTCCCGAGGGGCGCGAATCTACCCTCATCAACGGC
 CTGGACGCGCGGCAACGGATAGCACTTCCGACTTGACTGTATTACCGTGGAGCATGGGAAGCGCTATC
 GTTTCAGGCTTGTGTCGATCTTGTGACCCCAATCACACCTTTCAGCATCGATGGACACAACATGACTAT
 CATTGAAGTTCGATGGCGTCAACAGCAAGCCCCTCACCGTTCGACTCCATCCAGATCTTCGCCGCTCAGCGC
 TACTCCTTCGTGTTGAATGCTAACCAACCGGTGGACAACACTACTGGATTTCGTGCGAATCCGAGTGGCGGA
 CCCTGGGCTTCGAGGGCGGGATCAACTCTGTATCCTCCGGTACAAGGGTGGCCCGGATGCCGAACCCAC
 CAACACGACGGCACCGACATCTGTGATTCTTGTGGAGACAAATTTGCACCCTCTCAAGCCCATGCAA
 GTGCTGGCCGATCTGGTGTGGTAACGTCGATTATGCGAAGACCCTCAATTTCAACTTTAACGGCACCA
 ACTTCTTCATCAACAATGCGACGTTCACTCCGCCACAGTCCCCGTCCTCCTCCAGATCCTGAGCGGAGC
 GCACAACGCGCAGGACCTCTGCCTGCAGGGTCTGTTACACCCTTCTCCGCACAGCGCCATCGAGATC
 ACCATGCCGGCTACGACCATGGCCCCGGGCTCACCCACCCCTTCCACTTGCACGGCCACGTCTTCGCTG
 TCGTACGACGCGCCGGCAGTCCGAGTACAACACTACCACGACCCCATCTTCCGCGACGTGAGCACCAGG
 CCAGCCCCGGCAGCGTACGATCCGGTTCATGACGGACAATCCGGGGCCGTGGTTCTCCATTGCCAC
 ATCGACTTCCATCTCGAGGCGGGCTTCGCGATCGTGTTCGCGGAGGACGTGAATGATATCAAGTACGGCA
 ACCCGGTCCCGCCGTCGTGGGAGGAGCTCTGCCCATCTACGA**CAAGCTCCCGGAGTCCGACCAT**TAGGC
 TCGTGGCGCGGACTCCTTTGGGACATTTCTTCTTCTGTTTGGTTCTGCTATCAAGGACATGGAGGCTATT
 GGTGAGGTTAATACCGCGCGGACATTTGGATAATATTCAGGCAGATGTCGTGGCTTCGAGTGTGGTCCG
 CTGCTAGTCTAACAGTACACTCTTTGGTCTGCTGCTTGGTTTCGCTATACCCGGTGTGTAATACGT
 CCACATCGTTATGATTGTACAGTACATCATATATAACCAATGTGAATCCGGACAACAGGTATGTGGAT
 GACGAAGCGCCG

Figura 4.1. Seqüência completa do gene de uma lacase do fungo filamentosso *P. sanguineus*. Os segmentos de seqüências sublinhados representam a região de anelamento dos iniciadores desenhados para amplificação do gene de interesse. A seqüência ATG em vermelho representa o códon de iniciação da tradução, e a seqüência TAG em azul representa o códon de terminação da tradução.

Tabela 4.1. Iniciadores utilizados para amplificação do cDNA de uma lacase de *P. Sanguineus*. Em negrito são mostrados os sítios de restrição adicionados à seqüência. Utilizados para obtenção da construção 1.

Iniciadores	Seqüências	Sítio da enzima
Iniciador		
Senso(PFE)	5'- GGAATTC GCCATCGGGCCCAAGGCGGAC-3'	Sítio para EcoR I
Iniciador Anti-		
Senso(PRX)	5'- CAAGCTC CCCGGAGTCCGACCATCTAGAA-3'	Sítio para XbaI

Após seqüenciamento inicial do cDNA amplificado, iniciadores internos também foram desenhados para obtenção da seqüência completa do gene (Tabela 4.2).

Tabela 4.2. Iniciadores utilizados para seqüenciamento completo do gene da lacase de *P. sanguineus*, senso e anti-senso.

Iniciadores	Seqüências
Iniciador Senso (PFI)	5'-AACCTCACGATCCTCAGG-3'
Iniciador Anti-Senso (PRI)	5'-GCTCAGGATCTGGAGGAG-3'

Alternativamente, para a expressão da proteína de interesse na levedura *P. pastoris* foi utilizado o vetor pPIC9, e neste caso foi realizada uma nova construção, denominada construção 2. Para tanto, foram construídos outros dois iniciadores com seqüências contendo os sítios de restrição das enzimas BamHI e NotI, sendo que o iniciador anti-senso possui sítios para estas duas enzimas de restrição conforme apresentado na Tabela 4.3. Estes iniciadores foram denominados respectivamente, PFB e PRBN.

Tabela 4.3. Iniciadores utilizados para obtenção da construção 2. Em negrito são mostradas as seqüências referentes aos sítios de restrição de BamHI e Not I.

Iniciadores	Seqüências	Sítio da enzima
Iniciador Senso (PFB)	5'-TTCGGATTCATGAGATTCCTCAATTTTACT-3'	Sítio para BamHI
Iniciador Anti-Senso (PRBN)	5' AGGATCCGCGCCGCTAATGGTCCGACTCCGGGAGCTT G-3'	Sítios para BamHI e Not I

4.3. Extração do RNA de *P. sanguineus*

Esporos de *P. sanguineus* (1×10^7 esporos/mL) foram inoculados em dois frascos cônicos de 1L contendo 250 mL de meio de cultura para produção de lacases, denominado MPL (extrato de malte 1,25% (p/v), tween 20 0,1% (v/v), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,0005% (p/v) e 0,4 mM de 2,5-xilidina), conforme anteriormente descrito por Garcia e colaboradores (2006). Os frascos foram incubados a 28°C sob agitação de 120 rpm, após 24, 48, 60 e 72 horas de crescimento as culturas foram filtradas a vácuo, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, e posteriormente utilizadas na extração do RNA total. Os micélios congelados foram macerados em almofariz até a sua completa pulverização, estas amostras foram utilizadas na extração de RNA utilizando “RNeasy Plant Mini Kit” (Qiagen), conforme instruções do fabricante. Para a purificação do RNA poli A⁺ foi utilizado o “Kit Oligotex Spin Column” (Qiagen) e o procedimento foi realizado conforme instruções do fabricante.

4.4. Reação de Transcrição Reversa e amplificação do cDNA

A reação de transcrição reversa para obtenção da primeira fita do cDNA de interesse foi realizada utilizando a enzima “Superscript III” (Invitrogen). O sistema de reação contendo o RNA poliA⁺, 1 microlitro de 50 μ M do oligonucleotídeo (oligo-dT50) e 1 μ L de dNTP (10mM) e o RNA foi desnaturado a 70°C por 5 minutos. O sistema foi então incubado no gelo, e posteriormente acrescido de tampão da transcriptase, 1 uL de DTT (0,1mM) e 1 uL da transcriptase reversa (200U/uL). O sistema foi novamente incubado a 42°C, desta vez, por 1 hora e a reação interrompida pelo aquecimento a 70°C por 10 minutos. O RNA presente no sistema foi digerido com 1 uL de RNase H (2U/uL) a 37°C por 20 minutos.

Posteriormente, uma alíquota do sistema de reação da transcrição reversa foi submetida à PCR, utilizando a DNA polimerase “Platinum Taq DNA polymerase High Fidelity” (Invitrogen), e os iniciadores desenhados como descrito no item 4.2, para obtenção da construção 1. A 1 μ L do sistema de reação da PCR foram adicionados 1 μ M dos oligonucleotídeos, 0,2 mM de dNTP, tampão da Taq polimerase e a Taq polimerase (1 U). As condições da PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 94 °C por dois minutos, seguida pelas etapas de anelamento a 69 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto e 45 segundos, em 26 ciclos repetidos. Uma etapa final de extensão foi realizada por 1 minuto e 45 segundos a 70 °C e em seguida 12°C até o momento de uso do produto da PCR. O produto da PCR correspondente ao cDNA da lacase foi adenilado, e após dessalinização utilizado na ligação ao vetor de clonagem pGEM-T (Figura 4.2.)

4.5. Ligação ao vetor pGEM-T

O plasmídeo pGEM-T é um vetor de clonagem que possui um gene de resistência à ampicilina, e o gene codificador da β -galactosidase (*lac z*) (Figura 4.2). O sítio de clonagem encontra-se dentro do gene *lac z*, possuindo em suas extremidades os promotores SP6 e T7. A ligação do inserto no sítio de clonagem, interrompe o gene *lac z*, portanto, células bacterianas transformadas com esta construção não produzem a enzima β -galactosidase, e são identificadas em meio seletivo (meio de cultura contendo: ampicilina, IPTG e X-GAL), por apresentarem coloração branca.

Uma alíquota de 5 μ L do cDNA dessalinizado (133ng) foi ligado ao vetor de clonagem pGEM-T (Figura 4.2.), utilizando-se a enzima T4 DNA ligase I (20U). O sistema de ligação foi incubado a 18°C por 16 horas.

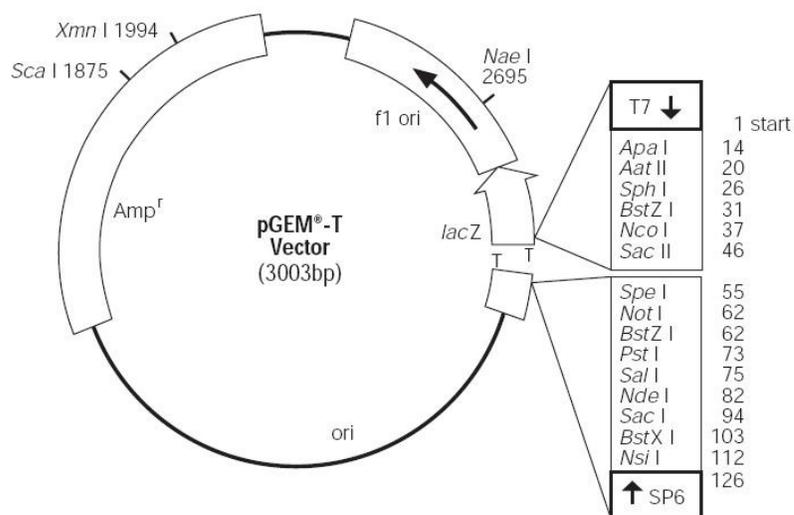


Figura 4.2. Mapa do vetor de clonagem do produto da RT-PCR, pGEM-T. Fonte: “Manual pGEM T vector for cloning”.

4.6. Transformação de células de *Escherichia coli*

A transformação de células de *E. coli* DH5 α foi realizada conforme procedimento descrito por Inoue *et al* (1990). Para tanto, a 50 μ L de células competentes foram adicionados 2 μ L do sistema de ligação, nas seguintes condições: 1,7 Kvolts, 25 μ F e 400 Ω .

Em seguida, foram adicionados à suspensão de células 800 μ L de meio SOC (2% bactotripton, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl, 0,5% de MgCl₂, 0,5% de MgSO₄, 1% de dextrose), em seguida estas foram incubadas por 1 hora a 230 rpm e 37°C. Uma alíquota de 200 μ L desta suspensão foi plaqueada em meio LB-ágar contendo ampicilina, IPTG (“isopropilthiogalactose”) e substrato da β -galactosidase (X-gal) (concentração final de 100 μ g/mL). Das colônias brancas que cresceram no meio seletivo, vinte foram selecionadas e cultivadas em meio LB líquido contendo ampicilina (100 μ g/mL) para posterior extração de DNA plasmidial e confirmação da presença do inserto.

4.7. Análise dos clones transformantes

As vinte colônias brancas selecionadas foram cultivadas em meio LB por 20 horas a 37°C e agitação de 240 rpm. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas a 8.000 r.p.m por 15 minutos. As células obtidas foram utilizadas na extração de DNA plasmidial. Este

procedimento foi realizado utilizando o “Mini plasmid Kit extraction” (Invitrogen). Destas preparações de DNA plasmidial 200ng foram digeridos com a enzima de restrição EcoRI (4U), por 16 horas a 30°C, para verificar quais destes clones apresentavam o plasmídeo com o tamanho esperado referente à presença do inserto (4,5Kb). O produto da digestão foi analisado em gel de agarose a 1% (m/v). Três destes clones denominados pGLac 1, pGLac 2 e pGLac 3 apresentaram o tamanho esperado e foram selecionados para o seqüenciamento.

O seqüenciamento foi realizado no seqüenciador 377 utilizando o Kit “Big Dye Terminator” da “Applied Biosystems”. As seqüências obtidas foram comparadas com seqüências já depositadas em bancos de dados, como descrito no item 4.10. A presença da seqüência codificadora da lacase foi obtida para o clone pGLac 1 que foi selecionado para os experimentos posteriores de expressão heteróloga.

4.8. Construção 1

4.8.1. Preparação do vetor de expressão pPICZ α A para transformação

O clone pGLac1 foi cultivado em 100 mL de meio LB por 20 horas a 37°C , e 240 rpm, posteriormente estas células foram centrifugadas a 5000 g por 15 minutos e utilizadas na extração de DNA plasmidial utilizando o “Mini plasmid Kit extraction” (Invitrogen). Desta preparação, 4 μ g do DNA plasmidial, do clone pGLac 1, foram digeridos com as enzimas de restrição Xba I e EcoR I (40U). O sistema da digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1% m/v), após coloração do gel com violeta cristal a 1%, o fragmento de interesse com 1500 pares de base foi eluído do gel utilizando o “Kit” eluição de DNA (INVITROGEN).

O plasmídeo pPICZ α A (100 ng) foi digerido com as enzimas de restrição EcoRI e Xba I (4 U), por 16 horas a 30°C. O cDNA do clone pGLac1 (134 ng) foi ligado ao vetor de expressão pPICZ α A (100 ng), utilizando-se a enzima DNA-ligase I (30U) e tampão desta enzima de acordo com orientações do fabricante (Invitrogen), durante 18 horas a 4°C. O plasmídeo pPICZ α A é um dos vetores utilizados na expressão heteróloga na levedura metilotrófica *Pichia pastoris*. Este plasmídeo contém a marca de resistência ao antibiótico zeocina, conforme mostrado na Figura 4.3.

Uma alíquota do sistema de ligação foi utilizado na transformação de células de *E. coli* DH5 α , por eletroporação, nas seguintes condições: 12,5 KV/cm, 25uF e 200 Ω . Após a

transformação, as células foram plaqueadas em meio LB contendo zeocina (100µg/mL). Das colônias que cresceram, 10, denominadas pPICZαA1, pPICZαA2, pPICZαA3, pPICZαA4, pPICZαA5, pPICZαA6, pPICZαA7, pPICZαA8, pPICZαA9, pPICZαA10, foram selecionadas e utilizadas na extração de DNA plasmidial. O DNA plasmidial extraído em seguida foi digerido com a enzima de restrição PmeI (4U), e o sistema de digestão analisado por eletroforese em gel de agarose a 1% para confirmação do tamanho esperado do plasmídeo em função da presença do inserto (4,5Kb).

Todos os clones analisados apresentaram o plasmídeo com o tamanho esperado, no entanto apenas o clone pPICZαA10 foi selecionado para experimentos posteriores de expressão da lacase em levedura e seqüenciamento do cDNA (itens 4.8.2 e 4.10).

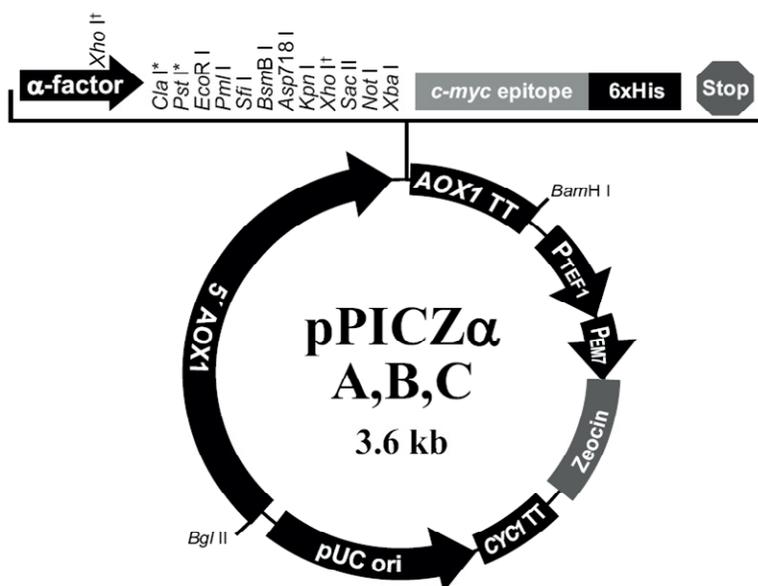


Figura 4.3. Mapa do vetor de clonagem pPICZαA, contendo os sítios das enzimas de restrição, o fator alfa, responsável pelo peptídeo sinal, a marca de seleção que confere resistência a zeocina e o promotor AOX1.

4.8.2. Transformação das células de *Pichia pastoris*

O DNA plasmidial do clone pPICZα10 foi linearizado pela digestão com a enzima de restrição Pme I (4U) durante 16 horas a uma temperatura de 30°C. O plasmídeo linearizado foi precipitado com 1V de etanol 100% e acetato de sódio 3M a -20°C, após 16 horas de precipitação o DNA foi centrifugado a 14000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em 20 microlitros de água milliQ, e posteriormente utilizado na transformação de células de *P. pastoris*.

A transformação foi realizada utilizando três linhagens de *P. pastoris* (GS115, SMD 1168 e X33) e de DNA linearizado (8µg), conforme instruções do “Kit” para expressão de proteínas em *P. pastoris* da Invitrogen (“Easy Select™ *Pichia* Expression Kit” – catálogo K1740-01). A eletroporação foi realizada nas seguintes condições: 2,5 volts, 25µF e 400Ω. Após a transformação, as células foram plaqueadas em meio seletivo, YPD “Yeast Extract Peptone Dextrose Medium” (Extrato de Levedura 1%, Peptona 2%, Dextrose 2% e zeocina™ 100µg/mL). Dentre os clones crescidos em meio YPD contendo zeocina, 288 clones foram estocados a -80°C em meio YPD líquido contendo glicerol a 20%, e posteriormente utilizados para análises da transformação.

4.8.3. Seleção de clones recombinantes por PCR de colônia

Dezoito das 288 colônias crescidas em meio seletivo com zeocina™, foram cultivadas em meio YPD sólido, coletadas deste meio e transferidas para microtubos contendo 20 µL de água MilliQ. Estas amostras foram fervidas por 5 minutos, e uma alíquota de 2 µL foi utilizada na reação de PCR, utilizando os iniciadores internos, PFI e PRI, nas seguintes condições: 80°C por 1 minuto; 34 ciclos de 94°C por 30 segundos, 52°C 30 segundos e 72°C por 90 segundos; mais 3 minutos a 72°C. O produto da PCR foi analisado em gel de agarose a 1% (m/v). Quinze dos clones que apresentaram o fragmento de DNA com tamanho esperado (704 pbs) foram selecionados para experimentos posteriores de produção da lacase em meio de cultura líquido e sólido.

4.8.4. Análise da produção da lacase recombinante

As quinze colônias recombinantes, selecionadas após a PCR de colônia, foram cultivadas em meio de cultura sólido seletivo (YPD contendo zeocina). Após 24 horas de crescimento neste meio de cultura, as colônias foram transferidas para meio sólido indutor, MMH (Manual do Kit para expressão heteróloga em *P. pastoris* da Invitrogen) contendo o substrato de lacase (0,2mM), AzBTS (2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid). O crescimento foi acompanhado por 7 dias com a adição de metanol 1% a cada 24 horas. Os clones capazes de oxidar o substrato são visualizados pela formação de um halo com coloração verde em torno da colônia produtora de lacase. Estas colônias foram cultivadas também em meio líquido indutor BMMH (YNB-1,34%, Biotina-4.x10⁻⁵%, Histidina-100X e

Metanol-0,5%). A atividade enzimática foi avaliada nos tempos de crescimento de 0 a 7 dias, seguindo o procedimento anteriormente descrito por Garcia e colaboradores (2006).

4.9. Construção 2

4.9.1 Ligação ao vetor de expressão pPIC 9

- Preparação do plasmídeo pPIC 9

O vetor de expressão pPIC 9, foi utilizado na transformação de células de *E. coli* DH5 α por choque térmico, conforme procedimento descrito por Inoue *et al* (1990). A uma alíquota de suspensão de células competentes foi adicionado 1 μ g do plasmídeo pPIC9, esta foi incubada por 30 minutos no gelo. Em seguida, o sistema de transformação foi incubado a 42°C por 2 minutos, rapidamente transferido para o gelo e incubado por 5 minutos. À esta suspensão de células foram adicionados 1 mL de meio LB-líquido, que posteriormente foi incubada por 1 hora a 37°C, sob agitação de 240 rpm. Deste sistema de transformação uma alíquota de 100 μ L foi plaqueada em LB-Ágar seletivo contendo ampicilina (100 μ g/mL), as placas foram incubadas por 24 horas a 37°C.

Das colônias que cresceram, uma foi selecionada e cultivada em meio LB líquido por 16 horas a 200 rpm. Esta cultura foi centrifugada a 5000 rpm. e o “pellet” utilizado na extração de DNA plasmidial. O DNA plasmidial foi extraído (pPIC 9) utilizando-se o “Mini plasmid Kit extraction” (Invitrogen) e digerido com a enzima de restrição NotI (4U), por 16 horas a 30°C. O sistema de digestão foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1% e o plasmídeo foi eluído do gel utilizando-se o “Kit Gene clean II” (bio101, Inc., cat. #1001-400).

O plasmídeo eluído do gel e já digerido com NotI foi preparado para uma nova digestão, desta vez com a enzima BamHI (4U), por 16 horas a 30°C. Esta dupla digestão foi realizada para tornar as extremidades do pPIC 9 coesivas com o inserto a ser ligado neste vetor. O plasmídeo linearizado foi defosforilado pela enzima “Alkaline Phosphatase Calf Intestinal” (CIAP) – 30U.

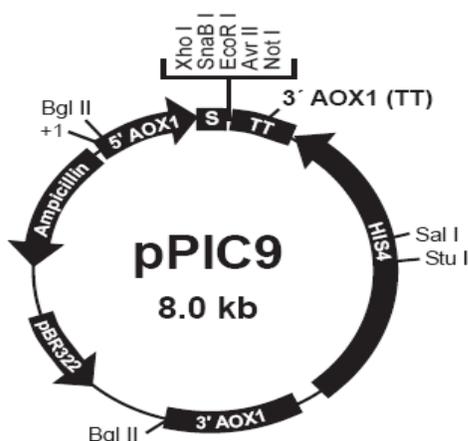


Figura 4.4. Mapa do vetor de expressão pPIC 9, onde se pode observar os sítios das enzimas de restrição, XhoI, SnaBI, EcoRI, AvrII e NotI; o tamanho do vetor de 8.0 kb, o promotor AOX1 e a marca de seleção para ampicilina.

- Preparação do inserto

O DNA plasmidial do clone pPICZ α 10 foi utilizado em uma reação em cadeia da polimerase (PCR), na presença dos iniciadores PFB e PRBN (Tabela 4.3.), com seqüências flanqueadoras contendo sítios de restrição das enzimas BamHI e Not I. Estes iniciadores foram utilizados para que o inserto obtido tenha extremidades coesivas com o vetor de expressão pPIC 9, já linearizado. Na figura 4.5. se pode observar, parte da seqüência de nucleotídeos do plasmídeo pPIC 9, a presença dos sítios das enzimas de restrição BamHI e NotI.

As condições da PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 94 °C por dois minutos, seguida pelas etapas de anelamento a 94 °C por 30 segundos, e extensão a 55 °C por 1 minuto, mais 72°C por 2 minutos em 26 ciclos repetidos. Uma etapa final de extensão foi realizada por 20 segundos a 72 °C e em seguida 12°C até o momento de uso do produto da PCR.

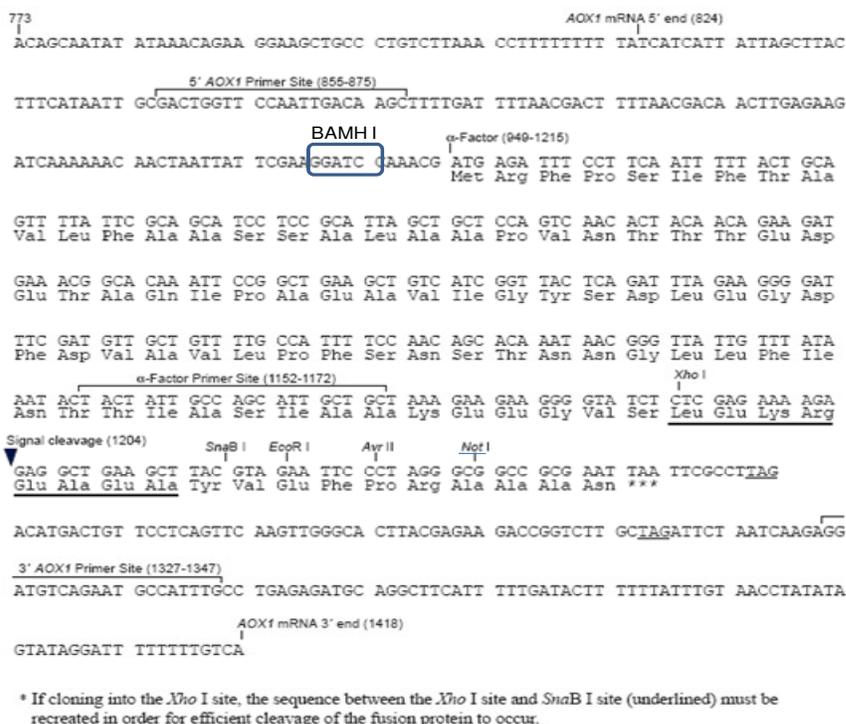


Figura 4.5. Representação de parte da seqüência do vetor de expressão pPIC 9, contendo destacados em azul os sítios das enzimas de restrição BamHI e NotI.

Após a PCR, o inserto foi digerido com a enzima de restrição BamHI e em seguida uma outra digestão, desta vez com a enzima NotI, ambas durante 16 horas a 30°C. O fragmento obtido foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1% e eluído deste utilizando-se o “Kit Gene clean II” (bio101, Inc., cat. #1001-400) e utilizado na ligação ao plasmídeo pPIC 9.

- Ligação ao plasmídeo pPIC 9 e Transformação em bactéria

Para a ligação foram utilizados 200ng do DNA plasmidial, 112ng do inserto, 4U da enzima T4 DNA – ligase e tampão desta enzima, este sistema foi incubado por 16 horas a 4°C. Posteriormente, o sistema de ligação foi dialisado, e em seguida utilizado na transformação de *E. coli* DH5α por eletroporação sob as condições: 1,7 volts, 25uF e 400Ω. A transformação de células de *E. coli* DH5α foi realizada conforme procedimento descrito por Inoue *et al* (1990). Para tanto, a 50uL de células competentes foram adicionados 2 μL do sistema de ligação, nas seguintes condições: 1,7 volts, 25uF e 400Ω.

Em seguida, foram adicionados à suspensão de células 800 µL de meio SOC (2% bactotripton, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de NaCl, 0,5% de MgCl₂, 0,5% de MgSO₄, 1% de dextrose), em seguida estas foram incubadas por 1 hora a 230 rpm e 37°C. Uma alíquota de 200µL desta suspensão foi plaqueada em meio LB-ágar contendo Zeocina (concentração final de 100µg/mL). Das colônias cresceram no meio seletivo, vinte foram selecionadas e cultivadas em meio LB líquido contendo Zeocina (100µg/mL) para posterior extração de DNA plasmidial e confirmação da presença do inserto. O DNA plasmidial ligado ao inserto (6µg) foi extraído das bactérias e em seguida utilizado na transformação de células competentes de *Pichia pastoris* GS115.

4.9.2. Transformação das células de *Pichia pastoris*

O DNA plasmidial do clone pPIC 9 foi linearizado pela digestão com a enzima de restrição Pme I (4U) durante 16 horas a uma temperatura de 30°C. O plasmídeo linearizado foi precipitado com 1V de etanol 100% e acetato de sódio 3M a -20°C, após 16 horas de precipitação o DNA foi centrifugado a 14000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 20 microlitros de água milliQ, e posteriormente utilizado na transformação de células de *P. pastoris*

No caso da transformação realizada com a construção 2, a linhagem de *P. pastoris* utilizada foi somente a GS115 (também realizada de acordo com as instruções do manual da Invitrogen). Às células competentes de *P. pastoris* GS115 (320µL) foram adicionados 6 µg do sistema de ligação. A eletroporação foi realizada nas seguintes condições: 2,5 volts, 25µF e 400Ω. Os transformantes foram selecionados em meio seletivo MD (1,34% de YNB, 4 x 10⁻⁵ % de biotina e 2% de glicose) na ausência de histidina. Como controle foi realizada a transformação com o plasmídeo sem o inserto.

Dentre os clones crescidos em meio MD na ausência de histidina, 288 clones foram estocados a -80°C em meio MD líquido contendo glicerol a 20%, e posteriormente utilizados para expressão em larga escala da enzima heteróloga.

4.9.3. Análise da produção da lacase recombinante

Foram selecionada 30 colônias e estas foram cultivadas em meio de indução sólido-MD (YNB 1,34%, biotina 4.x10⁻⁵%, metanol 0,5% e ágar 2%), sem a presença de histidina, contendo o substrato de lacase, AzBTS (0,2mM).

O crescimento foi acompanhado por 7 dias com a adição de metanol 1% a cada 24 horas. Os clones capazes de oxidar o substrato puderam ser visualizados pela formação de um halo com coloração verde em torno da colônia produtora de lacase.

4.10. Seqüenciamento do cDNA de lacase ligado ao pGEM-T

Para obtenção da seqüência da construção elucidada no item 4.7., os clones selecionados foram seqüenciados utilizando os iniciadores SP6 e T7, separadamente, que são flanqueadores do vetor pGEM-T. O mesmo foi realizado em relação aos transformantes com o vetor de expressão pPICZ α A (item 4.8.1.), desta vez com os iniciadores AOX-1 e α -factor, e ainda com os iniciadores PFE e PRX (Tabela 4.1.).

Para tanto, foi utilizado o kit de seqüenciamento “Big Dye Terminator” da “Applied Biosystems”, utilizando o seqüenciador 377 também da “Applied Biosystems”, seguindo as instruções do fabricante (“Applied Biosystems”).

4.11. Análises *in silico*

4.11.1 Análise da seqüência do cDNA da lacase de *P. sanguineus*

Realizado o seqüenciamento, a seqüência de nucleotídeos foi analisada utilizando-se o programa “Staden PreGap”, e em seguida foi verificado se a seqüência estava em fase. Esta mesma seqüência foi comparada com seqüências já depositadas em bancos de dados de livre acesso utilizando o programa *online* “BLAST nucleotide” disponível no servidor do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI). Deste modo pôde-se aferir se a seqüência em questão de fato tratava-se de uma seqüência codificadora de lacase.

A seqüência de aminoácidos da lacase foi predita a partir da seqüência completa do cDNA, utilizando-se o programa *online* “EMBOSS Transeq”, disponível no servidor “EXPASY Proteomics Server”. Neste mesmo servidor, a massa molecular e o ponto isoelétrico da proteína foram preditos por meio do programa *online* “Compute pI/Mw tool”.

4.11.2. Modelagem da estrutura molecular da enzima

A seqüência predita da lacase foi comparada com seqüências de proteínas com estrutura tridimensional já resolvida e depositadas em bancos de dados do servidor "BioInfo Meta Server" (GINALSKI *et al.*, 2003). Foram encontradas seqüências homólogas à da lacase, obtendo-se assim uma estrutura de alto "score" para se modelar a estrutura da lacase proveniente de *P. sanguineus*. Esta estrutura foi utilizada como molde da proteína predita, ou seja, uma seqüência com alto grau de homologia com a seqüência obtida. A estrutura molde de maior identidade foi obtida através do algoritmo computacional FFAS03 (JAROSZEWSKI *et al.*, 2005).

A partir do alinhamento das seqüências (lacase e molde), modelos contendo todos os átomos não-hidrogênios foram automaticamente calculados utilizando o programa Modeller 9v6 (SALI & BLUNDELL, 1993). A modelagem "de novo" dos "loops" na estrutura protéica, bem como a melhoria dos modelos foram realizados com o auxílio dos programas Modeller 9v6 e Swiss-PdbViewer 4.01 (GUEX e PEITSCH, 1997), utilizando-se protocolos de minimização de energia baseados em etapas descendentes de minimização. A validação dos modelos foi realizada pelo VADAR web server, versão 1.6 (<http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca/vadar/>) (WILLARD *et al.*, 2003). O programa Pymol (DELANO, 2002) foi utilizado para a visualização e sobreposição dos modelos.

5. Resultados e Discussão

5.1. Amplificação do cDNA da lacase de *P. sanguineus*

O RNA utilizado como molde para a obtenção do cDNA da lacase de *P. sanguineus* foi extraído de micélios cultivados por 24, 48, 60 e 72 horas em meio de indução MPL. Apenas para o tempo de 72 horas não foi observada a amplificação do cDNA com tamanho esperado de 1500 pb. Para os demais tempos foi amplificado o cDNA com tamanho esperado, no entanto a maior concentração foi obtida para a reação utilizando RNA poliA⁺ após 24 horas do fungo em meio de cultura MPL acrescido do indutor 2,5-xilidina (Figura 5.1). Este tamanho de cDNA está de acordo com o tamanho do gene de lacase utilizado como molde para construção dos "primers" utilizados neste trabalho, bem como de genes de lacases de outros fungos da podridão branca (BLIECK *et al.*, 2007)

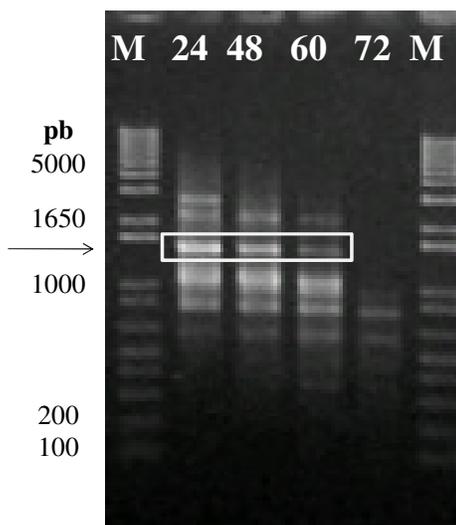


Figura 5.1. Análise Eletroforética em gel de agarose das reações da RT-PCR. RNA poliA⁺ extraído do micélio de *P. sanguineus* cultivado por 24, 48, 60 e 72 horas em meio MPL; M (Marcador de massa molecular, 1kb “ladder”). A seta indica o tamanho do cDNA de 1500 pares de base, podendo ser visualizado em destaque no retângulo.

5.2. Clonagem no vetor pGEM-T

As colônias brancas, selecionados pelo crescimento em meio seletivo, foram utilizadas na análise do DNA plasmidial. A figura abaixo mostra o perfil da digestão do DNA plasmidial do clone pGLac1 com as enzimas de restrição XbaI e EcoRI. Nos poços de números 1 e 2 desta figura, são apresentados, respectivamente, os fragmentos de DNA do plasmídeo pGLac1 intacto e digerido. As setas indicam o fragmento de DNA correspondente ao vetor sem o inserto (cDNA da lacase-lcc), com 3.000 pares de bases, e o cDNA da lacase (inserto) com 1500 pares de base. Este clone (pGLac1) foi então selecionado para ser utilizado na obtenção do cDNA de interesse, e ligação ao vetor de expressão na levedura metilotrófica *P. pastoris* (pPICZαA).

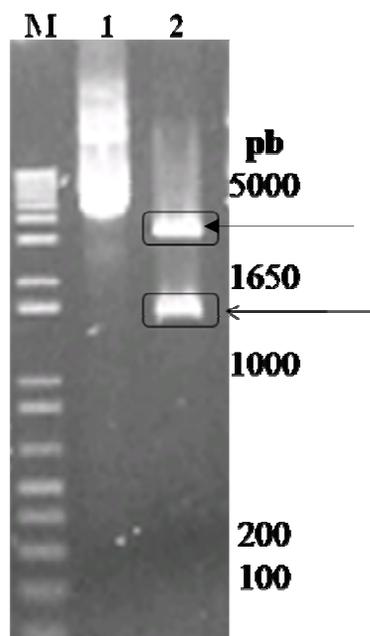


Figura 5.2. Análise Eletroforética em gel de agarose. 1- Clone de bactéria transformada com o pGEM-T mais lcc, não digerido, 2- Clone de bactéria transformada com o pGEM-T mais o lcc, digerido com EcoRI e Xba I. M-marcador de massa molecular 1kb l"ladder". A seta indica o tamanho do gene de 1500 pares de base.

5.3. Construção 1

5.3.1 Sub-clonagem do cDNA da lacase *P. sanguineus*

Após ligação do cDNA da lacase (lcc) ao vetor de expressão em *P. pastoris* foram selecionadas em meio seletivo dez colônias transformantes denominadas pPICZ α 1 a pPICZ α 10. Todos estes clones após digestão com a enzima de restrição PmeI e análise em gel de agarose 1% apresentaram o tamanho esperado em função da presença do cDNA lcc.

A figura abaixo mostra o perfil da digestão do DNA plasmidial dos clones pPICZ α 7 a pPICZ α 10, com a enzima de restrição PmeI. Como controle estão apresentados os plasmídeos recombinantes intactos. Os poços 1, 3, 5 e 7 correspondem ao DNA plasmidial dos clones pPICZ α 7 a pPICZ α 10 intactos, ou seja, na sua forma circular. Os poços 2, 4, 6 e 8 correspondem às construções pPICZ α 7 a pPICZ α 10 digeridos com PmeI e na sua forma linear (Tamanho estimado de 5.100 pares de bases-3600 pares de bases do vetor somados aos 1500 pares de bases do lcc). Destes, a construção pPICZ α 10 foi selecionada para transformação de *P. pastoris*.

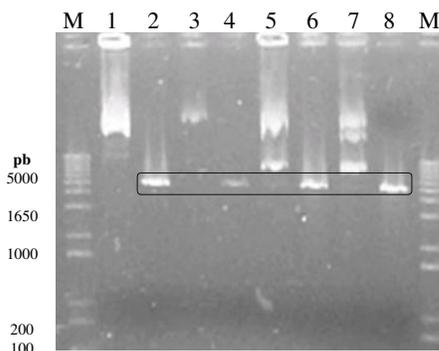


Figura 5.3. Análise Eletroforética em gel de agarose; 1,3,5,7- clones pPICZ α 7 a 10 intactos; 2,4,6,8- clones pPICZ α 7 a 10 digeridos com a enzima de restrição PmeI. Caixa de texto ressaltando os vetores recombinantes na sua forma linear; M-Marcador de Massa Molecular, “1kb ladder”.

5.3.2. PCR das colônias de *Pichia pastoris*

Após a transformação de células de *P. pastoris* com a construção pPICZ α A10 e seleção em meio seletivo, 300 colônias foram coletadas e estocadas a -80°C . Destas, 18 foram analisadas para verificar a presença do cDNA de interesse integrado no genoma das células de leveduras transformadas, utilizando-se PCR de colônia e os iniciadores internos do lcc, PFI e PRI). Na Figura 5.4. é apresentada a análise da reação de amplificação, em gel de agarose 1%. Dos 18 clones avaliados somente 3 não apresentaram o segmento de DNA de 704 nucleotídeos, com o tamanho esperado utilizando-se os iniciadores internos PFI e PRI (poços 3,6 e 9). Para todos os outros clones houve a confirmação da transformação.

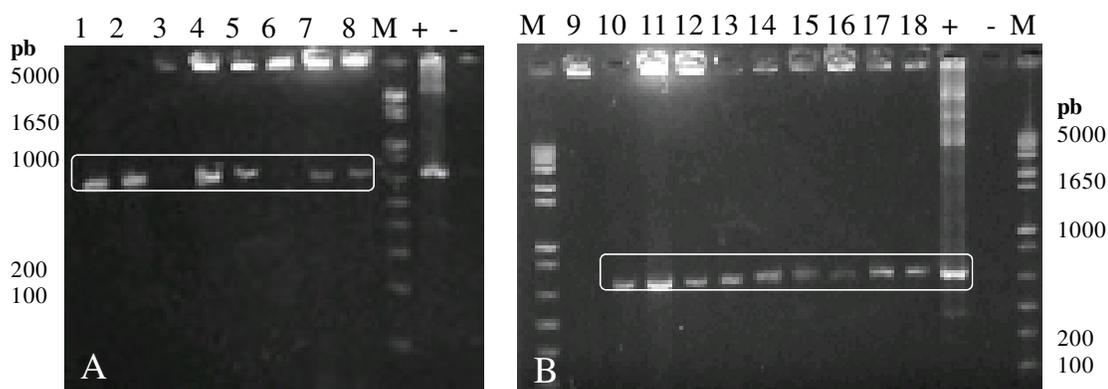


Figura 5.4. Análise Eletroforética em gel de agarose; (A) Poços de 1 a 8 e (B) 9 a 18 - PCR de colônia das leveduras de *P. pastoris* SMD 1168 transformadas. M- Marcador de massa molecular, 1kb ladder. (+) Controle positivo do gene de lacase de *P. sanguineus*; (-) Controle negativo, PCR com água ao invés de amostra. As regiões destacada com um retângulo nos géis A e B referem-se ao fragmento de DNA esperado de 704 nucleotídeos, referentes a região amplificada do gene de lacase, pelos iniciadores internos.

Os 15 clones positivos provenientes da PCR de colônia foram posteriormente utilizados nos testes para verificação da expressão da lacase de interesse. Foram realizados experimentos em diferentes meios de indução, sólido e líquido, na presença ou ausência de íons cobre, e para os substratos o AzBTS e seringaldazina. No entanto, para nenhum dos clones foi detectada atividade da enzima recombinante. Otterbein *et al.* (2000), alcançou resultados positivos de expressão de lacase, utilizando o plasmídeo pPICZ α B, e o gene de lacase do fungo *Pycnoporus cinereus*, que não foi o caso do presente trabalho.

Foram avaliadas diferentes condições de indução, para a expressão da lacase recombinante, dentre elas a variação dos meios de cultura, com mudanças de pH e nutrientes. Com a ausência de expressão de lacase concluiu-se que o problema poderia estar relacionado à construção. Por isto, foram desenhados novos iniciadores para amplificação do *lcc* e expressão em *P. pastoris*, obtendo-se uma nova construção, denominada, a construção 2.

5.4. Construção 2

5.4.1. Preparo da Construção 2

Para a obtenção da construção 2, foi realizada uma reação de PCR com os novos iniciadores com seqüências flanqueadoras contendo sítios de restrição das enzimas BamHI e NotI (PFB e PRBN), e o DNA plasmidial do vetor pPICZ α 10 como molde. Estes iniciadores

foram utilizados para que o inserto obtido tivesse extremidades coesivas com o vetor de expressão pPIC 9, já linearizado. O resultado desta reação, assim como a digestão do vetor para ligação com o cDNA lcc está mostrado na figura 5.5. No poço de número 1 é observado o fragmento de DNA referente ao produto desta PCR, com o tamanho esperado de 1500 pares de base. Já nos poços 2 e 3 são mostrados o vetor pPIC 9 intacto e digerido com a enzima de restrição Not I, neste caso deve ser observado o fragmento indicado pela seta inferior à direita, que mostra o plasmídeo linearizado com seus 8.0 kb.

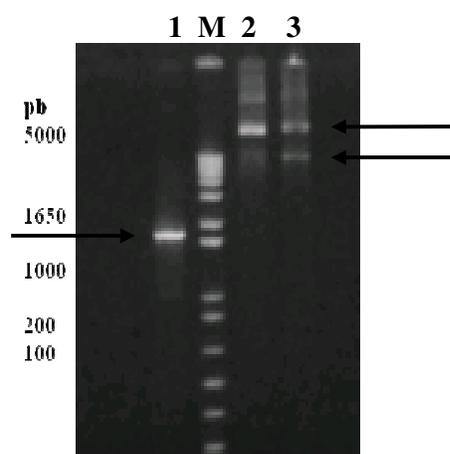


Figura 5.5. Análise eletroforética em gel de agarose; 1- Produto da PCR, utilizando os iniciadores PFB e PRBN. 2- pPIC 9 intacto. 3- pPIC 9 digerido com a enzima de restrição Not I.

Após a digestão com a enzima Not I o vetor pPIC 9 foi digerido com BamH I, conforme apresentado na figura 5.6. O cDNA lcc também foi submetido a digestões com Not I e BamH I, como mostrado na figura 5.6. Nos poços 3 e 4 são apresentadas as digestões do lcc com as enzimas NotI e BamHI, respectivamente. Como esperado não houve alterações no perfil de corrida do lcc após as digestões, visto que as mesmas não alteram o tamanho do inserto. O mesmo foi observado para o vetor pPIC 9 que mesmo após a digestão com BamH I, este já digerido com Not I, não apresentaram alterações no perfis de separação em gel de agarose a 1%.

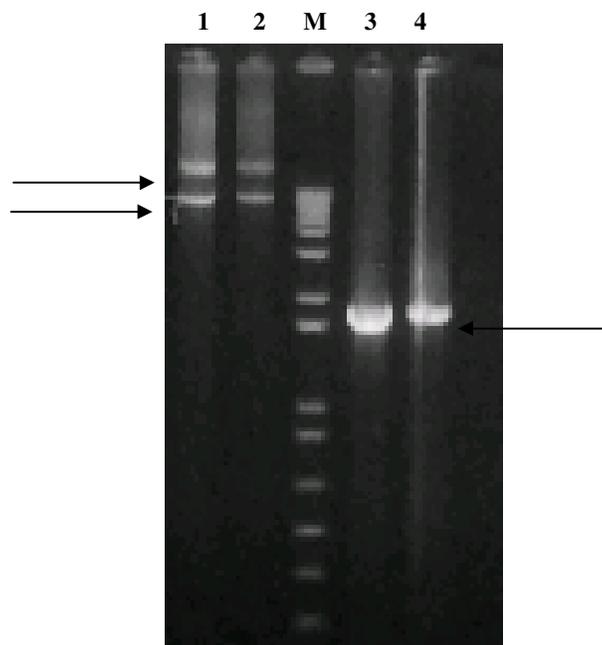


Figura 5.6. Análise Eletroforética em gel de agarose. 1-pPIC 9 digerido com Not I. 2-pPIC 9 digerido com BamH I após digestão com Not I. 3-lcc amplificado com os iniciadores PFB e PRBN; 4- lcc digerido com BamH I e Not I.

Os clones selecionados como positivos referentes à sub-clonagem da construção 2 (pPIC9+lcc), foram confirmados em uma reação de PCR, utilizando os iniciadores “ α factor” (“forward”) do vetor de expressão e PRBN do inserto (reverse). Na figura 5.7. é mostrado o resultado desta reação, dos 11 clones avaliados dois (clones 1 e 2) apresentaram segmento de DNA com tamanho esperado do cDNA lcc. O clone 1 foi escolhido para preparação de DNA plasmidial e transformação de células de *P. pastoris*.

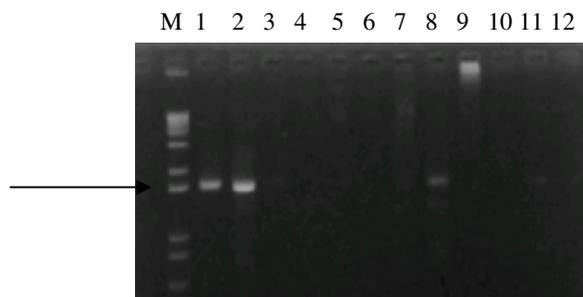


Figura 5.7. Análise eletroforética em gel de agarose. PCR dos clones provenientes da transformação de *E. coli* com a Construção 2. 1 e 2- Fragmentos de DNA amplificados em PCR, por meio dos iniciadores “ α factor” e o PRBN. 3-12 – Clones não amplificados por meio da PCR, sob mesmas condições, com exceção do clone 8 porém este apresentou baixa intensidade em gel.

5.4.2. Transformação e seleção dos clones recombinantes de *Pichia pastoris*

Os clones transformantes de *P. pastoris* foram selecionados pelo crescimento em meio MD na ausência de histidina. Esta seleção é possível, pois o vetor pPIC 9 possui a o gene, HIS4, que codifica a enzima histidinol-desidrogenase complementando as células hospedeiras auxotróficas *his4*. Foram selecionadas deste meio 206 colônias, que foram posteriormente transferidas para meio de cultura seletivo (MD) contendo metanol e o substrato para quantificação de atividade de lacase, AzBTS. Foi utilizada como controle negativo uma colônia de *P. pastoris* transformada com o vetor (pPIC9) sem o inserto (vazio). O crescimento foi acompanhado por 6 dias. No sexto dia puderam ser visualizados halos de cor verde ao redor das colônias, indicando a produção de lacase, que não foi observado na colônia controle (figura 5.8). Este teste foi repetido para confirmação desta atividade.

Das colônias avaliadas 35 apresentaram o halo de hidrólise do substrato e 5 não apresentaram halo de hidrólise.

Esta cor esverdeada é o resultado da atividade da lacase heteróloga sobre o substrato AzBTS, que também já foi relatado por Colao *et al.* (2006). Neste trabalho, células de *P. pastoris* foram transformadas com construções feitas com os vetores de expressão pHIL-D2 e com pPIC9 e um gene codificador de lacase, proveniente do fungo *Trametes trogii*. A secreção de lacase também foi detectada em meio indutor contendo metanol e o substrato AzBTS. Otterbein *et al.*, 2008 encontrou atividade de lacase heteróloga e detectou a primeira vista também por meio de indução em meio sólido, estes autores esperavam encontrar uma lacase de aproximadamente 81kDa, porém eles encontram uma lacase de 110 kDa o que indica que pode ter havido hiperglicosilação da proteína recombinante.

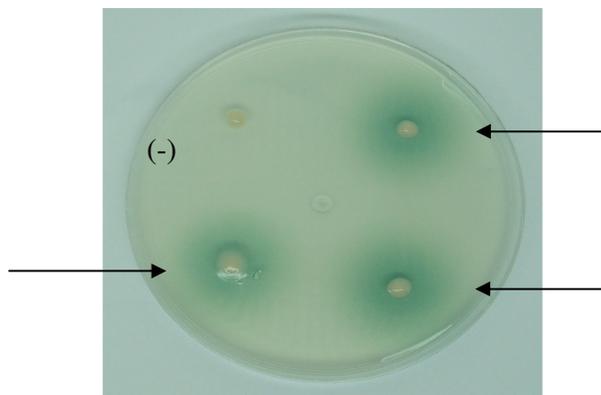


Figura 5.8. Placa contendo células de *P. pastoris* cultivadas em meio de cultura seletivo (MD) contendo metanol e o substrato de lacase AzBTS. As setas indicam as colônias das leveduras transformadas com a construção 2, ressaltando a presença do halo de hidrólise de cor verde ao redor das colônias; (-) corresponde a colônia de *P. pastoris* transformada com o plasmídeo vazio, utilizada como controle negativo.

O sistema de expressão em *P. pastoris* é utilizado para a expressão heteróloga de uma gama de proteínas (CEREGHINO *et al.*, 2000). A expressão de genes recombinantes sob o controle do promotor AOX 1, induzido por metanol, é uma forma eficiente de controlar a expressão de enzimas recombinantes em *P. pastoris*. Além disto, quando a levedura é crescida em meio com baixa concentração de carbono secreta uma quantidade muito pequena de proteínas nativas, o que se torna vantajoso para que se possa purificar a proteína heteróloga (CEREGHINO *et al.*, 1999). Há um enorme número de estratégias para otimizar o nível de produção de uma proteína heteróloga em *P. pastoris*, como por exemplo, o controle de parâmetros ambientais tais como: temperatura pH, concentração do metanol, bem como o uso de linhagens deficientes na produção de proteases, o que previne a degradação proteolítica da proteína recombinante (COLAO *et al.*, 2006).

Foi relatado por Colao *et al.*, 2006 que é possível aumentar a produtividade da lacase aumentando a quantidade de metanol adicionada no meio de crescimento. Neste trabalho, a enzima recombinante se tornou estável na presença do metanol e a atividade específica da enzima purificada aumentou, sendo que a amostra de lacase produzida por *P. pastoris* correspondeu a 17mg por litro. Além disto, a quantidade de lacase produzida pela levedura recombinante é maior que a obtida pelo próprio fungo (*T. trogii*), além disso a expressão nativa de lacase pelo fungo tem a desvantagem de poder haver a produção simultânea de outras proteínas nativas, o que dificulta a purificação da proteína de interesse (COLAO *et al.*, 2003).

Já tem sido demonstrado que a descoloração de corantes pode ser realizada por meio de lacases, inclusive por meio do fungo *P. sanguineus* (POINTING e VRIJMOED, 2000). Lacase de *P. coccineus* teve um resultado promissor no tratamento do efluente oriundo da produção do óleo de oliva (JAOUANI *et al.*, 2005).

Assim, a produção em larga escala da lacase heteróloga deste trabalho é promissora visto que se pode testar as suas diversas aplicabilidades.

5.5. Análise *in silico*

5.5.1. Análise da seqüência nucleotídica e protéica

A proteína predita à partir da seqüência do cDNA, possui 502 aminoácidos, 3 domínios conservados de cobre-oxidases (Figura 5.9.), massa molecular de 58,8 kDa e ponto isoelétrico de 5,7. Estes domínios de cobre-oxidase, são regiões conservadas da família das lacases, nestas regiões da proteína que se encontram os sítios de ligação aos íons cobre responsáveis por auxiliar a enzima no processo de catálise.

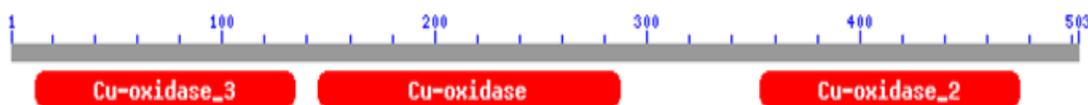


Figura 5.9. Esquema ilustrativo dos domínios de cobre oxidase presentes na seqüência predita da lacase de *P. sanguineus*

Depois de realizado o seqüenciamento do cDNA codificante de lacase proveniente de *P. sanguineus* ligado ao plasmídeo pPICZ α A, a seqüência obtida foi analisada utilizando o programa “Staden PreGap”, e em seguida aferido que a seqüência encontrava-se em fase, ou seja, apta a formar as trincas de aminoácidos para a posterior formação de lacase. Esta mesma seqüência foi submetida ao programa *online* “BLAST nucleotide” disponível no servidor do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI). Deste modo constatou-se que seqüência em questão de fato tratava-se de uma seqüência codificadora de lacase.

A seqüência nucleotídica da lacase de *P. sanguineus* quando comparada com seqüências de outras lacases depositadas no banco de dados do NCBI, apresentou identidade de 97% com as lacases de *P. sanguineus* e *P. cinnabarinus* e de 79% com uma lacase de *Trametes* sp. Mikolasch *et al.*, 2009 obteve a seqüência do gene de lacase do fungo filamentoso *Pleorotus* spp., e esta foi submetida ao programa de computador TBLASTX o que revelou 4 diferentes seqüências dos fungos *Pleorotus eryngii* e *P. ferulae*. Mozhaev *et al.*, 1998, comparou a seqüência de aminoácidos de uma lacase de *Pycnoporus cinnabarinus* com outras seqüências depositadas em bancos de dados e observou que esta possui 84% de similaridade com a seqüência de lacase de *Coriolus hirsutus* e 83% com uma lacase de *Trametes villosa*. Estes dados indicam a conservação das seqüências de lacases produzidas

por fungos da podridão branca, tais como *Pleorotus sp.*, *Coriolus hirsutus*, *Coprinus cinereus*, *Trametes sp.* e o próprio gênero *Pycnoporus*.

5.5.2. Modelagem molecular

A seqüência de lacase homóloga à de *P. sanguineus*, encontrada por meio do servidor "BioInfo Meta Server", foi utilizada para a modelagem da lacase estudada. O molde utilizado foi a seqüência de uma lacase do fungo *Coprinus cinereus*, a qual foi também modelada por Ducros *et al.* (2001).

A seqüência proveniente de *C. cinereus* (DUCROS *et al.*, 2001), dentre as encontradas foi a de maior homologia quando comparada com seqüência de lacase de *P. sanguineus*, e por meio dela foi realizada a modelagem da estrutura molecular terciária da enzima.

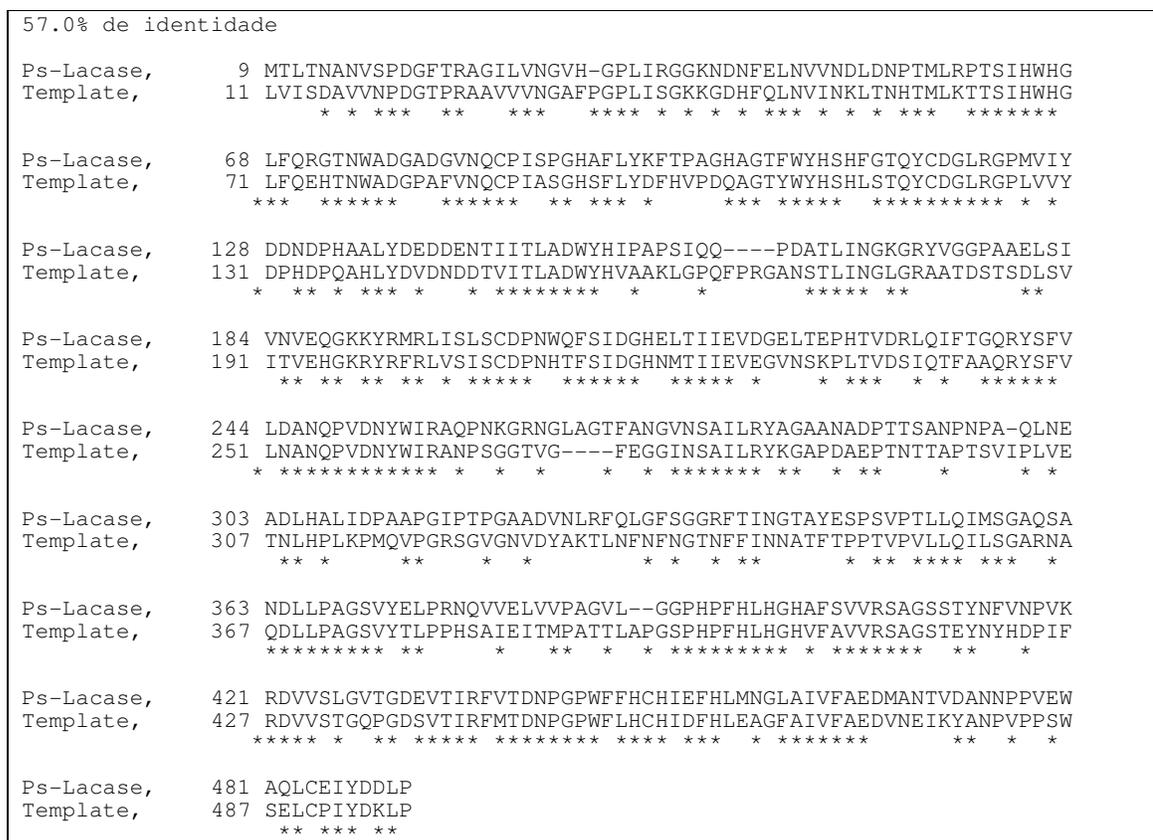


Figura 5.10. Alinhamento da seqüência de aminoácidos da lacase predita com a seqüência de aminoácidos utilizada como molde para obter a estrutura tridimensional; 57% de identidade entre as duas seqüências.

Na Figura 5.10. é apresentado o alinhamento da seqüência de aminoácidos da lacase predita neste trabalho, com a seqüência da lacase do fungo *C.cinereus*, a qual foi utilizada para modelar a estrutura terciária da lacase deste trabalho. É possível observar neste

alinhamento entre as seqüências em questão há uma porcentagem de identidade de 57%. No caso da análise realizada por Liu *et al.*, 2003, foi encontrado um valor de 67% de identidade entre as seqüências de *Fome lignosus* e *Trametes villosa*, além de ter 66% de identidade com o fungo *T. versicolor*, 63% com o *Lentinula edodes*, 53% com o *Pycnoporus cinabarinus* e 30% com o *Coriolus versicolor*. Sendo que a lacase estudada por estes autores também é uma lacase heteróloga com características cinéticas alteradas como pH ideal, temperatura ideal, níveis de glicosilação em relação a lacase nativa do fungo, que neste caso tratava-se do *F. lignosus*.

Como resultado da modelagem foi obtida uma estrutura terciária globular contendo cerca de 7,5% de alfa-hélices, 16% de folhas beta e o restante de beta “turns”, conforme apresentado na Figura 5.11.

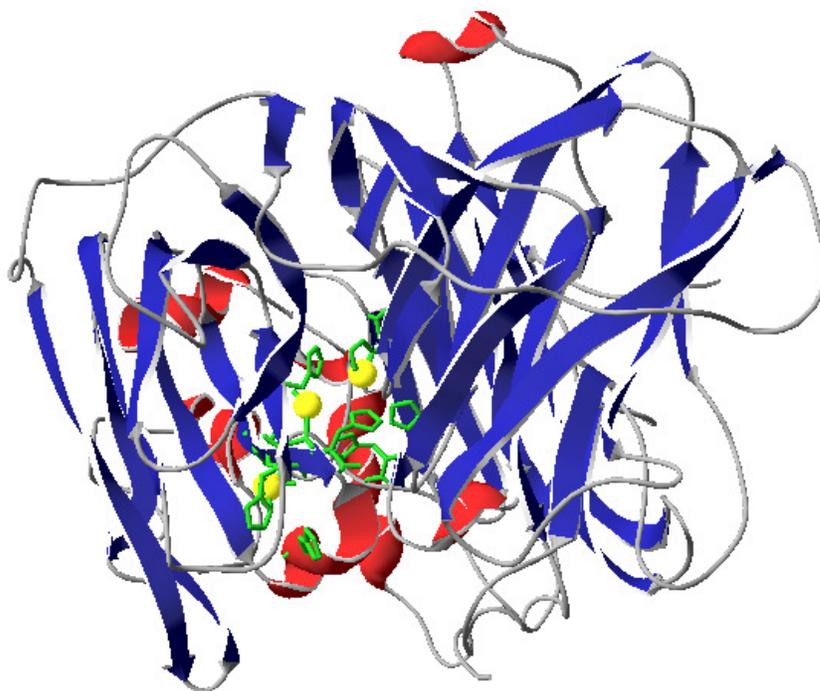


Figura 5.11. Modelo da estrutura tridimensional da lacase de *P. sanguineus*. Em azul são representadas as folhas beta e em vermelho as alfa-hélices e em cinza os beta-turns. No sítio ativo, em verde, são representados os anéis de histidina responsáveis pela ligação aos íons cobre (em amarelo) e críticos no mecanismo de catálise destas enzimas.

Os resíduos de histidina que coordenam os átomos de cobre no sítio ativo da lacase modelada neste trabalho são os seguintes: His-69, His-112, His-114, His-399, His-402, His-404, His-454 e His-460; além dos resíduos de histidina, há também no sítio ativo a presença

de uma cisteína, a Cis-455, que também participa na coordenação dos íons de Cobre. De acordo com os dados fornecidos pela modelagem, há no sítio ativo da lacase estudada, 3 íons de cobre, sendo que o Cu-1 é coordenado pelos resíduos His-399, Cis-455 e His-46; o Cu-2 é coordenado por His-114, His-402, His-454 e Cis-455; o Cu-3 por His-69, His-112 e His-456.

Neste trabalho, por meio da modelagem foram encontrados 9 aminoácidos (8 Histidinas e 1 Cisteína) que participam do sítio ativo e que coordenam os átomos de cobre presentes ali, no caso do trabalho realizado por Ducros *et al.* (2000), foram encontradas 10 histidinas e uma cisteína as quais são requeridas para coordenar os átomos de cobre no sítio ativo das lacases.

O sítio ativo das lacase é a região mais conservada desta enzima, portanto trata-se de uma região de grande importância para a atividade específica da enzima, como por exemplo a oxidação de componentes fenólicos. No caso da lacase estudada por Ducros *et al.*, 1998, o resíduo envolvido na coordenação dos átomos de cobre tipo 1 está localizado a jusante dos resíduos de Cisteína, e dentre estes podem ser: Leucina, Metionina ou Fenilalanina. A presença de Fenilalanina nesta porção aumenta o potencial redox das lacases. Entretanto, por meio de análises da estrutura tridimensional da estrutura da lacase (DUCROS *et al.* 1998), juntamente com estudos cinéticos e mutagênese sítio direcionada, aferiu-se que a lacase heteróloga possui no sítio ativo, adjacente à histidina conservada, os aminoácidos Leu–Glu–Ala, com alto potencial redox e aquelas que possuem os aminoácidos Val–Ser–Gly possuem baixo potencial redox (XU *et al.* 1998).

Dentre os modelos de lacase encontrados na literatura, a maior parte são de lacases provenientes de fungos, sendo a maioria deles pertencentes ao grupo de fungos da podridão branca. Porém, foi realizado por Cereghino *et al.*, 2000, a modelagem de uma estrutura tridimensional de lacase proveniente de bactérias anaeróbias nativas do rúmen de bovinos, e foi descrito que esta lacase bacteriana, também possui resíduos de histidina e cisteína que coordenam os íons de cobre no sítio ativo, auxiliando a enzima no processo de catálise. Este fato comprova o quão é conservada a região do sítio ativo das lacases, pois mesmo tratando-se se uma lacase de um organismo de um Reino diferente (Monera e Fungi) há uma forte semelhança entre as proteínas, revela ainda a importância desta região para a efetiva ação da enzima sobre o substrato.

6. Conclusão

- Foi gerado um cDNA de 1500 pares de bases extraído do fungo *Pycnoporus sanguineus*;
- O cDNA obtido foi clonado em um vetor de clonagem, o pGEM-T, e a partir desta clonagem foi realizado um seqüenciamento, e após análise deste seqüenciamento aferiu-se que de fato tratava-se de um gene de lacase;
- Foi realizada a construção 1, utilizando o plasmídeo pPICZ α A, onde esta foi utilizada para clonagem em *P. pastoris* e a partir desta clonagem obteve-se 15 clones positivos detectados por meio de PCR de colônia;
- A construção 1, utilizada neste trabalho, não foi eficiente para a expressão da lacase heteróloga;
- Foi realizado um seqüenciamento utilizando a construção 1, e obteve-se a seqüência completa do gene de lacase, que possui 97% de homologia com genes de lacase do banco de dados;
- A construção 2, onde o pPIC 9 foi o vetor de expressão foi eficiente no processo de expressão da lacase heteróloga, pois puderam ser visualizados os halos de hidrólise do AzBTS em meio de cultura sólido
- A estrutura da lacase modelada tem estrutura globular com um sítio ativo contendo íons de cobre coordenados por resíduos de histidina e de cisteína.

7. Perspectivas

Neste trabalho foi realizada a expressão heteróloga de uma lacase de *P. sanguineus*, no entanto a sua atividade só foi detectada em um teste inicial para seleção de clones recombinantes secretores da enzima na sua forma nativa, e em meio sólido. Em um segundo momento, estes clones serão utilizados na produção da lacase em meio de cultura líquida para determinação da cinética de produção da enzima, e a detecção de sua atividade no sobrenadante da cultura.

Além disto, a lacase será caracterizada quanto ao efeito do pH, temperatura e íons na velocidade da reação enzimática. Para tanto será utilizado o sobrenadante da cultura e estes parâmetros serão comparados com os obtidos para a enzima purificada. Serão determinados também os parâmetros cinéticos da enzima recombinante, que serão comparados aos determinados para as lacases de *P. sanguineus* selvagens.

A lacase heteróloga também será caracterizada quanto ao seu potencial de aplicação industrial. Sendo utilizada na biorremediação de corantes industriais têxteis e farmacêuticos, de outros compostos fenólicos produzidos como rejeitos em diferentes processos industriais, bem como no pré-tratamento de bagaço de cana de açúcar para delignificação da fibra de celulose, a ser utilizada na produção de bioetanol.

8. Referências

ABADULLA, E. ROBRA, K.H., GUBITZ, G.M., SILVA, L., CAVACO-PAULO A., Enzymatic decolorization of textile dyeing effluents. **Tex. Res. J.** 70: 409–414, 2000.

ALCADE, M., BULTER, T., ARNOLD, F.H., Colorimetric assays for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungal laccases. **J Biomol Screen.** 7(6):547-53, 2002.

ALBERTINI, S., CARMO, L. F., PRADO-FILHO, L.G., Determinação de isotermas de adsorção de *Saccharomyces cerevisiae* empregando acetato e sulfato de cádmio. **Ciênc. Technol. Aliment.** 27(2): 248-253, 2007.

ARANDA, E., GARCÍA-ROMERA, I., OCAMPO, J.A., CARBONE, V., MRI, A., MALORNI, A., SANNINO, F., DE MARTINO, A., CAPASSO R. Chemical characterization and effects on *Lepidium sativum* of the native and bioremediated components of dry olive mill residue. **Chemosphere**, 69:229–239, 2007.

AZEVEDO, João Lúcio. Fungos, **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento.** Universidade Federal de Goiás. Rev. Ano I. no. 1. maio de 1977.

BAJPAI P. BAJPAI P.K., (1994) Biological colour removal of pulp and paper mill wastewaters, **J. Biotechnol.**, **33**, 211-220.

BALDRIAN P. Fungal laccases – occurrence and properties. **FEMS Microbiol Rev.** 30(2):215-42, 2006.

BAMFORTH, S.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80 n. 7: 723-736, 2005.

BEHKI, R. M.; TOPP, E.; DICK, W.; GERMON, P. Degradation of atrazine, propazine, and simazine by *Rhodococcus* strain B-30. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 42, p. 1237-1241, 1993.

BENOIT, I., NAVARRO, D., MARNET, N., RAKOTOMANOMANA, N., LESAGE-MEESSEN L., SIGOILLOT, J.C., ASTHER, M., ASTHER, M. Feruloyl esterases as a tool for the release of phenolic compounds from agro-industrial by-products. **Carbohydrate Research.** 341: 1820-1827, 2006.

BISHNOI, K., U. SAIN, R. KUMAR, R. SINGH e N. R. BISHNOI. Distribution and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated sites of Hisar (India). **Indian J Exp Biol**, v.47, n.3, Mar, p.210-7. 2009.

BITTON, G.; GERBA, C. P. **Ground water. Pollution Microbiology**. John Wiley & Sons. N.Y. 377p., 1984.

BLIECK, L., DUMORTIER, F., VERSTREPEN, K.J., DELVAUX, F.R., THEVELEIN, J.M., VAN DIJICK, P., Isolation and characterization of brewer's yeast variants with improved fermentation performance under high-gravity conditions. **Appl. Environ. Microbiol.** 73(3): 815-824, 2007.

BORDEN, R. C.; GOMEZ, C. A.; BECKER, M. T. Geochemical indicators of intrinsic bioremediation. **Ground Water**, v.33(2), p. 180-189, 1995.

BUITRÓN, G.; GONZÁLES, A.; Biosorption and biodegradation of pentachlorophenol (PCP) in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor **Wat. Sci. Tech.**, 34, 289. 1996

BULL, A. T.; WARD, A. C. & GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 64(3): 573-606. 2000.

CALDERON, J., D. ORTIZ-PEREZ, L. YANEZ e F. DIAZ-BARRIGA. Human exposure to metals. Pathways of exposure, biomarkers of effect, and host factors. **Ecotoxicol Environ Saf**, v.56, n.1, Sep, p.93-103. 2003.

CANTU-MEDELLIN, N., N. O. OLGUIN-MONROY, L. C. MENDEZ-RODRIGUEZ e T.ZENTENO-SAVIN. Antioxidant enzymes and heavy metal levels in tissues of the black chocolate clam *Megapitaria squalida* in Bahia de La Paz, Mexico. **Arch Environ Contam Toxicol**, v.56, n.1, Jan, p.60-6. 2009.

CEREGHINO GPL, CREGG JM: Applications of yeast in biotechnology: Protein production and genetic analysis. **Curr Opin Biotechnol**, 10(5):422-427, 1999.

CEREGHINO JL, CREGG JM: Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiol**, 24(1):45-66, 2000.

CHAPELLE, F. H. **Ground water microbiology & geochemistry**. N.Y. John Wiley & Sons Inc. 424p., 1993.

CLAUS, H. Laccases and their occurrence in prokaryotes. **Arch Microbiol**.179(3):145-50, 2003.

COLAO MC, GARZILLO AM, BUONOCORE V, SCHIESSER A, RUZZI M: Primary structure and transcription analysis of a laccase-encoding gene from basidiomycete *Trametes trogii*. **Appl Microbiol Biotechnol** 2003, 63(2):153-158.

COLE, J.L.; TAN, G.O., YANG, E.K.; HODGSON, K.O.; SOLOMON, E.I. Reactivity of the laccase trinuclear copper active site with dioxygen: an x-ray absorption edge, *Journal American of Chemistry. Society*, 112, 2243, 1990.

CONESA A., PUNT P.J., HONDEL C.A.M.J.J. Fungal peroxidases: molecular aspects and applications, **J. Biotechnol.**, 93, 143-158. 2002.

CORDAZZO, J. Modelagem e simulação numérica do derramamento de gasolina acrescida de álcool em águas subterrâneas. **Dissertação (mestrado)** – Departamento de Engenharia Mecânica, UFSC – Florianópolis, SC, 2000.

COUTO, S.R ; HERRERA, J.L.T. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. **Biotechnology Advances**, 24: 500-513. 2006.

CREGG, J. M., VEDVICK, T. S., AND RASCHKE, W. C. Recent Advances in the Expression of Foreign Genes in *Pichia pastoris*. **Bio/Technology**, 11: 905-910.1993.

DAHLE, S.; SAVINOV, V. M.; GENNADIJ G. M.; EVENSET, A.; NAES, K. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in bottom sediments of the Kara Sea shelf, Gulf of Ob and Yenisei Bay. **The Science of the Total Environment**, 306, p. 57-71, 2003.

DAYARAM P, DASGUPTA D. Decolorisation of synthetic dyes and textile wastewater using *Polyporus ribidus*. **J. Environ Biol.**, 29 (6), p. 831-6, 2008.

DECKER, C.H., VISSER, J., SCHREIER, P. Beta-glucosidases from five black *Aspergillus* species: study of their physico-chemical and biocatalytic properties **J Agric Food Chem.** 48(10):4929-36, 2000.

DISTEFANO, T. D.; The effect of tetrachloroethene on biological dechlorination of vinyl chloride: potential implication for natural bioattenuation. **Wat. Res.**, 44, p. 1688-1684, 1999.

DOELMAM, P. Resistência of soil microbial to heavy metals. In: JENSEN, U. KJOLLER, A. & SORENSEN, L.H., EDS. Microbial communities in soil. New York, E.A.S., p.369-385, 1986.

DUCROS V, BRZOZOWSKI AM, WILSON KS, BROWN SH, ØSTERGAARD P, SCHNEIDER P, YAVER DS, PEDERSEN AH, DAVIES GJ Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinnereus* at 2.2 Å resolution. **Nat Struct Biol** 5:310–315, 1998.

DURÁN, N.; ROSA, M.A.; D'ANNIBALE, A. GIANFREDA, L. Applications of laccases and tyrosinases 9phenoloxidases0 immobilized on different supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology** 31: 907-931, 2002.

ELLIS, S. B., BRUST, P. F., KOUTZ, P. J., WATERS, A. F., HARPOLD, M. M., AND GINGERAS, T. R. Isolation of Alcohol Oxidase and Two other Methanol Regulatable Genes from the Yeast, *Pichia pastoris*. **Mol. Cell. Biol.** 5: 1111-1121.1985.

ERZINGER, G. S. e M. VITOLO. Zymomonas mobilis as catalyst for the biotechnological production of sorbitol and gluconic acid. **Appl Biochem Biotechnol**, v.131, n.1-3, Mar, p.787-94. 2006.

- ESPOSITO, E.; CANHOS, V. P.; DURÁN, N. 1991. Screening of lignin-degrading fungi for removal of color from kraft mill wastewater with no additional extra carbon-source. **Biotechnol. Lett.**, v. 13, p.571-576.
- EVANGELOU, M. W. H., EBEL M., SCHAEFFER, A. Chelate assisted phytoextraction of heavy metals from soil. Effect, mechanism, toxicity, and fate of chelating agents, **Chemosphere**. v. 68: 989–1003, 2007.
- FETTER, C. W. Contaminant Hydrogeology. New York: **Macmillan**, 1993.
- FJERBAEK, L., K. V. CHRISTENSEN e B. NORDDAHL. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. **Biotechnol Bioeng**, v.102, n.5, Apr 1, p.1298-315. 2009.
- FROEHNER S., ZENI J., LUZ, E. C., MACENO M. Characterization of Granulometric and Chemical Composition of Sediments of Barigui River Samples and their Capacity to Retain Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **Water, Air, & Soil Pollution**, p.69-73, 2009.
- GARCIA, T.A., SANTIAGO, M.F., ULHOA C.J. Properties of laccases produced by *Picnoporus sanguineus* induced by 2,5-xylidine. **Biotechnol. Lett.** 28(9): 633-636, 2006.
- GARCIA, T.A., SANTIAGO, M.F., ULHOA C.J. Studies on the *Pycnoporus sanguineus* purified by hydrophobic interaction chromatography. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 75(2): 311-318, 2007.
- GENTRY TJ, WICKHAM GS, SCHADT CW, HE Z, ZHOU J. Microarray applications in microbial ecology research. **Microb Ecol**;52:159–75, 2006.
- GHIORSE, W. C.; WILSON, J. L. Microbial ecology of the terrestrial subsurface. **Advances in Applied Microbiology**, v. 33, p. 107-172, 1988.
- GRINNA, L. S., AND TSCHOPP, J. F. Size Distribution and General Structural Features of N-Linked Oligosaccharides from the Methylophilic Yeast, *Pichia pastoris*. **Yeast** 5:107-115. 1989.
- HAHN-HÄGERDAL B, KARHUMAA K, FONSECA C, SPENCER-MARTINS I, Gorwa-Grauslund MF. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains, **Appl Microbiol Biotechnol.** 74(5):937-53, 2007.
- HALLBERG, G.R. The atrazyn. **Agr. Ecosys. Environ.** 26: 299-367, 1989.
- HARNLY, M., MCLAUGHLIN, R., BRADMAN, A., ANDERSON M., GUNIER R. Correlating agricultural use of organophosphates with outdoor air concentrations: a particular concern for children. **Environ Health Perspect.**;113:1184–1189, 2005.
- HARVEY, B.M. AND WALKER, J.P.K. Studies with plant laccase: I. comparison of plant and fungal laccase. **Biochem. Mol. Biol. Biophys.** 3, 45–51. 1999.
- HOSHIDA, H., MITSUhide N., HIDENOBU K., KANAKO K., TORU H., KOJI M., RINJI A. AND YOSHINORI N. Isolation of five laccase gene sequences from the white-rot fungus

Trametes sanguinea by PCR, and cloning, characterization and expression of the laccase cDNA in yeasts, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, V. 92 (4), p. 372-380, 2001.

HUBLIK, G., SCHINNER, F., Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. **Enzyme and Microbial Technology**, 27:330-336, 2000.

HUMANES, M. M.; MATOSO, C. M.; DA SILVA, J. A. L.; DA SILVA, F. J. J. R. New trends for treatment of industrial effluents containing organochloride species.; **Química** 58, 16. 1995.

HURST, C. J., CRAWFORD, R.L., KNUDSEN, G.R., MCINERNEY, M.J., STETZENBACH, L.D., **Manual of Environmental Microbiology**. Segunda edição, American Society for Microbiology Press, Washington, 2002.

HUSAIN, Q. Potential Applications of the Oxidoreductive Enzymes in the Decolorization and Detoxification of Textile and Other Synthetic Dyes from Polluted Water: A Review critical **Reviews in Biotechnology**, v. 26: 201 – 221, 2006.

HWANG, H. M., X. HU e X. ZHAO. Enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by environmentally friendly techniques. **J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev**, v.25, n.4, Oct-Dec, p.313-52. 2007.

IT, L., PHAM, E., TRUONG, K. Current approaches for engineering proteins with diverse biological properties. **Adv. Exp. Med. Biol.** 620:18-33, 2007.

JAOUANI, A., GUILLÉN, F., PENNINCKX, M. J., MARTÍNEZ, A. T., MARTINEZ, M. J., Role of *Pycnoporus coccineus* laccase in the degradation of aromatic compounds in olive oil Mill wastewater. **Enzyme and Microbial Technology**, 36: 478-486, 2005.

KANDELBAUER A, MAUTE O, KESSLER RW, ERLACHER A, GÜBITZ GM. Study of dye decolorization in an immobilized laccase enzyme-reactor using online spectroscopy **Biotechnol Bioeng.** 20;87(4):552-63, 2004.

KEHARIA, H., MADAMWAR, D. Bioremediation concepts for treatment of dye containing wastewater: a review. **Indian J Exp Biol.** 41(9):1068-75, 2003.

KOUTZ, P. J., DAVIS, G. R., STILLMAN, C., BARRINGER, K., CREGG, J. M., AND THILL, G. Structural Comparison of the *Pichia pastoris* Alcohol Oxidase Genes. **Yeast** 5: 167-177, 1989.

LANDETE, J. M., RODRÍGUEZ, H., DE LAS RIVAS, B., MUÑOZ, R. High-added-value antioxidants obtained from the degradation of wine phenolics by *Lactobacillus plantarum*. **J. Food Prot.** 70(11): 2670-2675, 2007.

LASAT, M.M. Phytoextraction of toxic metal: a review of biological mechanisms. **J. Environ. Qual.** 31, 109–120. 2002.

LEONTIEVSKY A., MYASOEDOVA, N., POZDNYAKOVA, N., GOLOVLEVA, L. 'Yellow' laccase of *Panus tigrinus* oxidizes non-phenolic substrates without electron-transfer mediators **FEBS LETTERS**, V. 413: 3, p. 446-448, 2002.

LEVANON, D. Roles of fungi and bacteria in the mineralization of the pesticides atrazine, alachlor, malathion and carbofuran in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 25, p. 1097-1105, 1993

LOGANATHAN, P.; SUNITA, R.; PARIDA, A.K.; NAIR, S. Isolation and characterization of two genetically distant groups of *Acetobacter diazotrophicus* from a new host plant *Eleusine coracana* L. **Journal of Applied Microbiology**, v.87, p.167-172, 1999.

LUDOVIC O., ERIC R., SONIA L., MARCEL A. AND SERGE M., Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* I-937 and expression in *Pichia pastoris* **Eur. J. Biochem.** 267, 1619-1625, 2000.

MARIANO, A. P. Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel. 147 f. **Tese (Doutorado em Geociências e Meio Ambiente)** - Programa de Pós-Graduação em Geociências e Meio Ambiente, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

MARCELINO, F. C. MARTINS, M. F.; PIMENTA, M. A. S. *et al.* Detecção de Transgênicos. A experiência da Agrogenética. **Ciência Hoje**. São Paulo: Sociedade Brasileira para o Progresso Científico, n.203, v.34, p.38-39. abr. 2004.

MAYER, A. M., STAPLES, R. C., Review – lacase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, 60:551-565, 2002.

MEDVE, R.J. & SAYRE, W.G. Heavy metals in red pines, basidiomycetes sporocarps and soils on bituminous stripmine spoils. **J. Pennsylvania Acad. Sci.** v 68, p.131-135, 1994.

MIKOLASCH A, SCHAUER F. Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. **Appl Microbiol Biotechnol.** 82(4):605-24, 2009.

MORENO, C. M., BECERRA, A. G., SANTOS, M. J. B., Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. **Rev. Iberoam Micol.** 21: 103-120, 2004.

MOREIRA, F. M. S. & SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras: Ed. UFLA. 626p. 2002.

MOREIRA, M.T., VIACAVA, C., VIDAL, G., Fed-batch Decolorization of Poly R-478 by *Trametes versicolor*. **Brazilian Archives of Biology and Technology.** 47(2): 179-183, 2004.

MOZHAEV V. V. , YURI L. KHMELNITSKY , SANCHEZ-RIERA F., MAURINA-BRUNKER J., REINHARDT A. ROSSON ALAN D. GRUND Arylsulfotransferase from *Clostridium innocuum* - A new enzyme catalyst for sulfation of phenol-containing compounds. **Biotechnology and Bioengineering** Volume 78 Issue 5, p. 567 – 575, 2001.

MUYZER, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. **Curr Opin Microbiol** 2:317–322, 1999.

NIKU-PAAVOLA M-L, FAGERSTRÖM R, KRUIUS K, VIIKARI L. 2004. Thermostable laccases produced by a white-rot fungus from *Peniophora* species. **Enzyme Microb. Technol.** 35, 100-102, 2004.

OLIVARES-RIEUMONT, S., D. DE LA ROSA, L. LIMA, D. W. GRAHAM, D. A. K, J. BORROTO, F. MARTINEZ e J. SANCHEZ. Assessment of heavy metal levels in Almendares River sediments--Havana City, Cuba. **Water Res**, v.39, n.16, Oct, p.3945-53. 2005.

OTHON, D.; TASLI, R.; SOZEN, S.; Experimental Basis of Activated Sludge Treatment for Industrial Wastewater-State of the Art, **Wat. Sci. Tech.**, 40, 1, 2009.

PAIVA, H.N. et al. Influência de doses crescentes de chumbo sobre o teor e o conteúdo de nutrientes e Pb em mudas de Ipê Roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.). **Rev. Árvore**, Viçosa, MG, v.27,nº 2, p.151-158, 2003.

PALONEN H, THOMSEN AB, TENKANEN M, SCHMIDT AS, VIIKARI L.. Evaluation of wet oxidation pretreatment for enzymatic hydrolysis of softwood. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 117, 1-18, 2004.

PARK, J.W.; CHOI, S.Y.; HWANG, H.J.; KIM, Y.B. Fungal mycoflora and mycotoxins in Korean polished rice destined for humans. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 103, n. 3, p. 305-314, set. 2009.

PENHA, F. M., MAIA, M., FARAH, M. E., DIB, E., PRÍCIPE, A. H., DEVIN, F., RODRIGUES, E. B., DUPRAT, J. P., FREYMÜLLER, E. Morphologic and Clinical Effects of Subretinal Injection of Indocyanine Green and Infracyanine Green in Rabbits. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, 24: 1, 2008.

PETERSON, D.H., MURRAY, H.C., EPPSTEIN, S.H., REINECKE, L.M., WEINTRAUB, A., MEISTER, P.D., LEIGH, H.M. Microbiological transformations of steroids.I. Introduction of oxygen at carbon-11 of progesterone. **J. Am. Chem. Soc.** 74:5933-5936, 1952.

PIONTEK K, MANTORINI M & CHOINOWSKI T Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. **J Biol Chem** 277: 37663–37669, (2002).

POINTING, S. B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 57: 20–33, 2001.

POKREL, D.; VIRARAGHAVAN, T., Leachate generation and treatment- a review. **Frenius Environmental Bulletin**, v.13, n.3, p.223-232, 2004.

RAY P.; ADHOLEYA, A., Correlation between organic acid exudation and metal uptake by ectomycorrhizal fungi grown on pond ash in vitro. **Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine**. 22(2):275-81. 2009.

RASKIN, I., SMITH, R.D., SALT, D.E., Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. **Curr. Opin. Biotechnol.** 8, 221–226, 1997.

RAYOL, Alice. Biotecnologia, ética e patentes. **Revista da ABPI**, São Paulo, n. 44, jan./fev. 2000, p. 22

REBROS, M., M. ROSENBERG, Z. GROSOVA, L. KRISTOFIKOVA, M. PALUCH e M. SIPOCZ. Ethanol Production from Starch Hydrolyzates using *Zymomonas mobilis* and Glucoamylase Entrapped in Polyvinylalcohol Hydrogel. **Appl Biochem Biotechnol**, Dec 17. 2008.

RUBIO, V., M. VALVERDE e E. ROJAS. Effects of atmospheric pollutants on the Nrf2 survival pathway. **Environ Sci Pollut Res Int**, Apr 15. 2009.

RUGGABER, T. P. TALLEY, J. W., Enhancing Bioremediation with Enzymatic Processes: a review. **Practice periodical of hazardous, toxic, and radioactive waste management** / 73.APRIL 2006

SÁNCHEZ-FERRER, A., RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J.N., GARCÍA-CÁNOVAS, F., GARCÍA-CARMONA, F. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. **Biochim Biophys Acta**. 22;1247(1):1-11, 1995.

SANGHI, A., ALVES D., EVENSON R., MENDELSON R. Global warming impacts on Brazilian agriculture: estimates of the Ricardian model. **Economia Aplicada**, v.1,n.1, 2005.

SANTOS, D. M. ; QUIRINO, B. F. ; CALDAS, R.A. . Evolução da Biotecnologia. In: Betania Ferraz Quirino. (Org.). **Revolução dos Transgênicos**. 1a ed. Rio de Janeiro: Interciência, p. 01-18, 2008.

SCHERER, M., FISHER, R. Purification and characterization of laccase II of *Aspergillus nidulans*. **Arch. Microbiol.**, 170 : 78–84, 1998.

SCHLESINGER, S. Indústria brasileira: caminhos para a sustentabilidade e a democracia. **Mimeo**, 1-3, 2000.

SCHNEIDER, L., L. BELGER, J. BURGER e R. C. VOGT. Mercury bioaccumulation in four tissues of *Podocnemis erythrocephala* (Podocnemididae: Testudines) as a function of water parameters. **Sci Total Environ**, v.407, n.3, Jan 15, p.1048-54. 2009.

SCORER, C. A., BUCKHOLZ, R. G., CLARE, J. J., AND ROMANOS, M. A. The Intracellular Production and Secretion of HIV-1 Envelope Protein in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. **Gene** 136, 111-119, 1993

SHAH, M.P.; REDDY, G.V.; BANERJEE, R.; RAVINDRA BABU, P.; KOTHARI, I.L. Microbial degradation of banana waste under solid state bioprocessing using two

lignocellulolytic fungi (*Phylosticta* spp. MPS-001 and *Aspergillus* spp. MPS-002). **Process Biochemistry (NLD)**, 40, (1), p. 445-451, 2005.

SMÂNIA, A.D.M.F., SMÂNIA, E. F. A., GIL, M. L., BENCHETRIT, L. C., CRUZ, F. S. Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus*. **Fr. Murr. J. Ethnopharmacol.** 45:177-181, 1995.

SMITH, S.E. & READ, D.J. & HARLEY, J.L. **Mycorrhizal symbiosis**. 2^a ed., San Diego, Academic Press, 605 p.,1997.

SPADARO, J.T.; GOLD, M.H. e RENGANATHAN, V. Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *P. chrysosporium*. **Appl. Environ. Microbiol.** 58, 2397-2401. 1992.

SUNDARAN, U.M., ZHANG, H.H., HEDMAN, B., HODGSON, K.O.; SOLOMON, E.I. **Journal of American Chemistry Society**, 119, 12525, 1997.

TSCHOPP, J. F., BRUST, P. F., CREGG, J. M., STILLMAN, C., AND GINGERAS, T. R. Expression of the *lacZ* Gene from Two Methanol Regulated Promoters in *Pichia pastoris*. **Nucleic Acids Res.** 15: 3859-3876, 1987a.

TSCHOPP, J. F., SVERLOW, G., KOSSON, R., CRAIG, W., AND GRINNA, L. High Level Secretion of Glycosylated Invertase in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. **Bio/Technology** 5:1305-1308, 1987b.

ULLAH M A; KADHIM H; RASTALL R A; EVANS C S. Evaluation of solid substrates for enzyme production by *Coriolus versicolor*, for use in bioremediation of chlorophenols in aqueous effluents. **Applied microbiology and biotechnology.** 54(6):832-7. 2000.

ULRICH AND HOFRICHTER, 2007 R. Ulrich and M. Hofrichter, Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds, **Cell. Mol. Life Sci.** 64, pp. 271–293, 2007.

WAMMER, K. H., PETERS, C. A. Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation rates: A structure-based study. **Environ. Sci. Technol.**, 39, p. 2571–2578, 2005.

WELLS L, FRIDOVICH-KEIL JL. The yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, as a model system for the study of human genetic disease. **SAAS Bull Biochem Biotechnol.** 9:83-8, 1996.

WESENBERG., 2003 D. WESENBERG, I. KYRIAKIDES AND S.N. AGATHOS, White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents, **Biotechnol. Adv.** 22 pp. 161–187. 2003.

WIEDEMEIR, T. H. Approximation of biodegradation rate constants for monoaromatic hydrocarbons (BTEX) in ground water. **Ground Water Monitoring Remote and Remediations**, Dublin, p.186-194, 1996.

XU F, BERKA RM, WAHLEITHNER JA, NELSON BA, SHUSTER JR, BROWN SH, PALMER AE, SOLOMON EI Site-directed mutagenesis in fungal laccases: effect on redox potential, activity and pH profile. **J Biochem** 334:63–70,1998.

YAMANE, Y. I., FUJITA, J., SHIMIZU, R. I., HIYOSHI, A., FUKUDA. H., KIZAKL, Y., WAKABAYASHI, W., Production of Cellulose- and Xylan-Degrading Enzymes by a Koji Mold, *Aspergillus oryzae*, and Their Contribution to the Maceration of Rice Endosperm Cell Wall. **Journal of Bioscience and Bioengineeri**. 93 (1): 9-14, 2002.

YOUNG, J.C.; TABAK, H.H. - Multilevel protocol for assessing the fate and effect of toxic organic chemicals in anaerobic treatment processes- **Water Environmental Research**, v.65, n.1, p. 34-45, 1993.

ZILLE, A., TZANOV, T., GÜBITZ, G.M., CAVACO-PAULO, M., Immobilized laccase for decolourization of reactive black 5 dyeing effluent. **Biotechnol. Lett.** 25:1473–1477, 2003.