UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ARTES, CIÊNCIAS E HUMANIDADES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

SUELEN DE BARROS SAMPAIO

**Produção, purificação e caracterização da enzima lacase do fungo
*Cochliobolus sativus***

São Paulo
2019

SUELEN DE BARROS SAMPAIO

**Produção, purificação e caracterização da enzima lacase do fungo
*Cochliobolus sativus***

Dissertação apresentada à Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular.

Versão corrigida contendo as alterações solicitadas pela comissão julgadora em 12 de novembro de 2019. A versão original encontra-se em acervo reservado na Biblioteca da EACH/USP e na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD), de acordo com a Resolução CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011.

Área de Concentração:

Bioquímica e Biologia Molecular

Orientador:

Prof. Dr. Felipe Santiago Chambergo
Alcalde

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Universidade de São Paulo. Escola de Artes, Ciências e Humanidades. Biblioteca)

CRB-8 4936

Sampaio, Suelen de Barros

Produção, purificação e caracterização da enzima lacase do fungo *Cochliobolus sativus* / Suelen de Barros Sampaio ; orientador, Felipe Santiago Chambergo Alcalde - 2019
115 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo
Versão corrigida

1. Biologia molecular. 2. Fungos. 3. Lignina. 4. Cana-de-açúcar. 5. Enzimas oxirredutoras. 6. Bagaços. I. Chambergo Alcalde, Felipe Santiago, orient. II. Título

CDD 22.ed. – 572.8

Nome: SAMPAIO, Suelen de Barros

Título: Produção, purificação e caracterização da enzima lacase do fungo
Cochliobolus sativus

Dissertação apresentada à Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular.

Área de Concentração:

Bioquímica e Biologia Molecular

Aprovado em: 12/11/2019

Banca examinadora

Profa. Dra. Sirlene Maria da Costa

Universidade de São Paulo. Escola de Artes, Ciências e Humanidades

Prof. Dr. Roberto Kopke Salinas

Universidade de São Paulo. Instituto de Química

Profa. Dra. Marcia Zorello Laporta

Fundação Santo André. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras

*Dedico este trabalho aos meus maiores e mais importantes apoiadores, meus pais
Lourdes Aparecida e Rubens Roberto.*

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais Lourdes e Rubens, que sempre me incentivam e me guiam em todos os momentos da vida, além de todo apoio psicológico e financeiro. Ao meu irmão Robson, que com toda sua sabedoria e inteligência sabe que a solução para os desafios que enfrento sempre estará na busca pelo conhecimento. Ao meu namorado Jefferson, pelo suporte nessa fase tão importante da minha vida. À Aline e Alice meus amuletos da sorte. Gostaria de agradecer a todos os meus familiares, avós, tios e primos por todo apoio, por serem a minha fonte de renovação, exemplo e esperança.

A todos os amigos do meu âmbito pessoal por vibrarem junto comigo em cada conquista e por fazerem parte da minha vida, em especial Gabriela e Fagner, amigos que acompanham a minha trajetória pessoal e acadêmica.

Aos amigos da graduação meus companheiros de jornada, pelo incentivo, por nossos reencontros, pelo carinho e pela troca de experiências. A todos os colegas da pós-graduação do programa de Bioquímica e Biologia molecular e aos alunos que integram o laboratório de biotecnologia, que contribuíram de alguma forma, dentre eles, Fábio, Daniela, Aline, Rafaela, Luis Felipi, Victoria, Geison, Danielle, Nathalia, Jeniffer, Maria Luiza, Myrian, Gustavo e aos alunos de iniciação científica Ana, Flávio e Amanda, em especial as minhas amigas Bruna e Renata pela força e cumplicidade.

Ao meu orientador, professor Felipe Chambergo, pela oportunidade, por tantos ensinamentos, pela persistência durante todo o desenvolvimento do meu trabalho, pelo suporte nos momentos de maior dificuldade, pelo incentivo, paciência e generosidade. Serei eternamente grata.

Aos meus professores de graduação e da pós-graduação, Viviane Nunes, José Ribamar, Regina Affonso, Márcia Laporta, Carmen Beatriz Taípe, Cristina Valleta, Roseli Corazzini, Miguel Garay, Tânia Viel, Sirlene da Costa, Patrícia Helena Matai, Ana Paula Pietri, Roberto Sallai, dentre tantos outros que não citei neste

agradecimento, a admiração que tenho por vocês não muda, só o tempo que passa. Obrigada por tudo que me ensinaram, pelos conselhos e por me motivarem a seguir em frente.

A todos os funcionários da instituição, pelos serviços prestados e ao técnico de laboratório Clarino, por sua gentileza, disposição e auxílio.

Ao laboratório de Bioquímica e Biotecnologia que ofereceu todo o suporte necessário para as atividades de pesquisa desenvolvidas, tanto relacionadas ao projeto de estudo em questão, quanto para as atividades de rotina do laboratório.

À escola de Artes, Ciências e Humanidades e a Universidade de São Paulo, por me proporcionar esse espaço de aprendizado e experiências inesquecíveis.

À agência de fomento à pesquisa FAPESP, pelo suporte e apoio financeiro.

“São os que sabem pouco, e não os que sabem muito, que afirmam de uma forma tão categórica que este ou aquele problema nunca será resolvido pela ciência.”

(Charles Darwin)

RESUMO

SAMPAIO, Suelen de Barros. **Produção, purificação e caracterização da enzima lacase do fungo *Cochliobolus sativus***. 2019. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019. Versão corrigida.

O aumento na demanda mundial por etanol atrelado a preocupações ambientais relacionadas ao desbalanceamento de carbono na atmosfera em decorrência da utilização de combustíveis fósseis, impulsionou o interesse por combustíveis renováveis. O bagaço da cana-de-açúcar é constituído principalmente por lignina, hemicelulose e celulose, estes dois últimos podem ser decompostos e fermentados em etanol. Durante a hidrólise da biomassa lignocelulósica ocorre a ação sinérgica de um complexo enzimático para obter os açúcares solúveis fermentáveis, no qual recentes pesquisas têm demonstrado a importância das enzimas oxidoredutases na despolimerização da lignina. O objetivo desse estudo foi identificar o fungo filamentoso BBF210, avaliar sua utilização na produção de lacase em meio de cultura contendo bagaço de cana-de-açúcar, purificar e caracterizar a oxidoredutase deste fungo, além de expressar e purificar a enzima lacase recombinante. Por análise de taxonomia clássica e molecular o fungo filamentoso BBF210 foi identificado como produtor de enzimas oxidoredutases, pertencente à espécie *Cochliobolus sativus*. A análise computacional do genoma de *C. sativus*, permitiu a identificação do cDNA do gene com 1575 pb, que codifica a putativa enzima lacase de 524 aminoácidos e massa molecular estimada em 57,7 kDa. O gene foi sintetizado e clonado nos vetores (pET, pTrc e pFLAG), para expressão em *E. coli*. A enzima lacase recombinante foi expressa e purificada. O fungo *C. sativus* foi avaliado quanto à sua capacidade de produzir oxidoredutases em meio de cultura MSB (caldo de cultura com sais minerais) contendo 0,5% de bagaço de cana-de-açúcar e os resultados mostraram uma maior atividade da enzima lacase com o substrato ABTS, quando comparado às peroxidases. Após o 7º dia de cultivo a enzima foi precipitada com etanol a 50% e purificada em duas etapas por cromatografia de troca iônica (coluna Q-sepharose). A fração pura de lacase apresentou 3.264,32 U/L e 11,25 U/mg. Os resultados sugerem que a proteína nativa é uma isoenzima com massa molecular de aproximadamente 50 kDa, similar à proteína recombinante, como confirmado em análise por *western*

blot. A atividade de lacase nativa foi determinada com o substrato ABTS por zimograma e espectrofotometria, com as constantes catalíticas $K_m = 0,094$ mM e $V_{max} = 1,62$ mM s⁻¹. O pH e temperatura ótimos da enzima foram determinados como sendo 4,0 e 30°C, respectivamente, com estabilidade térmica a 30°C e temperatura ideal na faixa entre 10 e 50°C. Sendo a lacase uma oxidoredutase fundamental no processo de degradação da biomassa vegetal, o presente estudo fornece informações sobre a enzima expressa por *C. sativus* e descreve pela primeira vez a produção, purificação e caracterização da enzima nativa deste fungo. O conhecimento de suas características e propriedades bioquímicas podem ser importantes para investigações científicas mais aprofundadas em torno da identificação e caracterização da enzima e colaborar para a otimização de processos que utilizam oxidases em coquetéis enzimáticos, tanto para a produção de etanol utilizando a metodologia 2G quanto para outros processos biotecnológicos.

Palavra-chave: *Cochliobolus*. Oxidoredutases. Biomassa lignocelulósica.

Bagaço da cana-de-açúcar. Enzima. Fungo.

ABSTRACT

SAMPAIO, Suelen de Barros. **Production, purification and characterization of the laccase enzyme of the fungus *Cochliobolus sativus***. 2019. 115 p. Dissertation (Master of Science) - Postgraduate Program in Biochemistry and Molecular Biology. School of Arts, Sciences and Humanities, University of São Paulo, São Paulo, 2019. Corrected version.

The increase in global demand for ethanol is linked to concerns about carbon imbalance in the atmosphere due to the use of fossil fuels, driven by the interest in renewable energy sources. Sugar cane sugar consists mainly of lignin, hemicellulose and cellulose, the latter two of which can be broken down and fermented in ethanol. During the hydrolysis of lignocellulosic biomass there is a synergistic action of an enzymatic complex to obtain soluble fermentable sugars, in which recent research has demonstrated the importance of oxidoreductase enzymes in lignin depolymerization. The objective of this study was to identify the filamentous fungus BBF210, to evaluate its use in the production of laccase in a culture medium containing sugarcane bagasse, to purify and characterize the oxidoreductase of this fungus, as well as to express and purify the recombinant laccase enzyme. By classical and molecular taxonomy analysis the filamentous fungus BBF210 was identified as a producer of oxidoreductase enzymes belonging to the species *Cochliobolus sativus*. The computational analysis of the *C. sativus* genome allowed the identification of the gene cDNA with 1575 bp, that encodes the putative 524 amino acid laccase enzyme and estimated molecular weight of 57,7 kDa. The gene was synthesized and cloned into vectors (pET, pTrc and pFLAG) for expression in *E. coli*. A recombinant laccase enzyme was expressed and purified. The fungus *C. sativus* was evaluated for its ability to produce oxidoreductases in MSB (mineral salts broth) culture medium containing 0,5% sugarcane bagasse and the results showed a higher activity of laccase enzyme with ABTS substrate when compared to peroxidases. After the 7th day of cultivation the enzyme was precipitated with 50% ethanol and purified in two steps of ion exchange chromatography (Q-sepharose column). The pure laccase fraction presented 3,264.32 U/L and 11,25 U/mg. The results suggest that the native protein is a isoenzyme with about 50 kDa, similar to the recombinant protein, as confirmed by *western blot* analysis. Native laccase activity was determined with ABTS substrate by zymogram and spectrophotometry, with catalytic constants $K_m = 0.094 \text{ mM}$ and $V_{max} = 1.62 \text{ mM s}^{-1}$.

The optimal pH and temperature of the enzyme were determined as being 4.0 and 30°C, respectively, with thermal stability at 30°C and ideal temperature in the range between 10 and 50°C. Since laccase is a fundamental oxidoreductase in the degradation process of plant biomass, the present study provides information about enzyme expressed by *C. sativus* and whose production, purification and characterization of the native enzyme of this fungus is describes for the first time. Knowledge of their biochemical characteristics and properties may be important for further scientific investigations around the identification and characterization of enzymes and for the optimization of processes using enzymatic cocktail with oxidases, both for ethanol production using the 2G methodology and for other biotechnological processes.

Keywords: *Cochliobolus*. Oxidoreductases. Lignocellulosic Biomass.
Sugarcane bagasse. Enzyme. Fungi.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema da estrutura ramificada da lignina que compõe a parede secundária das plantas.....	24
Figura 2 -	Representação esquemática da estrutura e degradação enzimática da biomassa lignocelulósica.....	26
Figura 3 -	Ciclo catalítico de lacase.....	28
Figura 4 -	Ciclo catalítico de manganês peroxidase.....	29
Figura 5 -	Ciclo catalítico de lignina peroxidase.....	31
Figura 6 -	Aplicações biotecnológicas da enzima lacase.....	32
Figura 7 -	Patogenicidade em plantas por <i>Cochliobolus sativus</i>	36
Figura 8 -	Ensaio de atividade enzimática oxidoredutase do fungo BBF210.....	37
Figura 9 -	Características morfológicas do fungo <i>Cochliobolus sativus</i>	58
Figura 10 -	Oligonucleotídeos utilizados para fazer a identificação molecular do fungo BBF210.....	59
Figura 11 -	Árvore filogenética.....	61
Figura 12 -	Sequência de cDNA e aminoácidos da enzima lacase de <i>Cochliobolus sativus</i>	63
Figura 13 -	Alinhamento da sequência de aminoácidos de lacases de diferentes fungos.....	65
Figura 14 -	Esquema do plasmídeo de expressão CsLac/pET-303/NT-His.....	67
Figura 15 -	Análise por eletroforese em gel SDS-PAGE (12,5%) da expressão da proteína lacase (CsLac/pET-303/NT-His) clonada em <i>E.coli</i> BL21DE3 star.....	68
Figura 16 -	Purificação da proteína lacase recombinante (CsLac/pET-303/NT-His) por cromatografia de afinidade.....	68
Figura 17 -	Análise por eletroforese em gel SDS-PAGE (12,5%) da expressão e purificação da proteína lacase (CsLac/pET-303/NT-His) a partir de corpo de inclusão.....	69

Figura 18 -	Análise por eletroforese em gel SDS-PAGE (12,5%) da expressão de lacase em diferentes vetores e esquema do plasmídeo CsLac/pFLAG-CTS.....	70
Figura 19 -	Esquema do plasmídeo de expressão CsLac/pTrc-His.....	71
Figura 20 -	Análise por eletroforese em gel de agarose 1% do produto de PCR amplificado (gene CsLac de 1575 pb).....	71
Figura 21 -	Análise por eletroforese em gel de agarose 1% dos clones selecionados com o vetor CsLac/pTrc-HisA.....	72
Figura 22 -	Análise por eletroforese em gel SDS-PAGE (12,5%) da expressão da proteína lacase (CsLac/pTrc-HisA).....	72
Figura 23 -	Purificação da proteína lacase (CsLac/pTrc-HisA) por cromatografia de afinidade.....	73
Figura 24 -	Análise por eletroforese em gel SDS-PAGE (12,5%) das frações puras de lacase (CsLac/pTrc-HisA).....	74
Figura 25 -	Análise por eletroforese em gel SDS-PAGE (12,5%) da amostra liofilizada (L1 e L2) de lacase (CsLac/pTrc-HisA).....	74
Figura 26 -	Atividade das enzimas oxidoredutases produzidas por <i>Cochliobolus sativus</i>	77
Figura 27 -	Determinação da atividade enzimática de lacase em PAGE-nativo.....	79
Figura 28 -	Atividade da enzima lacase produzida por <i>Cochliobolus sativus</i>	80
Figura 29 -	Teste enzimático utilizando concentrações variadas do agente de precipitação etanol.....	81
Figura 30 -	Cromatograma apresentando o perfil de purificação da enzima nativa eluída em coluna Q-sepharose 10 mL.....	82
Figura 31 -	Atividade enzimática da lacase nativa purificada de <i>Cochliobolus sativus</i>	82
Figura 32 -	Análise por eletroforese em gel SDS-PAGE (12,5%) das frações puras de lacase nativa de <i>Cochliobolus sativus</i>	83

Figura 33 - Cromatograma apresentando o perfil de purificação da enzima nativa eluída em coluna Q-sepharose HR 1 mL.....	84
Figura 34 - Atividade enzimática da fração pura de lacase.....	84
Figura 35 - Análise por eletroforese em gel SDS-PAGE (12,5%) da fração pura de lacase nativa.....	85
Figura 36 - <i>Western Blot</i>	88
Figura 37 - Ensaio de atividade enzimática utilizando diferentes concentrações de lacase.....	88
Figura 38 - Efeito da concentração do substrato ABTS na velocidade inicial de reação da enzima lacase nativa.....	89
Figura 39 - Efeito do pH na reação da enzima lacase nativa.....	91
Figura 40 - Efeito da temperatura na reação da enzima lacase nativa.	92
Figura 41 - Estabilidade térmica na reação da enzima lacase nativa...	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Oligonucleotídeos utilizados no estudo.....	60
Tabela 2 –	Similaridade entre espécies do gênero <i>Cochliobolus/Bipolaris</i> sp.....	61
Tabela 3 –	Classificação taxonômica de <i>Cochliobolus sativus</i>	62
Tabela 4 –	Condições testadas para expressão e obtenção de atividade da proteína lacase recombinante.....	75
Tabela 5 –	Purificação de lacase extracelular de <i>Cochliobolus sativus</i> comparada a outros gêneros de fungos.....	86
Tabela 6 –	Dados comparativos dos parâmetros cinético-enzimáticos de enzimas lacase de diferentes organismos.....	90
Tabela 7 –	Dados comparativos de pH e temperatura ótimos de enzimas lacase de diferentes fungos.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1G	Etanol 1ª Geração
2G	Etanol 2ª Geração
Abs	Absorbância
ABTS	Sal de 2,2-azino-bis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico
AERP	ArcticExpress
APS	Persulfato de Amônio
BBF	Bioquímica, biotecnologia, fungo
cDNA	DNA complementar
CONAB	Companhia nacional de abastecimento
DMP	2,6-dimethoxyphenol
EC	Número de classificação enzimática
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
IPTG	Isopropyl β -D-1-tiogalactopiranoside
Lac	Lacase
LB	Caldo Lisogênico
LiP	Lignina peroxidase
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MnP	Manganês peroxidase
mRNA	RNA mensageiro
MCOs	Multicobre oxidases
MSB	Caldo de cultura com sais minerais
NRPS	Peptídeo sintetase não ribossomal
pB	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
BDA	Ágar Batata Dextrose
BDC	Caldo Batata Dextrose

PKS	Policetídeo sintetase
PMO	Polissacarídeo monooxigenases
rpm	Rotação por minuto
rRNA	RNA ribossomal
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SSP	Pequenas proteínas secretadas
TEMED	N, N, N', N' -Tetrametiletilenodiamina
TBS-T	Tris-HCl 10 mM; NaCl 0,15 M; Tween 20 0,1%, pH 7,6
U/L	Unidade por litro
U/mg	Unidade por miligrama
VC	Volume de coluna
XYL2	Xilanase 2

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
1.1	COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA E COMPLEXO MULTIENTENZIMÁTICO DE DEGRADAÇÃO.....	23
1.2	ENZIMAS OXIDORREDUTASES.....	27
1.3	LACASE E BIOTECNOLOGIA.....	31
1.4	LACASE E FUNGOS FILAMENTOSOS.....	33
1.5	FUNGOS DO GÊNERO <i>Cochliobolus</i>	35
2	OBJETIVOS.....	38
2.1	GERAL.....	38
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1	MATERIAIS.....	39
3.1.1	Equipamentos e acessórios principais.....	39
3.1.2	Meios de cultura.....	40
3.1.3	Soluções.....	40
3.1.4	Colunas cromatográficas.....	42
3.2	MÉTODOS.....	43
3.2.1	Cepas e condições de cultura.....	43
3.2.2	Manipulação de DNA e técnicas gerais de biologia molecular.....	44
3.2.3	Identificação taxonômica e molecular do fungo BBF210...	44
<u>3.2.3.1</u>	<u>Identificação morfológica.....</u>	<u>44</u>
<u>3.2.3.2</u>	<u>Identificação molecular.....</u>	<u>45</u>
3.2.4	Análise e identificação da enzima lacase de <i>Cochliobolus</i> <i>sativus</i>	46
3.2.5	Clonagem do cDNA codificador da proteína recombinante.....	46
3.2.6	Transformação da bactéria <i>E.coli</i>	46
3.2.7	Deteção dos clones positivos.....	47
3.2.8	Crescimento bacteriano e expressão da proteína recombinante.....	47

3.2.9	Extração da proteína recombinante.....	48
3.2.10	Método de obtenção da proteína recombinante em meio pobre em nutrientes.....	48
3.2.11	Método de obtenção da proteína recombinante localizada na região periplasmática.....	48
3.2.12	Método de solubilização e purificação da proteína recombinante a partir de corpo de inclusão.....	49
3.2.13	Purificação da proteína recombinante.....	50
3.2.14	Solubilização e reenovelamento da proteína recombinante.....	50
3.2.15	Purificação da proteína nativa.....	51
3.2.16	Análise da proteína recombinante por eletroforese em gel SDS-PAGE (12,5%).....	51
3.2.17	Análise de atividade das enzimas oxidoredutases.....	52
<u>3.2.17.1</u>	<u>Lacase.....</u>	<u>52</u>
<u>3.2.17.2</u>	<u>Lignina peroxidase.....</u>	<u>53</u>
<u>3.2.17.3</u>	<u>Manganês Peroxidase.....</u>	<u>53</u>
3.2.18	Deteção da proteína nativa.....	53
<u>3.2.18.1</u>	<u>Análise de atividade enzimática por zimograma.....</u>	<u>53</u>
<u>3.2.18.2</u>	<u>Western Blot.....</u>	<u>54</u>
3.2.19	Determinação da atividade enzimática.....	55
<u>3.2.19.1</u>	<u>Temperatura ótima e Estabilidade térmica.....</u>	<u>55</u>
<u>3.2.19.2</u>	<u>pH ótimo.....</u>	<u>56</u>
<u>3.2.19.3</u>	<u>Cinética enzimática.....</u>	<u>56</u>
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
4.1	IDENTIFICAÇÃO DO FUNGO BBF210 – <i>Cochliobolus sativus</i>	57
4.1.1	Identificação morfológica.....	57
4.1.2	Identificação molecular.....	59
4.2	ANÁLISE E IDENTIFICAÇÃO DA ENZIMA LACASE DE <i>Cochliobolus sativus</i>	62
4.3	ANÁLISE COMPARATIVA DA ENZIMA EM ESTUDO COM	

	AS ENZIMAS DE OUTROS ORGANISMOS.....	64
4.4	CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA ENZIMA LACASE RECOMBINANTE.....	67
4.5	PRODUÇÃO DAS ENZIMAS NATIVAS OXIDORREDUTASES DE <i>Cochliobolus sativus</i>	76
4.6	PURIFICAÇÃO DA ENZIMA LACASE DE <i>Cochliobolus sativus</i>	80
4.7	<i>Western Blot</i>	87
4.8	CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	88
4.9	pH ÓTIMO.....	91
4.10	TEMPERATURA ÓTIMA E ESTABILIDADE TÉRMICA.....	92
5	CONCLUSÃO.....	96
6	PERSPECTIVAS.....	97
	REFERÊNCIAS.....	98
	APÊNDICE A - Dados para cálculo de cinética enzimática da enzima lacase.....	111

1 INTRODUÇÃO

A busca por fontes alternativas para a produção de biocombustíveis vem aumentando devido à necessidade de preservar o meio ambiente e a crescente preocupação com a escassez de jazidas petrolíferas, esses fatores aumentam o interesse pela substituição de combustíveis fósseis (principal fonte energética mundial) por combustíveis renováveis, o que é revelado nas agendas políticas de muitos países. (Pereira et al., 2015).

Como o setor de transportes é responsável por uma fração significativa das emissões de gases de efeito estufa, a utilização de biocombustíveis, contribui expressivamente para a redução de emissões de gases danosos e impactos ambientais como o aquecimento global, além de proporcionar benefícios socioeconômicos. (Dias et al., 2012).

O aumento da demanda mundial por etanol atrelado aos problemas de lançamento de carbono na atmosfera, tornam o Brasil um país competitivo por ser o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, ofertando para o mercado um combustível ecologicamente correto, aliado às grandes áreas cultiváveis e condições de solo e clima favoráveis à produção da cana-de-açúcar (Conab, 2019), porém para ser uma alternativa viável, além de benefícios ambientais e proporcionar um ganho líquido de energia, um biocombustível deve ser economicamente viável e também deve ser produzido em grandes quantidades sem reduzir o suprimento de alimentos. (Manavalan et al., 2012).

A produção convencional de etanol (1G) utiliza um processo de fermentação para converter açúcares, como amido, sacarose, glicose e frutose, em etanol. Os biocombustíveis de segunda geração (2G) utilizam resíduos agrícolas como o bagaço da cana-de-açúcar como matéria-prima. O bagaço da cana-de-açúcar é constituído por lignina, hemicelulose e celulose. A celulose é um material estrutural importante para as plantas composto de muitas unidades repetidas de açúcar, que juntamente com a hemicelulose pode ser decomposta para finalmente ser fermentada em etanol. (Castro et al., 2018).

O bagaço da cana-de-açúcar também é utilizado pelas indústrias para gerar energia elétrica, auxiliando na redução dos custos e contribuindo para a sustentabilidade da atividade, assim como, para obter outros co-produtos

economicamente importantes como farneseno e polietileno (De Souza et al., 2012).

Estima-se que a produção de cana-de-açúcar para a safra 2019/20 seja de 615.978,9 mil toneladas e de etanol total 30,31 bilhões de litros. (Conab, 2019).

Globalmente, as plantas produzem um valor estimado de 200 bilhões de toneladas de biomassa por ano na forma de açúcares, polissacarídeos, óleos e outros biopolímeros, representando um importante recurso para produção de biocombustíveis (Hayes, 2009; Vega-Sánchez; Ronald, 2010, Zhang et al., 2019).

A utilização da biomassa lignocelulósica a partir de resíduos para produção de bioetanol é preferível à produção de etanol a partir de açúcar ou amido, por causa da concorrência limitada com a produção de alimentos, devido a poucas mudanças no uso da terra e redução do desmatamento (Dias et al., 2011).

Diversos processos para obtenção de bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica têm sido desenvolvidos, entre eles: co-fermentação (CF), sacarificação simultânea e fermentação (SSF), sacarificação simultânea e co-fermentação (SSCF) e bioprocesso consolidado (CBP). (Sánchez; Cardona, 2005; Cardona; Sánchez, 2007; Wyman, 2007). Porém, o custo das enzimas necessárias ao processo de utilização da biomassa lignocelulósica para a obtenção dos açúcares fermentáveis é muito alto, sendo responsável por cerca de 40% dos custos de produção do bioetanol 2G (Immanuel et al., 2007; Singhania; Sukumaran; Pandey, 2007).

Investimentos no desenvolvimento de etanol a partir de material celulósico foram feitos, algumas plantas em escala industrial foram construídas e de fato, até 2018, o processo de etanol celulósico ainda não havia se mostrado completamente e comercialmente viável, mas tem um grande potencial para converter matérias-primas de baixo valor para aumentar a produção de biocombustível. (Castro et al., 2018). Há um grande esforço da comunidade científica para o desenvolvimento de novos processos economicamente viáveis para o aproveitamento da biomassa lignocelulósica, para produção de etanol 2G. (Santos et al., 2012).

1.1 COMPOSIÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA E COMPLEXO MULTIENZIMÁTICO DE DEGRADAÇÃO

Diversos processos para obtenção de bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica têm sido desenvolvidos, para diminuir os custos de produção e aumentar a competitividade com o etanol (1G). Um dos motivos para o alto custo desse processo é a composição da parede celular da planta, em particular a parede celular secundária, sendo uma estrutura rígida, de proteção que confere estabilidade e resistência à degradação. A recalcitrância da lignina dificulta a degradação enzimática e é uma limitação no processo de hidrólise total da biomassa que restringe o acesso das enzimas hidrolíticas à macro e microestrutura de celulose. A lignina e hemicelulose são os componentes principais que limitam a penetração das enzimas nas paredes das células, uma vez que estes componentes envolvem as microfibrilas de celulose, impedindo o acesso de enzimas celulasas. (Siqueira et al., 2011; Da Silva et al., 2012; Zhao; Zhou; Liu, 2012; Gourlay et al., 2013; Bugg; Rahmanpour, 2015).

A lignina é o segundo polímero natural mais abundante na biosfera, desempenhando um papel fundamental no ciclo do carbono na terra. Formada pela polimerização dos álcoois cumarílico (hidroxifenil), coniferílico (guaiacil) e sinapílico (siringil), juntos formam um polímero heterogêneo, amorfo e altamente ramificado, contendo pelo menos 12 ligações interunidades diferentes ligando os núcleos aromáticos. (Gold et al. 1999), como mostrado na Figura 1. As proporções de cada álcool diferem para cada espécie de plantas, gramíneas contêm tipicamente todos os três monômeros, enquanto ligninas de árvores coníferas contêm principalmente álcool coniferílico, já árvores folhosas contêm álcool coniferílico e sinapílico.

Depositada na parede vegetal durante a diferenciação celular, a lignina é necessária não somente para rigidez da planta, mas também para a sua integridade, sua hidrofobicidade permite o transporte de água e outros nutrientes. A ligação mais comum, uma ligação β O-4 éter, normalmente representa 50% das ligações formadas, durante a reação de polimerização, outras ligações importantes incluem β -5, β 1, β - β , 5-5 e 4-O-5, dificultando a

degradação devido a formação de ligações radicais e carbono-carbono. (Upton; Kasko, 2015).

Figura 1 - Esquema da estrutura ramificada da lignina que compõe a parede secundária das plantas. Composto por álcool cumarílico (a), álcool coniferílico (b) e álcool sinapílico (c). Fonte: Adaptado de Upton e Kasko. (2015).

Estudos para determinar a degradação e a modificação do polímero de lignina têm identificado a participação de enzimas oxidoredutases como: lacases, peroxidases (lignina peroxidase, manganês peroxidase e versátil peroxidase) (Lee, 1997; Martínez et al., 2005; Sánchez, 2009; Saritha; Arora; Lata, 2012), e na degradação da celulose participam principalmente as enzimas: exoglucanases (EC 3.2.1.74), endoglucanases (EC 3.2.1.4), celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) e β -glicosidases (EC 3.2.1.21). (Rizk; Antranikian; Elleuche, 2012;

Gomez; Saadeddin, 2013), como mostrado na Figura 2. A reatividade da celulose é determinada pelos grupos funcionais de sua estrutura, pela interação físico-química entre os monômeros e pela ausência de H₂O na estrutura de microfibrila. (Santos et al., 2012).

Com base nessas pesquisas, foram estabelecidos dois sistemas de degradação da lignocelulose: (I) o sistema celulolítico, constituído por enzimas hidrolíticas que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas e (II) o sistema acessório, constituído por enzimas auxiliares como o sistema de enzimas oxidorreduções lignolíticas responsáveis pela despolimerização da lignina, que geram radicais livres altamente reativos e não específicos que clivam as ligações interunidades carbono-carbono e éter, e as enzimas polissacarídeo monooxigenases (PMO) que clivam ligações glicosídicas nas moléculas de celulose utilizando oxigênio molecular (Sun Y; Cheng J, 2002; Levasseur et al., 2013).

De Souza et al. (2012), concluíram que a eficiente degradação da lignocelulose poderia ser obtida utilizando o coquetel natural ou preparando um coquetel de enzimas que possa ser adicionado no processo de hidrólise. Por exemplo, o bagaço de cana-de-açúcar com uma composição química de 38% - 43% celulose, 25% - 32% hemicelulose e 17% - 24% lignina (De Souza et al., 2012; Delabona et al., 2013; Szczerbowski et al., 2014), precisaria para sua degradação um coquetel de enzimas constituído por: celulasas, β -glicosidases, endo-xilanases, arabinofuranosidases, feruloil-esterases, β -xilosidases, lichenases, xiloglucanases, endoglucanases, β -galactosidases, α -xilosidases, endopoligalacturonases, pectina metil esterase, arabinosidases, galactanases, arabinases, lacases, peroxidases e polissacarídeo monooxigenases PMO (Levasseur et al., 2013).

Figura 2 - Representação esquemática da estrutura e degradação enzimática da biomassa lignocelulósica composta pelos sistemas celulolítico e lignocelulolítico. Fonte: Adaptado de Santos et al. (2012).

Coquetéis de enzimas para utilização na degradação de biomassa vegetal são oferecidos por diversas empresas (Verenium, Dyadic International e Genecor nos Estados Unidos da América, Iogen Corporation no Canadá e Novozymes na Dinamarca), que realizam pesquisa e aplicam recursos para o desenvolvimento de coquetéis enzimáticos contendo novas e mais estáveis enzimas para redução significativa do custo de produção no processo catalítico de hidrólise da biomassa (Cardona et al., 2007).

A importância de lacases como aditivo no coquetel de enzimas no processo de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar (Brenelli et al., 2018) e no processo de valorização e exploração da molécula de lignina, tem sido demonstrada. (Hämäläinen et al., 2018).

1.2 ENZIMAS OXIDORREDUTASES

A molécula de lignina, componente da parede celular das plantas é o recurso natural mais abundante de polímeros aromáticos (p-hidroxifenilo, guaiacil e siringil), que pode ser despolimerizada para obter moléculas aromáticas de interesse (Pollegioni et al., 2015).

Os microrganismos que degradam lignocelulose têm desenvolvido um sistema complexo multienzimático que utiliza enzimas oxidorredutases para degradação de lignina e polissacarídeos (Eastwood et al., 2011). Manganês peroxidase, lignina peroxidase e lacase são assumidas como sendo a primeira linha de proteínas expressas em fungos durante a degradação da lignina (Janusz et al., 2012).

As enzimas oxidorredutases catalisam a transferência de elétrons desde uma molécula doadora de elétrons (redutor) a outra, aceptora de elétrons (oxidante). As oxidases são uma subclasse de enzimas oxidorredutases que catalisam as reações de oxido-redução, utilizando oxigênio molecular (O_2) como aceitor de elétrons em reações com participação de átomos de hidrogênio, onde o oxigênio é reduzido à água (H_2O) ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2). (May; Padgett, 1983).

Um exemplo da importância destas enzimas está na lacase, uma enzima multicobre oxidase (MCOs) que catalisa a redução de O_2 à H_2O com oxidação do substrato (Yoon; Solomon, 2007), faz parte de uma família de enzimas largamente distribuídas na natureza, incluindo ascorbato oxidases, bilirubina oxidases e ferroxidases (Ramos et al., 2011). Esse grupo catalisa a oxidação de uma variedade de substratos orgânicos e inorgânicos, incluindo mono-, di-, e polifenóis, aminofenóis, metoxifenóis e aminas aromáticas. (Madhavi; Lele, 2009; Mikolasch; Schauer, 2009). Lacases (E.C.1.10.3.2) são proteínas extracelulares, na sua maioria de aproximadamente 60 a 70 kDa com pI em torno de pH 4,0, secretadas com duas ligações dissulfeto e quatro átomos de cobre e uma extensão de glicosilação variando entre 10 e 25% com apenas alguns casos superiores a 30%, recurso esse que pode contribuir para a alta estabilidade desta enzima, que é particularmente abundante em fungos de podridão branca, que são os únicos organismos capazes de degradar todos os componentes da

madeira. A Figura 3 mostra o ciclo redox promovido pela enzima lacase. (Osma; Herrera; Couto, 2010).

Figura 3 - Representação esquemática de ciclos redox catalisados por lacase sobre substratos fenólicos (a) e na ausência (b) ou presença (c) de mediadores redox. Fonte: Adaptado de Osma; Herrera; Couto, 2010.

Manganês peroxidase (MnP) é uma heme-glicoproteína produzida por fungos basidiomicetos durante o metabolismo secundário e alguns fungos de podridão branca (Patrick et al., 2011). O mecanismo de ação de MnP inclui a oxidação de Mn^{2+} para Mn^{3+} , que é altamente reativo e, por sua vez, oxida uma ampla gama de substratos fenólicos incluindo fragmentos fenólicos da lignina (Figura 4). Além disso, possui a capacidade de oxidar estruturas não fenólicas com a aplicação de mediadores, incluindo radicais lipídicos. A capacidade de oxidar e despolimerizar a lignina natural e sintética e compostos recalcitrantes também foi relatada. (Falade et al., 2016)

O ciclo catalítico de Manganês peroxidase é iniciado pela ligação de H_2O_2 à enzima nativa que é levada a um estado de oxidação deficiente em dois elétrons resultando na formação do composto I (que pode ser convertido em composto II tanto na presença de Mn^{2+} quanto outros doadores de elétrons com potencial redox), em seguida a redução da enzima até a forma nativa ocorre

através de dois passos sucessivos, por meio da formação do intermediário composto II. O composto II requer Mn^{2+} para completar o ciclo catalítico e ser convertido na forma nativa da enzima. O Mn^{3+} é um mediador redox formado durante a catálise, estabilizado por ácidos orgânicos como oxalato produzidos pelo próprio fungo, que pode oxidar várias moléculas orgânicas de maneira inespecífica, levando à formação de radicais bastante reativos que podem acometer estruturas recalcitrantes com alto potencial de redução. Manganês peroxidase é sensível a altas concentrações de H_2O_2 , o que pode causar inativação reversível da enzima, formando o composto III, um estado inativo. (Hofrichter, 2002).

Desde a descoberta, o interesse na MnP tem aumentado devido a sua potencial aplicação em biorremediação, além de seu papel essencial na despolimerização da lignina e cloro-lignina, bem como no branqueamento da celulose. A MnP na presença de ácidos orgânicos é capaz de mineralizar a lignina e compostos modelo em grande quantidade (Hatakka, 2005).

Figura 4 - Representação esquemática do ciclo catalítico de manganês peroxidase. Fonte: Adaptado de Hofrichter. (2002).

Lignina peroxidase (LiP) é uma heme-glicoproteína e possui um papel central na biodegradação da parede celular composta por lignina, catalisa a oxidação de estruturas fenólicas e não fenólicas, além de uma vasta gama de compostos modelo, por exemplo, guaiacol, álcool vanilílico, catecol e ácido siríngico. (Dashtban, 2010).

São enzimas extracelulares produzidas durante o metabolismo secundário, provocado pela limitação de nutrientes (Tien; Kirk, 1987). Sua atividade é geralmente dependente de H_2O_2 e têm potencial redox muito alto e pH ótimo baixo. Essas características são importantes para a sua capacidade de oxidar uma variedade de substratos, incluindo substratos poliméricos tais como compostos corantes complexos. Seu ciclo enzimático é típico, característico de outras peroxidases. LiP, MnP e versátil peroxidase compartilham características semelhantes, o que é responsável, entre outros fatores pelo seu alto potencial redox. No entanto, eles diferem nos substratos que podem oxidar devido à presença de diferentes sítios catalíticos em suas estruturas moleculares (Ogola et al., 2015).

Com potencial redox, no ciclo catalítico a lignina peroxidase reage com H_2O_2 , onde o ferro III é oxidado a ferro IV, formando o composto I que é capaz de oxidar a lignina (Figura 5). O composto I então reage com o redutor álcool veratrílico (metabólico secundário dos fungos) para formar veratril aldeído e por meio da transferência de um elétron é formado o composto II, o álcool veratrílico é responsável pelo retorno para a forma nativa da enzima. Na ausência de álcool veratrílico, o composto II é formado em uma reação relativamente lenta que envolve oxidação de H_2O_2 pelo composto I. (Kirk, 1987).

Figura 5 - Representação esquemática do ciclo catalítico de lignina peroxidase. Fonte: Adaptado de Tien e Kirk. (1987).

1.3 LACASE E BIOTECNOLOGIA

Nas últimas décadas, com o avanço da Biotecnologia diversos processos de produção utilizados pela indústria podem ser substituídos por processos menos poluidores e com foco na preservação do meio ambiente. Assim, a utilização de biocatalisadores ou enzimas é um dos componentes importantes no desenho de bioprocessos mais econômicos e sustentáveis.

Dessa forma, estudos envolvendo a identificação, produção e caracterização de novas enzimas e/ou o aumento da eficiência de enzimas conhecidas são fundamentais para o desenvolvimento de novas tecnologias que tenham menor custo e gerem menos impacto ambiental. Nesse aspecto, as enzimas lacases, apresentam importantes propriedades para aplicação em diversos setores da atividade humana.

Para fins de uso em processos industriais e biotecnológicos, as lacases foram as primeiras oxidoredutases fúngicas estudadas, em processos para

remoção de polifenóis em vinho e bebidas, conversão de compostos tóxicos e corantes têxteis em águas residuais, e no branqueamento e remoção de lignina da madeira (Sakurai; Takaoka, 2007).

Devido à sua habilidade de catalisar reações produzindo apenas água como único subproduto, tem aumentado o interesse da indústria no uso de lacases como catalisadores de “reações verdes”, sendo a lacase aplicada em uma variedade de processos, como quebra de biomassa vegetal, branqueamento de corantes têxteis, biorremediação da água e do solo, formação de pigmentos, desenvolvimento de testes clínicos e aplicações nos campos de biosensores, biorreatores e células de biocombustíveis (Ramos et al., 2011). De fato, o uso potencial de lacases para fins industriais e biotecnológicos é uma área próspera para pesquisa e desenvolvimento (Beloqui et al., 2006; Kunamneni et al., 2008; Fokina et al., 2015; Mate; Alcalde, 2016; Kaczmarek et al., 2017), como mostrado na Figura 6.

Figura 6 – Aplicações biotecnológicas da enzima lacase em indústrias de alimento; têxtil; polpa e papel; síntese orgânica; nanotecnologia; biomedicina e biocombustíveis. Fonte: Adaptado de Mate e Alcalde. (2016).

O mercado global da enzima lacase apresenta um grande potencial de desenvolvimento devido à forte demanda em países asiáticos e da América Latina, mercado no qual o Brasil não participa. Pesquisa na base de dados do Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) com a palavra chave “Lacase” no título permitiu identificar 19 registros de patentes relacionados à identificação ou aplicação de enzima lacase. Pesquisa na base de dados USPTO (United States Patent and Trademark Office) com a palavra chave “Lacase” no título, permitiu identificar 52 registros de patentes, relacionados à identificação, melhoramento genético ou aplicação de enzima lacase. (05/07/2019).

Assim, a identificação e caracterização de enzimas lacases com novas e importantes características são relevantes para sua aplicação no desenvolvimento de bioprocessos de interesse em diversos setores da atividade econômica.

1.4 LACASE E FUNGOS FILAMENTOSOS

Sabe-se que um número notável de fungos possui função fisiológica de produzir a enzima lacase (EC 1.10.3.2) obtida pela primeira vez a partir da árvore japonesa *Rhus venicifera*, e que sua síntese está principalmente relacionada com o seu papel na decomposição da lignina. (Yaropolov et al., 1994).

Desde o ponto de vista biológico as lacases possuem importante papel na vida dos organismos (plantas superiores, fungos, insetos e bactérias), exemplo disso, está envolvido na formação de corpos de frutificação, formação de conídios, esporulação, síntese de melanina, dentre outros pigmentos nos fungos, e patogênese em plantas. Estudos recentes mostram que a lacase e os genes que as codificam, são bastante numerosos em fungos basidiomicetos, bem como em ascomicetos, tais como *Aspergillus niger* (Ramos et al., 2011), *Trichoderma* spp (Cázares-García; Vázquez-Garcidueñas; Vázquez-Marrufo, 2013) e *Fusarium oxysporum* (Kwiatos; Ryngajłło; Bielecki, 2015), que são capazes de decompor e converter a lignocelulose vegetal, embora já tenha sido relatado que degradadores de lignina eficientes, como *P. chrysosporium* não produzem lacases (Floudas et al., 2012). Há também estudos que reconhecem vários

genes de lacase nos basidiomicetos não degradantes de lignina como, por exemplo, *Coprinopsis cinerea* e *Laccaria bicolor*, com funções e perfis de expressão desconhecidos (Lundell; Mäkelä; Hildén, 2010).

A enzima lacase, além de participar no processo de degradação da lignina, pigmentação em fungos e patogenicidade em plantas, exerce função na degradação de diferentes compostos aromáticos e xenobióticos. Devido a essas funções e à não especificidade pelo substrato, essa enzima tem um grande potencial em biotecnologia e pode ser utilizada como biocatalisador em muitos processos industriais, como processamentos enzimáticos da polpa de papel, branqueamento de corantes têxteis, remoção de compostos fenólicos e desintoxicação de efluentes (Nyanhongo et al., 2002).

Fungos produzem uma grande quantidade de enzimas que degradam lignocelulose e apresentam grande potencial de aplicação em biotecnologia branca ou verde. Assim, fungos coletados em diversos locais no Brasil têm sido estudados e caracterizados para determinar sua habilidade na degradação da lignocelulose. Fungos filamentosos identificados no Brasil (por exemplo: *Trichoderma viridae*, *T. reesei*, *Fusarium oxysporium*, *Piptoporus betulinus*, *Penicillium echinulatum*, *P. purpurogenum*, *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *Sporotrichum thermophile*, *Scytalidium thermophilum*, *Clostridium straminisolvens*, *Thermonospora curvata*, etc.) são reconhecidos por sua capacidade de produzir e secretar uma mistura de enzimas para degradação de biomassa (Valencia; Chamberg, 2013). Entretanto, esses microrganismos podem ser mais, ou menos, eficientes na secreção de alguma enzima, limitando a eficiência do processo de hidrólise da biomassa como um todo (Kumar et al., 2008). Além disso, os fungos de podridão branca costumam produzir mais de uma isoforma de lacase, Vázquez et al. (2019) relataram que o número de isoenzimas depende do microrganismo e diferem especificamente em termos de estabilidade, condições ideais de reação e afinidade para os diferentes substratos e por esse motivo, na mesma fermentação, podem ser encontrados vários tipos de isoenzimas produzidas pelo mesmo fungo, variantes de um gene devido a alterações pós-transcricionais ou outras modificações.

1.5 FUNGOS DO GÊNERO *Cochliobolus*

Fungos ascomicetos do gênero *Cochliobolus* (anamorfo *Bipolaris/Curvularia*), compreendem espécies patogênicas necrotróficas (*Cochliobolus heterostrophus*, *C. carbonum* e *C. victoriae*) e hemibiotróficas (*C. sativus*), altamente agressivas e específicas à sua planta hospedeira, causando um prejuízo anual estimado em US\$ 10 bilhões de dólares ao nível mundial (Bengyella, 2017).

A fase biotrófica de *C. sativus* é caracterizada pelo parasitismo onde há o desenvolvimento de hifas dentro da célula epidérmica da planta hospedeira para retirada de nutrientes, enquanto a fase necrotrófica ocorre com a penetração das hifas do fungo na camada do mesofilo da planta, causando a morte celular. (Zhong et al., 2015).

O fungo *Cochliobolus sativus* (S. Ito & Kurib) é o teleomorfo (estágio sexual) de *Bipolaris sorokiniana* (anamorfo) que é o agente causal de uma ampla variedade de doenças de cereais. (Fetch; Steffenson, 1999; Zhong; Stefferson, 2001; Joshi et al., 2007; Troth; Johnston; Dyer, 2018; Jamil, et al., 2018; Guo et al., 2019).

O patógeno pode infectar e causar doenças na raiz (onde é conhecido como podridão comum da raiz), folhas e caule (mancha marrom) como mostrado na Figura 7, afetando principalmente as culturas de trigo e cevada, causando prejuízos significativos, sobretudo em primaveras quentes e úmidas (Karov; Mitrev; Arsov, 2009).

Devido à diversidade de sintomas causados na degradação da parede celular das plantas, se considera que este fungo deve apresentar um conjunto de enzimas adequado para a degradação de lignocelulose. (Condon et al., 2013).

Figura 7 - Fotografia de sintomas causados na folha de *Brachypodium distachyon* infectada por *C. sativus*, onde os sintomas da doença foram examinados por sete dias após a inoculação do fungo no hospedeiro. Setas vermelhas indicam o local da infecção. (A) dois dias; (B) três dias; (C) cinco dias (D) sete dias; (E) apresenta as lesões conhecidas como mancha marrom, característico de infecção por *C. sativus*. Fonte: Adaptado de Zhong et al. (2015).

O genoma de cinco cepas de *C. heterostrophus*, duas de *C. sativus* e o de *C. victoriae*, *C. carbonum* e *C. miyabeanus*, foram sequenciados e identificados genes do metabolismo secundário, pequenas proteínas secretadas (SSP), peptídeo sintetase não ribossomal (NRPS) e policetídeo sintetase (PKS). *C. sativus* além de infectar a cevada e o trigo, ataca outras culturas de cereais e gramíneas (Condon et al., 2013), assim devido à sua importância na agricultura seu genoma foi sequenciado pelo *Joint Genome Institute* (Condon et al., 2013), apresentando genes putativos para as enzimas oxidoredutases, 15 para lacase, 15 para manganês peroxidase e 4 para lignina peroxidase. Até a presente data foi identificado e caracterizado o gene da xilanase (XYL2) (Emami; Hack, 2001), assim como, a atividade das enzimas xilanases (Bakri; Jawhar; Arabi, 2008).

Diversos trabalhos apresentam estudos sobre a infecção, patogenicidade, hospedeiros e resistência de plantas as espécies deste gênero (Bengyella et al., 2017). Considerando a demanda mundial por enzimas com aplicação biotecnológica, Bengyella e colaboradores (2019) mostram o potencial de algumas espécies do gênero *Cochliobolus* na produção de enzimas industriais e medicamentos, como a produção de nanopartículas verdes, biofertilizante, biorremediação, biodiesel, biofloculante, biossorvente e micoherbicida, que são

promissores para a bioeconomia.

Na execução do projeto FAPESP 2014/24107-1 “Estudo e Caracterização de enzimas oxidases produzidas por fungos filamentosos” foi identificado na biblioteca de fungos do laboratório de Bioquímica e Biotecnologia da Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo, o fungo BBF210 como produtor de enzimas oxidorreduções, principalmente a lacase quando crescido em meio contendo bagaço de cana-de-açúcar. A Figura 8 mostra o resultado do ensaio em meio mínimo sólido contendo 1% de bagaço da cana-de-açúcar (ABTS, DMP e Guaiacol). Culturas foram crescidas a 30°C por sete dias e cobertas com solução de cada reagente por 15 a 30 minutos. ABTS: 2,2-azino-bis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico; DMP: 2,6-dimethoxyphenol e no meio de cultura foi adicionado 2 mM de guaiacol. A aparição de cor no meio de cultura indica reação positiva de oxidação do reagente utilizado.

Figura 8 - Ensaio de atividade enzimática oxidorredução do fungo BBF210. Fonte: Adaptado do projeto FAPESP 2014/24107-1 (2016).

No presente estudo são descritas as etapas de identificação do fungo BBF210, pertencente a espécie *Cochliobolus sativus*, bem como a expressão e purificação da enzima lacase recombinante e nativa. Foram feitos ensaios de atividade enzimática e caracterização da lacase nativa deste fungo, sendo sua produção, purificação e caracterização descritas pela primeira vez.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Produzir, purificar e caracterizar a enzima lacase do fungo *Cochliobolus sativus*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificação taxonômica e molecular do fungo BBF210 - *Cochliobolus sativus*;
- Clonar, expressar e purificar a putativa enzima lacase recombinante do fungo *C. sativus*, no hospedeiro *E. coli*;
- Induzir a produção da proteína lacase nativa do fungo *C. sativus*;
- Purificar e determinar os parâmetros cinético-enzimáticos da enzima lacase nativa do fungo *C. sativus*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Equipamentos e acessórios principais

- Autoclave Vertical Phoenix modelo AV (Phoenix e Luferco, BRA);
- Balança Analítica M214Ai (Bel Engineering, ITA);
- Centrífuga ALLEGRA X-15R (Beckman Coulter, USA);
- Electroporador 2510 (Eppendorf, USA);
- Fluxo laminar (Labconco, USA);
- Fluxo laminar 1300 Série B2 (Thermo scientific, USA);
- Leitor de microplaca TECAN Infinite M200pro (Life Sciences, USA);
- Liofilizador (Vertis, Sp Scientific, USA);
- Sistema de eletroforese vertical, Mini-Protean (BIO-RAD, EUA);
- Sistema de purificação AKTA FPLC System (GE Healthcare, USA);
- Sonicador Sonics (Vibra cell, USA);
- Speed Vacuum Concentrator plus/Vacufuge (Eppendorf, USA);
- Termociclador PCR Veriti 96-Well Thermal Cycler (Biosystems, USA);
- Thermomixer comfort (Eppendorf, USA);
- Estufa bacteriológica 37°C (Sanyo, JAP);
- Incubadora 30°C model 1535 (Cvwr scientific, EUA);
- Incubadora refrigerada com agitação MaxQ 4000 (Thermo scientific, USA);
- Incubadora com agitação Forma orbital shaker (Thermo scientific, USA);
- Freezer - 80°C Forma 700 Series (Thermo Scientific, EUA);

3.1.2 Meios de cultura

- LB-líquido: 10 g de triptona; 10 g de cloreto de sódio; 7,5 g de extrato de levedura, para 1 litro de H₂O destilada.
- LB-ágar: 10 g de triptona; 10 g de cloreto de sódio; 7,5 g de extrato de levedura; 20 g de ágar bacteriológico, para 1 litro de H₂O destilada.
- Caldo de cultura com sais minerais, MSB: 2 g de fosfato monopotássico; 0,5 g de sulfato de magnésio; 100 µl de cloreto de cálcio 1 M; 0,3 g de ureia; 2,10 g de sulfato de amônio e suplementado com 1 mL de solução de metais 1000x concentrado, composto por 4,1 g de sulfato de ferro; 0,23 g de sulfato de cobalto; 1,05 g de sulfato de manganês; 0,1 g de sulfato de cobre; 0,23 g de ácido bórico e 23 g de sulfato de zinco para 50 mL de H₂O destilada.
- Meio mínimo-M9, MM9: composto por 20 mL de sais 5x concentrados (4,26 g de fosfato de sódio bibásico; 1,5 g de fosfato monopotássico; 0,25 g de cloreto de sódio); suplementado com 2 mL de glicose 20%; 0,2 mL de sulfato de magnésio; 10 µl de cloreto de cálcio e 100 µl de tiamina para 100 mL de H₂O destilada.
- Ágar Batata Dextrose, BDA: 4 g infusão de batata; 20 g glicose; 15 g Ágar-ágar, para 1 litro de H₂O destilada, pH 5,6.
- Caldo Batata Dextrose Broth, BDC: 4 g infusão de batata; 20 g de glicose, para 1 litro de H₂O destilada, pH 5,1).

3.1.3 Soluções

- Solução de metais 1000x concentrado: 8,22 g de sulfato de ferro; 0,46 g de sulfato de cobalto; 2 g de sulfato de manganês; 0,34 g de sulfato de cobre; 0,46 g de ácido bórico; 0,46 g de sulfato de zinco para 100 mL de H₂O destilada.
- Tampão para obtenção da proteína recombinante a partir do periplasma: Tris-HCl 30 mM; sacarose 20%; EDTA 1 mM, pH 8,0.
- Tampão A (equilíbrio/lavagem) para cromatografia de afinidade: Tris-HCl 20 mM; NaCl 0,5 M, pH 8,0.
- Tampão B (eluição) para cromatografia de afinidade: Tris-HCl 20 mM; NaCl 0,5 M; Imidazol 0,5 M, pH 8,0.

- Tampão A (solubilização/ligação) para cromatografia de afinidade a partir de corpo de inclusão: Ureia 8 M; Tris-HCl 20 mM; NaCl 0,5 M, pH 8,0.
- Tampão B (lavagem) para cromatografia de afinidade a partir de corpo de inclusão: Tris-Cl 20 mM; NaCl 0,5 mM; pH 8,0.
- Tampão C (eluição) para cromatografia de afinidade a partir de corpo de inclusão: Tris-Cl 20 mM; NaCl 0,5 M; Imidazol 0,5 M, pH 8,0
- Tampão de desnaturação: Tris-HCl 20 mM; NaCl 0,5 M; Imidazol 0,5 M, pH 8,0 da fração pura + ureia 8 M; β -mercaptoetanol 4 mM.
- Tampão de renaturação/reenovelamento (diálise): Fosfato de sódio 50 mM; sulfato de zinco 4 mM, pH 7,0.
- Tampão A (equilíbrio/lavagem) para cromatografia de troca iônica: Tris-HCl 20 mM, pH 8,0.
- Tampão B (eluição) para cromatografia de troca iônica: Tris-HCl 20 mM; NaCl 1 M, pH 8,0.
- Tampão de amostra proteica SDS-PAGE: 1 g de SDS; 0,05 g de azul de bromofenol; 16,5 mL de glicerol 30%; 5% de β -mercaptoetanol, na concentração final de Tris-HCl 50 mM, pH 6,8.
- Tampão de amostra proteica não desnaturante: 0,05 g de azul de bromofenol; 16,5 mL de glicerol 30% na concentração final de Tris-HCl 50 mM, pH 6,8.
- Tampão de corrida eletroforética SDS-PAGE: 1 g de SDS; 3,02 g de Tris; 14,4 g de glicina para 1 L de H₂O destilada.
- Tampão de corrida eletroforética PAGE-nativo: 3,02 g de Tris; 14,4 g de glicina para 1 L de H₂O destilada.
- Solução Comassie Blue: 50 mL de metanol; 10 mL de ácido acético; 40 mL de H₂O destilada; 0,2 g de comassie brilliant blue.
- Gel de separação SDS-PAGE 12,5%: 5 mL de Bis/acrilamida; 3 mL de tampão de separação, completa para 20 mL de H₂O destilada, com adição de 50 μ L de APS e 25 μ L de TEMED.
- Gel de empilhamento SDS-PAGE 4%: 800 μ L de Bis/acrilamida; 1 mL de tampão de empilhamento, completa para 4 mL de H₂O destilada, com adição de 25 μ L de APS e 12,5 μ L de TEMED.
- Gel de separação não desnaturante (PAGE-nativo) 12%: 4,16 mL de

tampão de separação; 2,03 mL de glicerol 44%; 8,3 mL de Bis/acrilamida; 0,75 µl de APS e 0,37 µl de TEMED, acrescentando H₂O para 20 mL.

- Gel de empilhamento não desnaturante (PAGE-nativo) 5%: 1,25 mL de tampão de empilhamento; 0,75 mL de Glicerol 44%; 0,8 mL de Bis/acrilamida; 37,5 µl de APS; 18,75 µl de TEMED, acrescentando H₂O para 5 mL.
- Tampão de separação: 3 g de Tris-HCL (0,5 M); 0,2 g de SDS acrescentando H₂O destilada para 20 mL, pH 8,8.
- Tampão de empilhamento: 3 g de Tris-HCL (0,5 M); 0,2 g de SDS acrescentando H₂O destilada para 20 mL, pH 6,8.
- Solução Bis/acrilamida: 29 g de acrilamida; 1 g de N,N'-Methylenebis(acrylamide) para 100 mL de H₂O destilada.
- APS: 20 g de persulfato de amônio para 100 mL de H₂O destilada.
- Solução descorante: 50 mL de ácido acético glacial; 75 mL de metanol para 875 mL de H₂O destilada.
- Gel de agarose 1%: 35 mL de TAE 1X; 0,35 g de agarose, com adição do corante Cyber-Safe (Invitrogen).
- TAE 1x: 0.04M de Tris-acetato e 0.001M de EDTA.
- TAE 50x: 242 g de Tris, 51,7 mL de ácido acético glacial e 100 mL de EDTA 0.5M (pH 8.0) para 1 L de H₂O destilada.
- Tampão de lavagem (Blot) TBS-T: Tris-HCl 10 mM; NaCl 0,15 M e TWEEN 20 0,1%, pH 7,2.

3.1.4 Colunas cromatográficas

- His-Trap Chelating de 5 mL (GE Healthcare, USA);
- Q-sepharose 10 mL (GE Healthcare, USA);
- Q-sepharose HR 1 mL (GE Healthcare, USA).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Cepas e condições de cultura

A cepa do fungo BBF210 - *Cochliobolus sativus* é mantida em meio BDA (ágar batata dextrose, BDA). O fragmento de 1cm³ da colônia foi inserido em 250 mL de BDC (caldo batata dextrose) a 30°C agitando a 150 rpm por três dias. Após a centrifugação e filtração da massa micelial, o fungo foi inoculado em 500 mL de meio caldo de sais minerais MSB (caldo de cultura com sais minerais). Foi adicionado ao meio de cultura 0,5% (5 g/L) de bagaço de cana-de-açúcar não processado e estéril, previamente triturado, cedido pelo Prof. Dr. Luis Basso da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo. A indução foi realizada no 3º dia de cultivo com 0,5 mL de sulfato de cobre (0,5 mM). (Arora, 2000). A incubação ocorreu a 30°C, 150 rpm até o 7º dia após a indução, com a retirada diária de uma alíquota do meio de cultura para a realização dos ensaios enzimáticos, em seguida a cultura foi coletada, centrifugada a 5.000rpm/10min/4°C e filtrada utilizando papel filtro (0,45 µm - Cellulose Nitrate Membrane Filters – Whatman), para obtenção do sobrenadante contendo as proteínas nativas, o qual foi conservado a 13°C.

Para os experimentos de transformação por eletroporação e amplificação dos plasmídeos foi utilizada a cepa *E. coli* BL21 (GE, USA), para produção da proteína recombinante foram utilizadas as cepas *E. coli* BL21(DE3) star (Invitrogen, USA) e BL21 (GE, USA), crescidas em meio sólido LB-ágar ou LB-líquido em agitação a 150 rpm, 37°C. Quando necessário ao meio de cultura foi adicionado o antibiótico de seleção ampicilina 150 µg/mL (Sigma-aldrich, USA). A cepa *E. coli* BL21 ArcticExpress (DE3) (AERP) (Agilent Technologies, USA), que expressa constitutivamente as chaperonas Cpn10 e Cpn60 de *Oleispira antarctica*¹, foi utilizada para produção da proteína recombinante nas mesmas condições de cultura, porém, com variação de temperatura de incubação a 13°C.

¹ Bactéria psicrófila que expressa as chaperonas Cpn10 e Cpn60 adaptadas ao frio.

3.2.2 Manipulação de DNA e técnicas gerais de biologia molecular

Preparação e transformação de bactérias competentes, géis de proteínas, DNA e outras técnicas empregadas em biologia molecular foram feitas segundo descrito por Sambrook, Fritsch e Maniatis (1989), ou de acordo com os protocolos fornecidos pelos fabricantes dos produtos utilizados.

Para amplificações de DNA foi utilizado o kit pfx DNA polimerase (Life technologies, USA), seguindo as instruções do fornecedor, adaptando temperaturas e ciclos de acordo com a temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores. Reações de ligação foram realizadas utilizando o kit T4 DNA ligase (Promega, USA), seguindo as instruções do fornecedor.

3.2.3 Identificação taxonômica e molecular do fungo BBF210

3.2.3.1 Identificação morfológica

A identificação é baseada na análise comparativa de características diferenciais da morfologia, além da análise da fisiologia e metabolismo bioquímico da linhagem teste que foram comparados aos dados das espécies de referência descritas na literatura utilizando chaves taxonômicas, através de caracteres como textura, cor, conídios, patogenicidade por meio de Pitt e Hocking (2009).

A identificação morfológica (macroscópica) foi realizada pela técnica de colônia gigante, inoculando o fungo no centro de placas de Petri contendo meio de cultura sólido (BDA) e para o crescimento foi mantido em estufa a 27°C. Após o crescimento do fungo foram observadas as características de cor, tamanho e textura das colônias. A identificação microscópica dos fungos foi realizada pela técnica de microcultivo em lâmina proposta por Riddell (1950), descritas a seguir para a observação das hifas por microscopia. No interior da placa de Petri forrada com papel de filtro, foi disposta uma lâmina de vidro sobre um bastão de vidro em “U”. Este conjunto foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. Um fragmento de 1cm³ do meio BDA foi depositado sobre a lâmina. Com auxílio de alça de níquel cromo em “L”, o fungo foi semeado em torno do meio de cultura e o papel de filtro umedecido com H₂O destilada estéril, visando auxiliar no desenvolvimento fúngico e na fixação dos órgãos vegetativos e reprodutivos do

fungo. As estruturas morfológicas microscópicas dos fungos foram então identificadas de acordo com os compêndios de Pitt e Hocking (2009) e Morejon et al. (2006).

3.2.3.2 Identificação molecular

O fungo cultivado em BDC por três dias, para obtenção da massa micelial, foi coletado por centrifugação e utilizado na extração de DNA, utilizando o KIT comercial ZR Fungal/Bacterial DNA miniprep (ZymoResearch), seguindo as informações fornecidas pelo fabricante. Após a extração do DNA, o material foi estocado a temperatura de -20°C.

A amplificação do DNA ribossomal (rDNA) alvo, através da Reação em Cadeia da Polimerase, foi realizada utilizando de oligonucleotídeos de sequências conservadas de rDNA. A região espaçadora interna transcrita (ITS Internal transcribed spacer, 1706 pb) e a subunidade maior de RNA (LSU, Large subunit RNA 25-28S, 938 pb), foram amplificados por PCR utilizando os oligonucleotídeos, SR6R, ITS1 e ITS5 da região ITS; LR1, LROR-F e LR5-R da região LSU do rDNA (Vilgalys lab, Duke University), para a identificação molecular do fungo.

Após corrida eletroforética em gel de agarose 1%, o produto foi purificado através do EasyPure PCR Purification Kit (TransGen Biotech), seguindo as informações do fabricante, em seguida foi quantificado, alíquotado e acrescido dos respectivos oligonucleotídeos para sequenciamento, este último realizado na plataforma ABI 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies) ou na Central analítica do Instituto de Química/USP.

A sequência consenso foi gerada pelo programa BioEdit a partir das sequências obtidas pelos oligonucleotídeos supracitados. A classificação taxonômica das amostras se baseou na comparação entre a sequência consenso e as sequências depositadas no GenBank via MEGABLAST. A sequência única ou consenso foi alinhada com as similares disponíveis no banco de dados e foi construída uma árvore de distância filogenética com auxílio do mesmo, para comparação de similaridade e filogenia das sequências obtidas contra sequências de outras espécies do gênero *Cochliobolus/Bipolaris*.

3.2.4 Análise e identificação da enzima lacase de *Cochliobolus sativus*

A análise do genoma do fungo *Cochliobolus sativus* ND90Pr v1.0 (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/Cocsa1/Cocsa1.home.html>) feito pelo *Joint Genome Institute*, permitiu identificar o gene ID 121436, a qual foi denominada no trabalho como CsLac, anotada como putativa enzima lacase. A sequência de aminoácidos da proteína lacase foi comparada a outras sequências já caracterizadas e depositadas em bancos de dados. Quanto a análise múltipla das sequências de aminoácidos, foi realizada com o programa Clustalx e visualizada no programa GeneDoc.

3.2.5 Clonagem do cDNA codificador da proteína recombinante

A sequência de cDNA que codifica a putativa enzima lacase, foi utilizada para sintetizar o gene pela empresa Thermo Scientific (USA). O gene foi sintetizado e clonado no vetor de expressão pET-303/NT-His, sob controle do promotor T7.

O gene CsLac foi amplificado por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando oligonucleotídeos específicos para clonagem nos vetores de expressão pTrc-HisA (Invitrogen, USA) e pFLAG-CTA (Sigma, USA) sob controle dos promotores Trc e Tac respectivamente. Os vetores pET e pTrc possuem uma cauda de 6 histidinas no extremo N-terminal e o plasmídeo pFLAG contém a sequência sinal OmpA para a localização da proteína recombinante no espaço periplásmico da bactéria.

3.2.6 Transformação da bactéria *E.coli*

As cepas foram transformadas com os plasmídeos de interesse, *E.coli* BL21 (DE3) star (Introigen); *E.coli* BL21 DE3 e *E.coli* BL21 AERP com o plasmídeo CsLac/pET-303/NT-His de 7258 pb e a cepa *E.coli* BL21 (GE) para transformação com o plasmídeo CsLac/pTrc-HisA de 6001 pb e com o plasmídeo CsLac/pFLAG-CTS de 6975 pb, seguindo o protocolo de eletroporação. A bactéria competente foi estocada a -80C° e o DNA plasmidial foi inserido no gelo até degelar a solução de bactéria, que foi misturada com 1 µL do DNA plasmidial

e o volume total transferido para uma cubeta de eletroporação estéril para a transformação, utilizando o equipamento electroporador 2510 (eppendorf, USA) a 2500 V. Em seguida incubou-se em meio LB, a 37°C por 1 hora agitando em 150 rpm e após esse período foi inoculado em meio de cultura sólido (LB-ágar/ampicilina 150 µg/mL), mantido por 18 horas a 37°C em estufa para a seleção das colônias. (Sambrook; Fritsch; Maniatis, 1989).

3.2.7 Detecção dos clones positivos

Colônias com resistência a ampicilina foram avaliadas por reação de PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos, para analisar se o inserto (cDNA-CsLac) estava presente na bactéria. Colônias positivas na reação de PCR foram selecionadas e crescidas individualmente em meio de cultura líquido (LB/ampicilina 150 µg/mL). (Sambrook; Fritsch; Maniatis, 1989).

3.2.8 Crescimento bacteriano e expressão da proteína recombinante

Para a produção da proteína recombinante, foram utilizadas as cepas *E. coli* BL21 (DE3) star (Invitrogen, USA), *E. coli* BL21 AERP (DE3) (Agilent Technologies, USA) e BL21 (GE, USA). As colônias isoladas contendo os plasmídeos de interesse, foram crescidas em meio sólido LB-ágar em estufa a 37°C por 16 horas, após esse período foram adicionadas individualmente em 5 mL de meio LB-líquido com antibiótico ampicilina, sob agitação em 150 rpm por 16 horas a 37°C. Posteriormente, uma alíquota desta cultura foi inserida em 100 mL de meio LB-líquido mantido na mesma condição de agitação e temperatura anterior, seguido de 4 horas de crescimento bacteriano. Ao atingir a absorbância de $OD_{600} \approx 0,8$, onde foi adicionado o reagente IPTG (isopropyl β -D-1-tiogalactopiranoside) em uma concentração final de 0,5 mM para promover a expressão da proteína de interesse de 4 a 16 horas. (Sambrook; Fritsch; Maniatis, 1989). Quando necessário foi adicionada solução de metais 1000x concentrado. Para a produção da proteína recombinante utilizando a cepa *E. coli* BL21 AERP (DE3) (Agilent Technologies, USA), as colônias foram crescidas em meio LB-líquido em agitação a 13°C por 16 horas.

3.2.9 Extração da proteína recombinante

A massa bacteriana contendo o plasmídeo CsLac/pET-303/NT-His ou o plasmídeo CsLac/pTrc-HisA, foi então coletada através da centrifugação 5000rpm/10min/4°C e o pélete rompido em tampão de lise (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0), através de sonicação 10s ON e 50s OFF durante 18 minutos, empregando-se o sonicador Sonics (Vibra cell, USA). Após a lise celular feita através da sonicação, a suspensão foi centrifugada a 5000rpm/10min/4°C para a separação do sobrenadante e precipitado. A análise foi feita por eletroforese em gel SDS-PAGE (12,5%).

3.2.10 Método de obtenção da proteína recombinante em meio pobre em nutrientes

A cepa transformada com o plasmídeo CsLac/pTrc-HisA, foi inoculada em 100 mL de meio líquido LB/ampicilina 150 µg/mL e após 4 horas de crescimento sob agitação de 150 rpm a 37°C ao atingir a absorbância de OD₆₀₀ ≈ 0,8, a cultura foi coletada por centrifugação 5.000rpm/10min/4°C. A massa bacteriana foi ressuspensa em meio de cultura M9 composto por 20 mL de sais 5x concentrados, suplementado com 2 mL de glicose 20%; 0,2 mL de sulfato de magnésio; 10 µl de cloreto de cálcio e 100 µl de tiamina para 100 mL de H₂O destilada. Ao meio de cultura foi acrescentado ampicilina 150 µg/mL e solução de metais 1000x concentrado, por fim, foi adicionado o reagente IPTG em uma concentração final de 0,5 mM para promover a expressão da proteína de interesse por 6 horas (Tong et al., 2000), que foi analisada por eletroforese em gel SDS-PAGE (12,5%).

3.2.11 Método de obtenção da proteína recombinante localizada na região periplasmática

Após o cultivo bacteriano de *E. coli* transformada com o plasmídeo CsLac/pFLAG-CTS, como descrito nos itens 3.2.6 e 3.2.8, foi seguido o método para a obtenção da proteína a partir do periplasma por choque osmótico como descrito por Neu e Heppel (1965): centrifugação da cultura a

5.000rpm/10min/4°C para descarte do sobrenadante, seguido por lavagem em H₂O destilada do pélete bacteriano, centrifugado novamente na mesma condição que a centrifugação anterior. O pélete bacteriano foi ressuspenso em 15 mL de tampão (Tris-HCl 30 mM; sacarose 20%; EDTA 1 mM, pH 8,0), mantido por 15 minutos em temperatura ambiente e centrifugado novamente a 11.000rpm/10min/4°C para descarte do sobrenadante, seguido por adição de 15 mL de H₂O destilada gelada com a amostra mantida no gelo, vortexado fortemente a cada 2 minutos, por 15 segundos cada, até completar 15 minutos. Após esse período a amostra centrifugada a 11.000rpm/10min/4°C para separar a fração sobrenadante do pélete bacteriano, que foi analisada por eletroforese em gel SDS-PAGE (12,5%). A amostra solubilizada foi concentrada no equipamento Speed Vacuum Concentrator plus/Vacufuge (Eppendorf, USA) e em seguida foi feito o ensaio de atividade enzimática, utilizando o substrato ABTS.

3.2.12 Método de solubilização e purificação da proteína recombinante a partir de corpo de inclusão

Após o cultivo da proteína clonada no plasmídeo pET e lise da massa bacteriana descritos nos itens 3.2.8 e 3.2.9, a recuperação da proteína a partir de corpo de inclusão foi seguindo o método de reenovelamento e purificação em coluna de afinidade (GE Healthcare, 2009). A proteína em corpo de inclusão foi tratada com solução 8 M de ureia, por 1 hora em temperatura ambiente sob agitação lenta. Esta metodologia mantém a proteína na forma solúvel e após ser purificada pode ser reenovelada. A amostra solubilizada, foi centrifugada a 4500rpm/20min/4°C, o sobrenadante foi clarificado utilizando o filtro 0,45 µm e purificado por cromatografia de afinidade no equipamento AKTA FPLC System (GE Healthcare, USA), utilizando a coluna His-Trap Chelating de 5 mL (VC). A coluna foi equilibrada com 3 VC de tampão A (tampão de solubilização/ligação: Ureia 8 M; Tris-HCl 20 mM; NaCl 0,5 M, pH 8,0). Lavagem com 3 VC de tampão B (tampão de lavagem: Tris-Cl 20 mM; NaCl 0,5 mM; pH 8,0), e eluição de 0-100% 3 VC de tampão C (tampão de eluição: Tris-Cl 20 mM; NaCl 0,5 M; Imidazol 0,5 M, pH 8,0). (GE Healthcare, 2009).

Além disso, foram testados ensaios para solubilização, diferentes condições de cultura (temperatura, agitação, tempo de indução e tempo de crescimento), agentes desnaturantes e variação na concentração de indutor (0,05 – 0,5 mM), com a finalidade de favorecer a solubilidade das proteínas em estudo.

3.2.13 Purificação da proteína recombinante

Após os diversos procedimentos de expressão e obtenção da proteína recombinante foi realizada a purificação da mesma.

O sobrenadante foi clarificado utilizando o filtro 0,45 µm e aplicado na coluna His-Trap Chelating de 5 mL de volume de coluna (VC), para purificação por cromatografia de afinidade no equipamento AKTA FPLC System (GE Healthcare, USA). A coluna foi equilibrada com 4 VC de tampão A (tampão de equilíbrio: Tris-HCl 20 mM; NaCl 0,5 M, pH 8,0, seguido de lavagem com 4 VC de tampão A e por fim, eluição de 0-100% com 4 VC de tampão B (tampão de eluição: Tris-HCl 20 mM; NaCl 0,5 M; Imidazol 0,5 M, pH 8,0). As frações coletadas foram analisadas por eletroforese em gel SDS-PAGE (12,5%).

3.2.14 Solubilização e reenovelamento da proteína recombinante

A partir de frações puras de lacase (CsLac/pTrc-HisA), obtidas por cromatografia de afinidade (GE Healthcare; 2009), foi feito ensaio de desnaturação por utilização do agressivo reagente ureia 8 M e com o redutor β-mercaptoetanol 4 mM sob as frações que estavam presentes em tampão de purificação (tampão Tris-HCl 20 mM; NaCl 0,5 M; Imidazol 0,5 M, pH 8,0), em agitação lenta por 2 horas em temperatura ambiente. O reenovelamento foi feito por diálise em solução tampão (fosfato de sódio 50 mM; sulfato de zinco 4 mM, pH 7,0), com o intuito de recuperar a atividade da proteína solúvel na conformação mais próxima à nativa. (Mollania et al., 2013).

3.2.15 Purificação da proteína nativa

O sobrenadante da cultura de *Cochliobolus sativus* foi obtido no 7º dia através da centrifugação a 8000rpm/10min/4°C, para descarte do resíduo do bagaço de cana-de-açúcar e separação do sobrenadante. Filtrado em papel filtro de 0,45 µm, sob o volume total de sobrenadante foi adicionado etanol absoluto em 50% (v/v), seguindo o procedimento de precipitação de proteínas descrito por Brazkova et al. (2017). A amostra homogeneizada com etanol 50% permaneceu por 2 horas a -20°C, para em seguida, ocorrer a precipitação das proteínas nativas.

Após esse período o sobrenadante foi centrifugado a 8000rpm/10min/4°C com descarte do mesmo, permanecendo apenas a proteína precipitada que foi seca a 37°C por 16 horas em estufa. A amostra seca foi ressuspensa e tamponada em Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 e filtrada com filtro 0,45 µm. (Brazkova et al 2017).

A purificação das proteínas nativas foi realizada por meio da metodologia de cromatografia de troca iônica, utilizando a coluna Q-sepharose de 10 mL (VC), a qual foi equilibrada e lavada com 3 VC de tampão A (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0), a eluição foi feita em etapas escalonadas de 25%, 50%, 75% e 100% de 3 VC de tampão B (tampão A + NaCl 1 M). Após a purificação, as frações coletadas foram analisadas por SDS-PAGE e PAGE-nativo (12,5%). Frações com atividade foram dialisadas em tampão A e aplicadas em coluna Q-sepharose HR 1 mL (VC). A eluição foi feita em gradiente de 3 VC de tampão B (tampão A + NaCl 1 M) até 100%. (GE Healthcare; 2009).

3.2.16 Análise da proteína recombinante por eletroforese em gel SDS-PAGE (12,5%)

Para avaliar a proteína quanto a sua massa molecular, solubilidade e pureza, a técnica de eletroforese em gel SDS-PAGE foi empregada. As amostras a serem analisadas foram tamponadas e fervidas a 96°C por 10 minutos. As amostras foram aplicadas individualmente nos poços do gel SDS-PAGE, composto por gel de separação 12,5% e gel de empilhamento 4% mergulhado em tampão de corrida. (Sambrook; Fritsch; Maniatis, 1989). A corrida

eletroforética foi realizada a 70 V até o corante de azul de bromofenol chegar ao final do gel. O gel foi corado com solução Coomassie Blue, por 30 minutos para visualização das bandas proteicas.

3.2.17 Análise de atividade das enzimas oxidoredutases

A atividade das oxidoredutases foi monitorada através de espectrofotometria no equipamento de leitura de microplacas (TECAN Infinite M200pro). A leitura das reações foi feita em duplicata em placas de 96 poços, após 3 minutos de incubação a 30°C, durante 10 ciclos de 30 segundos cada ciclo, com medição da absorbância.

Para a determinação da atividade enzimática foi utilizado o cálculo descrito por Kaplan et al. 1995, em que:

Δ ABS = Curva de inclinação da absorbância durante 5 minutos.

ϵ = Coeficiente de extinção molar.

R = Quantidade de extrato enzimático na amostra.

U/L = Unidade por litro, em que U significa a quantidade de enzima capaz de converter 1 μ Mol de substrato por minuto.

$$U/L = \frac{\Delta ABS}{\epsilon \times R} \times 10^6$$

3.2.17.1 Lacase

A atividade de lacase foi determinada a 30°C, utilizando uma mistura de reação composta por 60 μ l de tampão tartarato de sódio 250 mM, pH 4; 30 μ l de ABTS 5 mM e 40 μ l da solução enzimática. A reação foi iniciada com a adição de 70 μ L de H₂O, com aumento da absorbância devido à oxidação do ABTS medido a 420 nm. Coeficiente de extinção $\epsilon=36000.M.cm^{-1}$. (Szklarz et al., 1989). Para os ensaios de cinética e caracterização enzimática foi utilizado 1 μ g de proteína.

3.2.17.2 Lignina peroxidase

A atividade de lignina peroxidase foi determinada a 30°C, utilizando uma mistura de reação composta por 100 µl de tampão tartarato de sódio 250 mM, pH 4; 20 µl de solução de álcool veratrílico 100 mM e 70 µl da solução enzimática. A reação foi iniciada com a adição de 10 µL de H₂O₂ 10 mM e o aumento da absorbância, devido à oxidação do álcool veratrílico na presença de peróxido de hidrogênio, foi medido a 310 nm. Coeficiente de extinção $\epsilon=9300.M.cm^{-1}$. (Tien; Kirk, 1988).

3.2.17.3 Manganês peroxidase

A atividade de manganês peroxidase foi determinada a 30°C, utilizando uma mistura de reação composta por 100 µl de tampão tartarato de sódio 250 mM, pH 4; 2 µl de guaiacol 400 mM; 20 µl de sulfato de manganês 10 mM e 70 µl da solução enzimática. A reação foi iniciada com a adição de 10 µL de H₂O₂ 10 mM e o aumento da absorbância, devido à oxidação do guaiacol na presença de peróxido de hidrogênio, foi medido a 465 nm. Coeficiente de extinção $\epsilon=12000.M.cm^{-1}$. (Lundell et al., 1990).

3.2.18 Detecção da proteína nativa

3.2.18.1 Análise de atividade enzimática por zimograma

A análise qualitativa da atividade enzimática foi realizada por PAGE-nativo 12,5% (gel não desnaturante). Foi aplicado no poço do gel de empilhamento 50 µl de amostra + 10 µl de tampão de amostra e a eletroforese foi feita em condição não desnaturante da proteína. As amostras foram separadas lentamente em baixa temperatura por um campo elétrico de 50 V, a 13°C, por 12 horas, em seguida o gel foi submetido a duas lavagens em tampão tartarato de sódio 250 mM, pH 4, durante 1 hora e incubado com ABTS 2 mM a 37°C, na ausência de luz por 30 minutos, determinando a atividade enzimática de lacase pela aparição de uma banda de cor verde.

3.2.18.2 Western Blot

Para a realização do procedimento de *western blot* foi obtido o anticorpo primário anti-lacase (CsLac/pTrc-HisA), o qual foi produzido em camundongo no laboratório de Bioquímica de Parasitas do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. A proteína recombinante (antígeno) foi purificada por cromatografia de afinidade no AKTA FPLC System (GE Healthcare, USA), liofilizado (Vertis, Sp Scientific, USA) e quantificado (TECAN infinite 200pro). Foi inoculado no animal (camundongo), 15 mg do antígeno juntamente com o coadjuvante de Freud, para a ativação de seu sistema imunológico e após trinta dias o sangue do animal foi recolhido e centrifugado para separação do soro contendo o anticorpo primário. Após verificar a proteína nativa quanto a sua massa molecular e pureza em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12,5%), foi feita a identificação da amostra através da técnica *Western Blot*, uma reação imunológica de ligação antígeno-anticorpo, onde o antígeno é a proteína de interesse (lacase), que foi transferida do gel SDS-PAGE para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi umedecida em tampão de lavagem TBS-T (Tris-HCl 10 mM; NaCl 0,15 M e TWEEN 20 0,1%, pH 7,2), para a realização da transferência à seco (iBlot – Invitrogen, USA). Após esta etapa, a membrana foi incubada com TBS-T acrescido de 5% de leite em pó desnatado (NESTLÉ, Suíça) por 1 hora, com agitação lenta em temperatura ambiente. Para a retirada da solução, foi lavada seis vezes com tampão TBS-T de 10 minutos cada. Em seguida a membrana foi incubada por 16 horas a 13°C, com soro contendo o anticorpo primário contra lacase com diluição de 1:500 em solução TBS-T e 5% de leite em pó desnatado, após este período a membrana foi submetida a seis lavagens de 10 minutos apenas com TBS-T e posteriormente incubada com o anticorpo secundário (anti-camundongo-HRP), com diluição de 1:1000 por 1 hora em agitação lenta em temperatura ambiente. A membrana foi lavada com tampão TBS-T por seis vezes de 10 minutos cada e para a detecção da proteína foi utilizado o sistema ECL com substrato quimioluminescente. (Sambrook; Fritsch; Maniatis, 1989). A leitura da reação quimioluminescente foi realizada no equipamento Imagequant Las 500 (GE, USA).

3.2.19 Determinação da atividade enzimática

Os ensaios para a determinação da atividade enzimática, parâmetros cinéticos, estabilidade térmica, temperatura e pH ótimos foram realizados, utilizando o método colorimétrico de oxidação do reagente ABTS (diammonium, cat. SIGMA A1888), com coeficiente de extinção $\epsilon=36000.M.cm^{-1}$. (Szklarz et al., 1989). O ABTS é um substrato para determinação de atividade de enzimas oxidases, que ao final da reação produz um produto solúvel de cor verde que pode ser quantificado por espectrofotometria a 420 nm.

A atividade enzimática foi monitorada por espectrofotometria no equipamento de leitura em microplacas (TECAN Infinite M200pro). A leitura das reações foi feita em duplicata, após 3 minutos de incubação a 30°C, durante 10 ciclos de 30 segundos cada, com medição da absorbância. Todos os ensaios foram realizados em microplacas, com 96 poços de fundo plano (Costar, USA). A atividade foi determinada, utilizando uma mistura de reação composta por 60 μ l de tampão tartarato de sódio 250 mM, pH 4; 30 μ l de ABTS 5 mM; 100 μ L de H₂O e 1 μ g da solução enzimática. A reação apresenta aumento da absorbância devido à oxidação do ABTS medido a 420 nm.

3.2.19.1 Temperatura ótima e Estabilidade térmica

O efeito da temperatura ótima na atividade enzimática foi determinado utilizando o tampão tartarato de sódio 250 mM, pH 4,0, variando a temperatura na faixa de 20°C – 40°C em intervalos de 5°C. A estabilidade térmica da atividade enzimática foi determinada após a confirmação da temperatura e pH ótimos. A pré-incubação foi realizada na faixa de 10°C – 80°C em intervalos de 10°C por 1 hora em thermomixer (Eppendorf, USA), e as amostras foram coletadas para análise a cada 15 minutos para realizar o ensaio de atividade remanescente. O ensaio teve como controle a alíquota retirada antes da incubação.

3.2.19.2 pH ótimo

A determinação do pH ótimo para atividade enzimática foi realizada utilizando o tampão acetato borato fosfato (PBA) 20 mM, variando o pH na faixa de 3,0 - 12,0.

3.2.19.3 Cinética enzimática

Para determinar os parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) calculados de acordo com Lineweaver e Burk (1934), os ensaios com a amostra purificada na concentração de 1 μ g utilizando o substrato ABTS, foram feitas em sete concentrações diferentes no intervalo entre 0,05 e 7 mM de substrato. Os parâmetros cinéticos foram estabelecidos utilizando o programa GraphPad Prism. (GraphPad Software, <https://www.graphpad.com/>).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 IDENTIFICAÇÃO DO FUNGO BBF210 – *Cochliobolus sativus*

4.1.1 Identificação morfológica

A cepa do fungo BBF210 presente na micoteca do laboratório de Bioquímica e Biotecnologia da Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo, foi isolada durante o desenvolvimento do projeto FAPESP 2014/24107-1 (Estudo e Caracterização de enzimas oxidasas produzidas por fungos filamentosos) e caracterizada como fungo com atividade de enzimas oxidorreduções, como apresentado na Figura 8. No laboratório análises iniciais de identificação morfológica e molecular foram realizadas e para a confirmação dos resultados, foi feita a validação através de análises complementares realizados na Fundação André Tosello (FAT). (<http://fat.org.br/>).

A cepa selecionada foi crescida em meio BDA a 27°C durante sete dias e colocada em temperatura ambiente para exposição à luz após o 8º dia. As colônias cresceram rapidamente alcançando o diâmetro de 3 a 9 cm durante a incubação, tornando-se maduras em menos de cinco dias. As características morfológicas da cepa em estudo estão mostradas na Figura 9 com descrição da colônia em meio de cultura BDA após sete dias de crescimento.

No anverso da cepa, o fungo possui colônias aveludadas, planas e totalmente cobertas por pequenos conidióforos, com conídios negros em seu ápice que refletem a luz e dão aparência de brilho à colônia. Os micélios são aéreos e abundantes nos primeiros dias de crescimento apresentando um aspecto cotonoso com coloração que varia entre branca e creme. O verso da colônia possui coloração em tons contínuos de marrom oliva escuro formando um degradê e o crescimento em formações circulares a partir do centro, formam um gradiente com tons de marrom, preto e amarelado.

Os aspectos microscópicos da cepa em estudo também foram observados. A cepa foi submetida ao microcultivo e analisada por microscopia de luz sob a coloração de lactofenol (azul de algodão). As culturas foram observadas em duplicata ao 5º e 7º dia de cultivo. A Figura 9 apresenta as estruturas vegetativas e reprodutivas do fungo. O fungo apresenta hifas septadas e o desenvolvimento de estruturas de reprodução foi observado a partir

do 5º dia de cultivo e utilizando chaves de taxonomia, foi classificado como pertencente ao Gênero *Cochliobolus*. Dentre as características microscópicas de crescimento observadas, o gênero produz um longo e largo conídio com um único septo.

Cochliobolus sativus (Ito & Kurib.) Drechs. ex Dastur (anamorfo: *Bipolaris sorokiniana* [Sacc. in Sorok.] Shoem.) possui características bastante associadas a doenças em plantas que causam desastrosos prejuízos em plantações de uma variedade de cereais como trigo e gramíneas. (Morejon et al., 2006), ocorrendo em muitas áreas de produção de cevada no mundo e comumente encontrado em áreas com um clima quente e úmido. Muitos estudos relatam que formas fisiológicas do fungo causam diferentes graus de infecção em diferentes espécies de plantas. (Zhong; Stefferson, 2001).

Na última década estudos demonstraram que a diversidade genética dentro das populações de *C. sativus* é maior do que se pensava anteriormente e sendo geneticamente distintas, pode haver variação em vários aspectos ecológicos, fisiológicos e traços de virulência entre as populações. (Jawhar et al., 2018). A Figura 9 apresenta algumas macrofotografias das culturas em meio sólido (Figura 9 A e 9 C) e microfotografias da microcultura (9 D – 9 H).

Figura 9 - Características morfológicas do fungo *Cochliobolus sativus*. (A) cultura crescida em BDA após sete dias, lado verso; (B) cultura crescida em BDA após sete dias, lado anverso; (C) três inoculações da cultura crescida em BDA após quatro dias, lado anverso; (D) microcultivo onde as hifas são observadas no 7º dia de crescimento; (E); (F); (G) e (H) microcultivos observados ao 5º dia de crescimento, corados com azul de lactofenol apresentando células conidiogênicas, apontadas com setas pretas. Microfotografias E, F, G e H 400x. Fonte: Suelen de Barros Sampaio (A; B; C; E; F; G e H) e Fundação André Tosello (D), 2019.

Tabela 1 – Oligonucleotídeos utilizados no estudo.

Função	Oligonucleotídeo	região rDNA	Sequência
Identificação molecular do fungo BBF210	SR6R	SSU	5' AAGWAAAAGTCGTAACAAGG 3'
	LR1	LSU	5' GGTTGGTTTCTTTTCCT 3'
	ITS 1	ITS	5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'
	ITS5	ITS	5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3'
	LROR-F	LSU	5' ACCCGCTGAACTTAAGC 3'
	LR5-R	LSU	5' TCCTGAGGGAACTTCG 3'
Clonagem vetor pTRC-HisA	CsLACtrc-F		5' CTAGCTAGCATGAGCCGTAGCACCTGG 3'
	CsLACtrc-R		5' CCGCTCGAGTTA AACACCGCTATCATCCTG 3'
Clonagem vetor pFLAG-CTS	CsLACflag-F		5' CCCAAGCTTCT ATGAGCCGTAGCACCTG 3'
	CsLAC flag-R		5' CCGGAATTC TTAACACCGCTATCATCCTG 3'

Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

As sequências de nucleotídeos obtidas na etapa anterior foram analisadas, utilizando o programa blastn (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e para a comparação de similaridade e filogenia das sequências obtidas contra sequências de outras espécies do gênero *Cochliobolus/Bipolaris* e para a construção da árvore de distância filogenética foi utilizado o programa MEGABLAST, com os oligonucleotídeos específicos SR6R da região SSU e LR1 da região LSU do rDNA (Figura 11), enquanto que os oligonucleotídeos específicos ITS1 - ITS5 da região ITS e LROR-F – LR5-R da região LSU do rDNA, foram utilizados para montar a Tabela de similaridade com espécies do mesmo gênero. (Tabela 2).

Figura 11 – Árvore filogenética construída com base nas sequências de oligonucleotídeos. SR6R da região SSU e LR1 da região LSU do rDNA. Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

Tabela 2 – Similaridade entre espécies do gênero *Cochliobolus/Bipolaris* sp.

BBF210	Description	Max score	Total score	Query cover	Ident	Accession
<i>Cochliobolus sativus</i> LROR-F LR5 (internal transcribed spacer regions)	<i>Cochliobolus sativus</i> CMON27	1040	1040	90%	100 %	JQ753977.1
	<i>Cochliobolus sativus</i> C17	1037	1037	90%	100 %	JQ936204.1
	<i>Cochliobolus sativus</i> C20	1031	1031	90%	100 %	JQ936205.1
	<i>Bipolaris sorokiniana</i> CFFSUR-12A	998	998	87%	100 %	KY860660.1
	<i>Bipolaris sorokiniana</i> CFFSUR-22C	970	970	84%	100 %	KY860661.1
	<i>Bipolaris</i> sp. CBMAI 56	950	950	83%	100 %	DQ123600.1
	<i>Cochliobolus sativus</i> M21	1085	1085	95%	99,66 %	JQ93099.1
	<i>Bipolaris sorokiniana</i> CSB_F081	1098	1098	97%	99,34 %	KU574681.1
	<i>Cochliobolus sativus</i> M20	1068	1068	95%	99,32 %	JQ936098.1
	<i>Bipolaris sorokiniana</i> RM8	1085	1085	98%	99,01 %	MG664726.1
<i>Cochliobolus sativus</i> ITS-1 ITS-4 (internal transcribed spacer regions)	<i>Cochliobolus sativus</i> CMON27	865	865	96%	97,59%	MG664725.1
	<i>Cochliobolus sativus</i> C17	865	865	96%	97,59%	KY860660.1
	<i>Cochliobolus sativus</i> C20	865	865	96%	97,59%	JQ936205.1
	<i>Bipolaris sorokiniana</i> CFFSUR-12A	865	865	96%	97,59%	JQ936204.1
	<i>Bipolaris sorokiniana</i> CFFSUR-22C	865	865	96%	97,59%	JQ936099.1
	<i>Bipolaris</i> sp. CBMAI 56	865	865	96%	97,59%	JQ753977.1
	<i>Cochliobolus sativus</i> M21	865	865	96%	97,59%	DQ123600.1
	<i>Bipolaris sorokiniana</i> CSB_F081	861	861	96%	97,39%	KU574681.1
	<i>Cochliobolus sativus</i> M20	859	859	96%	97,38%	JQ936098.1
	<i>Bipolaris sorokiniana</i> RM8	841	841	96%	96,78%	MG664726.1

Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

Considerando as análises que foram realizadas apresentando os diversos marcadores moleculares, foi verificado com 99% de identidade que o fungo BBF210 pertence ao gênero *Cochliobolus* sp. Foi concluído que esses dados reunidos aos resultados de identificação morfológica e molecular classificam o fungo à espécie *Cochliobolus sativus*, indicada na Tabela 3 por sua classificação taxonômica. (Shoemaker, 1959).

Tabela 3 – Classificação taxonômica de *Cochliobolus sativus*.

Reino	Fungi
Subreino	Dikarya
Filo	Ascomycota
Subfilo	Pezizomycotina
Classe	Dothideomycetes
Subclasse	Pleosporomycetidae
Ordem	Pleosporales
Família	Pleosporaceae
Gênero	<i>Cochliobolus</i>
Espécie	<i>Cochliobolus sativus</i>

Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

4.2 ANÁLISE E IDENTIFICAÇÃO DA ENZIMA LACASE DE *Cochliobolus sativus*

Análises de bioinformática do genoma de *Cochliobolus sativus* ND90Pr v1.0, realizada pelo *Joint Genome Institute*, permitiu identificar o gene com o código ID 121436, denominado neste trabalho como CsLac de 1575 pb de cDNA como suposta enzima lacase com 524 aminoácidos e massa molecular de 57,7 kDa, cuja as sequências de cDNA e aminoácidos são apresentados na Figura 12.

```

1  atgtctcgttcaacatggtgcgactattcgatagatacggactatgcaacgattgtccct
   M S R S T W C D Y S I D T D Y A T I V P      20
61  catactggagtaacccgagaataactggctcgatttgacagaagtaacggttgaccccgat
   H T G V T R E Y W L D L T E V T V A P D      40
121 ggagtttctcggacagcaatggctgtgaacggaacctccctggtccaacattatttggc
   G V S R T A M A V N G T I P G P T L F A      60
181 gactggggcgatacggtagttgtacacgtcaacaacagactcgaaacctcacagaatgga
   D W G D T V V V H V N N R L E T S Q N G      80
241 actagtatccactggcacggcctccggcaaaacggtacaaatgatcaggatggagtctca
   T S I H W H G L R Q N G T N D Q D G V S     100
301 tctatcacacaatgccccaccgccccgggaagctcgatgacatacacatggcgagcgacg
   S I T Q C P T A P G S S M T Y T W R A T     120
361 cagtacggggagcacttgggtatcactcacattttgcacttcaagcttggcaaggtattttt
   Q Y G S T W Y H S H F A L Q A W Q G I F     140
421 ggcgactcattatcaatggaccagcgacggcaaattatgacgaggacctagggatgtta
   G G L I I N G P A T A N Y D E D L G M L     160
481 tttctgaacgactgggatcaccagacagtagatgaactttacatgtctgctcagagtagt
   F L N D W D H Q T V D E L Y M S A Q S S     180
541 gggccgccgactctcgacaatgctttaatcaatggtacaaatcgtagaagatggcggc
   G P P T L D N A L I N G T N T Y E D G G     200
601 catcgttataacatatcgtttactccagggtcatcacagaatacgtctggtaaacgggt
   H R Y N I S F T P G S S Y R I R L V N G     220
661 gctattgatacccatTTTTAAGTTTatgatagataatcacacaatgactgtgattgcatct
   A I D T H F K F M I D N H T M T V I A S     240
721 gacttggtagccattcagccgtacaacacgacagctcttggatattggtataggacaacgt
   D L V P P I Q P Y N T T V L D I G I G Q R     260
781 tacgatattattgtcacagccgaccaagcatctgtgcagaaaacttttggatgcgtggt
   Y D I I V T A D Q A S A A E N F W M R G     280
841 attcctcagtcctgctctgacgtcaaaaatgcgaatgatatccgcggtatcgtttat
   I P Q S A C S D V K N A N D I R G I V Y     300
901 tacggttcttcgccctctacaccctcttcatcagcctacaactacacggacgaatgtggc
   Y G S S P S T P S S S A Y N Y T D E C G     320
961 gatgaaacagacaaccttgttccttacgttgcgaaaaaagtttcagaaccaaacagtaca
   D E T D N L V P Y V A K K V S E P N S T     340
1021 aaagctgagattgcaactggttgctctaataccgaaggtctcttccgttggtacctgaac
   K A E I A T V G S N T E G L F R W Y L N     360
1081 tctacgtccatggtagcgaattgggcagatccaacgttactgcagatactggacggcaag
   S T S M V A N W A D P T L L Q I L D G K     380
1141 aattcttttacagaatcaaagtgtgtaattgagctgcctaattgctggagaatgggtatat
   N S F T E S N A V I E L P N A G E W V Y     400
1201 gtcataatcgagacttccctacctgttccgcaccctatacaccttcacggacacgatttc
   V I I E T S L P V P H P I H L H G H D F     420
1261 tttgtcttagcacaaggctctggtgcttatactccgaaataactctgcagcttgataat
   F V L A Q G S G A Y T S E I T L Q L D N     440
1321 cctccaaggagagatacagcaatgcttccctgcctcagggtaccttgtgctggcattcgag
   P P R R D T A M L P A S G Y L V L A F E     460
1381 atcgataatcctggggccttggctgatgcatgtcacataggttggcatacctcggaggga
   I D N P G A W L M H C H I G W H T S E G     480
1441 tttgctttgcagtttgtggaacaatatgacaaaattgggaatataactcatgcagatcaa
   F A L Q F V E Q Y D K I G N I T H A D Q     500
1501 gttcagcgagattgtagtaactgggggaagcttccaaataagcgcaaggatcatccaagac
   V Q R D C S N W G S F Q I S A R I I Q D     520
1561 gattctggcgtttag
   D S G V -                                     535

```

Figura 12 – Sequência de cDNA e aminoácidos da enzima lacase de *Cochliobolus sativus*. Indicando os códons de iniciação e finalização em negrito, os aminoácidos do centro catalítico estão destacados em negrito e inseridos na região conservada sublinhada. Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

A Figura 12, indica os códons de iniciação e finalização e os aminoácidos do centro catalítico presentes na região conservada do cDNA da enzima em estudo ([Prosite expasy/https://prosite.expasy.org/PDOC00076](https://prosite.expasy.org/PDOC00076)).

O banco de dados do *Joint Genome Institute*, possui a distribuição dos genes correspondentes a genomas de fungos que degradam lignocelulose (Fernández et al., 2014; Martínez et al. 2017), do qual foi identificado o putativo gene de lacase utilizado no estudo.

4.3 ANÁLISE COMPARATIVA DA ENZIMA EM ESTUDO COM AS ENZIMAS DE OUTROS ORGANISMOS

Os alinhamentos completos realizados no programa blastp (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), mostraram que lacase de *Cochliobolus sativus* apresenta 68% de identidade, com as enzimas lacase de *Metarhizium anisopliae* (GenBank: KFG77930.1) (Staats et al., 2014) e *Metarhizium guizhouense* ARSEF 977 (GenBank: KID83124.1) (Hu et al, 2014), respectivamente. Nesta análise comparativa foram utilizadas apenas enzimas que já foram caracterizadas estruturalmente.

Foi feita a análise múltipla da sequência de aminoácidos através do programa Clustalx (<http://www.clustal.org/clustal2/>) e visualizado no programa Gene Doc (<http://genedoc.software.informer.com/2.7/>), comparando a sequência de lacase de *Cochliobolus sativus* com diferentes espécies de fungos.

A Figura 13, mostra o alinhamento de lacase de *C. sativus* (CsLAC/Coch) com enzimas lacases de diferentes fungos, no qual foi identificado a região padrão de consenso como HCHx (3) -Hx (3) - [AG] - [LM] ([Prosite expasy/https://prosite.expasy.org/PDOC00076](https://prosite.expasy.org/PDOC00076)), indicando similaridade com o grupo MULTICOPPER_OXIDASE2, em que os primeiros 2 H são resíduos de ligação tipo cobre 3, enquanto que o C, o terceiro H e o L ou M são ligandos de cobre tipo 1, os aminoácidos do centro catalítico foram ressaltados na Figura anterior.

```

          *          20          *          40          *          60          *          8
LAC6/Tram : -MSRFSLLTTFIVASLASSALASTIGPVADMTISNAEVSFDPGFARQAVVVNGVITFGPLVKGNMGDRFQINVIDNLTNHTM : 78
LAC7/Lent : -MAKFSQSLLSYTVLSFVAAAAYAAIGPVADLTISNAQVSPDGFLLDAVVTNGLVFGPLITGNKGDRFQINVIDQMTNHTM : 78
LAC8/Dich. : -MAKFMCLLSYVTLFASAYAGIGPVTDLTITNADTAPDNFTAAAIVVNGVFFAPPLITGNKGDRFQINVIDQLTNHTM : 78
LAC4/Tram. : -MSRFSQSLFFEVILASLAAVANAAIGPVADLTLTNAAVSPDGFTRFVAVVNGVITFAPPLTAGKKGDRFQINVIDNLTNHTM : 78
LAC9/Gan.1 : -MVKFSQSLSCVTLFASAHAGIGPKADLTISNANTAPDGYTFAAVVVNGVFFFGPLITGNKGDRFQINVIDQLTNHTM : 78
LAC1/Tram. : -MSRFSQSLLCFVLVSLAAVANAAIGPVADLTLTNAAVSPDGFTRFVAVVNGVITFAPPLTAGKKGDRFQINVIDNLTNHTM : 78
LAC2/Tram. : -MSRFSQSLLCFVLVSLAAVANAAIGPVADLTLTNAAVSPDGFSTRFVAVVNGVITFAPPLTAGKKGDRFQINVIDNLTNHTM : 78
LAC3/Pyc.c : -MSRFSQSLLSFVLVSLAAVANAAIGPVADLTLTNAAVSPDGFSTRFVAVVNGVITFAPPLTAGKKGDRFQINVIDNLTNHTM : 78
LAC5/Tram. : -----AIGPVADLTLTNAQVSPDGFARFVAVVNGVITFAPPLITGNKGDRFQINVIDQLTNHTM : 57
csLAC/Coch : MSRSTWCDYSIDTDYATIVPHTGVITREYWLDTLEVTWAPDGVSEETAMAVNGTIEGPTLFALWGDITVVVHVNNRLETS-- : 77

```

```

          0          *          100          *          120          *          140          *          1
LAC6/Tram : LKSTSIHWHGFLFHGTNWADGPAFVNQCPIASGHSFLYDFQVPGQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPLVVYDFHDPHKSR : 157
LAC7/Lent : LKTTSIHWHGFFQKGTNWADGPAFVNQCPIASGNSFLYDFQVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPLVVYDFNDPAAAL : 157
LAC8/Dich. : LKTTSIHWHGFFQKGTNWADGPAFINQCPIASGNSFLYDFQVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPLVVYDFNDPAAAL : 157
LAC4/Tram. : LKTTSIHWHGFFQKGTNWADGVSFVNQCPIASGHSFLYDFQVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPLVVYDFNDPQASL : 157
LAC9/Gan.1 : LKTTSIHWHGFFQKGTNWADGPAFINQCPIASGHSFLYDFQVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPLVVYDFNDPQASL : 157
LAC1/Tram. : LKTTSIHWHGFFQKGTNWADGVSFVNQCPIASGHSFLYDFQVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPLVVYDFNDPQASL : 157
LAC2/Tram. : LKTTSIHWHGFFQKGTNWADGPAFVNQCPIASGHSFLYDFQVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPLVVYDFNDPQASL : 157
LAC3/Pyc.c : LKTTSIHWHGFFQKGTNWADGPAFINQCPIASGHSFLYDFQVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPLVVYDFNDPQASL : 157
LAC5/Tram. : LKTTSIHWHGFFQKGTNWADGPAFVNQCPIASGHSFLYDFQVPDQAGTFWYHSHLSTQYCDGLRGPLVVYDFNDPQASL : 136
csLAC/Coch : QNGTSTSIHWHGLRNGTNDQDGVSSITOCPTAPGSSMTITWRATQYGSTWYHSHFALQAWQGIFFGLIINGE-----AT : 150

```

```

          60          *          180          *          200          *          220          *
LAC6/Tram : YDVENDDTVITLADWYHVAAKRRSAFPLGAG----DATLINGLGRSPPTTPSADLAVINVTQKKRYRFRFLVSLSCDPNHT : 231
LAC7/Lent : YDIIDDDNTVITLTDWYHTAARLGPRFPLGAG----DATLINGLGRSPATPTANLTVINVTQKKRYRFRFLVSLSCDPNYV : 231
LAC8/Dich. : YDVENDDTVITLADWYHVAARVGRFPLGSG----BSTLINGLGRSPSTPTADLAVISVTQKKRYRFRFLVSLSCDPNYV : 231
LAC4/Tram. : YDIIDDDTVITLADWYHVAARVGRFPLGAG----DATLINGLGRSPPTTPSADLAVIKVTQKKRYRFRFLVSLSCDPNHT : 231
LAC9/Gan.1 : YDVENDDTVITLSDWYHVAARLGPRFPLGSG----BSTLINGLGRSTTNTATAGLAVINVTQKKRYRFRFLVSLSCDPNYT : 231
LAC1/Tram. : YDIIDDDTVITLADWYHVAARVGRFPLGAG----DATLINGLGRSPPTTPSADLAVIKVTQKKRYRFRFLVSLSCDPNHT : 231
LAC2/Tram. : YDIIDDDTVITLADWYHVAARVGRFPLGSG----DATLINGLGRSPPTTPSADLAVIKVTQKKRYRFRFLVSLSCDPNHT : 231
LAC3/Pyc.c : YDIIDDDTVITLADWYHVAARVGRFPLGAG----DATLINGLGRSPPTTPSADLAVIKVTQKKRYRFRFLVSLSCDPNHT : 231
LAC5/Tram. : YDIIDDDTVITLADWYHVAARVGRFPLGSG----BSTLINGLGRSPPTTPSADLAVIKVTQKKRYRFRFLVSLSCDPNHT : 210
csLAC/Coch : ANYDEELGLMFLFNDWDHQTVDELYMSAQSSGPPTLNALIN--GTNTYEDGGHRYNISTFIPGSSYRIRLVNGAITHFK : 227

```

```

          240          *          260          *          280          *          300          *
LAC6/Tram : FSIDGHTMTTIEADSVNTQPLEVDSIQIFAAQRYSFVLDTANQA--VDNYWIRANPFSFGNVGFSGGINSAILRYDGAFAI : 308
LAC7/Lent : FSIDNHTMTSVIETDITVNTQPLETVDSIQIYAAQRYSFVLDTANQS--VDNYWIRANPNFGNVGFTDAINSAILRYDGAEDA : 308
LAC8/Dich. : FSIDNHTMTSVIETDITVNTQPLETVDSIQIYAAQRYSFVLDTANQT--IDNYWIRANPNFGNVGFTDGINSAIRLYDGAASI : 308
LAC4/Tram. : FSIDGHTMTTIEADSVNTQPLEVDSIQIFAAQRYSFVLDTANQA--VDNYWIRANPFSFGNVGFSGGINSAILRYDGAFAI : 308
LAC9/Gan.1 : FSIDGHTMTTIEADSVNTQPLEVDSIQIFAAQRYSFVLDTANQT--IDNYWIRANPFSFGNVGFTDGINSAIRLYDGAASI : 308
LAC1/Tram. : FSIDGHTMTTIEADSVNTQPLEVDSIQIFAAQRYSFVLDTANQA--VDNYWIRANPFSFGNVGFSGGINSAILRYDGAFAI : 308
LAC2/Tram. : FSIDGHTMTTIEADSVNTQPLEVDSIQIFAAQRYSFVLDTANQA--VDNYWIRANPFSFGNVGFSGGINSAILRYDGAFAI : 308
LAC3/Pyc.c : FSIDGHTMTTIEADSVNTQPLEVDSIQIFAAQRYSFVLDTANQA--VDNYWIRANPFSFGNVGFSGGINSAILRYDGAFAI : 308
LAC5/Tram. : FSIDNHTMTTIEADSVNTQPLEVDSIQIFAAQRYSFVLDTANQA--VDNYWIRANPFSFGNVGFSGGINSAILRYDGAFAI : 287
csLAC/Coch : FMIDNHTMTVIAASLVPIDFYNTTVLDIGIGORYDILVTDQASAAENFWMGIFQSAQSDVKNNATIRGLVYYSPPS : 306

```

```

          320          *          340          *          360          *          380          *
LAC6/Tram : EF-TTQTTTPKPLNEVDLHPLTPMPVPGRPFGVGGVDKPLNMVFNFGNTNFFINNHSFVP-PTVPVLLQILSGAQAAQD : 385
LAC7/Lent : EFSATPTAPTLNPLVEANLHPLASMPVPGSPVSGGVDKAINLDFNFGNTNFFINNHSFVP-PTVPVLLQIMSGANTAQD : 386
LAC8/Dich. : EF-TTSQQVTONLLNEATLAPLTARVTPGTAVQGGVDKAINLDFNFGNTNFFINNHSFVP-PTVPVLLQILSGAQAAQD : 385
LAC4/Tram. : EF-TTQTTTPKPLNEVDLHPLTPMPVPGRPFGVGGVDKPLNMVFNFGNTNFFINNHSFVP-PTVPVLLQILSGAQAAQD : 385
LAC9/Gan.1 : EF-TTAQQTTONLLNEVDLHPLFAVAKQTPGRATQGGTDVAINMVFNFGNTNFFINNHSFVP-PTVPVLLQILSGAQAAQD : 385
LAC1/Tram. : EF-TTQTTTPKPLNEVDLHPLTPMPVPGRPFGVGGVDKPLNMVFNFGNTNFFINNHSFVP-PTVPVLLQILSGAQAAQD : 385
LAC2/Tram. : EF-TTQTTTPKPLNEVDLHPLTPMAVPGRPFGVGGVDKPLNMVFNFGNTNFFINNHSFVP-PTVPVLLQILSGAQAAQD : 385
LAC3/Pyc.c : EF-TTQTTTPKPLNEVDLHPLTPMAVPGRPFGVGGVDKPLNMVFNFGNTNFFINNHSFVP-PTVPVLLQILSGAQAAQD : 385
LAC5/Tram. : EF-TSVQTTTPKPLNEVDLHPLSPMPVPGSPFGVGGVDKPLNLVFNFGNTNFFINDHFTFVP-PTVPVLLQILSGAQAAQD : 364
csLAC/Coch : TESSAYNYTDECGDETDLNLPYVAKKVSEPNSTKABEATVGSNTEGLFRVYLNSTSMVANWADETLLOILDGKN---S : 382

```

Figura 13 – Alinhamento da sequência de aminoácidos de lacases de diferentes fungos. LAC6/*Trametes sanguinea* (GenBank: ACZ37083.1); LAC7/*Lentinus* sp. WR2 (GenBank: ACZ82339.1); LAC8/*Dichomitus squalens* LYAD-421 SS1 (NCBI: XP_007360655.1); LAC9/*Ganoderma lucidum* (GenBank: AAG17009.2), LAC1/*Trametes sanguinea* (PDB: 5NQ7_A); LAC2/*Trametes coccinea* (PDB: 5NQ8_A); LAC3/*Pycnoporus coccineus* (GenBank: BAB69775.1); LAC5/*Trametes sanguinea* (GenBank: ACZ37083.1) e CsLAC/*Cochliobolus sativus*. Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

A sequência consenso pertencente à família de enzimas Multicobre oxidases 2 está indicado dentro da caixa preta, onde os aminoácidos do centro catalítico estão sublinhados na cor azul e também são apresentados na Figura 12.

Estudos estruturais e comparativos identificaram as regiões conservadas nas quais resíduos de histidina podem se ligar a quatro átomos de cobre localizados em dois principais locais que estão envolvidos na atividade catalítica da enzima lacase produzida em fungos. (Ducros et al., 1998; Antorini et al., 2002; Martínez et al. 2017).

O alinhamento da Figura 13 mostra que a proteína em estudo através das análises computacionais, apresenta características que correspondem às enzimas lacases (Orlikowska et al., 2017), de domínio e similaridade com as enzimas de outros microrganismos já descritos na literatura.

4.4 CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA ENZIMA LACASE RECOMBINANTE

A sequência de cDNA da enzima lacase foi sintetizada pela empresa Thermo Scientific (USA) e clonada no vetor pET-303/NT-His (Invitrogen, USA), obtendo o vetor CsLac/pET-303/NT-His de 7258.

Figura 14 – Esquema do plasmídeo de expressão CsLac/pET-303/NT-His de 7258 pb para a produção da proteína lacase recombinante de *Cochliobolus sativus*. Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

A análise da expressão da proteína em estudo foi feita por eletroforese em gel SDS-PAGE (12,5%) e mostra que maioritariamente a enzima foi expressa predominantemente na forma de corpo de inclusão. (Figura 15).

Figura 15 - Análise por eletroforese em gel SDS-PAGE (12,5%) da expressão da proteína lacase (CsLac/pET-303/NT-His) clonada em *E.coli* BL21DE3 star de 57,7 kDa (1-3). (1) Induzido; (2) Sobrenadante e (3) Precipitado. Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

Singh et al. (2015) considerou que a elevada proporção de proteína recombinante na forma de corpo de inclusão, deva-se à utilização do sistema de expressão contendo o forte promotor pET. Devido às proteínas estarem em corpo de inclusão, foi utilizado o protocolo de solubilização e renaturação da proteína, a qual ficou agitando em tampão de solubilização/ligação contendo o forte agente ureia (8 M) em temperatura ambiente durante 1 hora. Em seguida a amostra foi centrifugada e filtrada (filtro 0,45 μ m), para realização da purificação (Figura 16). (GE Healthcare; 2009).

Figura 16 - Purificação de lacase (CsLac/pET-303/NT-His), por cromatografia de afinidade, utilizando a coluna His-Trap Chelating de 5 mL (VC) e tampão para a eluição da proteína Tris-HCl 20 mM; NaCl 0,5 M; Imidazol 0,5 M, pH 8,0. Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

A purificação da lacase utilizando o vetor pET em gradiente de purificação com a coluna His-Trap Chelating de 5 mL (VC) foi facilitada pela presença da cauda de histidina contida na região N-terminal, proporcionando a obtenção da proteína pura.

A Figura 17 mostra a análise por eletroforese em gel SDS-PAGE (12,5%) na qual foi observado que a proteína lacase recombinante após ser tratada utilizando o protocolo de solubilização e renaturação, foi purificada.

Figura 17 - Análise por eletroforese em gel SDS-PAGE (12,5%) da expressão e purificação da proteína lacase (CsLac/pET-303/NT-His) de 57,7 kDa em *E. coli* BL21 (DE3) star a partir de corpo de inclusão. (MW) peso molecular Marker Dual Color (Biorad). (1) Cultura bacteriana não induzida; (2) cultura bacteriana induzida; (3) lisado bacteriano (solúvel); (4-6) Frações 13, 14 e 15 coletadas pela coluna His-Trap Chelating de 5 mL (VC), por meio da purificação por cromatografia de afinidade. Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

Após o processo de recuperação da proteína, foi verificado que ela estava inativa. A seguir são mostradas outras maneiras de obter a proteína solúvel e pura utilizando diferentes vetores, cepas e condições de cultura, como por exemplo, *E. coli* BL21 com CsLac/pFLAG-CTS e CsLac/pTrc-HisA e *E. coli* AERP (DE3) com CsLac/pET-303/NT-His, este último foi expressando a proteína em baixa temperatura, os procedimentos estão descritos em materiais e métodos (Figura 18). A proteína lacase foi produzida em ambas as condições citadas sendo possível identificar a purificação da enzima realizada por cromatografia de afinidade, no entanto foi constatado em teste de atividade enzimática que ela não está na forma ativa.

Figura 18 – (A; B e D) Análise por eletroforese em gel SDS-PAGE (12,5%) da expressão de lacase de 57,7 kDa. (A) Expressão de (CsLac/pET-303/NT-His) em *E. coli* BL21 AERP (DE3). (MW) peso molecular Marker Dual Color (Biorad). (1) Cultura bacteriana não induzida; (2) cultura bacteriana induzida; (3) lisado bacteriano (solúvel); (4) lisado bacteriano (precipitado). (B) Expressão de (CsLac/pET-303/NT-His) em *E. coli* BL21 (DE3). (MW) peso molecular Marker Dual Color (Biorad). (1) Cultura bacteriana não induzida; (2) cultura bacteriana induzida; (3) lisado bacteriano (solúvel); (4-5) frações coletadas após a purificação. (C) Esquema do plasmídeo de expressão CsLac/pFLAG-CTS de 6975 pb para a produção de lacase recombinante. (D) Expressão de lacase (CsLac/pFLAG-CTS) em *E. coli*. (MW) peso molecular Marker Dual Color (Biorad). (1) Cultura bacteriana não induzida; (2) cultura bacteriana induzida; (3) lisado bacteriano (solúvel); (4) lisado bacteriano precipitado; (5) proteína coletada do periplasma lac1; (6) proteína coletada do periplasma lac2; (7) precipitado bacteriano; (8) proteína coletada do periplasma concentrada 1 e (9) proteína coletada do periplasma concentrada 2. Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

Para a última construção (Figura 19), foi utilizada a sequência do gene da enzima lacase presente no vetor pET-303/NT-His representado na Figura 14. Para o PCR foi utilizado os oligonucleotídeos (CsLac/trc-F e CsLac/trc-R), mostrados na Tabela 1. Após a obtenção do PCR foi feita a clonagem, através da ligação do inserto no vetor pTrc-HisA (Invitrogen, USA) obtendo o plasmídeo CsLac/pTrc-HisA de 6001pb.

Figura 19 - Esquema do plasmídeo de expressão CsLac/pTrc-HisA 6001 pb para a produção da proteína lacase recombinante de *Cochliobolus sativus*. Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

O vetor pTrc-HisA contendo o inserto para lacase, foi amplificado por PCR e a análise do resultado foi feita através da eletroforese em gel de agarose 1%, como mostrado na Figura 20, na qual foi observado o resultado positivo da amplificação do gene CsLac de 1575 pb.

Figura 20 - Análise por eletroforese em gel de agarose 1% do produto de PCR amplificado. Gene CsLac de 1575 pb. (MW) Marcador de peso molecular New 1 Kb ladder. (1-5) amostras. Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

Após a construção do plasmídeo de interesse, foi feita a clonagem em cepa bacteriana, através da transformação utilizando a bactéria *E.coli* BL21. As colônias bacterianas obtidas foram cultivadas individualmente em meio LB/ampicilina por 16h/37°C/150rpm, em seguida foi feito uma reação de PCR para confirmar se os clones possuíam o plasmídeo de interesse. Na Figura 21 é possível ver que a clonagem do gene foi bem sucedida.

Figura 21 - Análise por eletroforese em gel de agarose 1% dos clones selecionados com o vetor CsLac/pTrc-HisA, contendo o inserto de 1575 pb. (MW) Marcador de peso molecular New 1 Kb ladder. (1-8) confirmação dos clones positivos. Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

Depois de confirmada a construção do vetor CsLac/pTrc-HisA, foi realizada a expressão da enzima recombinante em meio de cultura líquido LB/ampicilina até atingir $OD_{600} \approx 0,8$, seguido de recuperação da massa celular por centrifugação e indução por IPTG por 6 horas a $37^{\circ}\text{C}/150\text{rpm}$ em meio de cultura M9.

Após o período de 6 horas induzido, a cultura foi coletada por centrifugação e o pélete bacteriano foi ressuspensão em tampão de sonicação Tris-HCl 20 mM e sonicado. Depois da lise celular a amostra foi centrifugada novamente para a separação da fração sobrenadante e precipitado e a análise foi feita por eletroforese em gel SDS-PAGE (12,5%), apresentado na Figura 22.

Figura 22 - Análise por eletroforese em gel SDS-PAGE (12,5%) da expressão da proteína lacase (CsLac/pTrc-HisA) de 57,7 kDa. (MW) marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Standards, BIO-RAD); (1) cultura não induzida; (2) cultura induzida; (3) sobrenadante da cultura lisada e (4) precipitado da cultura lisada. Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

Por meio de análise por eletroforese em gel SDS-PAGE (12,5%) foi possível identificar que maioritariamente a proteína foi expressa na forma solúvel (coluna 3, Figura 22). Após confirmada a solubilidade, foi feito o isolamento da

proteína derivada do sobrenadante da amostra, através da purificação por cromatografia de afinidade. O vetor pTrc-HisA possui uma cauda de 6 histidinas no extremo N-terminal. Seguindo esta metodologia, a proteína foi eluída de 0 a 100% em gradiente linear com Imidazol. A pureza da enzima foi confirmada em gel SDS-PAGE (12,5%).

A Figura 23 mostra o cromatograma fornecido pelo sistema AKTA FPLC, na qual observamos a purificação realizada da proteína lacase recombinante em meio de cultura M9 suplementado com solução de metais.

Figura 23 – Purificação da proteína lacase (CsLac/pTrc-HisA) por cromatografia de afinidade, utilizando a coluna His-Trap Chelating de 5 mL (VC) e tampão para a eluição da proteína Tris-HCl 20 mM; NaCl 0,5 M; Imidazol 0,5 M, pH 8,0. Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

A purificação de lacase utilizando o vetor pTrc-HisA em gradiente de purificação com a coluna His-Trap Chelating de 5 mL (VC), proporcionou a obtenção da proteína recombinante em grande quantidade.

A Figura 24 mostra a análise da purificação por eletroforese em gel SDS-PAGE (12,5%), na qual observamos um alto grau de pureza da proteína produzida.

Figura 24 - Análise por eletroforese em gel SDS-PAGE (12,5%) das frações puras de lacase (CsLac/pTrc-HisA) de 57,7 kDa, coletadas pela coluna His-Trap Chelating de 5 mL (VC), por meio da purificação por cromatografia de afinidade. (MW) marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Standards, BIO-RAD); 1-4 frações purificadas (FP). (1) F18; (2) F19; (3) F20 e (4) F21. Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

Sucessivas purificações demonstraram a pureza da lacase recombinante realizada por cromatografia de afinidade, no entanto, ensaios de atividade enzimática não mostraram a enzima ativa, uma barreira comum na expressão heteróloga da proteína lacase e um dos motivos pode estar relacionado a sua conformação e modificações pós traducionais que ocorrem naturalmente em células eucarióticas fúngicas e que bactérias não são metabolicamente capazes de realizar. (Yoshitake et al., 1993; Couto; Herrera, 2007; Mandic et al., 2019).

Após a obtenção da fração pura, a enzima foi dialisada, liofilizada e quantificada (639,87 $\mu\text{g/mL}$) para posterior ensaio de caracterização imunológica.

Figura 25 - Análise por eletroforese em gel SDS-PAGE (12,5%) da amostra liofilizada (L1 e L2) de lacase (CsLac/pTrc-HisA) de 57,7 kDa. Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

A Tabela 4 apresenta um resumo das diversas condições testadas para obtenção da proteína lacase recombinante na forma ativa.

Tabela 4 - Condições testadas para expressão e obtenção de atividade da proteína lacase recombinante.

Procedimento/Vetor	pET303-NT His	pTrc-HisA	pFLAG-CTS
Característica	Promotor pET, proteína no citoplasma	Promotor pTrc, proteína no citoplasma	Promotor pTac, proteína no periplasma
<i>E.coli</i>			
Bactéria <i>E. coli</i> utilizada para produção	BL21(DE3) star, <i>E.coli</i> BL21 AERP (DE3) - contendo chaperonas	<i>E.coli</i> BL21	<i>E.coli</i> BL21
Meio de cultura para indução	LB-líquido	LB-líquido, MM9	LB-líquido
Tempos de indução	4, 6, 8, 18 h	6 h	18 h
Extração da Proteína recombinante	Sonicação em diversas condições	Sonicação em diversas condições	Choque osmótico
Proteína recombinante	Em corpos de Inclusão	Solúvel	Solúvel
Ensaio de desnaturação/renaturação	Sim	Sim	Não
Purificação	Sim, cromatografia de afinidade	Sim, cromatografia de afinidade	Não
Ensaio de atividade	Não ativa	Não ativa	Não ativa

Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

Ma et al. (2017) relataram que a lacase recombinante ativa do fungo ascomiceto *Setosphaeria turcica* foi clonada e expressa em *E. coli* por inserção do plasmídeo pET-30^a. Por outro lado, diversos estudos demonstraram que oxidorreduções fúngicas clonadas em *E. coli* resultaram constantemente na formação de corpo de inclusão e a reconstituição da proteína na forma ativa só foi possível após o tratamento incessante com agentes de solubilização como ureia, seguido de renaturação proteica, ou testando outra possibilidade, como a superprodução nos hospedeiros homólogos, uma vez que a produção de oxidorreduções em fungos que degradam biomassa lignocelulósica, ocorre naturalmente durante o metabolismo secundário, apesar dos rendimentos de lacase serem variáveis dependendo da espécie e linhagem (Conesa et al., 2001; Mollania et al., 2013; Sánchez-Trasviña et al., 2017). O sistema de expressão com a levedura *Pichia pastoris* é utilizado para produzir enzimas em escala industrial, mas enzimas ligninolíticas como lacases heterólogas são notoriamente difíceis de expressar (Yang et al., 2017), em função disso, neste trabalho foi feita a produção da enzima lacase nativa obtida a partir da cultura de *Cochliobolus sativus* em meio de cultura contendo o bagaço de cana-de-açúcar como substrato, apresentada nos itens a seguir.

4.5 PRODUÇÃO DAS ENZIMAS NATIVAS OXIDORREDUTASES DE *Cochliobolus sativus*

Foi feita a cultura do fungo *Cochliobolus sativus* no meio BDC por três dias, a massa micelial recuperada por centrifugação foi transferida para o meio de cultura MSB e em seguida acrescido com solução de metais, 0,5% de bagaço de cana-de-açúcar e após três dias foi induzido com sulfato de cobre 0,5 mM.

Diversos estudos demonstraram a participação das enzimas oxidorreduções no processo de degradação da biomassa lignocelulósica. (Hossain; Anantharaman, 2006; Guerra et al., 2008; Aguiar; Ferreira; Monteiro, 2010; Martínez et al., 2017), onde a lacase se destaca no processo utilizando o bagaço da cana-de-açúcar como substrato. (Meza et al., 2006; Adav et al., 2012; Karp et al., 2012; Hernández et al., 2017).

Alíquotas foram retiradas diariamente até o 17º dia para análises de atividade enzimática das enzimas oxidoredutases lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase, respectivamente. (Figura 26).

Figura 26 - Atividade das enzimas oxidoredutases produzidas por *Cochliobolus sativus*. LAC (lacase); LIG (lignina peroxidase) e MNP (manganês peroxidase). O fungo foi cultivado durante 17 dias em meio MSB contendo bagaço de cana-de-açúcar (0,5%) a 30°C. A lacase nativa mostrou maior atividade no 10º dia de cultivo com 102,81 U/L, enquanto a lignina peroxidase apresentou 76,95 U/L no 5º dia e manganês peroxidase 4,3 U/L no 4º dia. (1U) 1 unidade de atividade enzimática corresponde a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 µM de substrato por minuto. Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

A Figura 26 mostra que a enzima lacase apresenta maior atividade em relação às enzimas peroxidases. A atividade de lacase apresentou maior oscilação entre o dia que antecedeu a indução com 8,2 U/L e o 4º dia de cultivo, momento em que completou 24 horas de ativação obtendo 35,79 U/L, aumentando gradativamente do 4º ao 10º dia de cultivo (35,79 U/L; 86,94 U/L; 94,20 U/L; 99,24 U/L; 100,754 U/L e 102,81 U/L). Nos dias seguintes ocorreu uma diminuição sucessiva da atividade de lacase que apresentou 97,26 U/L; 79,60 U/L e 72,77 U/L, entre o 12º e 14º dia respectivamente. Um estudo monitorou a produção de lacase em meio MSB durante 20 dias com os fungos *T. versicolor*, *D. squalens*, *P. fascicularia* e *P. oridensis* que apresentaram 15

U/L, 60 U/L, 1.750 U/L e 100 U/L respectivamente, onde a produção máxima correspondeu ao 8º, 10º e 18º dias para *P. oridensis*, *P. fascicularia* e *D. squalens*. (Arora, 2000).

O ensaio correspondente à Figura 26, teve como objetivo analisar a produção de lacase nativa diretamente do cultivo fúngico, verificar o período de maior atividade da enzima e compara-la à expressão das peroxidases, utilizando um meio de cultura específico para a sua produção. Nesse contexto, foi possível verificar que a lacase aumentou gradativamente após a indução, com maior atividade no 10º dia de cultivo que correspondeu ao 6º dia de indução, comparado à lignina peroxidase com maior atividade no 3º dia após a indução e que apresentou oscilação na atividade entre o 5º e o 11º dia de cultivo, enquanto manganês peroxidase possuiu a menor atividade.

Um estudo comparativo da produção quantitativa de lacase utilizando diferentes meios de cultura, entre eles o meio MSB, mostrou que produtos de degradação da biomassa vegetal podem estar atuando como indutores de lacase. *Phlebia radiata* e *Daedalea flavigra* foram mais sensíveis ao efeito indutivo de vários resíduos agrícolas. A produção de lacase por fungos de podridão branca como *P. radiata* foi aumentada 222 vezes com a adição de bagaço de cana-de-açúcar em meio MSB (meio de sais minerais) enquanto para *D. flavigra* o aumento foi de cerca de 170 vezes na suplementação de palha de trigo em meio MEB (meio de extrato de malte). O bagaço de cana-de-açúcar tem sido descrito como um substrato melhor para a produção de lacase também por *Flavodon flavus* (Arora, 2001). O substrato de bagaço de cana rico em lignina demonstra deste modo, que as linhagens apresentaram atividades enzimáticas ligninolíticas similares aos encontrados na literatura. (Menezes et al., 2009; Ribeiro et al., 2013; Marx et al., 2013).

No 17º dia de cultivo de *Cochliobolus sativus* a massa micelial foi recuperada por centrifugação, o sobrenadante foi tamponado em Tris-HCl 20 mM e em seguida 50 mL da amostra foi aplicada no sistema AKTA FPLC, para purificação das proteínas nativas sem a etapa de precipitação. Com as frações

obtidas da purificação foi feito um ensaio de atividade enzimática em condição não desnaturante no gel nativo (zimograma). Foi possível visualizar a atividade da enzima lacase, mostrada por bandas de cor verde na ausência de luz, após 30 minutos de incubação com ABTS 2 mM em tampão tartarato de sódio 250 mM, pH 4,0 a 37°C. (Figura 27).

Figura 27 - Determinação da atividade enzimática de lacase em PAGE-nativo (12,5%) incubado com ABTS (2 mM). (1) Fração 1 da purificação; (2) Fração 2 da purificação; (3) Fração 3 da purificação e (4) Fração 4 da purificação. Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

Estudos qualitativos utilizam o zimograma em condições similares para verificar a atividade de lacase. O fungo *Trametes hirsuta* Bm-2 produziu uma lacase de 65 kDa, em meio de cultura contendo farelo de trigo, que pôde ser revelada com ABTS 2,5 mM em tampão acetato 100 mM, pH 5,0 (Castillo et al., 2012), enquanto a lacase de *Aspergillus flavus* MFw3 de 68 kDa foi relevada com ABTS 5 mM em tampão acetato de sódio pH 4,5 (Aftab et al., 2019).

A atividade de lacase foi confirmada por espectrofotometria e zimograma. Após monitorar e padronizar sua produção em meio de cultura MSB contendo bagaço da cana-de-açúcar e indução por sulfato de cobre, a proteína foi produzida e ativada por sete dias para posteriormente ser precipitada.

Alíquotas de 1 mL foram retiradas do meio de cultura do 1º ao 7º dia após a indução, para análises de atividade enzimática de lacase com obtenção de 195,83 U/L; 231,38 U/L; 264,30 U/L; 279,86 U/L e 260,83 U/L nos dias 1, 4, 5, 6 e 7, respectivamente (Figura 28). Vázquez et al. (2019) relataram que há um padrão semelhante para a maioria dos fungos lignolíticos como *Curvularia kusanoi* L7, que expressam sua atividade mais alta ao 7º dia em meio líquido.

Figura 28 - Atividade da enzima lacase produzida por *Cochliobolus sativus*. O fungo foi cultivado em meio MSB contendo bagaço de cana-de-açúcar (0,5%) a 30°C com indução por sulfato de cobre durante 7 dias. (1) 195,83 U/L; (4) 231,38 U/L; (5) 264,30 U/L; (6) 279,86 U/L e (7) 260,83 U/L. (1U) 1 unidade de atividade enzimática corresponde a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μ M de substrato por minuto Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

4.6 PURIFICAÇÃO DA ENZIMA LACASE DE *Cochliobolus sativus*

Para realizar a purificação da enzima lacase a partir do sobrenadante da cultura de *Cochliobolus sativus*, foi utilizado o método de precipitação descrito por Brazkova et al. (2017), com a finalidade de reduzir o volume da amostra. Alíquotas da cultura foram retiradas no 3º dia de cultivo em meio MSB e testadas para verificar a melhor condição de precipitação em etanol. Gradualmente foi adicionado à amostra concentrações variadas de etanol absoluto, em um volume final de 50%, 60%, 70%, 80% e 90%. As amostras foram armazenadas por 2 horas a -20°C. Após esse período o sobrenadante foi centrifugado a 8000rpm/10min/4°C e a amostra seca a 37°C. O precipitado foi suspenso em tampão tartarato de sódio, 250 mM, pH 4,0 para medir a atividade enzimática de lacase com o substrato ABTS, a leitura foi feita a 420 nm.

Figura 29 – Teste enzimático utilizando concentrações variadas do agente de precipitação etanol. 50% (951,03 U/L); 60% (751,80 U/L); 70% (427,07 U/L); 80% (326,45 U/L) e 90% (164,72 U/L). (1U) 1 unidade de atividade enzimática corresponde a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μ M de substrato por minuto. Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

Na Figura 29, observa-se a variação da atividade enzimática em diferentes concentrações de etanol. Foi possível confirmar que a melhor condição para a precipitação proteica foi a 50%, esses dados foram utilizados para concentrar as proteínas produzidas antes da purificação.

Novas culturas foram produzidas utilizando o meio específico MSB para a produção da enzima oxidoredutase. O meio foi suplementado com solução de metais e 0,5% de bagaço de cana-de-açúcar, com indução no 3º dia de cultivo com sulfato de cobre 0,5 mM. (Arora, 2000). A incubação foi mantida a 30°C/150rpm até o 7º dia de induzido, em seguida a cultura foi coletada por centrifugação a 5.000rpm/10min/4°C e filtrada com papel filtro (0,45 μ m - Cellulose Nitrate Membrane Filters – Whatman), para obtenção do sobrenadante contendo as proteínas nativas.

O sobrenadante filtrado seguiu o procedimento de precipitação descrito anteriormente e a amostra foi tamponada em 50 mL de Tris-HCl 20 mM para ser aplicada no sistema AKTA FPLC de purificação de proteínas nativas, por cromatografia de troca iônica em etapas escalonadas de 25%, 50%, 75% e 100% NaCl, utilizando a coluna Q-sepharose (10 mL) VC. A Figura 30 mostra o cromatograma obtido da purificação onde as frações eluídas a 50% apresentam-se ativas.

Figura 30 – Cromatograma apresentando o perfil de purificação da enzima nativa utilizando a coluna Q-sepharose 10 mL (VC). A purificação apresenta frações ativas que foram eluídas a 50% NaCl. Frações: F25: 3.144,44, F26: 833,33 U/L. Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

Após a etapa de purificação foi feito o ensaio de atividade enzimática das frações puras por espectrofotometria em leitura de 420 nm, utilizando o substrato ABTS. (Figura 31).

Figura 31 - Atividade enzimática da fração pura da lacase nativa de *Cochliobolus sativus*. Frações: F25: 3.144,44 e F26: 833,33 U/L. (1U) 1 unidade de atividade enzimática corresponde a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μ M de substrato por minuto. Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

Na análise da purificação por eletroforese em gel SDS-PAGE (12,5%), foi verificado que as frações apresentam mais que uma banda proteica.

Figura 32 - Análise por eletroforese em gel SDS-PAGE (12,5%) das frações puras de lacase nativa de *Cochliobolus sativus*. (F25) Fração 25 purificada; (F26) Fração 26 purificada; (F27) Fração 27 purificada e (C) Lacase recombinante liofilizada utilizada como controle. Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

Devido à amostra purificada obtida da cultura de *Cochliobolus sativus* conter contaminantes, observado nas purificações da enzima nativa, frações com o mesmo perfil (eluídas com NaCl a 50% e ativas) foram combinadas para a 2ª etapa da purificação, com o intuito de obter uma fração pura da enzima concentrada e livre de contaminantes produzidos pelo fungo. Vázquez et al. (2019) relataram que na mesma cultura, podem ser encontradas várias isoenzimas produzidas pelo mesmo fungo. Sendo essa objeção comum, muitos estudos descrevem que a eficácia na obtenção da enzima nativa pura foi demonstrada após duas ou mais etapas da purificação. (Ellouz; Durand; Tiraby, 1987; Forootanfar et al., 2011; Vantamuri; Kaliwal, 2016).

Para atingir o objetivo da obtenção de uma fração pura da enzima de interesse contendo atividade, foi escolhido o método de purificação por cromatografia de troca iônica, com a utilização da coluna Q-sepharose HR 1 mL (VC). As etapas de equilíbrio e lavagem foram feitas com tampão A (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0) e para a eluição da proteína foi utilizado o tampão B (Tris-HCl 20 mM + NaCl 1 M pH 8,0).

Figura 33 - Cromatograma apresentando o perfil de purificação da enzima nativa utilizando a coluna Q-sepharose HR 1 mL (VC). A purificação apresenta frações ativas. Frações: F7: 341,66 U/L; F10: 197,22 U/L; F11: 3.264,32 U/L; F12: 466,66 U/L; F13 2,77 U/L; F14 -8,33 U/L. Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

Após a cromatografia foi feito um ensaio de atividade com as frações obtidas, sendo possível observar que a fração 11 obteve maior atividade (3.264,32 U/L) correspondente ao pico do gradiente de purificação.

Figura 34 - Atividade enzimática da fração pura da lacase nativa de *Cochliobolus sativus*. C- (controle negativo) e Frações: F7: 341,66 U/L; F10: 197,22 U/L; F11: 3.264,32 U/L; F12: 466,66 U/L; F13 2,77 U/L e F14 -8,33 U/L. (1U) 1 unidade de atividade enzimática corresponde a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μ M de substrato por minuto. Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

A análise da purificação foi feita por eletroforese em SDS-PAGE (12,5%), indicando que a fração 11 além de ativa, apresenta-se pura.

Figura 35 - Análise por eletroforese em gel SDS-PAGE (12,5%) da fração pura de lacase nativa. (MW) marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Standards, BIO-RAD); (1) Fração 11 purificada. Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

Analisando o resultado da purificação, nota-se que a proteína nativa tem a massa molecular muito semelhante a lacase recombinante de 57,7 kDa de *Cochliobolus sativus*, tamanhos aproximados entre 50 e 60 kDa são típicos entre lacases expressas por diferentes fungos de podridão branca, como *Panaeolus sphinctrinus* de 50 kDa (Heinzkill et al., 1998); *Pleurotus sajor-caju* Lac4 de 59 kDa (Soden et al., 2002); *Trametes pubescens* LAP2 de 65 kDa (Galhaup et al., 2002); *Lepista nuda* de 56 kDa (Zhu et al., 2016); *Aspergillus nidulans* CASVK3 de 66 kDa (Vivekanandan; Sivaraj; Kumaresan, 2014) e *Cerrena unicolor* GSM-01 de 63,2 kDa (Wang et al., 2017).

Com a fração purificada, foi feita a quantificação da proteína pelo método de Bradford e leitura a 595 nm. O resultado mostrou que a proteína obtida na forma pura foi 291,07 µg/mL. Esse dado foi utilizado para realizar os ensaios enzimáticos e ensaio imunológico.

A Tabela 5 apresenta as etapas utilizadas para a purificação da enzima lacase produzida por outros gêneros fúngicos.

Tabela 5 – Purificação de lacase extracelular de *Cochliobolus sativus* comparada a outros gêneros de fungos.

Fungo	Purificação	mg/mL	U/mg	Referência
<i>Pleurotus ostreatus</i>	1) Precipitação 80% de sulfato de amônio 2) Precipitação protamina sulfato 1% 3) DEAE Sephadex A-50 4) Ultrafiltração 5) Sephacryl S-200HR 6) Ultrafiltração 7) DEAE 5PW	1,8	3,00	Youn et al., 1995.
<i>Marasmius quercophilus</i>	1) Filtração 2) Ultrafiltração 3) Q-Sepharose 4) Sephacryl S-200 5) Chelating Sepharose(Cu)	18,8	13	Dedeyan et al., 2000.
<i>Trichoderma harzianum WL1</i>	1) Precipitação acetona 66% 2) Filtragem por membrana 3) Sephadex G-4 4) Concanavalin-A	0,02	130,5	Sadhasivam et al., 2008.
<i>Paraconiothyrium</i>	1) Precipitação 80% sulfato de amônio 2) Q-Sepharose XL 3) Precipitação sulfato de amônio 4) Sephadex G-100	0,32	18,4	Forootanfar et al., 2011.
<i>Trametes pubescens</i>	1) Ultrafiltração 2) Q-Sepharose 3) DEAE-Celulose	0,11	9,25	Gonzalez et al., 2013.
<i>Mycena purpureofusca</i>	1) Precipitação acetona 2) DEAE-Sepharose 3) Sephadex G-100	7,8	9,38	Sun et al., 2013.
<i>Pleurotus fossulats (MTCC 1800)</i>	1) Precipitação 80% sulfato de amônio 2) DEAE-Sephadex A-50	12,78	5,39	Chowdhury et al., 2014.
<i>Aspergillus nidulans CASVK3</i>	1) Ultrafiltração 2) Sulfato de amônio 80% 2) DEAE-Celulose 3) Biogel P-200	30	9,10	Vivekanandan; Sivaraj; Kumaresan, 2014.

<i>Marasmius BBKAV79</i>	1) Precipitação 80% sulfato de amônio 1) Sephadex G-100 2) DEAE-celulose	2,16	0,22	Vantamuri; Kaliwal, 2016.
<i>Trametes pubescens</i>	1) 80% sulfato de amônio 2) nd	4,45	3,55	Aruwa; Christiana, 2018.
<i>Deconica castanella</i>	1) Precipitação sulfato de amônio 2) Filtração 3) Ultrafiltração 4) Sephadex G-200	0,73	31,9	Coelho et al., 2019.
<i>Cochliobolus sativus</i>	1) Precipitação 50% etanol 2) Filtração 3) Q-sepharose 4) Q-sepharose HR	0,29	11,25	O estudo.

Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

Nota-se na Tabela 5 que a maioria das purificações de lacase nativa ocorre em pelo menos duas etapas. A lacase do fungo *Cochliobolus sativus* apresentou 11,25 U/mg em sua fração pura, valor esse comparável a lacases purificadas de outros fungos produtores da enzima, tendo como exemplo, *Mycena purpureofusca* (Sun et al., 2013) e *Aspergillus nidulans* CASVK3 (Vivekanandan; Sivaraj; Kumaresan, 2014) com 9,38 U/mg e 9,10 U/mg, respectivamente, e quando comparado a *Trametes pubescens* 3,55 U/mg (Aruwa; Christiana, 2018) e a *Marasmius BBKAV79* 0,22 U/mg (Vantamuri; Kaliwal, 2016), apresenta 3 e 50 vezes mais U/mg, respectivamente, porém em relação a *Deconica castanella* 31,9 U/mg (Coelho et al., 2019) e a *Trichoderma harzianum* WL1 130,5 U/mg (Sadhasivam et al., 2008) apresenta 2,8 e 11,6 vezes menos U/mg da enzima.

4.7 Western Blot

A confirmação da identidade da proteína expressa e purificada foi feita por meio de *Western Blot* utilizando o anticorpo policlonal de lacase recombinante (anticorpo de camundongo) e na mesma membrana foi realizada o método de coloração com Ponceou que confirmou a localização das proteínas.

Figura 36 – *Western Blot* contendo as amostras de lacase nativa e lacase recombinante expressa com o vetor pTrc-HisA (MW). Marcador de peso molecular Biorad; (1) proteína lacase nativa 10 μ g e (2) controle positivo lacase recombinante 10 μ g. Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

Após o ensaio imunológico a atividade da enzima foi medida para formar a curva padrão em função da concentração do substrato e a curva padrão de formação de produto. Primeiramente, foi feito o ensaio enzimático em diferentes concentrações da proteína (μ g/mL) para posteriormente obter dados sobre a velocidade máxima da reação determinando os parâmetros cinético-enzimáticos seguindo o modelo de Michaelis-Menten. A Figura 37 mostra que quanto mais intensa a coloração verde, maior é a concentração da enzima.

Figura 37 - Ensaio de atividade enzimática determinada com o substrato ABTS, utilizando diferentes concentrações de lacase. (1) 3 μ g; (2) 2 μ g; (3) 1 μ g; (4) 0,25 μ g; (5) controle negativo com ABTS e sem a presença da enzima; (6) 0,75 μ g; (7) 0,6 μ g; (8) 0,5 μ g; (9) 0,25 μ g e (10) controle negativo. Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

4.8 CINÉTICA ENZIMÁTICA

Os parâmetros cinéticos da atividade de lacase nativa (Tabela 6) foram determinados através da utilização do substrato ABTS. Para determinar os parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}), os ensaios foram feitos com a amostra purificada na concentração de 1 μ g. Foram utilizadas sete concentrações diferentes no intervalo entre 0,05 e 7 mM de substrato.

A Figura 38 mostra a cinética de Michaelis-Menten, seguida pela enzima lacase, análise do GraphPad e do plot duplo-recíproco ou plot de Lineweaver-Burk que permitiu determinar os parâmetros cinéticos de K_m e V_{max} , sendo de 0,094 mM e 1,621 mM. s⁻¹, respectivamente.

Figura 38 - Efeito da concentração do substrato ABTS na velocidade inicial de reação da enzima lacase nativa. Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

Em experimentos para a determinação de parâmetros de cinética enzimática, busca-se aumentar a concentração de substrato com o objetivo de saturar a enzima e se obterem dados sobre a velocidade máxima da reação, pois, em concentrações altas do substrato, todos os sítios ativos da enzima são ocupados e a reação torna-se independente da concentração do substrato, uma vez que não há como formar mais complexos enzima-substrato. Nas condições testadas foi obtida a saturação de lacase, apresentando um valor de K_m similar a 94,11 μM (Tabela 6).

Tabela 6 - Dados comparativos dos parâmetros de cinética enzimática* de enzimas lacase de diferentes organismos.

Fungo	kDa	pH	Km (mM)	Vmax ($\mu\text{M.s}^{-1}$)	Referência
<i>Rhizoctonia solani</i> <i>Lcc4</i>	n.d	5,3	0,05	n.d	Xu et al., 1996.
<i>Panaeolus sphinctrinus</i>	50	5,0	0,03	n.d	Heinzkill et al., 1998.
<i>Coprinus cinereus</i> <i>Lcc1</i>	n.d	5,5	0,02	n.d	Schneider et al., 1999.
<i>Pleurotus sajor-caju</i> <i>Lac4</i>	59	3,3	2,5	n.d	Soden et al., 2002.
<i>Trametes pubescens</i> <i>LAP2</i>	65	3,0	0,01	n.d	Galhaup et al., 2002.
<i>Thielavia arenaria</i> <i>Lcc1</i>	n.d	4,5	0,07	n.d	Paloheimo et al., 2010.
<i>Lepista nuda</i>	56	3,0	0,19	195	Zhu et al., 2016.
<i>Leucoagaricus naucinus</i> LAC-04	56	2,2	0,05	n.d	Ning et al., 2016.
<i>Marasmius</i> BBKAV79	75	5,5	3,03	n.d	Vantamuri; Kaliwal, 2016.
<i>Aspergillus nidulans</i> CASVK3	66	5,5	0,07	1530	Vivekanandan; Sivaraj; Kumaresan, 2014.
<i>Cerrena unicolor</i> GSM-01	63,2	3,0	0,3	13.6	Wang et al., 2017.
<i>Pestalotiopsis CDBT-F-G1</i>	43	6,0	0,10	n.d	Yadav et al., 2019.
<i>Cochliobolus sativus</i>	57,7	4,0	0,09	1621	O estudo.

*Determinados utilizando ABTS como substrato. *n.d, não determinado. Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

Na Tabela 6 observa-se que a lacase de *Cochliobolus sativus* apresenta o Km próximo de lacases de *Pestalotiopsis* CDBT-F-G1 (Yadav et al., 2019) e *Thielavia arenaria* Lcc1 (Paloheimo et al., 2010), enquanto tem o Km 34 e 28 vezes menor que as lacases de *Marasmius* BBKAV79 (Vantamuri; Kaliwal, 2016) e *Pleurotus sajor-caju* Lac4 (Soden et al., 2002), respectivamente. Já para *Trametes pubescens* LAP2 é 9 vezes maior (Galhaup et al., 2002).

4.9 pH ÓTIMO

O pH ótimo foi determinado com ensaio enzimático em que a enzima apresenta maior atividade. Utilizando o tampão acetato borato fosfato 20 mM em uma faixa de pH entre 3 – 12. O pH ótimo para lacase corresponde a pH 4,0, como apresentado na Figura 39.

Figura 39 - Efeito do pH na reação da enzima lacase nativa. Tampão acetato borato fosfato 20 mM. pH ótimo 4,0. Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

Apesar da maioria das lacases fúngicas serem funcionais em valores de pH mais ácido entre 2-5 (Ning et al., 2016; Sadhasivam et al., 2008). Yadav et al. (2019) relataram a atividade máxima de lacase em pH 6,0, enquanto os fungos *Botrytis cinerea* 61-34. (Slomczynski; Nakas; Tanenbaum, 1995) e *Penicillium chrysogenum* (Senthivelan et al., 2019) apresentaram pH ótimo 3,5 e 5,5, respectivamente, mais próximos ao pH de lacase produzido por

Cochliobolus sativus. Outros dados comparativos são apresentados na Tabela 7.

4.10 TEMPERATURA ÓTIMA E ESTABILIDADE TÉRMICA

O ensaio de temperatura ótima foi realizado em cinco temperaturas distintas 20-40°C com intervalo de 5°C, onde a temperatura ideal corresponde a 30°C, apresentado na Figura 40.

Figura 40 - Efeito da temperatura na reação da enzima lacase nativa. °C ótima a 30°C. Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

A atividade enzimática total da lacase purificada em temperatura ótima de 30°C foi de 3.820,83 U/L, seguido por 40°C (3.584,72 U/L), 35°C (3.519,44 U/L), 20°C (2.897,22 U/L) e 25°C (2.612,5) U/L respectivamente, semelhante a outras lacases, como de *Magnaporthe grisea* temperatura ótima a 30°C, seguido por 40°C, 50°C e 20°C (Iyer G; Chattoo BB, 2003); *Tricholoma mongolicum* com temperatura ótima a 30°C, seguido por 40°C e 20°C (Li et al., 2010) e *Leucoagaricus naucinus* LAC-04 com temperatura ótima a 30°C, seguido por 40°C e 50°C respectivamente. (Ning et al., 2016).

Por outro lado, as lacases de *Aspergillus flavus* (Gomaa OM; 1 Momtaz OA, 2015) e *Lepista nuda* (Zhu et al., 2016) possuem temperatura ótima a 50°C, seguido de 40°C e 30°C. Ai; Wang; Huang (2015) descreveram uma lacase

termoestável de *Trametes trogii* com temperatura ótima a 70°C seguido de 75°C e 65°C.

Na Tabela 7 pode-se verificar a relação entre temperatura e pH dos diferentes microrganismos comparados a *Cochliobolus sativus* onde a maioria tem o pH ótimo entre 2-5. Youn et al. (1995) relatou pH ideal menos ácido (pH 6,0), enquanto a temperatura ótima entre a maioria dos fungos produtores de lacase varia entre 25 e 35°C. Para Zhu et al. (2016) a melhor temperatura foi descrito a 50°C.

Tabela 7 - Dados comparativos de pH e temperatura ótimos de enzimas lacase de diferentes fungos.

Fungo	pH ideal	°C ideal	Referência
<i>Pleurotus ostreatus</i>	6,0	30	Youn et al., 1995.
<i>Trametes pubescens</i>	5,0	25	Sadhasivam et al., 2008.
<i>Trametes hirsuta</i>			Castillo et al., 2012.
<i>Bm-2</i>	4,0	40	
<i>Aspergillus nidulans</i> CASVK3.	5,5	25	Vivekanandan; Sivaraj; Kumaresan, 2014
<i>Lepista nuda</i>	3	50	Zhu et al., 2016.
<i>Leucoagaricus naucinus</i> LAC-04	2,2	30	Ning et al., 2016.
<i>Cerrena unicolor</i> GSM-01	2,5	45	Wang et al., 2017.
<i>Trichoderma harzianum</i> WL 1	4,5	35	Aruwa; Christiana, 2018.
<i>Pestalotiopsis</i> CDBT-F-G1	6,0	60	Yadav et al., 2019.
<i>Cochliobolus sativus</i>	4,0	30	O estudo.

*n.d, não determinado. Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

A Figura 41 mostra a estabilidade térmica da enzima utilizando a temperatura a 30°C como controle. A enzima lacase manteve maior estabilidade e atividade a 30°C durante no período de 1 hora em que foi testada, exibindo mais de 90% de sua atividade nos primeiros 60 minutos e com temperatura ideal na faixa de 10 e 50°C com 90% e acima de 70% de atividade, respectivamente. Na estabilidade térmica a 60°C metade da atividade da enzima já havia sido perdida nos primeiros 15 minutos, correspondendo a 50% da atividade.

Figura 41 – Estabilidade térmica na reação da enzima lacase nativa, utilizando a faixa de temperatura de 10°C a 80°C, apresentando maior atividade e estabilidade a 30°C. Fonte: Suelen de Barros Sampaio, 2019.

Um ensaio de estabilidade térmica monitorado em 60 minutos com a lacase de *Trametes versicolor* sintetizada por *Arxula adenivorans* mostrou uma temperatura ideal entre 35 e 55°C com uma atividade máxima a 50°C. Atividades mais baixas de 18,4 e 19,8% foram alcançadas realizando a reação no gelo ou a 70°C, respectivamente, onde metade da atividade é perdida a 60°C em 20,94 min. (Litwińska et al., 2019). A lacase de *Pestalotiopsis* CDBT-F-G1 foi determinada a temperaturas variando entre 20 a 80°C com temperatura ideal a 60°C, onde a enzima é relativamente estável entre 30 e 50°C por até 120 minutos, caindo significativamente dentro de 30 minutos a uma temperatura acima de 60°C. Em 60 minutos, a atividade de lacase a 70°C diminuiu 36% da

atividade inicial, enquanto após 180 minutos a 70°C a atividade de lacase diminuiu 95%. (Yadav et al., 2019).

Vázquez et al. (2019) em um ensaio de 60 minutos relataram que a lacase do fungo *Curvularia kusanoi* L7 testado na faixa de temperatura de 30 a 80°C, manteve sua atividade ideal na faixa de 30 a 40°C, semelhante a de *Cochliobolus sativus*, e observaram uma diminuição da atividade enzimática a partir de 50°C a medida que o tempo de incubação progredia, com perda brusca de atividade a 70°C e 80°C já nos primeiros 10 minutos de incubação, além disso, concluíram que provavelmente a variedade no comportamento das lacases fúngicas se deva ao fato de muitos microrganismos secretarem isoformas da enzima e terem sido encontradas como sendo do mesmo ou de outro gene que as codifica.

Embora preliminares, os resultados apresentados pela primeira vez neste estudo quanto à produção, purificação e caracterização bioquímica inicial da enzima lacase nativa de *C. sativus*, devem contribuir para o aprimoramento da obtenção da enzima ativa em maiores quantidades, aplicável ao processo de degradação da biomassa vegetal com a sua utilização em coquetéis enzimáticos, onde sua atividade é fundamental para obter os açúcares solúveis fermentáveis.

5 CONCLUSÃO

Este trabalho teve como objetivo identificar o fungo filamentoso BBF210, avaliar sua utilização na produção de enzima lacase em meio de cultura contendo bagaço de cana-de-açúcar, purificar e caracterizar a enzima lacase deste fungo, além de expressar e purificar a enzima lacase recombinante.

A identificação taxonômica e molecular do fungo BBF210 confirmou a identidade do fungo como sendo da espécie *Cochliobolus sativus*.

A metodologia de clonagem, expressão e purificação da lacase recombinante do fungo *C. sativus*, possibilitou a produção da enzima na forma solúvel e isolada, porém, inativa.

A proteína lacase nativa pura, foi obtida em duas etapas da purificação, sua atividade catalítica foi determinada com o substrato ABTS.

O pH e temperatura ótimos da enzima foram determinados a 4,0 e 30°C, respectivamente, com maior atividade e estabilidade térmica mantida a 30°C.

A determinação dos parâmetros cinético-enzimáticos da enzima nativa lacase do fungo *C. sativus*, apresenta as constantes catalíticas $K_m = 94,11 \mu\text{M}$ e $V_{\text{max}} = 1,62 \text{ mM s}^{-1}$.

Futuramente serão necessárias pesquisas para explicar as propriedades enzimáticas ao nível estrutural.

Os resultados apresentados têm o objetivo de fornecer informações sobre enzima lacase fúngica expressa na forma nativa pela espécie *C. sativus*. O conhecimento de suas características e propriedades bioquímicas podem ser importantes para posteriores investigações científicas mais aprofundadas em torno da caracterização bioquímica e estrutural da enzima, que além de ser do interesse de indústrias de biocombustíveis com a metodologia 2G, pode ter diversas aplicações biotecnológicas.

6 PERSPECTIVAS

Novas condições de cultura devem ser testadas para induzir o fungo *Cochliobolus sativus* a produzir maior quantidade da enzima lacase nativa para ser isolada e purificada, com a finalidade de obter resultados complementares ao de caracterização enzimática, além de clonar a lacase recombinante em novos vetores e cepas que expressem a enzima recombinante na forma solúvel e ativa.

REFERÊNCIAS²

- Adav SS, et al. Label free quantitative proteomic analysis of secretome by *Thermobifida fusca* on different lignocellulosic biomass. *Journal of Proteomics*. 2012 Jun;75(12):3694-3706.
- Aguilar MM; Ferreira LFR, Monteiro RTR. Use of vinasse and sugarcane bagasse for the production of enzymes by lignocellulolytic fungi. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2010 Oct;53(5):1245-1254.
- Ai MQ; Wang FF, Huang F. Purification and characterization of a thermostable laccase from *Trametes trogii* and its ability in modification of kraft lignin. *Journal Microbiology Biotechnology*. 2015 Aug;25(8):1361–1370.
- Antorini M, et al. Purification, crystallisation and X-ray diffraction study of fully functional laccases from two ligninolytic. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 2002 Jan;1594(1):109-114.
- Aftab M, et al. Investigation of novel laccase producing fungal species and its substrate specificity by wet and dry lab. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 2019 Sep;18(3):1233-1243.
- Arora DS, Gill PK. Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi. *Bioresource Technology*. 2001 Mar;77(1):89-91.
- Arora DS, Gill PK. Laccase production by some white rot fungi under different nutritional conditions. *Bioresource Technology*. 2000 Jul;73(3):283-285.
- Aruwa CE. Opuntia extractable and non-extractable (NEP) Residues as co-carbon sources for improved extracellular laccase production: Partial purification and characterization. *Biotechnology Journal International*. 2018 May;21(1):1-13.
- Bakri Y; Jawhar M, Arabi MIE. Improvement of xylanase production by *Cochliobolus sativus* in solid state fermentation. *Brazilian Journal Microbiology*. 2008 Sep;39(3):602-604.
- Beloqui A, et al. Novel polyphenol oxidase mined from a metagenome expression library of bovine rumen: biochemical properties, structural analysis, and phylogenetic relationships. *Journal of Biological Chemistry*. 2006 Aug 11;281(32):22933-42.
- Bengyella L, et al. Global invasive *Cochliobolus* species: cohort of destroyers with implications in food losses and insecurity in the twenty-first century. *Archives of Microbiology*. 2017 Aug;200(1):119–135.

² De acordo com Estilo Vancouver.

- Bengyella L, et al. Biotechnological application of endophytic filamentous bipolaris and curvularia: a review on bioeconomy impact. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2019 Apr; 35(5):35-69.
- Brazkova M, et al. Isolation, purification and characterization of laccase from the white-rot fungus *Trametes Versicolor*. *Engineering and Technology*. 2017 Mar;63(1):155-162.
- Brenelli L, et al. Laccase-derived lignin compounds boost cellulose oxidative enzymes AA9. *Biotechnology Biofuels*. 2018 Jan;11(1):10.
- Bugg TDH, Rahmanpour R. Enzymatic conversion of lignin into renewable chemicals. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2015 Dec;29:10-17.
- Cardona CA, Sánchez OJ. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology*. 2007 Sep;98(12):2415-2457.
- Castillo PZ, et al. Purification and characterization of laccase from *Trametes hirsuta* Bm-2 and its contribution to dye and effluent decolorization. *African Journal of Biotechnology*. 2012 Feb;11(15):3603-3611.
- Castro R, et al. Assessment of Sugarcane-Based Ethanol Production. *Fuel Ethanol Production from Sugarcane*. IntechOpen. 2018; doi:10.5772/intechopen.78301.
- Cázares-García; Vázquez-Garcidueñas, Vázquez-Marrufo. Structural and phylogenetic analysis of laccases from *Trichoderma*: A bioinformatic approach. *PLoS One*. 2013 Jan;8(1):e55295.
- Conesa A, et al. Fungal peroxidases: molecular aspects and applications. *Journal of Biotechnology*. 2001 Aug;93(2002):143–158.
- Couto SR, Herrera JLT. Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnology Advances*, 2007 Dec;25(6):558–569.
- Chowdhury R, et al. Isolation, culture optimization and physico-chemical characterization of laccase enzyme from *Pleurotus fossulatus*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 2014 Jan;17(2):173-181.
- Coelho GD, et al. Characterization of a thermostable *Deconica castanella* laccase and application toward pentachlorophenol degradation. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 2019 Jul;49(9):908-915.
- Conab. Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). V.6 - SAFRA 2019/20 - N.1 - Primeiro levantamento | MAIO 2019. Database [internet]. [cited 2019 May. 12]. Available from: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>.
- Condon BJ, et al. Comparative genome structure, secondary metabolite, and

effector coding capacity across *Cochliobolus* pathogens. Plos Genetics. 2013 Jan;9(1)e10003233.

Crop science. [homepage] *Cochliobolus sativus*. [cited 2017 Mar. 5]. Available from: <https://www.cropscience.bayer.com/en/crop-compendium/pests-diseases-weeds/diseases/cochliobolus-sativus>.

Da Silva AJ, et al. Blue native-PAGE analysis of *Trichoderma harzianum* secretome reveals cellulases and hemicellulases working as multienzymatic complexes. Proteomics. 2012 Aug;12(17):2729-2738.

Dashtban M, et al. Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. Int Journal Biochemical Molecular Biology. 2010 May;1(1):36–50.

Dedeyan B, et al. Biochemical and Molecular Characterization of a Laccase from *Marasmius quercophilus*. Applied and Environmental Microbiology. 2000 Mar;66(3):925–929.

Delabona PDS, et al. Understanding the cellulolytic system of *Trichoderma harzianum* P49P11 and enhancing saccharification of pretreated sugarcane bagasse by supplementation with pectinase and alpha-L-arabinofuranosidase. Bioresource Technology. 2013 Mar;131,500-507.

De Souza AP, et al. Composition and Structure of Sugarcane Cell Wall Polysaccharides: Implications for Second-Generation Bioethanol Production. BioEnergy Research. 2012 Nov;6(2)564-579.

Dias MOS, et al. Second generation ethanol in Brazil: can it compete with electricity production?. Bioresource Technology. 2011Oct;102(19):964-8971.

Dias MOS, et al. Integrated versus stand-alone second generation ethanol production from sugarcane bagasse and trash. Bioresource Technology. 2012 Jan;103(1):152–161.

Duke University. [homepage]. Vilgalys lab, 1992 Feb. [cited 2018 set. 10]. Available from: <https://sites.duke.edu/vilgalyslab/files/2017/08/rDNA-primers-for-fungi.pdf>.

Ducros V, et al. Crystal structure of the type-2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinereus* at 2.2 Å resolution. Nature Structural Biology. 1998 Apr;5: 310-316.

Eastwood DC, et al. The plant cell wall: Decomposing machinery underlies the functional diversity of forest fungi. Science. 2011 Aug;333(6043):762-765.

Ellouz S, Durand H, Tiraby G. Analytical separation of *Trichoderma reesei* cellulases by ion-exchange fast protein liquid chromatography. Journal of Chromatography. 1987 Jan;396,307-317.

Emami K, Hack E. Characterisation of a xylanase gene from *Cochliobolus sativus* and its expression. *Mycological Research*. 2001 Mar;105(3):352-359.

Falade AO, et al. Lignin peroxidase functionalities and prospective applications. *Microbiology Open*. 2016 Jun;6(1).e00394.

Fernández FE, et al. Ligninolytic peroxidase genes in the oyster mushroom genome: heterologous expression, molecular structure, catalytic and stability properties, and lignin-degrading ability. *Biotechnology Biofuels*. 2014 Jan;3-7(1):2.

Fetch TG, Steffenson BJ. Rating Scales for Assessing Infection Responses of Barley Infected with *Cochliobolus sativus*. *Plant Disease*. 1999 Mar;83(3):213–217.

Floudas D, et al. The paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes. *Science*. 2012 Jun;33(6089):1715-1719.

Fokina O, et al. Improving the performance of a biofuel cell cathode with laccase-containing culture supernatant from *Pycnoporus sanguineus*. *Bioresource Technology*. 2015 Jan;175,445-453.

Forootanfar H, et al. Purification and biochemical characterization of extracellular laccase from the ascomycete *Paraconiothyrium variable*. *Bioresource Technology*. 2011 Jan;102(2):1808–1814.

Galhaup C, et al. Characterization of the major laccase isoenzyme from *Trametes pubescens* and regulation of its synthesis by metal ions. *Microbiology*. 2002 Jul;148(Pt 7):2159-69.

Gold MH, Wariishi H, Valli K. Extracellular peroxidases involved in lignin degradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete Chrysosporium*. *Biocatalysis in Agricultural Biotechnology*. 1999 Jan;389(9):127-140.

Gomez del Pugar EM, Saadeddin A. The cellulolytic system of *Thermobifida fusca*. *Critical Reviews Microbiology*. 2014 Aug;40(3):236-247.

Gomaa OM, Momtaz OA. Copper induction and differential expression of laccase in *Aspergillus flavus*. *Brazilian Journal Microbiology*. Mar 2015;46(1):285-292.

Gourlay K, et al. Swollenin aids in the amorphogenesis step during the enzymatic hydrolysis of pretreated biomass. *Bioresource Technology*. 2013 Aug;142,498-503.

Gonzalez JC, al. Production of *Trametes pubescens* laccase under submerged and semi-solid culture conditions on agro-industrial wastes. Plos one. 2013 Sep;8(9):PMC3760920.

Guerra G, et al. Production of laccase and manganese peroxidase by white-rot fungi from sugarcane bagasse in solid bed: use for dyes decolourisation. Sugar Tech. 2008 Oct;10(3):260–264.

Guo H, et al. Virulence and molecular diversity in the *Cochliobolus sativus* population causing barley spot blotch in China. Plant Disease. 2019 Sep;103(9):2252-2262.

Hämäläinen V, et al. Enzymatic Processes to unlock the lignin value. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2018 Mar;6:20.

Hatakka A. Biodegradation of Lignin. Part 1. Lignin, Humic Substances and Coal. Biopolymers. 2005; doi: 10.1002/3527600035.bpol1005.

Hayes DJ. An examination of biorefining processes, catalysts and challenges. Catalysis Today. 2009 Jul;145(1-2):138-151.

Healthcare GE. Recombinant protein purification handbook, principles and methods: Handling inclusion bodies. 2009 Jan;10,205-211.

Heinzkill M, t al. Characterization of laccases from wood-rotting fungi (family Coprinaceae). Applied Environmental Microbiology. 1998 May;64(5):1601-6.

Hernández C, et al. Laccase induction by synthetic dyes in *Pycnoporus sanguineus* and their possible use for sugar cane bagasse delignification. Applied Microbiology and Biotechnology. 2017 Feb;101(3):1189–1201.

Hofrichter M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). Enzyme and Microbial Technology. 2002 Apr;30(4):454-466.

Hossain SKM, Anantharaman N. Activity enhancement of ligninolytic enzymes of *Trametes versicolor* with bagasse powder. African Journal of Biotechnology. 2006 Jan;5(2):189-194.

Hu X, et al. Trajectory and genomic determinants of fungal-pathogen speciation and host adaptation. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2014 Nov 25;111(47):16796-801.

Immanuel G, et al. Production and partial purification of cellulase by *Aspergillus niger* and *A. fumigatus* fermented in coir waste and sawdust. Journal of Microbiology. 2006 Dec;3(1):1-11.

Inpi. Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI). Lacase. Database [internet]. [cited 2019 Jul. 5]. Available from: <http://www.inpi.gov.br/>.

Iyer G, Chatto B. Purification and characterization of laccase from the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. FEMS Microbiology Letters. 2003 Sep;277(1):121-126.

Jamil M, et al. Genome-wide association studies for spot blotch (*Cochliobolus sativus*) resistance in bread wheat using genotyping-by-sequencing. Phytopathology. 2018 Nov;108(11):1307-1314.

Janusz G, et al. Fungal laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase: gene expression and regulation. Enzyme and Microbial Technology. 2013 Jan;52(1):1-12.

Jawhar M, et al. Efficient discovery of single-nucleotide variations in *Cochliobolus sativus* vegetative compatibility groups by ecotilling. Journal of Plant Biochemistry & Physiology. 2018 Mar; 6(2):e1000211.

Joint Genome Institute - JGI. The fungal genomics resource. *Cochliobolus sativus*. Database [Internet]. [cited 2016 Set. 18]. Available from: <http://genome.jgi.doe.gov/Cocsa1/Cocsa1.home.html>.

Joshi AK, et al. Associations of environments in South Asia based on spot blotch disease of wheat caused by *Cochliobolus sativus*. Crop Science. 2007 May;47(3):1071.

Kaczmarek MB, et al. Laccases – enzymes with an unlimited potential. Biotechnology and Food Science. 2017 Jan;81(1):41-70.

Kaplan A, et al. Clinical Chemistry, Interpretation and techniques. Williams & Wilkins. 1995 Jan;4:247-248.

Karov I; Mitrev S, Arsov E. *Bipolaris sorokiniana* (teleomorph *Cochliobolus sativus*), causer of barley leaf lesions and root rot in Macedonia. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2009 Jan;116:167-174.

Karp SG, et al. Characterization of laccase isoforms produced by *Pleurotus ostreatus* in solid state fermentation of sugarcane bagasse. Bioresource Technology. 2012 Jun;114:735-739.

Kumar R, Singh S, Singh OV. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 2008 May; 35(5):377-391.

Kunamneni A, et al. Laccases and their applications: A patent review. Recent Patents on Biotechnology. 2008 Feb;2(1):10-24.

Kirk TK. Lignin-degrading enzymes. Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences. 1987 Apr;321(1561):461-474.

- Kwiatos N; Ryngajło M, Bielecki S. Diversity of laccase-coding genes in *Fusarium oxysporum* genomes. *Frontiers in Microbiology*. 2015 Sep;6:933.
- Lee J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal Biotechnology*. 1997 Jul;56(1):1-24.
- Levasseur A, et al. Expansion of the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnology for Biofuels*. 2013 Mar;6(1):41.
- Li M, et al. Purification and characterization of a Laccase from the edible wild mushroom *Tricholoma mongolicum*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2010 Jul;20(7):1069-1076.
- Lineweaver H, Burk D. The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of American Chemical Society*. 1934 Mar;56(3):658-666.
- Litwińska K, et al. Characterization of recombinant laccase from *Trametes versicolor* synthesized by *Arxula adeninivorans* and its application in the degradation of pharmaceuticals. *AMB Express*. 2019 Jul;9(1):102.
- Lundell TK; Mäkelä MR, Hildén K. Lignin-modifying enzymes in filamentous basidiomycetes – ecological, functional and phylogenetic review. *Journal Basic Microbiology*. 2010 Feb;50(1):5-20.
- Lundell T, et al. Formation and action of lignin-modifying enzymes in cultures of *Phlebia radiata* supplemented with veratric acid. *Applied and Environmental Microbiology*. 1990 Jun;56(9):2623-2629.
- Ma S, et al. Expression, purification, and characterization of a novel laccase from *Setosphaeria turcica* in *Escherichia coli*. *Journal of Basic Microbiology*. 2017 Jan;58(1):68–75.
- Madhavi V, Lele SS. Laccase: Properties and Applications. *Bioresources*. 2009 Nov;4(4):1694-1717.
- Manavalan T, et al. Secretome analysis of *Ganoderma lucidum* cultivated in sugarcane bagasse. *Journal Proteomics*. 2012 Dec;77:298-309.
- Mandic M, et al. Identification and characterization of new laccase biocatalysts from *Pseudomonas* species suitable for degradation of synthetic textile dyes. *Catalysts*. 2019 Jul;9(7):629.
- Martínez AT, et al. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*. 2005 Sep;8(3):195-204.
- Martínez AT, et al. Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations. *Biotechnology Advances*. 2017 Nov;35(6):815–831.

Marx IJ, et al. Comparative secretome analysis of *Trichoderma asperellum* S4F8 and *Trichoderma reesei* Rut C30 during solid-state fermentation on sugarcane bagasse. *Biotechnology Biofuels*. 2013 Nov;6(1):172.

Mate DM, Alcalde M. Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. *Microbiology Biotechnology*. 2017 Nov;10(6):1457-1467.

May SW, Padgett SR. Oxidoreductase enzymes in biotechnology: Current status and future potential. *Nature Biotechnology*, 1983 Oct;1(8):677–686.

Menezes CR, Silva IS, Durrant LR. Sugarcane bagasse: Source for the production of ligninocelulolytic enzymes. *Estudos Tecnológicos*. 2009 jan;5(1):68-78.

Meza JC, et al. New process for fungal delignification of sugar-cane bagasse and simultaneous production of laccase in a vapor phase bioreactor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006 May;54(11):3852-3858.

Mikolasch A, Schauer F. Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009 Mar;82(4):605-24.

Mollania N, et al. An efficient in vitro refolding of recombinant bacterial laccase in *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2013 May;52(6-7):325-330.

Morejon KR, et al. Identification of *Bipolaris bicolor* and *Bipolaris sorokiniana* on wheat seeds (*Triticum aestivum* L.) in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2006 Jul;37:247-250.

MycoBank. Database [internet]. Fungal Databases Nomenclature and Species Bank Online Taxonomic Novelties Submission. [cited 2018 Ago. 10]. Available from: <http://www.mycobank.org>.

Neu HC, Heppel LA. The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. *Journal of Biological Chemistry*. 1965 Sep;240(9):3685-92.

Ning YJ, et al. An extracellular yellow laccase with potent dye decolorizing ability from the fungus *Leucoagaricus naucinus* LAC-04. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016 Dec;93(Pt A):837-842.

Nyanhongo GS. Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Water Research*. 2002 Mar;36(6):1449-56.

Ogola HJO et al. Advances in Bioremediation of Wastewater and Polluted Soil,. Explorations and Applications of Enzyme-linked Bioremediation of Synthetic Dyes. Chapter: 6. 2015; doi: 10.5772/60753.

Orlikowska M, et al. Structural studies of two thermostable laccases from the white-rot fungus *Pycnoporus sanguineus*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018 Feb;107(Pt B):1629-1640.

Osma JF; Toca-Herrera JL, Rodríguez-Couto S. Uses of Laccases in the Food Industry. *Enzyme Research*. 2010 Sep;2010:1–8.

Paloheimo, M., Valtakari, L., Puranen, T., Kruus, K., Kallio, J., Mantyla, A., Fagerstrom, R., Ojapalo, P., Vehmaanpera, J. Laccase enzymes and their uses. United States patent US 7,732,178 B2. 2010 Jun 08.

Patrick F, et al. Optimization of laccase and manganese peroxidase production in submerged culture of *Pleurotus sajor-caju*. *African Journal of Biotechnology*. 2011 Sep;10:(50)10166-10177.

Pereira S.C, et al. 2G ethanol from the whole sugarcane lignocellulosic biomass. *Biotechnology for Biofuels*. 2015 Mar;8(1):44.

Pollegioni L, Tonin F, Rosini E. Lignin-degrading enzymes. *The FEBS Journal*. 2015 Apr;282(7):1190-1213.

Prosite. Documentation PDOC00076 Multicopper oxidases signatures. Database [internet]. [cited 2017 Dec. 7]. Available from: <https://prosite.expasy.org/PDOC00076>.

Prosite. Documentation PDOC00394 Heme peroxidase signatures and profiles. Database [internet]. [cited 2017 Dec. 7]. Available from: <https://prosite.expasy.org/PDOC00394>.

Pitt JI, Hocking AD. *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic & Professional, London, 1985. New York: Springer US, 2009;4(3).

Ramos JAT, et al. The *Aspergillus niger* multicopper oxidase family: analysis and overexpression of laccase-like encoding genes. *Microbial cell factories*. 2011 Jul;10(1):78.

Ribeiro D, et al. The *Penicillium echinulatum* secretome on sugar cane bagasse. *PLoS One*. 2012 Dec;7(12):e50571.

Ridell RW. Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. *Mycologia*. 1950 Apr;42(2):265-270.

Rizk M, Antranikian G, Elleuche S. End-to-end gene fusions and their impact on the production of multifunctional biomass degrading enzymes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012 Nov;428(1):1-5.

Sadhasivam S, et al. Production, purification and characterization of mid-redox potential laccase from a newly isolated *Trichoderma harzianum* WL1. *Process Biochemistry*. 2008 Jul;43(7):736–742.

Sakurai T, Kataoka K. Basic and applied features of multicopper oxidases, CueO, bilirubin oxidase, and laccase. *Chemical Record*. 2007 Mar;7(4):220-9.

Sambrook J; Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989 Jan;(2):931-957.

Sambrook J; Fritsch EF, Maniatis T. Detection and analysis of proteins expressed from cloned genes. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989 Jan;18(2):60-74.

Santos FA, et al. Potential of sugarcane straw for ethanol production. *Química Nova*. 2012 Jan;35(5):1004-1010.

Sánchez C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*. 2009 Mar;27(2):185-194.

Sánchez OJ, Cardona CA. Producción biotecnológica de alcohol carburante I: Obtención a partir de diferentes materias primas. *Interciencia*, 2005 Nov;30(11):671-678.

Sánchez-Trasviña, et al. Refolding of laccase from *Trametes versicolor* using aqueous two phase systems: Effect of different additives. *Journal of Chromatography A*. 2017 Jul;1507:25–31.

Saritha M; Arora A, Lata. Biological pretreatment of lignocellulosic substrates for enhanced delignification and enzymatic digestibility. *Indian Journal Microbiology*. 2012 Jun;52(2):122–130.

Schneider P, et al. Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase. *Enzyme and Microbial Technology*. 1999 Sep;25(6):502-508.

Senthivelan T, et al. Screening and production of a potential extracellular fungal laccase from *Penicillium chrysogenum*: Media optimization by response surface methodology (RSM) and central composite rotatable design (CCRD). *Biotechnology Reports (Amst)*. 2019 Sep;23:e00344.

Shoemaker, RA. Nomenclature of *Drechslera* and *Bipolaris*, grass parasites segregated from "*Helminthosporium*". *Canadian Journal of Botany*. 1959 May;37(5):879-887.

Singhania RR, Sukumaran RK, Pandey A. Improved cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30 under SSF through process optimization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2007 Jul;142(1):60-70.

Singh A, et al. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using

mild solubilization process. *Microbial Cell Factories*. 2015 Mar;14(1):14-41.

Siqueira G, et al. Topochemical distribution of lignin and hydroxycinnamic acids in sugar-cane cell walls and its correlation with the enzymatic hydrolysis of polysaccharides. *Biotechnology Biofuels*. 2011 Mar;4(1):7.

Slomczynski D; Nakas JP, Tanenbaum W. Production and characterization of laccase from *Botrytis cinerea* 61-34. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995 Mar;61(3):907–912.

Soden DM, O’Callaghan J, Dobson ADW. Molecular cloning of a laccase isozyme gene from *Pleurotus sajor-caju* and expression in the heterologous *Pichia pastoris* host. *Microbiology*. 2002 Dec;148(Pt 12):4003-14.

Staats CC, et al. Comparative genome analysis of entomopathogenic fungi reveals a complex set of secreted proteins. *BMC Genomics*. 2014 Sep 29;15:822.

Sun S, et al. Purification and characterization of fungal laccase from *Mycena purpureofusca*. *Chiang Mai Journal of Science*. 2013 Apr;40(2):151-160.

Sun Y, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*. 2002 May; 83(1):1-11.

Szczerbowski D, et al. Sugarcane biomass for biorefineries: comparative composition of carbohydrate and non-carbohydrate components of bagasse and straw. *Carbohydrate Polymers*. 2014 Dec;114,95-101.

Szklarz GD, et al. Production of phenol oxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. *Mycologia*. 1989 Mar;81(2):234-240.

Tien M, Kirk TK. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in enzymology*. Biomass, part b, lignin, pectin, and chitin. 1988;161(1):238-249.

Tong L, et al. Extracellular expression, purification, and characterization of a winter flounder antifreeze polypeptide from *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 2000 Mar;18(2):175-181.

Troth EEG; Johnston JA, Dyer AT. Competition Between *Fusarium pseudograminearum* and *Cochliobolus sativus* Observed in Field and Greenhouse Studies. *Phytopathology*. 2018 Feb;108(2):215–222.

Upton BM, Kasko AM. Strategies for the Conversion of Lignin to High-Value Polymeric Materials: Review and Perspective. *Chemical Reviews*. 2015 Dec;116(4):2275–2306.

Uspto. United States Patent and Trademark Office (USPTO). Laccase. Database [internet]. [cited 2019 Jul. 5]. Available from: <https://www.uspto.gov/>.

Valencia EY, Chambergo FS. Mini-review: Brazilian fungi diversity for biomass degradation. *Fungal Genetics and Biology*. 2013 Nov;60:9-18.

Vantamuri AB, Kaliwal BB. Purification and characterization of laccase from *Marasmius species* BBKAV79 and effective decolorization of selected textile dyes. *3 Biotech*. 2016 Dec;6(2):189.

Vázquez MA, et al. Cellulolytic and ligninolytic potential of new strains of fungi for the conversion of fibrous substrates. *Biotechnology Research and Innovation*. 2019 Jun;3(1):177-186.

Vega-Sánchez ME, Ronald PC. Genetic and biotechnological approaches for biofuel crop improvement. *Current Opinion Biotechnology*. 2010 Apr;21(2):218-224.

Vivekanandan; Sivaraj, Kumaresan. Characterization and purification of laccase enzyme from *Aspergillus nidulans* CASVK3 from vellar estuary south east coast of India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2014;3(10):213-227.

Wang J, et al. Purification, characterization, and cloning of an extracellular laccase with potent dye decolorizing ability from white rot fungus *Cerrena unicolor* GSM-01. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017 Feb;95:920-927.

Wyman CE. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. *Trends in Biotechnology*. 2007 Jun;25(4):153-157.

Yadav M, et al. Secretory Laccase from *Pestalotiopsis* Species CDBT-F-G1 Fungal Strain Isolated from High Altitude: Optimization of Its Production and Characterization. *Applied Sciences*. 2019 Jan;9(2):340.

Yang et al. Laccases: Production, Expression Regulation, and Applications in Pharmaceutical Biodegradation. *Frontiers in Microbiology*. 2017 May;8:832.

Yaropolov AI, et al. Laccase: Properties, Catalytic .Mechanism, and Applicability. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1994 Feb;49(3):257-280.

Youn HD, et al. Single electron transfer by an extracellular laccase from the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Microbiology*. 1995 Feb;141(Pt 2):393-8.

Yoon J, Solomon EI. Eletronic structure of the peroxy intermediate and its correlation to the native intermediate in the multicooper oxidases: Insights into the reductive cleavage of the o-o bond. *Journal of American Chemical Society*. 2007 Oct 31;129(43):13127-36.

Yoshitake A, et al. N-linked carbohydrate chains protect laccase III from proteolysis in *Coriolus versicolor*. *Journal of General Microbiology*, 1993 Jan;139(1):179–185.

Xu F. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry*. 1996 Jun;35(23):7608-7614.

Zhang L, et al. Lignocellulosic hydrogen production using dark fermentation by *Clostridium lentocellum* strain Cel10 newly isolated from *Ailuropoda melanoleuca* excrement. *RSC Advances*. 2019 Jan;9(20):11179-11185.

Zhao X, Zhou Y, Liu D. Kinetic model for glycan hydrolysis and formation of monosaccharides during dilute acid hydrolysis of sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*. 2012 Feb;105:160-8.

Zhong S, et al. *Brachypodium distachyon-Cochliobolus sativus* pathosystem is a new model for studying plant-fungal interactions in cereal crops. *Phytopathology*. 2015 Apr;105(4):482-9.

Zhong S, Steffenson BJ. Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus*. *Genetics and Resistance*. 2001 Jan;91(5):469-476.

Zhu M, et al. Purification and characterization of a white laccase with pronounced dye decolorizing ability and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity from *Lepista nuda*. *Molecules*. 2016 Mar;21(4):415.

APÊNDICE A - Dados para cálculo de cinética enzimática da enzima lacase

1. Determinação da curva padrão de formação do produto ABTS.

[P] μM	Abs (420 nm)
250	0,0004
500	0,0009
1000	0,0017
2500	0,0036
5000	0,0072
7500	0,0116
10000	0,0192
12500	0,0227
15000	0,0292

2. Dados dos ensaios.

Tabela 1 - Dados de formação de produto em função da concentração do substrato [S] – 1.

Tempo (secs)/ [S] (μM)	50	100	500	1000	3000	5000	7000
30	89250	118000	121825	116525	152225	184800	217050
60	118125	160050	171950	167300	202650	235325	268700
90	141400	196300	219325	215700	253650	286850	319875
120	161025	230675	265425	269025	304775	336150	371950
150	179400	261550	309975	317050	356650	386125	420975
180	197725	291775	353675	362825	407800	436900	471900
210	214100	318475	395425	414175	457575	487150	521950
240	227825	344025	436725	461675	510350	539500	572275
270	242175	367925	478050	509875	558750	590700	623475
300	253275	391100	521725	556150	607500	642575	673475

Tabela 2 - Dados de formação de produto em função da concentração do substrato [S] – 2.

Tempo (secs)/ [S] (μM)	50	100	500	1000	3000	5000	7000
30	102250	117800	141250	164575	204325	236700	269950
60	128975	148700	186225	215100	254075	283975	319550
90	150850	177075	229475	264250	304725	332500	368850
120	170850	203450	271525	314475	355300	381200	418550
150	188550	227875	313800	365750	405225	430375	470000
180	204925	251350	353925	412950	455500	479775	520400
210	220075	273375	392750	464925	504750	529600	570500
240	233200	293975	431450	509525	555950	579225	621350
270	246100	313950	467925	555425	608750	629350	672600
300	258000	333550	505600	600825	659700	678525	723900

Tabela 3 - Dados de velocidade (V) da atividade enzimática em função da concentração do substrato [S] para cálculo da equação de Michaelis-Menten, pelo programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, USA).

[S] μM	Vo (mM/seg) - 1	Vo (mM/seg) - 2
50	0,489	607,5
100	0,689	1,011
500	1,184	1,481
1000	1,424	1,628
3000	1,487	1,686
5000	1,442	1,695
7000	1,483	1,690

Figura 1 - Curva de Michaelis-Menten gerada pela análise dos dados feita pelo programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, USA), calculando os valores de $V_{\text{max}}=1,621 \text{ mM} \cdot \text{s}^{-1}$ e $K_m=94,11 \text{ uM}$.

Tabela 4 - Dados para transformação da equação de Michaelis-Menten no Duplo recíproco ou plot de Lineweaver-Burk.

Ensaio 1	Ensaio 2	
$1/[S]$	$1/[S]$	Média
0,02	0,02	0,02
0,01	0,01	0,01
0,002	0,002	0,002
0,001	0,001	0,001
0,000333	0,000333	0,000333
0,0002	0,0002	0,0002
0,000143	0,000143	0,000143
0	0	0
-0,01161	-0,01966	-0,01563

Ensaio 1	Ensaio 2	
$1/v$	$1/v$	Média
0,001646	0,002044	0,001845
0,000989	0,001451	0,00122
0,000675	0,000844	0,00076
0,000614	0,000702	0,000658
0,000593	0,000672	0,000633
0,00059	0,000693	0,000641
0,000592	0,000674	0,000633
0,0006	0,0007	0,00065
0	0	0

X	Y
$1/[s]$	$1/v$
0,02	0,001845
0,01	0,00122
0,002	0,00076
0,001	0,000658
0,000333	0,000633
0,0002	0,000641
0,000143	0,000633
0	0,00065
-0,01563	0

Figura 2 - Plot de Lineaweaver-Burke. Duplo-recíproco dos gráficos de Michaelis-Menten para o substrato ABTS.