



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Avaliação da Estabilidade ao pH e à Temperatura da Enzima Lacase de *Ganoderma lucidum* Livre e Imobilizada em Suporte Iônico MANAE-Agarose

Tatiane Brugnari¹, Marita Gimenez Pereira², Emanuelle Neiverth de Freitas¹, Emanuele Parreira de Lima¹, Jéssica Amanda Andrade Garcia¹, Maria de Lourdes T.M. Polizeli², Cristina G.M. de Souza¹, Rosane Marina Peralta¹

¹Universidade Estadual de Maringá – Departamento de Bioquímica
Cep –87020-900 Maringá – PR - E-mail: tatiane.bru@gmail.com

²Departamento de Biologia-FFCLRP-USP-Ribeirão Preto-SP

RESUMO

As lacases são enzimas produzidas por diversos microrganismos, incluindo plantas superiores, fungos e bactérias. Possuem muitas aplicações biotecnológicas, portanto, estudos que avaliem sua estabilidade são de grande importância. O objetivo deste trabalho foi avaliar a estabilidade da lacase de *Ganoderma lucidum* livre e após imobilização em suporte iônico MANAE-Agarose. Tanto a enzima livre quanto a imobilizada apresentaram atividade ótima em pH 5,0, mas a enzima imobilizada foi menos sensível a alterações do pH do meio reacional, apresentando 54% de atividade em pH 10 contra 6,4% da enzima livre. Com relação à termoestabilidade, a enzima imobilizada apresentou 70% de atividade residual após 30 min de incubação a 55 °C, contra menos de 20% de atividade residual da enzima livre.

Palavras-chave: Lacase; Imobilização; *Ganoderma lucidum*; Termoestabilidade

INTRODUÇÃO

Lacases (benzenodiol: oxigênio oxirredutase, EC 1.10.3.2) são oxidases multi-cobre produzidas por diversos microrganismos, principalmente pelos fungos da podridão branca da madeira (Aghaie-Khouzani *et al.*, 2012). Lacases oxidam diferentes substratos como fenol clorado, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), benzeno tióis e corantes têxteis, sendo de grande interesse para a remoção de xenobióticos (Forootanfar *et al.*, 2011, 2012). No entanto, a maioria das lacases apresentam baixa estabilidade tanto a variações de pH quanto a variações de temperatura, o que restringe seu uso em processos industriais (Salis *et al.*, 2009; Ping *et al.*, 2008). Outra limitação para aplicação industrial em larga escala das lacases é seu alto custo de produção (Manavalan *et al.*, 2013). A imobilização de uma enzima pode tanto melhorar a sua estabilidade quanto permitir o seu reuso, o que, pelo menos em tese, resolve as duas limitações para aplicação de lacases em larga escala (Mateo *et al.*, 2007). *G. lucidum*, quando cultivado em estado sólido utilizando resíduo de laranja (casca e bagaço) como substrato, produz lacase como principal enzima ligninolítica. A principal lacase produzida nestas condições é uma proteína com massa molecular de 43 kDa, que tem demonstrado ser útil em diversos processos de bioremediação (Mota *et al.*, 2015). O objetivo deste trabalho foi



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

avaliar a estabilidade da lacase de *G. lucidum* livre e imobilizada no suporte iônico mono aminoetil-N-etil-agarose (MANAE-agarose) frente a variações de temperatura e pH.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a produção de lacases, *G. lucidum* foi cultivado por 14 dias a 28 °C no resíduo de laranja (casca e bagaço) a uma umidade inicial de 90%. O extrato enzimático bruto foi obtido adicionando-se 20 mL de água destilada a cada 5 g de cultura (peso úmido), seguido de agitação por 30 min. Restos de micélio e substrato foram removidos por centrifugação (12 min a 8000 rpm). Os extratos enzimáticos límpidos foram dialisados contra água destilada em saco de diálise com *cut-off* de 12 kDa, liofilizados e congelados a -20 °C até uso.

A atividade da lacase (EC 1.10.3.2) foi mensurada com 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) em 50 mmol/L de tampão acetato de sódio pH 5,0. A oxidação do ABTS foi determinada pelo aumento da absorbância a 420 nm ($\epsilon = 36 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Shin & Lee, 2000). As atividades enzimáticas foram determinadas a 40 °C e expressas em unidade enzimática internacional (U).

Para a imobilização da lacase em suporte iônico, primeiramente, mono aminoetil-N-etil-agarose (MANAE- agarose) foi preparado de acordo com Carvalho *et al.*, (2014). A imobilização foi realizada na proporção de 1 g de suporte MANAE, previamente preparado, para 10 mL de extrato bruto enzimático (3 mg do extrato liofilizado por mL de tampão fosfato de sódio 25 mmol/L pH 7,0). As diferentes suspensões foram suavemente agitadas em rolo agitador a 4 °C, durante 24 h. As amostras do sobrenadante e as suspensões foram periodicamente retiradas e as atividades enzimáticas foram medidas. Depois disso, os derivados foram lavados cinco vezes com 2 volumes do mesmo tampão de adsorção e, finalmente, duas vezes, com 2 volumes de tampão fosfato de sódio 25 mmol/L a pH 7,0, filtrados e mantidos resfriados até o momento do uso.

O pH ótimo foi determinado a 40 °C em diferentes faixas de pH (3,0-10,0). A termoestabilidade das enzimas livre e imobilizada foi avaliada determinando-se atividade residual após incubação das enzimas na ausência de substrato a temperaturas variando de 30 a 55 °C por 30 min.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Figura 1 mostra o efeito do pH na atividade das enzimas livre e imobilizada. Houve redução da sensibilidade da enzima ao pH após a imobilização. Em pH 5,0 ambas enzimas apresentaram atividade ótima. Entretanto, a enzima livre apresentou somente 6,4% de atividade no pH 10, enquanto a atividade da enzima imobilizada foi de 54%.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

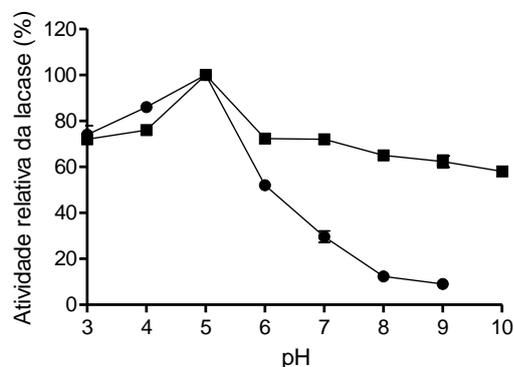


Figura 1: Efeito do pH na atividade da lacase de *Ganoderma lucidum* (●) lacase livre; (■) lacase imobilizada.

A Figura 2 apresenta os valores de atividade residual das enzimas livre e imobilizada após 30 min de exposição a diferentes temperaturas na ausência do substrato. É bastante clara a maior termoestabilidade da enzima imobilizada. Após 30 min a 55 °C, a enzima livre reteve 20% da atividade inicial, enquanto a enzima imobilizada reteve 70% da atividade inicial. O aumento da estabilidade pode se dar em função da estabilização da estrutura da proteína ou simplesmente porque enzimas imobilizadas estão menos acessíveis a agentes desnaturantes ou a ataques de microorganismos (Marconi, 1989). Essa estabilidade é regida pelo número e a natureza das ligações formadas entre a enzima e o suporte; pelo grau de confinamento da enzima ao suporte; pelo micro-ambiente formado entre a enzima e o suporte e as condições de imobilização (Cao, 2005).

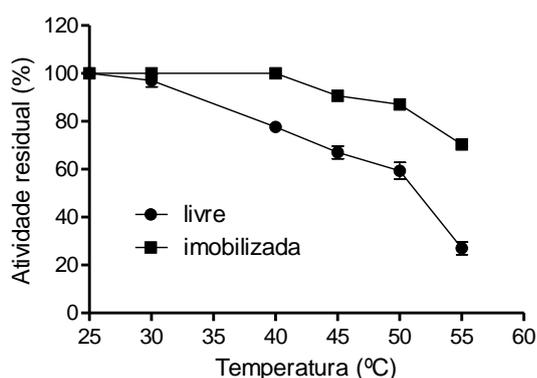


Figura 2: Termoestabilidade da lacase de *Ganoderma lucidum*. Enzima livre (●) e imobilizada (■) foram expostas por 30 min às temperaturas indicadas. Em seguida, atividades residuais foram determinadas conforme descrito em seção Material e Métodos.

As diversas aplicações tecnológicas das lacases têm incentivado trabalhos visando sua imobilização. Em recente revisão, lacases de diferentes origens, imobilizadas através de diversos métodos, tiveram suas propriedades e aplicações comparadas e analisadas (Fernández-Fernández *et al.*, 2013).

CONCLUSÕES



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Os resultados mostraram que a imobilização da lacase de *G. lucidum* em suporte MANAE-agarose tornou a enzima mais resistente tanto à temperatura quanto a faixas de pH alcalinos, abrindo possibilidades de se estender sua aplicação em processos de biorremediação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aghaie-Khouzani M, Forootanfar H, Moshfegh M, Khoshayand MR, Faramarzi MA. 2012. Decolorization of some synthetic dyes using optimized culture broth of laccase producing ascomycete *Paraconiothyrium variabile*. *Biochem Eng J* 60:9-15.

Carvalho CC, Ziotti LS, Pereira MG, Cruz AF, Jorge JA, Polizeli MLTM. 2014. Production and functional properties of free and immobilized glucoamylases of *Penicillium citrinum*. *J Biotech Bioeng* 1(2): 007.

Cao L. 2005. Immobilised enzymes: science or art? *Curr Opin Chem Biol* 9(2): 217-226.

Fernández-Fernández M, Sanromán MA, Moldes D. 2013. Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotech Ad* 31: 1808-1825.

Forootanfar H, Faramarzi MA, Shahverdi AR, Tabatabaei Yazdi M. 2011. Purification and biochemical characterization of extracellular laccase from the ascomycete *Paraconiothyrium variabile*. *Bioresour Technol* 102:1808-1814.

Forootanfar H, Movahednia MM, Yaghmaei S, Tabatabaei-Sameni M, Rastegar H, Sadighi A, Faramarzi MA. 2012. Removal of chlorophenolic derivatives by soil isolated ascomycete of *Paraconiothyrium variabile* and studying the role of its extracellular laccase. *J Hazard Mater* 209-210:199-203

Mateo C, Palomo JMG, Fernandez-Lorente G, Guisán JM, Fernandez-Lafuente R. 2007. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Technol* 40 (6): 1451-1463.

Manavalan T, Manavalan A, Thangavelu KP, Heese K. 2013. Characterization of optimized production, purification and application of laccase from *Ganoderma lucidum*. *Biochem Eng J* 70:106-114

Marconi, W. 1989. Immobilized enzymes: their catalytic behaviour and their industrial and analytical applications. *Reactive Polymers* , 11, 1-19.

Mota TR, Kato CGK, Peralta RA, Bracht A, Morais GR, Baesso ML, Souza CGM, Peralta RM. 2015. Decolourization of Congo Red by *Ganoderma lucidum* laccase: evaluation of degradation products and toxicity. *Water Air Soil Pollut* 226:351-362

Ping W, Xuerong F, Li C, Qiang W, Aihui Z. 2008. Decolorization of reactive dyes by laccase immobilized in alginate/gelatin blent with PEG. *J Environ Sci* 20:1519-1522.

Salis A, Pisano M, Monduzzi M, Solinas V, Enrico Sanjust E. 2009. Laccase from *Pleurotus sajor-caju* on functionalised SBA-15 mesoporous silica: Immobilisation and use for the oxidation of phenolic compounds. *J Mol Catal B* 58:175-180.

Shin KS, Lee YJ. 2010. Purification and characterization of a new member of the laccase family from the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *Arch Biochem Biophys* 384:109-15.