

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Imobilização da Enzima Lacase de Fungos Ligninolíticos em Suportes de Agarose Ativados Iônica e Covalentemente

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

Lacases são enzimas com grande potencial biotecnológico que tem os custos de produção elevados. Processos que permitam a imobilização desta enzima para seu reuso aumentarão as possibilidades de sua aplicação. O objetivo deste estudo foi avaliar a imobilização das lacases de três diferentes fungos, Ganoderma lucidum, Pleurotus ostreatus e Pleurotus pulmonarius, em diferentes suportes de agarose ativada. Foram testados três tipos de suportes, Agarose-epóxido, Glioxil-agarose e Manae-agarose, sendo este último o mais eficiente. Imobilização em Manae-agarose permitiu o reuso da enzima por oito ciclos. Com relação à dessorção na presença de NaCl, ela foi significativa somente a partir de 100 mmol/L de NaCl.

Palavras-chave: lacase, imobilização, Manae-agarose

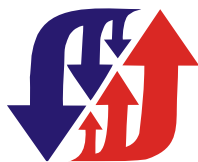
INTRODUÇÃO

Os fungos ligninolíticos são os principais produtores da enzima lacase (Gochev & Krastanov, 2007). As lacases se caracterizam por possuírem baixa especificidade ao substrato e são capazes de oxidar tanto compostos fenólicos quanto não fenólicos (Duran & Esposito, 2000). Por catalisar tanto reações de despolimerização como de polimerização, lacases têm sido bastante estudadas em processos de biorremediação e deslignificação de fibras celulósicas.

O alto custo de produção das lacases e sua sensibilidade a fatores ambientais faz com que sua aplicação em larga escala na área industrial, seja ainda, limitada. Algumas destas restrições podem ser contornadas pela imobilização de enzimas em suportes, de modo a permitir seu reuso e reduzir sua sensibilidade a fatores desnaturantes (Duran *et al.*, 2002). Considerando o exposto, os objetivos desse estudo foram imobilizar as lacases de três fungos da podridão branca *G. lucidum*, *P. ostreatus* e *P. pulmonarius*, nos suportes Manae-agarose, Agarose-epóxido e Glioxil-agarose e avaliar a possibilidade de reusos da enzima e estabilidade de dessorção dos imobilizados frente ao NaCl.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a produção das lacases, *G. lucidum*, *P. ostreatus* e *P. pulmonarius* foram cultivados 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



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

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 o momento do uso.

A atividade da lacase (EC 1.10.3.2) foi avaliada 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 no suporte Manae-agarose, primeiramente, mono aminoetil-N-etil-agarose foi ativada ionicamente de acordo com Carvalho *et al.*, (2014). Nos suportes Agarose-epóxido e Glioxil-agarose, a agarose comercial 4 BCL foi ativada covalentemente, de acordo com Bolivar *et al.*, (2010).

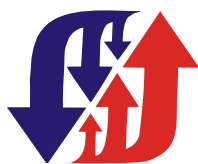
A imobilização foi realizada na proporção de 1 g dos suportes, previamente preparados, para 10 mL de extrato bruto enzimático (3 mg do extrato liofilizado por mL de tampão fosfato de sódio 25 mmol/L pH 7,0 para o suporte Manae-agarose, pH 8,0 para o Agarose-epóxido e pH 10,0 para o Glioxil-agarose). As diferentes suspensões foram suavemente agitadas em rolo agitador a 4 °C, durante 24 h. Depois disso, os derivados de Manae-agarose e Epóxido-agarose foram lavados cinco vezes com 2 volumes do mesmo tampão de adsorção e, finalmente, duas vezes, com 2 volumes de fosfato de sódio 25 mmol/L tampão a pH 7,0, filtrados e mantidos resfriados até o momento do uso. Já o derivado de Glioxil-agarose foi reduzido com boro-hidreto de sódio (1mg/mL) por 30 min e depois lavado com água destilada e tampão, como os demais. Para avaliar a porcentagem de imobilização, amostras do sobrenadante e as suspensões foram periodicamente retiradas e as atividades enzimáticas foram medidas.

Para testar a possibilidade de reutilização dos derivados, os mesmos foram submetidos a análise de atividade enzimática pelo método de ABTS e, posteriormente, centrifugados (10 min a 8000 rpm), lavados com água destilada e submetidos ao teste de atividade enzimática novamente.

No processo de dessorção, 10 mg dos derivados de Epóxido-agarose, Glioxil-epóxido e Manae-agarose foram suspensos em 1 mL de tampão acetato de sódio 50 mmol/L pH 5,0 e acrescidos de diferentes concentrações de NaCl, começando com 50 até 2000 mmol/L. A medição foi efetuada em intervalos de 60 min, onde alíquotas foram retiradas a partir de ambos, do sobrenadante e da suspensão, que contém o derivado, e a atividade da lacase foi determinada.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O suporte Manae-agarose foi o mais eficiente na imobilização das três lacases, obtendo-se 100% de retenção. Já os suportes Agarose-epóxido e Glioxil-agarose mostraram baixa taxa de imobilização, conforme detalhado na Tabela 1. Tais diferenças na porcentagem de imobilização podem ser devidas à natureza das ligações oferecidas pelos mesmos, sendo Manae-agarose um suporte onde a enzima é imobilizada através de ligações iônicas e, nos demais suportes, a enzima se liga pelos resíduos hidrofóbicos através de ligações covalentes, sugerindo, assim, que ambas as enzimas possuem poucos resíduos hidrofóbicos ou, esses não se encontram expostos.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Tabela 1: Taxa de imobilização da lacase em diferentes suportes.

	% Imobilização		
	Manae-agarose	Agarose-epóxido	Glioxil-agarose
<i>G. lucidum</i>	100	67,98	15,01
<i>P. ostreatus</i>	100	68,05	7,89
<i>P. pulmonarius</i>	100	67,73	1,25

A possibilidade de reusos dos derivados enzimáticos a partir do suporte Manae-agarose foi alta, onde, após o 8º reuso ainda manteve-se 85,69%, 72,77% e 75,29 % de atividade residual da lacase dos fungos *G. lucidum*, *P. ostreatus* e *P. pulmonarius* respectivamente (Figura 1).

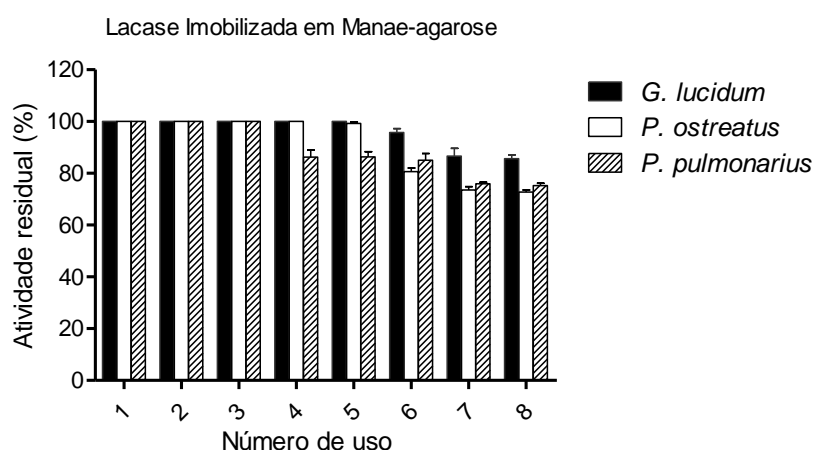
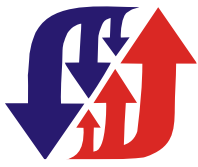


Figura 1: Atividade residual (%) da lacase imobilizada em suporte iônico Manae-agarose e submetida a sucessivos reusos.

No processo de dessorção, a enzima manteve-se ligada ao suporte até a adição de 100 mmol/L de NaCl. A lacase do fungo *G. lucidum* mostrou menor taxa de dessorção quando comparada às demais, sendo a lacase de *P. ostreatus* a mais afetada pela adição do sal, alcançando uma taxa de 89,61 % de dessorção (Figura 2).

Para que a aplicação enzimática no setor industrial seja viável, é preciso obter um biocatalisador estável, que tenha suas propriedades preservadas durante o processo e que se possível, possa permitir a reutilização do mesmo. O desenvolvimento de técnicas de imobilização enzimática em suportes sólidos possibilitou a preservação das propriedades cinéticas e estabilidade estrutural da enzima, reduzindo sua inativação por fatores químicos, físicos ou biológicos, além de permitir o reaproveitamento da mesma, tornando o processo mais sustentável e rentável economicamente (Castro *et al.*, 2010).



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

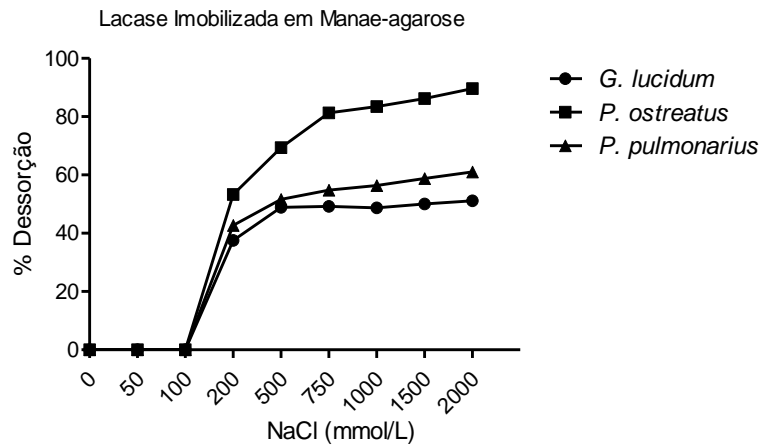


Figura 2: Porcentagem de dessorção da lacase imobilizada no suporte Manae-agarose na presença de NaCl, em diferentes concentrações.

CONCLUSÕES

Conclui-se que as lacases obtidas dos fungos *G. lucidum*, *P. ostreatus* e *P. pulmonarius* apresentaram altas taxas de imobilização no suporte Manae-Agarose e baixas taxas de imobilização nos suportes Glioxil e Agarose epóxido. Os dados são importantes para possíveis aplicações dos derivados em processos industriais, pois observou-se, também, a possibilidade de reúsos e alta tolerância de dessorção na presença de até 100 mmol/L de NaCl.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bolivar, JM, Mateo C, Grazu V, Carrascosa AV, Pessela BC, Guisan JM. 2010. Heterofunctional supports for the one-step purification, immobilization and stabilization of large multimeric enzymes: Amino-glyoxyl versus amino-epoxy supports. *Process Biochem* 45(10): 1692-1698.
- 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.
- Castro HF, Zanin GM, De Moraes FF, Sá-Pereira P. 2010. Rio de Janeiro. Capítulo 6, In: Bon, E. P. S.; Pereira Jr., N.; Gottschalk, L. M. F.; Sá-Pereira, P.; Roseiro, J. C.; Ferrara, M. A. *Enzimas em biotecnologia: Produção, aplicação e mercado*. 3. ed. Interciência.
- Duran N, Esposito E. 2000. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Appl Catal B Environ* 28:83-99.
- Duran N, Rosa MA, D'Annibale A, Gianfreda L. 2002. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microb Technol* 31:907-931.
- Gochev VK, Krastanov AI. 2007. Fungal laccases (Review). *Bulg J Agric Sci* 13:75-83.
- Riva S. 2006. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends Biotechnol* 24:219-226.
- Shin KS, Lee YJ. 2000. Purification and characterization of a new member of the laccase family from the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *Arch Biochem Biophys* 384:109-115.