

Produção e imobilização da enzima lacase em diferentes suportes

Production and immobilization of the laccase enzyme in different supports

RESUMO

A imobilização da enzima lacase, surge como uma alternativa promissora, uma vez que a imobilização pode aumentar a estabilidade e vida útil da enzima, facilitar a separação entre produto e catalisador, possibilitando a reutilização e reduzindo os custos do processo. O presente trabalho buscou mostrar os resultados da produção da lacase a partir do fungo *Trametes villosa* em meio semi-sólido com resíduos agroindustriais e sua imobilização em suporte de alginato de sódio com adição de cálcio e cobre e na formação de agregados com ligações cruzadas com micropartículas de ferro (MCLEAS). A produção de lacase nas condições testadas mostrou resultados expressivos, chegando a atividades de até 16.703 U/L. As duas técnicas de imobilização apresentaram resultados significativos de porcentagem de imobilização, resultando em 100% para os MCLEAS e 97,5% para a imobilização com suporte de alginato. As porcentagens de recuperação de atividade enzimática dos imobilizados foram de 18% para os MCLEAS e 4% para a imobilização com suporte de alginato. A produção e imobilização da enzima lacase apresentaram resultados satisfatórios, ambas as técnicas de imobilização devem ser otimizadas e continuar sendo estudadas em razão de suas vantagens e possíveis aplicações.

PALAVRAS-CHAVE: Lacase. Imobilização. Suportes.

ABSTRACT

The immobilization of the laccase enzyme appears as a promising alternative, since immobilization can increase the stability and useful life of the enzyme, facilitate the separation between product and catalyst, enabling reuse and reducing process costs. The present work sought to show the results of the production of the laccase from the fungus *Trametes villosa* in a semi-solid medium with agro-industrial residues and its immobilization in sodium alginate support with addition of calcium and copper and in the formation of cross-linked aggregates with iron microparticles (MCLEAS). The laccase production in the tested conditions showed expressive results, reaching activities of up to 16,703 U/L. Both immobilization techniques showed significant results of immobilization percentage, resulting in 100% for MCLEAS and 97.5% for immobilization with alginate support. The production and immobilization of the laccase enzyme showed satisfactory results, both immobilization techniques must be optimized and continue to be studied due to their advantages and possible applications.

KEYWORDS: Lacasse. Immobilization. Supports.

Roberta dos Anjos Peretiatko
roh.0301@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

Giselle Maria Maciel
gisellemariam@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

Tatiane Brugnari
tatiane.bru@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

Lacases (E.C. 1.10.3.2) são enzimas pertencentes à família das enzimas multicobre, cuja estrutura física se mantém estável, em parte, pela presença de quatro íons de cobre em seu sítio ativo. A eficiência catalítica desta enzima está relacionada ao potencial redox, que advém das características do cobre T1 no sítio ativo, podendo ser divididas em enzimas de alto e baixo potencial redox, onde as secretadas pelos fungos basidiomicetos, conhecidos como “podridão branca”, são de alto potencial redox. Para obtenção de uma boa produção dessas enzimas por fungos basidiomicetos a adição de resíduos agroindustriais e soluções adicionais contendo metais ao meio de cultivo tem sido uma boa alternativa, podendo levar a um “aumento na produção de lacase de até 43%” (RIEDI, 2019).

As reações enzimáticas em geral são seletivas e não necessitam de ativação de grupos funcionais, o que leva a vantagens sobre rotas sintéticas convencionais, como maior eficiência energética, menor formação de resíduos e maior grau de pureza em seus produtos. Em razão de suas propriedades, as lacases têm sido estudadas em várias aplicações biotecnológicas, como a biodegradação de xenobióticos, bioremediação de efluentes industriais e solos contaminados, produção de etanol, utilização em biosensores, descoloração de corantes e clarificação de vinhos e chás. No entanto, as aplicações citadas tem menor viabilidade com a lacase na forma livre, em razão das mesmas serem moléculas altamente sensíveis e estarem sujeitas a fatores químicos, físicos ou biológicos, onde a enzima pode desnaturar ou perder sua atividade, limitando sua vida útil durante uso ou estocagem.

Muitas das características indesejáveis no uso da enzima na forma livre, podem ser amenizadas ou removidas com a utilização das enzimas na forma imobilizada. As enzimas imobilizadas têm sido largamente empregadas em indústrias químicas, farmacêuticas e alimentícias, em razão das suas vantagens sobre as enzimas livres, sendo elas: maior facilidade de separação do produto do catalisador, estabilidade operacional, possibilidade de reutilização e aumento da vida útil da enzima, diminuindo os custos do processo. A imobilização das enzimas pode ser obtida por diferentes técnicas. “Normalmente estas envolvem a ligação da proteína em um suporte através de trocas iônicas, adsorção, uso de resina, encapsulamento em um polímero inerte ou ligações covalentes” (ASGHER et al., 2014; SHELDON, 2011).

O presente trabalho, busca avaliar a produção da enzima lacase a partir do fungo *Trametes villosa* em meio semi-sólido com resíduos agroindustriais (bagaço de cana, casca de arroz e bagaço de uva) e sua imobilização por ligações cruzadas intermoleculares adicionadas de micropartículas de ferro (MCLEAS) e na imobilização em suporte de alginato de sódio, cálcio e cobre.

MATERIAL E MÉTODOS

Para obtenção do extrato bruto enzimático o fungo da podridão branca (*Trametes villosa*), disponível no laboratório de Biotecnologia da Universidade

Tecnológica Federal do Paraná, campus Curitiba sede Ecoville, foi cultivado em placas de Petri com Ágar Batata Dextrose (PDA) por 7 dias à 28°C.

Por meio da inoculação, três plugs miceliais do fungo cultivado foram introduzidos em fracos Erlenmeyers de 250 mL com o meio semi-sólido, composto por: 10 g/L de glicose; 0,5 % de peptona; 3 g/L de fosfato de potássio, 1% de casca de arroz; 0,5% de bagaço de uva bordo; 1g de bagaço de cana e 2 mL de MnSO₄ 1mM, CuSO₄ 1mM, e solução mineral de FeSO₄, ZnSO₄ e de MgSO₄. Após foi triturado e filtrado, para separar a biomassa do filtrado e esse foi centrifugado por 10 min a 8.000 rpm e usado como extrato enzimático bruto.

O extrato bruto enzimático foi então utilizado nos testes de imobilização pelas técnicas de formação de agregados com ligações cruzadas com micropartículas de ferro (MCLEAS) e Imobilização de lacases fúngicas em suportes de alginato de sódio com adição de cálcio e cobre.

A imobilização das lacases por MCLEAS foi realizada com base nas metodologias descritas por Kumar et al. (2014), Reza et al. (2010) e Matijosyte et al. (2010). A imobilização foi feita em triplicata, colocando nos frascos Erlenmeyers de 25 mL: 1 mL do extrato bruto diluído a 6600 U/L, 2,5 mL de acetona gelada, 800 µL de glutaraldeído, 20 µL de tampão acetato de sódio (50 mM, pH 5) e 0,05 g das micropartículas magnéticas de ferro. Os frascos Erlenmeyers foram agitados no shaker à 100 RPM, 25 °C por 4 horas.

A imobilização das lacases com o uso de alginato de sódio com adição de cálcio e cobre foi realizada pelo método de encapsulamento, descrito previamente por Niladevi e Prema (2010). Inicialmente, adicionou-se o extrato bruto enzimático (1000 U/L) em uma solução de alginato de sódio (2,5 m/V), a mistura foi agitada em incubadora shaker a 100 rpm, por 30 min. Após, adicionou-se 0,2 M de sulfato de cobre e 0,2 M de cloreto de cálcio à mistura e com o auxílio de uma seringa foram formadas as esferas. As capsulas formadas foram resfriadas em geladeira por 2 horas, filtradas e lavadas com tampão acetato de sódio até a ausência de atividade enzimática no lavado.

As atividades das lacases (livre e imobilizadas) foram avaliadas utilizando como substrato o 2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiazolona-6-sulfônico) (ABTS) conforme descrito por Shin & Lee, (2000).

A atividade da lacase livre foi calculada de acordo com a equação 1.

$$\frac{U}{L} = \frac{A \cdot FD \cdot V_t}{t \cdot V_a \cdot \varepsilon \cdot b} \quad (1)$$

A atividade dos imobilizados, foi calculada de acordo com a equação 2.

$$\frac{U}{g} = \frac{A \cdot FD \cdot V_t}{t \cdot m \cdot \varepsilon \cdot b} \quad (2)$$

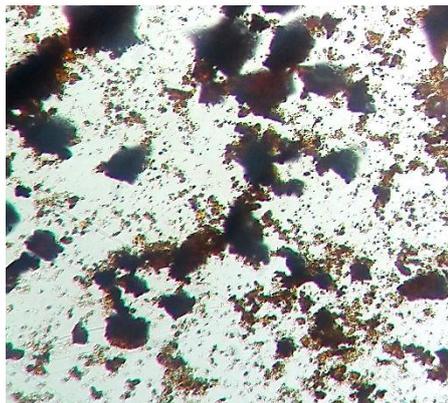
Sendo, para equações 1 e 2, *A* a absorbância, *FD* o fator de diluição, *V_t* o volume total da reação, *t* o tempo, *V_a* o volume da amostra, *ε* o coeficiente de extinção molar do ABTS a 420 nm, *b* o caminho óptico da cubeta. Para a imobilização em alginato *m* é a quantidade em massa das capsulas e para os MCLEAS é a quantidade em massa das micropartículas magnéticas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção da enzima lacase com o uso do fungo da podridão branca *Trametes Villosa* em meio semi-sólido com resíduos agroindustriais mostrou bons resultados, chegando a um extrato enzimático bruto com atividade de até 16.703 U/L.

A porcentagem da enzima imobilizada pelo método dos MCLEAS foi 100%. A enzima imobilizada está representada na imagem 1.

Imagem 1 – MCLEAS



Fonte: A autora, 2020.

A porcentagem de imobilização foi quantificada pelas unidades totais ofertadas no processo diminuída da atividade no sobrenadante e nos lavados após a imobilização. Os MCLEAS apresentaram ausência de atividade já no sobrenadante. Entretanto, nessa técnica de imobilização há a possibilidade de modificação estrutural ou desnaturação da enzima, podendo ainda assim haver lacase no sobrenadante, mas na forma desnaturada.

A atividade enzimática recuperada após a imobilização foi calculada pela razão entre a atividade real (atividade dosada em unidades enzimáticas após a imobilização) e a atividade teórica (unidades enzimáticas ofertadas no processo), resultando em uma atividade de recuperação de 18%. O resultado pode ser atribuído a alguns fatores que interferem na atividade catalítica do imobilizado, como: a ligação da enzima pelo sítio ativo e a modificação da conformação natural da enzima pelo processo.

Apesar das desvantagens, os MCLEAS “melhoram a estabilidade térmica e de armazenamento e mantêm uma alta produtividade e uma boa eficiência catalítica no decorrer de vários ciclos”(KUMAR; SIVANESAN; CABANA, 2014). Além disso, é uma técnica que não necessita de suporte ou matriz para imobilização, reduzindo os custos do processo.

A porcentagem de enzimas imobilizadas no suporte de alginato foi determinada da mesma forma do que os MCLEAS, apresentando apenas uma pequena atividade no sobrenadante. A porcentagem da enzima imobilizada em suporte de alginato foi de 95,7 %. Diferente dos MCLEAS, os danos da imobilização utilizando suporte de alginato, são relativamente insignificantes à conformação natural da enzima, reduzindo as chances de desnaturação da enzima pelo processo. A enzima imobilizada em alginato está representada na imagem 2.

Imagem 2 – Lacase imobilizada em suporte de alginato



Fonte: A autora, 2020.

Na imobilização de lacase com suporte de alginato, a dosagem da atividade enzimática e a atividade recuperada foram calculadas e determinadas do mesmo modo que para os MCLEAS. Apresentando uma atividade recuperada de 4%. Limitação de transferência de massa e carga enzimática, são fatores que podem ser atribuídos e justificar o resultado. Neste método a porosidade das cápsulas formadas pela reação entre o alginato de sódio e o cálcio é um fator limitante e pode ter interferido na acessibilidade do substrato ao sítio ativo da enzima, assim como a dificuldade de excreção do produto da catálise ao meio reacional, impedindo a dosagem real de atividade do imobilizado.

Apesar das desvantagens, na técnica de imobilização utilizando suporte de alginato a conformação natural da enzima é melhor conservada e sua estabilidade é mantida por um longo tempo. É também um método econômico e acessível.

Entre os fatores que podem intervir na atividade catalítica de uma enzima após a imobilização, além dos citados anteriormente para cada técnica em individual, estão também a possibilidade de adsorção de reagentes da catálise pelos imobilizados e a alteração do microambiente da enzima (pH e temperatura) causada pela proteção do suporte ou acúmulo de reagentes e conseqüentemente mudança na cinética de reação e afinidade pelo substrato. Observou-se nos imobilizados em alginato que ao final da reação com o ABTS, as cápsulas ficaram verdes, indicando retenção e ou adsorção do produto no imobilizado (Imagem 2).

Melhores resultados podem ser alcançados através da otimização das técnicas. A parte de otimização e aplicação dos imobilizados seriam feitas no semestre que foi interrompido devido a pandemia.

CONCLUSÃO

A produção da enzima lacase utilizando o fungo da podridão branca *Trametes villosa* em meio semi-sólido com resíduos agroindustriais, mostrou ser um método significativo para a produção da enzima lacase e pode ser seguido para produções futuras da enzima.

A imobilização enzimática de lacases fúngicas pelas técnicas de MCLEAS e suporte de alginato de sódio com adição de cálcio e cobre apresentaram resultados interessantes, porém ambas as técnicas devem ser otimizadas para uma maior rentabilidade dos imobilizados.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Laboratório de Biotecnologia, a Universidade Tecnológica Federal do Paraná e ao CNPq pela bolsa, apoio e pela oportunidade de desenvolver a pesquisa.

REFERÊNCIAS

BILAL, M. et al. Immobilized ligninolytic enzymes: An innovative and environmental responsive technology to tackle dye-based industrial pollutants – A review *Science of the Total Environment*. **Elsevier**, 576, 646–659, 15 jan. 2017. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969716323269>>. Acesso em: 22 ago. 2020

DE OLIVEIRA, I. R. W. Z. et al. Immobilization of laccase in microparticles of chitosan obtained by spray drying and used in the biosensors construction. **Quimica Nova**, v. 32, n. 5, p. 1195–1201, 2009

DURÁN, N. et al. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: A review *Enzyme and Microbial Technology*. **Elsevier**, v. 31, n. 7, p. 907–931, 2 dez. 2002.

HILDÉN, K.; HAKALA, T. K.; LUNDELL, T. Thermotolerant and thermostable laccases. **Biotechnology Letters**, 2009.

HUSAIN, Q.; JAN, U. Detoxification of phenols and aromatic amines from polluted wastewater by using phenol oxidases. **Journal of Scientific and Industrial**, v. 59, p. 286–293, abr 2000. Disponível em:
<http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/26576>. Acesso em 02 set. 2020.

KUMAR, V. V.; SIVANESAN, S.; CABANA, H. Magnetic cross-linked laccase aggregates — Bioremediation tool for decolorization of distinct classes of recalcitrant dyes. **Science of The Total Environment**, v. 487, n. 1, p. 830–839, 15 jul. 2014.

LEE, H.B., PEART, T.E. Bisphenol A contamination in Canadian municipal and industrial wastewater and sludge samples. *Water Pollut. Res. J. Can.* v. 35, p. 283–289, 2000.

MACELLARO, G. et al. Effective mutations in a high redox potential laccase from *Pleurotus ostreatus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 11, p. 4949–4961, 2014.

MATIJOŠYTE, I., Et al. Preparation and use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of laccases. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 62(2), p. 142–148, 2010.

MORENO, A. D. et al. Different laccase detoxification strategies for ethanol production from lignocellulosic biomass by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. **Bioresource Technology**, v. 106, p. 101–109, 1 fev. 2012.

PACHECO, S. M. V.; SOARES, C. H. L. Imobilização e caracterização de lacase e seu uso na biodegradação de efluentes de indústrias papeleiras. **Química Nova**, v. 37, n. 2, p. 209–214, 2014.

PLÁCIDO, J.; IMAM, T.; CAPAREDA, S. Evaluation of ligninolytic enzymes, ultrasonication and liquid hot water as pretreatments for bioethanol production from cotton gin trash. **Bioresource Technology**, v. 139, p. 203–208, 1 jul. 2013.

RIEDI, H. Purificação, caracterização e imobilização de lacases de basidiomicetos e seu uso na degradação simultânea de rifampicina e isoniazida. Dissertação (Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2019. Disponível em: <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/4205>. Acesso em: 1 set. 2020.

SHELDON, R. A. Cross-linked enzyme aggregates as industrial biocatalysts. **Organic Process Research and Development**, v. 15, n. 1, p. 213–223, 21 jan. 2011.

SHLEEV, S. et al. Electrochemical redox transformations of T1 and T2 copper sites in native *Trametes hirsuta* laccase at gold electrode. **The Biochemical journal**, v. 385, n. Pt 3, p. 745–54, 2005.

ZANIN, G.; MORAES, F.F. (2004) Em **Enzimas como agentes biotecnológicos**; Said, S.; Pietro, R. C. L. R., eds.; Legis Summa: Ribeirão Preto.