



VII SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
11 a 13 de setembro de 2019, Londrina - PR

Imobilização da Lacase de *Oudemansiella canarii*: Parâmetros Cinéticos e Reúso

Thaís Marques Uber¹, Gabriel Bruno da Silva¹, Giselle Maria Maciel², Cristiane Vieira Helm³,
Adelar Bracht¹, Rosane Marina Peralta¹

¹Universidade Estadual de Maringá, CEP 87 020-900 Maringá, PR. E-mail: (adebracht@uol.com.br)

²Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Curitiba, PR

³EMBRAPA-FLORESTAS, Colombo, PR

RESUMO

*Neste trabalho, uma lacase de *Oudemansiella canarii* foi imobilizada pela técnica de agregados de enzimas reticuladas (CLEA). A imobilização foi eficiente com um rendimento de imobilização de 95% e retenção de atividade de 66,7%. As constantes cinéticas, K_M e V_{max} , determinadas usando ABTS como substrato, foram $0,21 \pm 0,01$ mM e $2,04 \pm 0,04$ $\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ para a enzima livre e $0,14 \pm 0,01$ mM e $1,25 \pm 0,03$ $\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ para a enzima imobilizada, respectivamente. A enzima imobilizada foi testada quanto ao seu reúso, mantendo uma atividade de 80% no décimo ciclo.*

Palavras-chave: lacase; cinética enzimática; imobilização de enzimas; fungos ligninolíticos

INTRODUÇÃO

As lacases (benzenodiol:oxigênio oxidorreduzases, EC 1.10.3.2) são cobre-oxidases que catalisam a oxidação de um elétron de compostos fenólicos, aminas aromáticas e outros substratos ricos em elétrons com a redução concomitante de O_2 para H_2O . A enzima é amplamente distribuída em fungos, plantas, insetos, bactérias e líquens, mas as lacases derivadas de fungos ligninolíticos tem recebido maior atenção graças ao grande potencial biotecnológico e versatilidade para oxidar uma ampla variedade de substratos, incluindo diferentes compostos xenobióticos (PERALTA et al. 2017).

A aplicação de lacases solúveis na biodegradação de xenobióticos apresenta algumas desvantagens, como o alto custo de produção, a perda de estabilidade e a não reutilização. Esses fatores tornam menos atraente seu uso em processos de bioremediação. A imobilização de lacases pode resolver, pelo menos em parte, a limitação para aplicação em larga escala. Por esta razão, esforços consideráveis têm sido feitos nos últimos anos para a obtenção de lacases imobilizadas úteis em processos de biorremediação. A imobilização da lacase resulta em diversas melhorias para sua aplicação, incluindo aumentos na estocagem e estabilidades operacionais, melhor controle da reação enzimática em solução aquosa e possibilidade de reúso. Diferentes enzimas, incluindo lacases, têm sido imobilizadas utilizando a metodologia de agregados de enzimas reticuladas (CLEAs), que consiste em uma precipitação controlada das enzimas seguida de reticulação por meio do uso de reagentes bifuncionais como o glutaraldeído (SHELDON, 2007; VRŠANSKÁ et al. 2018) (Fig. 1).

Universidade Estadual de Londrina - Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380 - Campus Universitário
Caixa Postal 10.011 CEP 86057-970 Centro de Ciências Exatas - Departamento de Bioquímica e Biotecnologia
Fone +55 (43) 3371.4270 - biq@uel.br

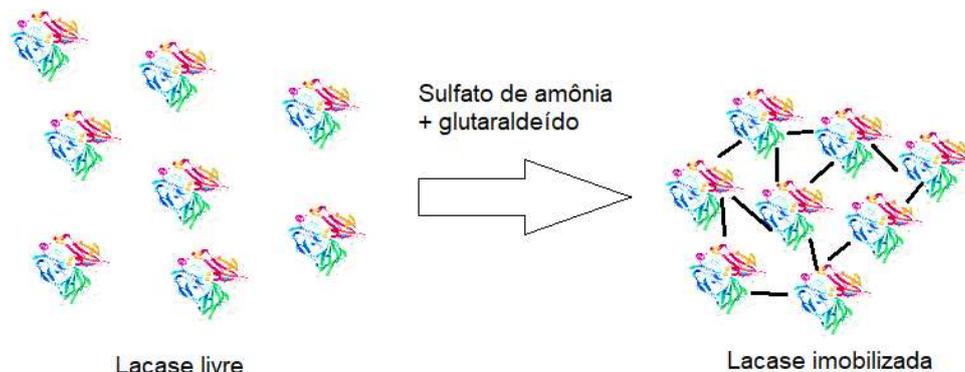


Figura 1. Esquema geral de imobilização da lacase por formação de agregados de enzimas reticuladas.

Os CLEAs têm sido propostos como alternativas às imobilizações convencionais em suportes sólidos por serem simples, rápidos e de baixo custo (SHELDON, 2007). O objetivo deste trabalho foi imobilizar a lacase de *O. canarii* utilizando a metodologia CLEA e comparar as constantes cinéticas das enzimas livre e imobilizada bem como o reúso da enzima imobilizada.

MATERIAL E MÉTODOS

Oudemansiella canarii foi identificado e gentilmente cedido pela Embrapa-Floresta, Colombo, PR. O fungo foi mantido em laboratório através de repiques sucessivos em ágar-batata-dextrose. Para a produção de lacase, discos miceliais de *O. canarii* (diâmetro de 10 mm) foram transferidos para frascos Erlenmeyer (0,25 L) contendo uma mistura de 2,5 g de bagaço de cana e 2,5 g de farelo de trigo como substrato e 15 mL de solução mineral. Os cultivos foram mantidos por 14 dias a 28 °C na ausência de luz. A lacase foi extraída pela adição de água aos cultivos. Após centrifugação, o extrato enzimático foi dialisado contra água destilada e concentrado por liofilização (IARK et al. 2019).

Para imobilização da lacase de *O. canarii*, utilizou-se a metodologia CLEA. Resumidamente, ao extrato enzimático adicionou-se sulfato de amônia para uma concentração final de 55%. Em seguida, adicionou-se glutaraldeído 25% como agente de reticulação. A mistura foi mantida a 4 °C por 24 h, sendo em seguida centrifugada por 15 min a 5000 rpm. Os CLEAs foram lavados até remoção do excesso de sulfato de amônio e glutaraldeído e armazenados a 4° C em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0.

Para determinação da lacase utilizou-se ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico, ABTS) como substrato em tampão acetato de sódio 50 m, pH 5,0, à 40 °C e tempo de reação de 5 min. A oxidação do ABTS foi determinada pelo aumento da absorbância em 420 nm ($\epsilon = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (MOTA et al., 2015). Uma unidade de atividade de lacase foi definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar 1 μmol de substrato por minuto. A reutilização da enzima imobilizada foi analisada repetindo consecutivamente a experiência nas mesmas condições mencionadas acima. Após cada ciclo, os derivados foram lavados três vezes com tampão de acetato de sódio (pH 5,0) e centrifugados a 2000 rpm para recuperação da enzima imobilizada.

Para obtenção dos parâmetros cinéticos (velocidade máxima, V_{max} e a constante de Michaelis-Menten, K_M), as velocidades iniciais foram determinadas utilizando concentrações de ABTS variando de 0,1 a 2,0 mM. Para determinar K_M e V_{max} , a equação de Michaelis-Menten

($v = V_{max}[S]/(K_M + [S])$) foi ajustada diretamente aos dados experimentais usando o procedimento de ajuste não-linear de mínimos quadrados do Graph-Pad Prism. Software 5.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A imobilização da lacase utilizando a técnica CLEA foi eficiente com um rendimento de imobilização de 95% e retenção de atividade de 66,7%. As constantes cinéticas, K_M e V_{max} , determinadas usando ABTS como substrato, foram $0,21 \pm 0,01$ mM e $2,04 \pm 0,04 \mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ para a enzima livre e $0,14 \pm 0,01$ mM e $1,25 \pm 0,03 \mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ para a enzima imobilizada, respectivamente (Fig. 2). O menor valor de K_M para a lacase imobilizada sugere que após a imobilização, a lacase de *O. canarii* apresentou uma maior afinidade para o ABTS. Isso implica que a interação entre enzima e substrato pode ter sido reforçada por uma orientação adequada do sítio ativo da enzima em direção ao substrato (SANGEETHA & ABRAHAM, 2008).

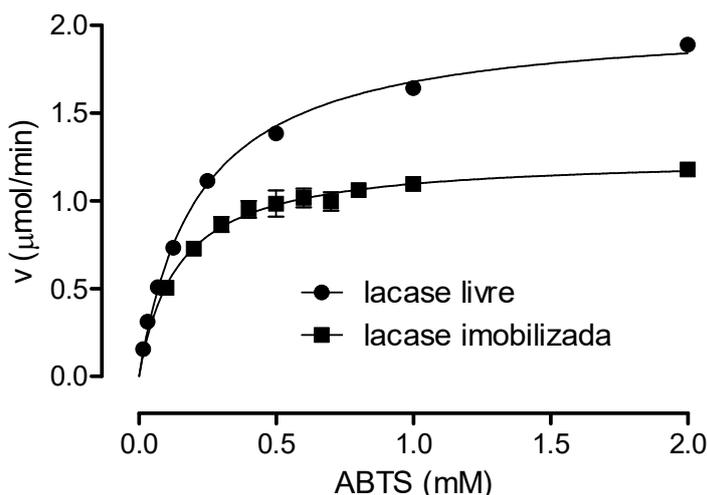


Figura 2. Curva de saturação pelo substrato (ABTS) das lacases livre e imobilizada

Como o reuso é um parâmetro importante a ser considerado para enzimas imobilizadas, o reuso da lacase imobilizada foi examinado aplicando ciclos consecutivos de oxidação do substrato ABTS. Como pode ser visto na Fig. 3, a enzima imobilizada reteve 80% da capacidade inicial de oxidação do substrato após 10 ciclos de reuso.

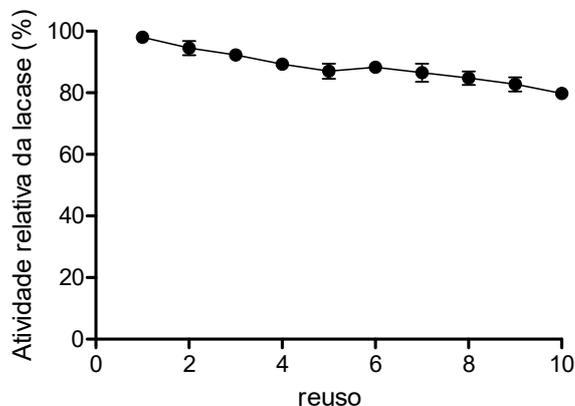


Figura 3. Réuso da lacase imobilizada de *O. canarii*

CONCLUSÕES

No presente estudo, pela primeira vez, a lacase de *Oudemansiella canarii* foi imobilizada pela técnica CLEA. As propriedades cinéticas das enzimas livre e imobilizada foram comparadas. Também avaliamos o réuso da enzima imobilizada, que apresentou 80% da atividade inicial após 10 ciclos de oxidação do substrato ABTS. Novos experimentos estão sendo realizados para avaliar a estabilidade, propriedades físico-químicas e aplicação da enzima imobilizada em processos biotecnológicos.

Agências de Fomento: Capes, CNPQ e UEM.

REFERÊNCIAS

- IARK, D., BUZZO, A.J.R., GARCIA, J.A.A., CORREA, V.G., HELM, C.V., CORREA, R.C.G., PERALTA, R.A., PERALTA MUNIZ MOREIRA, R.F., BRACHT, A., PERALTA, R.M. Enzymatic degradation and detoxification of azo dye Congo red by a new laccase from *Oudemansiella canarii*. **Bioresource Technology**, v. 289, article 121655, 2019
- MOTA, T.R., KATO, C.G., PERALTA, R.A., BRACHT, A., MORAIS, G.R., BAESSO, M.L., SOUZA, C.G.M., PERALTA, R.M. Decolourization of congo red by *Ganoderma lucidum* laccase: evaluation of degradation products and toxicity. **Water, Air, Soil & Pollution**, v. 226, pp. 351-36, 2015
- PERALTA, R.M., SILVA, B.P., CÔRREA, R.C.G., KATO, C.G., SEIXA, F.A.V.S., BRACHT, A. Enzymes from Basidiomycetes: peculiar and efficient tools for biotechnology. In: G Brahmachari, A.L. Demain and J.L. Adrio (Eds), **Biotechnology of Microbial Enzymes-Production, Biocatalysis and Industrial Applications**. (pp. 119-150). Elsevier, 2017
- SANGEETHA, K., ABRAHAM, T.E. Preparation and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEA) of subtilisin for controlled release applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, p. 314-319, 2008
- SHELDON, R.A. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, p. 1289-1307, 2007
- VRŠANSKÁ, M., VOBERKOVÁ, S., JIMÉNEZ, A.M.J., STRMISKA, V., ADAM, V. Preparation and optimisation of cross-linked enzyme aggregates using native isolate white rot fungi *Trametes versicolor* and *Fomes fomentarius* for the decolourisation of synthetic dyes. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, p. 23-37, 2018