

CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DAS LACASES LIVRES E IMOBILIZADAS DE *Trametes versicolor* M5

Sarah de Oliveira Vicente (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Paloma Ribeiro Lopes de Sá (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Cristina Giatti Marques de Souza (Orientadora). E-mail: cgmsouza@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá, PR.

Ciências Biológicas, Bioquímica/Bioquímica de Microrganismos

Palavras-chave: biorremediação; glicoproteína; microrganismo.

RESUMO

O uso de resíduos agrícolas e a imobilização de enzimas vêm ganhando cada vez mais espaço e importância por conta da bioeconomia circular. O primeiro por conta da eficiência do processamento da biomassa por microrganismos, gerando um produto de interesse biotecnológico, as enzimas. O segundo, por conta de o processo conferir um aumento da estabilidade, recuperação e possibilidade de reuso. Parâmetros como pH e temperatura são fatores de grande importância para a aplicabilidade de enzimas. Este trabalho teve como objetivo realizar estas caracterizações. O fungo cresceu em meio sólido e as enzimas foram extraídas por acréscimo de água destilada. A lacase, principal enzima produzida, foi imobilizada usando a técnica de reticulação por glutaraldeído e a imobilização teve rendimento de 30%. O pH ótimo ficou entre 4,5-5,0 e a temperatura ótima entre 50-60 °C. Quanto à estabilidade à temperatura, a enzima livre se mostrou mais estável entre 30 e 60 °C enquanto a enzima imobilizada perdeu atividade em 50 °C. Km foi mais alta para a enzima imobilizada, mas ela teve uma velocidade maior de oxidação do ABTS.

INTRODUÇÃO

Os fungos da podridão branca da madeira são conhecidos pelo seu aparato enzimático inespecífico do qual lacases, manganês peroxidases, lignina peroxidases e demais enzimas estão envolvidas no processo de degradação da lignina. Lacases têm sido muito estudadas nos processos de biorremediação de compostos xenobióticos contribuindo assim para as tecnologias de tratamento de resíduos, sejam eles depositados no solo ou contaminantes de águas. A produção agrícola acaba gerando muitos resíduos ao longo da produção de diversos produtos, o que se torna um problema por se acumularem. Porém, eles possuem potencial biotecnológico para serem usados como substrato no cultivo de fungos, uma vez que simulam as condições de crescimento no ambiente natural, tornando-se uma estratégia eficiente para diminuir o acúmulo de resíduos no ambiente e usá-los na pesquisa, visando uma aplicação industrial (TÍŠMA *et al.*, 2021; STOILOV *et al.*,

2010). Uma forma de usar industrialmente estas enzimas produzidas é imobilizá-las, pois se tornam mais estáveis à desnaturação por calor, solventes orgânicos, proteólise e há a possibilidade de reuso, tornando-se economicamente mais interessante. Além disso, este método de imobilização purifica e imobiliza em apenas um estágio, sendo assim um método interessante a ser utilizado. O objetivo deste trabalho foi o de imobilizar a lacase de *T. versicolor* isolado M5 e avaliar parâmetros que influenciam na atividade da enzima livre e imobilizada.

MATERIAIS E MÉTODOS

Macromiceto: *Trametes versicolor* (M5), da coleção de culturas do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Alimentos (LBM)/DBQ/UEM O fungo foi mantido através de repiques sucessivos em placas de Petri contendo meio de extrato de malte a 2%.

Fermentação em estado sólido: o fungo foi cultivado em meio sólido contendo sabugo de milho (3 g) acrescido de uma solução contendo 2% de glicose e 0,1% de peptona para dar uma umidade de 85%. Três discos de micélio do isolado M5, de (\varnothing 2 cm), foram inoculados em frascos Erlenmeyer (125 mL) contendo o meio. Todos os materiais utilizados foram esterilizados a 121 °C e 1 atm por 20 minutos antes do uso. Os cultivos permaneceram em estufa a 28 ± 2 °C por 8 dias e foram interrompidos com 20 mL de água destilada gelada, deixados em geladeira por 30 minutos e filtrados em gaze. Os filtrados foram congelados para serem usados nos demais procedimentos.

Atividade enzimática e proteínas: atividade lacase foi medida através da oxidação do ABTS e determinada pelo aumento na absorbância 420 nm ($\epsilon = 36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). As proteínas solúveis no extrato bruto foram mensuradas pelo método de Bradford (1976). As lacases do fungo foram imobilizadas utilizando-se a técnica de reticulação com glutaraldeído após precipitação com sulfato de amônio 75%. Após acréscimo do glutaraldeído a mistura permaneceu em geladeira por 24 horas, foi centrifugada e lavada com tampão da enzima até não ter mais atividade no sobrenadante. Os sobrenadantes foram testados quanto à atividade das enzimas para cálculo do rendimento e recuperação. A eficiência do procedimento de imobilização foi expressa como rendimento de imobilização $IY(\%) = UA - UE / UA * 100$ (MATIJOŠYTE *et al.*, 2020).

Caracterização: as enzimas foram caracterizadas em relação às suas atividades e estabilidade frente ao pH e temperatura. A atividade da enzima livre (EL) e imobilizada (EIM) foi determinada na faixa de pH de 2,5 a 7,0 usando tampão citrato de sódio 50 mM. O tempo de incubação foi de 5 minutos a 40 °C em banho Maria. A temperatura ótima e a estabilidade à temperatura foram determinadas incubando a enzima livre e imobilizada em tampão de pH ótimo, em temperaturas de 30 a 70 °C (temperatura ótima) e na mesma faixa por vários intervalos de tempo (estabilidade). Parâmetros de K_m e $V_{m\acute{a}x}$. Foram obtidos medindo-se a atividade da enzima nas concentrações de 1 a 10mM de ABTS.

Os dados obtidos, foram plotados no software Prism-GraphPad© versão 5.0 e apresentados em porcentagem relativa da atividade da enzima.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Comparou-se a estabilidade térmica, pH ótimo, temperatura ótima, Km e Vmáx tanto das enzimas livres, quanto das enzimas imobilizadas. A figura 1 mostra os resultados obtidos. No gráfico A pode-se perceber que a EL apresentou temperatura ótima de 55 °C e boa atividade entre 40 °C e 65 °C, já a EIM (gráfico B), apresentou temperatura ótima em 60 °C com a maior atividade relativa entre as temperaturas analisadas. Quando se analisou a estabilidade térmica da EL (gráfico C), ela apresentou-se estável em todas as temperaturas estudadas, exceto a 70 °C. Já a EIM apresentou uma excelente estabilidade entre 30 °C e 40 °C, porém perdeu gradativamente sua atividade em 50 °C e em 60 °C, não apresentando atividade a 70 °C. Quanto ao pH, a imobilização parece não ter alterado as características da proteína, sendo que a EL (gráfico E) e a EIM (gráfico F), apresentaram pH ótimo em 4,5 e 5,0 e comportamento semelhante na faixa de pH testada, sendo que pequena diferença na atividade da EIM em pH mais ácido foi encontrada. Os valores encontrados para os parâmetros de pH e temperatura não diferem dos encontrados na literatura (YANG *et al.*, 2020). Km e Vmáx. obtidos, resultaram nos valores da Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros cinéticos das enzimas livre (EL) e imobilizada (EIM)

Enzimas	Km (mM)	Vmáx. (umoles/min.)
EL	0,884 ± 0,093	755,4 ± 13,48
EIM	2,657 ± 0,22	1.396 ± 31,40

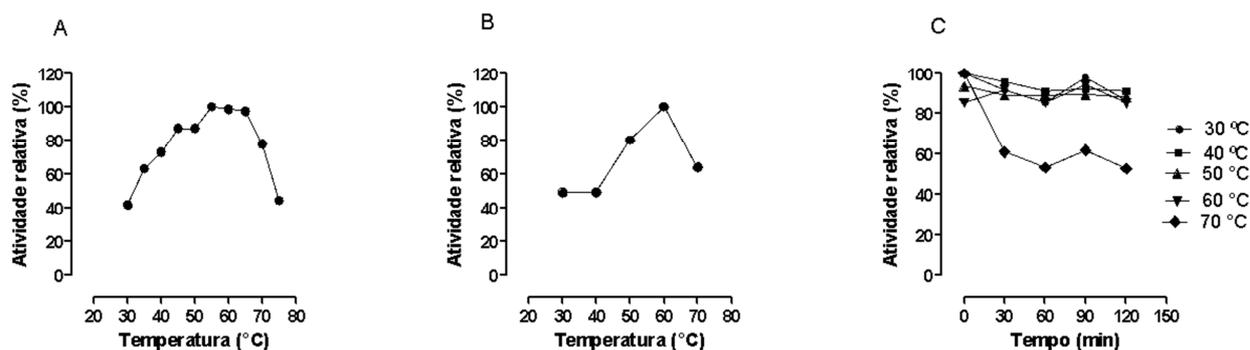
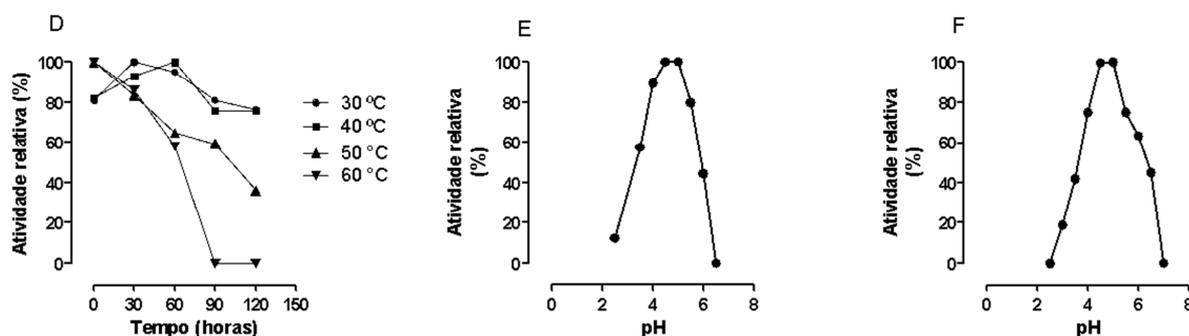


Figura 1: Em A e B Temperatura ótima das enzimas livre (EL) e imobilizada (EIM). Em C e D estabilidade térmica e em E e F, pH ótimo respectivamente.

CONCLUSÕES

As enzimas apresentaram comportamento semelhante frente ao pH e temperatura, porém a livre apresentou maior estabilidade térmica que a enzima imobilizada. O maior valor de Km encontrado para a enzima imobilizada, indica que a imobilização influenciou na afinidade desta pelo ABTS. Portanto, é necessário otimizar os



processos de imobilização e novo estudo para verificar o real potencial do uso das lacases imobilizadas de *T. versicolor* M5.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, à PPG/UEM e ao Laboratório de Bioquímica de Microrganismos (LBM – DBQ-UEM) nossos agradecimentos.

REFERÊNCIAS

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.1-2, p.248-254, 7 may 1976. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0003269776905273>. Acesso em: 18 ago. 2023.

YANG, X. et al. A Thermo-Active Laccase Isoenzyme from *Trametes trogii* and its potential for dye decolorization at high temperature. **Frontiers in Microbiology**, v. 11 – 241, feb 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.00241/full>. Acesso em 18 ago. 2023.

MATIJOŠYTE, I. et al. Preparation and use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of laccases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.62, p. 142-148, feb. 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1381117709002537>. Acesso em: 18 ago. 2023.

STOILOV, Ivanka; KRASTANOV, Albert, STANCHEV, Veselin. Properties of crude laccase from *Trametes versicolor* produced by solid-substrate fermentation. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 1, p. 208–215, 22 apr. 2010. Disponível em: https://www.scirp.org/html/10-7300029_2368.htm. Acesso em: 18 ago. 2023.

TIŠMA, Marina *et al.* *Trametes versicolor* in lignocellulose-based bioeconomy: State of the art, challenges and opportunities. **Bioresource Technology**, v.330, n. 124997, jun. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852421003369>. Acesso em: 18 ago. 2023.