UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JOSÉ CLEUB SILVA SANTOS JÚNIOR

Imobilização e caracterização físico-química parcial de uma lacase produzida por *Pleurotus pulmonarius* utilizando fermentação em estado sólido com resíduos agroindustriais

JEQUIÉ/BA

SETEMBRO/2019

JOSÉ CLEUB SILVA SANTOS JÚNIOR

Imobilização e caracterização físico-química parcial de uma lacase produzida por *Pleurotus pulmonarius* utilizando fermentação em estado sólido com resíduos agroindustriais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Baraquizio Braga do Nascimento Júnior
Coorientador: Profª. Drª. Andréa Miura da Costa

JEQUIÉ/BA
SETEMBRO/2019

S237i Santos Júnior, José Cleub Silva.

Imobilização e caracterização físico-química parcial de uma lacase produzida por *Pleurotus pulmonarius* utilizando fermentação em estado sólido com resíduos agroindustriais / José Cleub Silva Santos Júnior - Jequié, 2019.

61f.

(Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação do Prof. Dr. Baraquizio Braga do Nascimento Júnior e coorientação da Profa. Dra. Andréa Miura da Costa)

Rafaella Câncio Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária – UESB - Jequié

TERMO DE APROVAÇÃO

JOSÉ CLEUB SILVA SANTOS JÚNIOR

"Imobilização e caracterização físico-química parcial de uma lacase produzida por *Pleurotus pulmonarius* utilizando fermentação em estado sólido com resíduos agroindustriais"

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Baraquizio Braga do Nascimento Junior - Orientador
(UFRJ, Rio de Janeiro - RJ, 2008)

Prof. Dr. João Carlos Teixeira Dias
(UFMG, Belo Horizonte - MG, 2003)

Prof. Dr. Gildomar Lima Valasques Junior
(UEFS, Feira de Santana - BA, 2014)

Dissertação aprovada pelo Colegiado do Curso de Pós-graduação em Química em 20 / 09 / 19

À minha companheira, pela dedicação, suporte
e incansável apoio ao longo do período
de elaboração deste trabalho

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Secretaria de Educação do Estado da Bahia – SEC, por permitir o meu afastamento para dedicação aos estudos.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

Às agências financiadoras do projeto, FAPESB e CNPq, pela contribuição para a realização da pesquisa.

Ao meu orientador Prof. Baraquízio Braga do Nascimento Júnior pela orientação, ensinamentos, incentivo e dedicação dispensados a mim.

À minha coorientadora, Prof. Dra. Andréa Miura da Costa pelos ensinamentos, colaboração e apoio.

A minha amada companheira Ariana Santos, pela paciência, apoio, compreensão e ajuda. Sem dúvida, minha gratidão por ter colaborado imensamente em todos os momentos de dificuldade.

A minha querida família, por entender minha ausência e pelo apoio. A minha irmã Jamile Maiara e especialmente aos meus pais amados, meus infinitos agradecimentos.

A todos os colaboradores do LABMA que também contribuíram significativamente para o andamento das atividades, em especial Camila Oliveira e Manuela Gomes.

Aos meus queridos colegas e amigos de laboratório, especialmente minha amiga Kelly Menezes, pelo companheirismo e ajuda durante toda a caminhada do Mestrado.

Enfim, a todos que colaboraram com a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos

O universo não foi feito à medida do ser humano,
mas tampouco lhe é adverso: é-lhe indiferente.

Carl Sagan

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Topologia dos domínios (I, II e III) e os centros de íons cobre da lacase. O domínio I mostrado em vermelho, o domínio II em verde e o domínio III em azul... 19

Figura 2. Sítio ativo da lacase com os quatro centros de íons cobre com os aminoácidos de coordenação. 20

Figura 3. Mecanismo da reação de catálise nos centros de cobre da lacase. 21

Figura 4. Interações químicas para imobilização enzimática. (a) Adsorção de enzimas sobre um suporte. (b) Ligação covalente entre os grupos nucleófilo da enzima e o suporte... 23

Figura 5. Imobilização de enzimas por interações físicas. (a) Entrelaçamento de enzimas numa matriz porosa. (b) Encapsulamento de enzimas. 24

Figura 6. Reação de condensação do glutaraldeído com o grupo amino. 25

Figura 7. Estrutura química do alginato: (G) α-L-gulurônico e (M) β-D-manurônico. 28

Figura 8. Enzima imobilizada em alginato de cálcio (A) e tamanho médio das microesferas (B). 36

Figura 9. Efeito do pH na atividade da lacase de *P. pulmonarius* a 40 °C. Os dados são apresentados como média ± DP (n = 3). 38

Figura 10. Efeito da temperatura na atividade da lacase de *P. pulmonarius* em pH ótimo (pH 4,0). Os dados são apresentados como média ± DP (n = 3). 39

Figura 11. Termoestabilidade da lacase livre (A) e da lacase imobilizada (B) nas condições ótimas de pH (4,0) e em diferentes tempos de incubação. Os dados são apresentados como média ± DP (n = 3). 40

Figura 12. Cinética de desativação da lacase livre e da lacase imobilizada nas temperaturas: 30 °C (A), 40 °C (B), 50 °C (C) e 60 °C (D) em pH (4,0). 43

Figura 13. Determinação dos parâmetros cinéticos (k_m e V_{max}) pelo método gráfico Lineweaver-Burk da lacase livre e lacase imobilizada à 40°C e pH 4,0. 45

Figura 14. Estabilidade de armazenamento à 4 °C em tampão acetato (pH 4,0) para lacase livre e lacase imobilizada. 50

Figura 15. Potencial de reutilização da lacase imobilizada em ciclos de oxidação do ABTS. 51

LISTA DE TABELAS

Pág.

Tabela 01. Parâmetros da lacase imobilizada por aprisionamento (sem reticulação) e por aprisionamento com reticulação. 37

Tabela 02. Parâmetros da inativação térmica da lacase livre e da lacase imobilizada. Constante de decaimento térmico (k_1) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$). 44

Tabela 03. Parâmetros cinéticos: constante de Michaelis-Menten (km) e velocidade máxima (v_{max}) da lacase livre e da lacase imobilizada. 46

Tabela 04. Efeito de íons e aditivos na atividade da lacase livre e da lacase imobilizada. 47

Imobilização e caracterização físico-química parcial de uma lacase produzida por *Pleurotus pulmonarius* utilizando fermentação em estado sólido com resíduos agroindustriais

Autor: José Cleub Silva Santos Júnior

Orientador: Baraquizio Braga do Nascimento Júnior

Coorientador: Andréa Miura da Costa

RESUMO:

As lacases de origem fúngica são enzimas de alto potencial redox utilizadas na indústria de alimentos e em biotecnologia ambiental. Geralmente, a lacase imobilizada apresenta estabilidade maior do que a forma livre e ainda pode ser recuperada e reutilizada. A produção da lacase por *Pleurotus pulmonarius* foi realizada utilizando fermentação em estado sólido tendo resíduos agroindustriais como substrato. A condição de produção de lacase (893,5 $U.L^{-1}$) foi com umidade inicial de 85%, 5 dias de cultivo e 30°C. As microesferas com lacase reticulada com glutaraldeído 2% apresentou a melhor eficiência de imobilização (72,4%) e reduziu a lixiviação enzimática em aproximadamente 3 vezes. O pH 4,0 foi o ótimo da lacase livre e imobilizada, enquanto que a temperatura ótima foi 40 e 50 °C, respectivamente. A 40 °C a constante de decaimento (k_1) da lacase imobilizada reduziu em 2 vezes e o tempo de meia vida aumentou 2,3 vezes em relação aos valores obtidos para a enzima livre. O valor de k_m aumentou de 0,124 para 0,177 mM e o valor de V_m diminuiu de 0,162 para 0,089 $mM.min^{-1}$ na lacase livre e imobilizada, respectivamente. A lacase livre e imobilizada foram inibidas pelo β-mercaptoetanol, SDS e EDTA e ativadas na presença de Cu^{+2}. A lacase livre reteve 36% da atividade inicial após 7 dias de armazenamento, enquanto a lacase imobilizada manteve 67%. Após cinco ciclos de uso a lacase imobilizada apresentou atividade superior a 70%. Estes resultados indicam que a lacase apresenta características físico-químicas que permitem a utilização tanto da sua forma livre quanto imobilizada. Além disso, a imobilização melhorou a estabilidade ao armazenamento e possibilitou o reuso da lacase.

Palavras-Chave: Lacase, imobilização, caracterização *e Pleurotus pulmonarius*.

Immobilization and partial physicochemical characterization of a laccase produced by *Pleurotus pulmonarius* using solid-state fermentation with agroindustrial residues

Author: José Cleub Silva Santos Júnior

Advisor: Baraquizio Braga do Nascimento Júnior

Co-Advisor**:** Andréa Miura da Costa

ABSTRACT:

Laccases of fungal origin are high potential redox enzymes used in the food industry and environmental biotechnology. Generally, the immobilized laccase has greater stability than the free form and can still be recovered and reused. *Pleurotus pulmonarius* laccase production was performed using solid-state fermentation with agroindustrial residues as substrate. The condition of laccase production (893.5 $U.L^{-1}$) was with initial humidity of 85%, 5 days of cultivation and 30 °C. The microspheres with 2% glutaraldehyde cross-linked laccase showed the best immobilization efficiency (72.4%) and reduced enzymatic leaching by approximately 3-fold. The pH 4.0 was the optimum of free and immobilized laccase, while the optimum temperature was 40 and 50 °C, respectively. At 40 °C the decay constant (k_1) of the immobilized laccase decreased by 2 times and the half-life increased 2.3 times compared to the values obtained for the free enzyme. The k_m value increased from 0.124 to 0.177 mM and the V_m value decreased from 0.162 to 0.089 $mM.min^{-1}$ in free and immobilized laccase, respectively. Free and immobilized laccase were inhibited by β-mercaptoethanol, SDS and EDTA and activated in the presence of Cu^{+2}. Free laccase retained 36% of initial activity after 7 days of storage, while immobilized laccase maintained 67%. After five cycles of use the immobilized laccase showed activity greater than 70%. These results indicate that laccase has physicochemical characteristics that allow the use of both its free and immobilized form. In addition, immobilization improved storage stability and enabled laccase reuse.

Keywords: Laccase, immobilization, characterization and *Pleurotus pulmonarius.*

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO.....15

2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....16

2.1 O Gênero *Pleurotus* 16

2.2 Lacase.....18

2.3 Imobilização de enzimas 22

3.0 OBJETIVOS.....29

3.1 Geral.....29

3.2 Específico.....29

4.0 MATERIAL E MÉTODOS.....30

4.1 Reagentes.....30

4.2 Obtenção e manutenção de *Pleurotus pulmonarius CCB*30.....30

4.3 Produção do extrato enzimático bruto.....30

4.4 Determinação da atividade de lacase 31

4.5 Imobilização de lacase 32

4.5.1 Encapsulação da lacase em alginato.....32

4.5.2 Reticulação da lacase em glutaraldeído.....32

4.5.3 Eficiência de imobilização 32

4.5.4 Teste de lixiviação enzimática.....33

4.6 Caracterização bioquímica da lacase livre e da lacase imobilizada 33

4.6.1 Efeito do pH sobre a atividade enzimática 33

4.6.2 Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática 34

4.6.3 Estabilidade térmica.....34

4.6.4 Efeito de íons e reagentes sobre a atividade enzimática 35

4.6.5 Determinação dos parâmetros de Michaelis-Menten 35

4.6.6 Armazenamento e reuso 35
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....36
5.1 Obtenção do extrato bruto enzimático com alta atividade de lacase.....36
5.2 Imobilização e lixiviação da lacase.....36
5.3 Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade 38
5.4 Estabilidade térmica da lacase.....39
5.5 Parâmetros da inativação térmica.....42
5.6 Estudo Cinético 45
5.7 Efeito de íons e aditivos 47
5.8 Efeito do armazenamento e da reutilização.....49
6.0 CONCLUSÕES.....52
7.0 PERSPECTIVAS 53
REFERÊNCIAS

1. INTRODUÇÃO

A lacase é uma enzima que pertence à família da multicobre oxidases e catalisam reações de oxidação do substrato concomitantemente como a redução do oxigênio molecular (O_2) à água (H_2O). Estas enzimas são encontradas em diversos organismos, porém às produzidas por fungos decompositores da madeira são de grande interesse biotecnológico. Entre as espécies de fungos, o *Pleurotus pulmonarius* está entre as mais estudas, principalmente pela alta produção de lacase e pela facilidade de crescimento em substratos lignocelúsicos, como os provenientes da indústria do processamento da pupunha (*Bactris gasipaes*) e da amêndoa de cacau (*Theobroma cacao*) (SINGH; SINGH, 2014; PERALTA et al., 2016).

Devido ao elevado potencial redox da lacase estudos estão sendo desenvolvidos com vista a sua aplicação em diversos setores industriais. No entanto, muitas das condições operacionais da indústria são incompatíveis as características físico-químicas da lacase em sua forma solúvel. Portanto, torna-se imperativo o estudo e desenvolvimento de sistemas enzimáticos que garantam a maior eficiência e estabilidade da lacase (GIARDINA et al., 2010; MATE; ALCALDE, 2017).

Entre as maiores limitações para uso da lacase solúvel estão a dificuldade de recuperação, sensibilidade a ação de agentes desnaturantes e baixa estabilidade condições extremas, como pH e temperatura. Assim, a imobilização enzimática surge como uma tecnologia viável e capaz de superar estas limitações. Geralmente, a enzima imobilizada ganha estabilidade, tem a recuperação e reutilização facilitada, possibilitando, assim, a redução dos custos dos do processo (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015; MOHAMAD et al., 2015; SOUZA; et al., 2017).

Várias métodos de imobilização são abordados na literatura, porém o aprisionamento enzimático em microesferas de alginato se destaca como uma técnica ecologicamente correta, de baixo custo e de fácil execução. No entanto, essa técnica apresenta como principal limitação o tamanho dos poros formados na matriz de alginato, o que dificulta a retenção da enzima nesse suporte (BRUGNARI et al., 2018). O presente estudo realizou o aprisionamento enzimático em microesferas de alginato o empregando a lacase reticulada com glutaraldeído e a caracterização físico-química da enzima tanto da sua forma livre e como na imobilizada.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Gênero *Pleurotus*

Os basidiomicetos do gênero *Pleurotus* pertencem à ordem Agaricales e à família Pleurotaceae e são também denominados fungos da podridão da madeira. Reconhecidas mundialmente por seu valor gastronômico, as espécies do gênero *Pleurotus* se destacam como uma importante fonte de nutrientes, particularmente proteínas, minerais, bem como vitaminas B, C e D (PANJIKKARAN; MATHEW, 2013). Elas são encontradas nos ecossistemas florestais e geralmente se desenvolvem sob árvores mortas ou em troncos caídos, onde atuam enzimaticamente na degradação dos polímeros naturais, especialmente lignina. A bioconversão da lignina é um processo de grande relevância ambiental, pois contribui significativamente para a reciclagem do carbono nos ecossistemas (SINGH; SINGH, 2014;).

Os fungos degradadores da madeira são excelentes produtores de enzimas lignolíticas com potencial para a aplicação biotecnológica industrial. Por isso, o interesse nestes organismos e aumento no número de estudos que visam a seleção de cepas e a otimização das dos meios de cultivo de espécies de gênero *Pleurotus* com alta capacidade de produção (PERALTA et al., 2016).

No que tange a produção de enzimas o *Pleurotus ostreatus* e o *Pleurotus pulmonarius*, se destacam como espécies bem estudas. O grande interesse por elas está relacionado às suas propriedades lignolíticas e com a facilidade de cultivo, pois desenvolvem seus micélios em diversos substratos, de onde extraem os nutrientes e obtém as substâncias necessárias para o crescimento, como carbono, nitrogênio, vitaminas e minerais (BALLAMINUT; MATHEUS, 2007; DIAS et al., 2003)

Os resíduos agroindustriais são substratos que dispõem dos nutrientes necessários para o cultivo de basidiomicetos. Estudos demonstram a capacidade de cepas do gênero *Pleurotus* de crescerem nos diferentes substratos como palha de arroz e palha de trigo (PANT; REDDY; ADHOLEYA, 2006; TANIGUCHI et al., 2005), casca da semente de café e sabugo de milho (DIAS et al., 2003), polpa e casca de frutas (ALEXANDRINO et al., 2007), capim (FANADZO et al., 2010), plantas daninhas (DAS; MUKHERJEE, 2007). O aproveitamento de resíduos agroindustriais no cultivo de micro-organismos agrega valor a estes produtos e também contribui para resolver

os problemas ambientais decorrentes do seu acúmulo na natureza. (ALEXANDRINO et al., 2007; TASKIN et al., 2019). Além disso o uso de agro-resíduos combinado a eficientes processos fermentativos, viabilizam a produção de enzimas em grande quantidade e com as propriedades físico-químicas exigidas em aplicações industriais e biotecnológicas.

Os processos fermentativos em estado sólido têm se consolidado como tecnologia alternativa para produção de enzimas lignolíticas em larga escala. A fermentação em estado sólido (FES) pode ser definida como o processo de cultivo em que os micro-organismos crescem em suportes sólidos. Nessa técnica há umidade suficiente para garantir o crescimento e a atividade metabólica dos micro-organismo (HÖLKER; HÖFER; LENZ, 2004; PANDEY, 2003). Uma das vantagens da FES é que está reproduz as condições naturais de vida dos fungos, portanto, caracteriza-se como a técnica mais adequada para a obtenção de altas concentrações de enzimas a partir de substratos lignocelulósicos (RODRIGUEZ COUTO, 2008)

Os basidiomicetos se notabilizam por sua capacidade de degradar a lignina. A clivagem desse biopolímeros envolve a ação coordenada de um conjunto de enzimas extracelulares chamadas de modificadoras da lignina (EML). O conjunto de EML compreende três peroxidase: lignina peroxidase (LiP; EC 1.11.1.14), manganês peroxidase (MnP; EC 1.11.1.13) e uma versátil peroxidase (VP; EC 1.11.1.16) e uma fenol-oxidase: lacase (Lac; EC 1.10.3.2). Normalmente são secretadas diferentes combinações de isoformas destas enzimas ao longo do processo de despolimerização (ALEXANDRINO et al., 2007; BAZANELLA et al., 2013; GIATTI MARQUES DE SOUZA; ZILLY; PERALTA, 2002; PERALTA et al., 2016).

A habilidade para síntese de EML varia entre os basidiomicetos, por isso eles podem ser distribuídos em quatro grupos, de acordo com sua capacidade de produzir lacase e peroxidases: (1) os que produzem lacase e todas as peroxidases, (2) os que produzem lacase e pelo menos uma peroxidase, (3) os que produzem apenas lacase e os que produzem apenas peroxidases. O *P. ostreatus* e *P. pulmonarius* são excelentes produtores de lacase e Mn peroxidase (grupo 2), as demais peroxidases, aparecem em pequenas quantidades ou não são detectadas nas culturas destes fungos (BAZANELLA et al., 2013; PERALTA et al., 2016).

A lacase fúngica tem despertado o maior interesse, elas são capazes de catalisar reações com moléculas estruturalmente semelhantes à lignina, característica

que a aliada ao seu elevado potencial redox e baixa especificidade ao substrato oferece múltiplas possibilidades de aplicações, seja em processos industriais ou biotecnológicos (RIVERA-HOYOS et al., 2013; YANG et al., 2017).

2.2 Lacase

Lacases (Lac; EC 1.10.3.2) são fenol-oxidases que integram à classe das cupro-proteínas. No seu mecanismo de ação de ação usam o seu potencial redox do sítio ativo para catalisar a oxidação de diversos substratos, ao mesmo tempo que promovem a redução do oxigênio molecular à água (MATE; ALCALDE, 2017).

A atividade de lacase foi inicialmente identificada na seiva da espécie vegetal *Rhus vernicifera*, desde então, estudos apontam a presença dessa enzima em outros organismos como bactérias, insetos e fungos (ascomicetos e basidiomicetos) (GIARDINA et al., 2010; YOSHIDA, 1983). Em plantas, estão envolvidas na constituição da parede celular, onde participam da biossíntese da lignina. Já em bactérias as lacases participam da síntese de pigmentos e compõem o sistema de proteção das células microbianas contra os efeitos deletérios causados pela exposição ao peróxido de hidrogênio e a luz ultravioleta. Enquanto que nos insetos, a principal função atribuída a lacase relaciona-se aos processos de esclerotização da cutícula epidérmica (GIARDINA et al., 2010; MATE; ALCALDE, 2017).

Apesar de descritas em diversos organismos, as lacases de origem fúngica são as mais pesquisadas. Em fungos, participam de diversos processos relacionados à sua fisiologia, por exemplo, regulam a fase de esporulação e formação de pigmentos, atuam na patogênese de plantas e nos mecanismos de desintoxicação. Além disso as lacases integram o sistema enzimático modificador da lignina e está presente na maioria das espécies de fungos decompositores da madeira como o *Trichoderma harzianum*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus pulmonarius* (HAKULINEN; ROUVINEN, 2015; MATE; ALCALDE, 2017; PERALTA et al., 2016; SINGH; SINGH, 2014).

As lacases produzidas por fungos decompositores da madeira são as multicobre oxidases melhor compreendidas do ponto vista bioquímico e estrutural. Em sua maioria apresentam-se como proteínas monoméricas e globulares, com peso molecular médio de 66 KDa, extracelulares e glicosiladas, com o teor de carboidratos

entre 15–30%. A extensão da glicosilação contribui para o aumento do peso molecular e confere às lacases maior estabilidade frente a ação de inativantes, como solventes, radicais livres e altas temperaturas. O seu pH ótimo e o ponto isoelétrico (pi) situam-se na faixa ácida (pH 2-5) e as temperaturas ótimas situa-se na faixa de 30 a 70ºC (MATE; ALCALDE, 2017; SHARMA; GOEL; CAPALASH, 2007; SINGH et al., 2011).

Na organização da sua estrutura tridimensional as lacases fúngicas exibem uma arquitetura molecular bastante similar. Estão sequencialmente arranjadas em três domínios. Cada um dos domínios têm uma topologia β-barril, morfologia comum às diversas cupro-proteínas (HAKULINEN; ROUVINEN, 2015; WONG, 2009) O sítio ativo da lacase é composto por quatro íons de cobre, todos com o mesmo estado de oxidação (Cu^{+2}) e distribuídos nos três domínios.

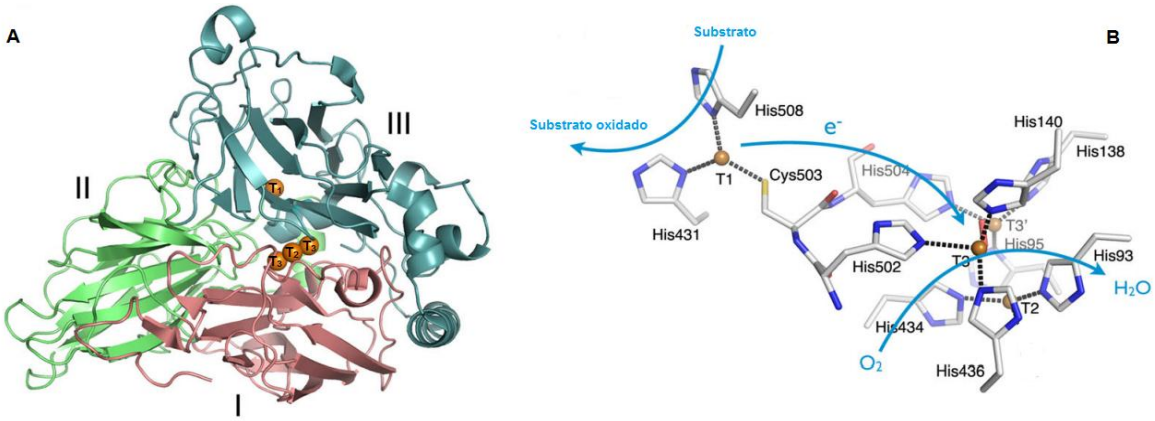

Figura 1. A) Topologia dos domínios (I, II e III) e os centros de íons cobre da lacase. O domínio I mostrado em vermelho, o domínio II em verde e o domínio III em azul. Os íons de cobre (T_1, T_2 e T_3) são representados por esferas laranjas. **B)** Sítios de oxidação do substrato (T_1) e de redução do oxigênio molecular centro trinuclear (T_2 e T_3) (Adaptado de Silva et al., 2012).

No sítio ativo tem-se um cobre do tipo I (CuT_1), um cobre do tipo II (CuT_2) e dois cobres do tipo III (CuT_3) (Figura 1 A). O CuT_1, localizado no domínio 3, caracteriza-se como o aceptor primário de elétrons retirados do substrato. Os Cu íons CuT_2 e CuT_3 formam um centro trinuclear, localizado na interface dos domínios 1 e 3, região onde ocorre a redução do oxigênio (O_2) à água (H_2O) (figura 1 B) (GIARDINA et al., 2010; MUNK et al., 2015; SILVA et al., 2012).

Os quatro íons são distinguidos por espectroscopia ultravioleta/visível e espectroscopia de ressonância eletrônica paramagnética (REP). O CuT_1 caracteriza-

se por uma forte absorbância em 610 nm, detectável por REP e também responsável pela coloração azul da proteína. O CuT_2 não absorve na faixa do visível, porém responde a REP. O par de íons de CuT_3 apresenta fraca absorbância em 330 nm e sinal de REP não detectável (DWIVEDI et al., 2011; GIARDINA et al., 2010; WONG, 2009).

Nas lacases os íons de cobre atuam como bases de Lewis e coordenam os elétrons livres de átomo de nitrogênio (N) e átomo de enxofre (S) presentes nos resíduos de aminoácidos. Nestas enzimas sequência de aminoácidos coordenados encontra-se bastante conservada e é utilizada como critério de classificação das cupro-proteínas (DWIVEDI et al., 2011).

O padrão de coordenação dos aminoácidos é mostrado na figura 2. O CuT_1 coordena o átomo de nitrogênio de duas histidinas e o átomo de enxofre da cisteína, estes ligantes do cobre se dispõem em posição equatorial e assumem a geometria trigonal.

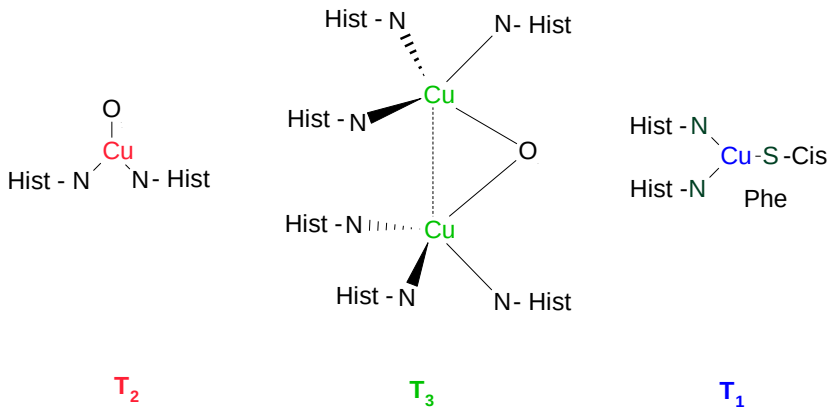

Figura 2. Sítio ativo da lacase com os quatro centros de íons cobre com os aminoácidos de coordenação (Adaptado de (GUPTA et al., 2019).

O CuT_1 ainda estabelece outra ligação, em posição axial, com a fenilalanina e completa a coordenação neste centro catalítico. O CuT_2 coordena um dos átomos de nitrogênio de duas histidinas e o átomo de oxigênio da água, que formam outro centro catalítico com geometria trigonal. No par CuT_3 cada íon coordena um dos átomos de nitrogênio de três histidinas e ainda coordena um átomo de oxigênio (proveniente de uma hidroxila) e configura configuração centro catalítico em tetraédrica (BALDRIAN, 2006; GUPTA et al., 2019).

A catálise mediada por lacase se processa de maneira que ao final do ciclo quatro substratos são oxidados, concomitante a redução do oxigênio molecular (O_2) à água (H_2O). Os estudos sobre o mecanismo de ação catalítica da lacase sugerem que fluxo de elétrons ocorre em três etapas como mostrado na figura 3. Inicialmente, quatro moléculas do substrato são oxidadas pelo CuT_1, que transfere os elétrons extraídos para o centro trinuclear CuT_2 / CuT_3 e converte a enzima da forma nativa (com os íons Cu^{+2}) para o seu estado reduzido (com os íons Cu^{+1}) (JONES; SOLOMON, 2015) .

Na segunda etapa a molécula de oxigênio se liga ao centro trinuclear, recebe dois elétrons transferidos dos íons CuT_3 reduzido, que resulta na formação de um intermediário peróxido (O_2^{-2}). Por último, o peróxido intermediário sofre clivagem na ligação O-O, libera uma molécula de água e decai para um radical oxigênio (*O). Imediatamente o CuT_2 reduz radical oxigênio à um novo peróxido, libera uma segunda molécula de água e recompõe a enzima a seu estado de repouso (RIVERA-HOYOS et al., 2013; SHARMA et al., 2006; SILVA et al., 2012).

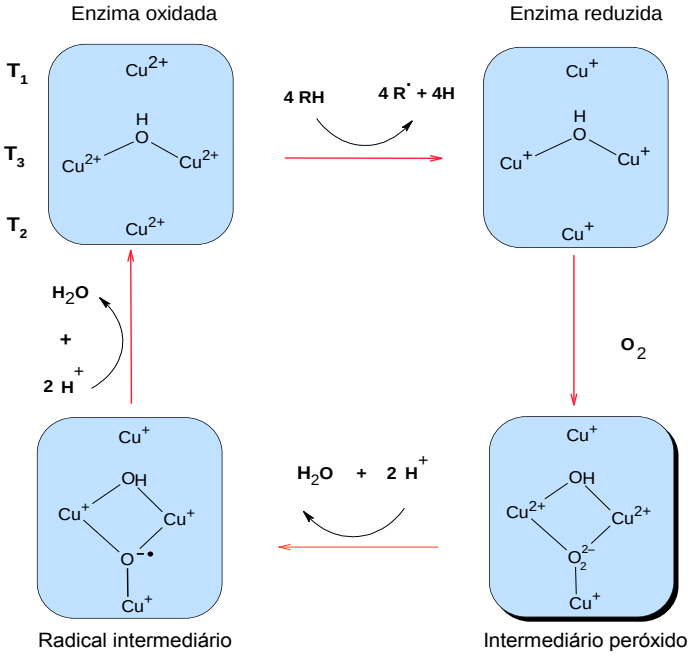

Figura 3. Mecanismo da reação de catálise nos centros de cobre da lacase. (Adaptado de Wong, 2009).

2.3 Imobilização de enzimas

A imobilização enzimática caracteriza-se pela retenção de enzimas, seja pelo seu acondicionamento físico em matriz polimérica ou por ligação química com o suporte (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015; MOHAMAD et al., 2015; SOUZA; et al., 2017). Os materiais mais utilizados na preparação da matriz/suporte exibem diferenças estruturais, por isso podem ser classificados em dois grupos: inorgânico ou orgânico. O grupo dos orgânicos pode ser subdividido em sintéticos ou naturais (BRENA; PAULA GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013)

Diversos matérias de origem inorgânica são utilizados como suporte, entre estes destacam-se: areia, alumina, carvão ativo, cerâmica, hidroxiapatita, sílica, vidro e outros. Estes materiais apresentam como vantagem o fato de serem estáveis, de baixo custo, resistentes a solventes orgânicos e ao crescimento de fungos e bactérias (AHMAD; SARDAR, 2015)

Os suportes sintéticos, como por exemplo: poliestireno, poliacrilamida, poliacrilato e polivinil estão entre os mais empregados na imobilização de enzimas. Estes suportes exibem diferenças quanto a forma física e na estrutura química, logo podem ser combinadas para se obter suportes com as propriedades desejadas. Porém os suportes naturais apresentam algumas vantagens quando comparados aos sintéticos, pois geralmente são de fácil obtenção e são biodegradáveis (BRENA; PAULA GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013; SOUZA; et al., 2017).

Entre os suportes naturais utilizados, as proteínas (albumina, colágeno, gelatina, glúten e seda) e os polissacarídeos (ágar, agarose, amido, alginato, celulose e quitosana) estão entre mais usados na imobilização de enzimas (SOUZA; et al., 2017). A utilização de proteínas ou polissacarídeos contribuí para o aumento da biocompatibilidade do suporte, que consequentemente favorece manutenção da atividade da enzima (MOHAMAD et al., 2015).

A escolha do suporte adequado torna a imobilização vantajosa, pois melhora algumas das propriedades da enzima, principalmente a estabilidade térmica, a resistência ao pH, a estocagem e a durabilidade. Além disso, a imobilização enzimática permite que a enzima seja facilmente separada do meio reacional e reutilizada. A reutilização destaca-se como uma das vantagens mais relevantes da imobilização, porque reduz consideravelmente os custos operacionais e viabiliza a

aplicação de enzimas em processos industriais e biotecnológicos (BRUGNARI et al., 2018; CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2013).

Algumas dessas vantagens foram evidenciadas no estudo desenvolvido por BRUGNARI et al., (2018), que imobilizaram enzimas produzidas por *Pleurotus ostreatus* em suporte de agarose. Nesse estudo os autores concluíram que a termoestabilidade e a resistência ao pH da enzima imobilizada foi maior que da enzima livre. Adicionalmente os pesquisadores verificaram que após a imobilização a enzima retém 90% da sua atividade inicial após 15 ciclos de operação. Este estudo evidencia que a imobilização melhora as propriedades da enzima.

As estratégias de imobilização enzimática são baseadas no modo de interação entre a enzima e o suporte. Estas estratégias são divididas em química e física. Entre as estratégias químicas destacam-se: adsorção, ligação covalente e ligação cruzada (Figura 4), enquanto a estratégia de confinamento físico (Figura 5) inclui o aprisionamento e a encapsulação (SOUZA; et al., 2017).

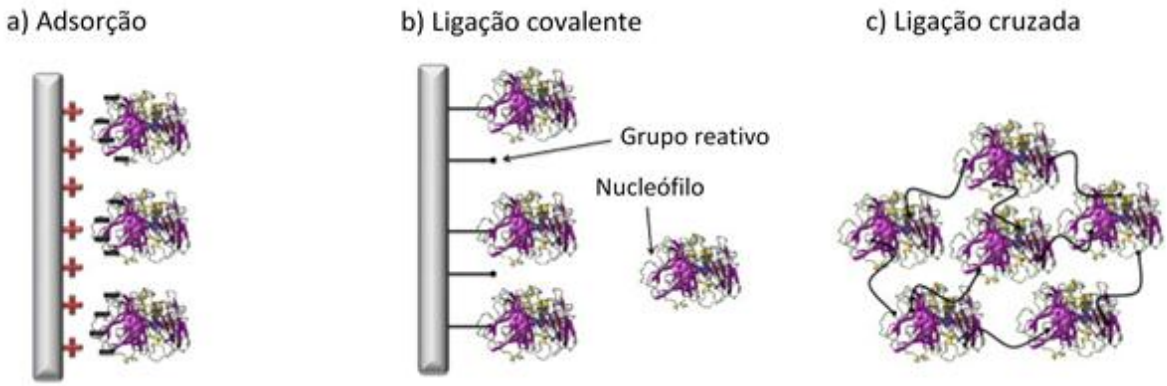

Figura 4. Interações químicas para imobilização enzimática. (a) Adsorção de enzimas sobre um suporte. (b) Ligação covalente entre os grupos nucleófilo da enzima e o suporte. (c) Reticulação de enzimas por agentes bifuncionais. (Adaptado de Fernández-Fernández; Sanromán; Moldes, 2013).

Na imobilização por adsorção a enzima encontra-se ligada ao suporte sólido por interações fracas como forças de van der Waals (interações hidrofóbicas), pontes de hidrogênio e ligações iônicas. As principais vantagens da adsorção são a facilidade do processo, o baixo custo, o reprocessamento do suporte e a manutenção da estrutura nativa da enzima. A grande desvantagem da técnica está na possibilidade

de reversão da ligação (dessorção) devido às variações de temperatura, pH e da força iônica do meio reacional (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2013). Esta desvantagem pode ser superada ao empregar a imobilização enzimática baseada em ligação covalente.

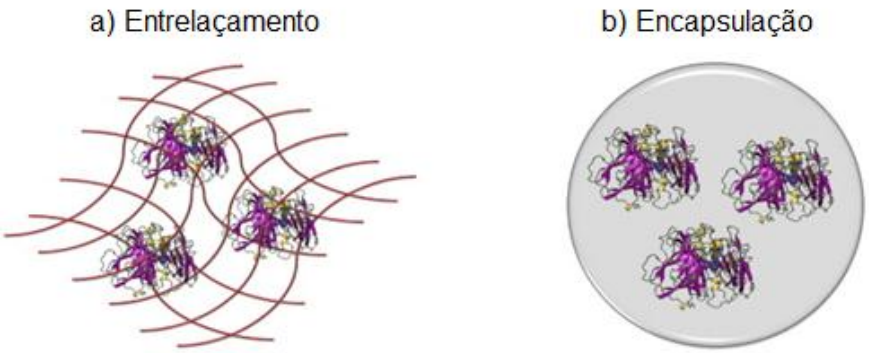

Figura 5. Imobilização de enzimas por interações físicas. (a) Entrelaçamento de enzimas numa matriz porosa. (b) Encapsulamento de enzimas. (Adaptado de Fernández-Fernández; Sanromán; Moldes, 2013).

A imobilização por ligação covalente envolve reações irreversíveis do suporte com os aminoácidos da cadeia lateral da enzima. Estes aminoácidos possuem em sua porção terminal grupos funcionais do tipo carboxilato, fenólico, sulfídrico, amino, imidazol e indol, que em condições específicas de reação se ligam covalentemente o suporte (BRENA; PAULA GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013). Em alguns casos, a imobilização por ligação covalente inicia com reações de ativação da superfície do suporte, onde grupos funcionais do suporte são modificados e produzem intermediários reativos (SOUZA; et al., 2017). Nas reações de ativação geralmente são empregados peptídeos ou reagentes bifuncionais como glioxol e o glutaraldeído. (AHMAD; SARDAR, 2015).

A intensidade da ligação covalente confere vantagens ao biocatalisador, como redução da dessorção da enzima, termoestabilidade, aumento da resistência a variação de pH e a solventes orgânicos. Ao mesmo tempo essa técnica pode comprometer a atividade catalítica da enzima, caso a ligação envolva aminoácidos do sítio ativo (SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016; SOUZA; et al., 2017). Assim, estratégias de proteção devem ser adotados, como a que envolve a realização da reação na presença do substrato ou de inibidor competitivo, desde que este último estabeleça

ligações reversíveis com a enzima (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015; MOHAMAD et al., 2015).

A imobilização por adsorção e também a imobilização por ligação covalente, frequentemente, apresentam problemas quanto ao custo e eficiência. Ambos os processos demandam quantidades elevadas da enzima e introduzem massa não catalítica no suporte. Assim, além de elevar o custo do processo, estas intercorrências podem comprometer a atividade catalítica e, portanto, limitar ou até mesmo inviabilizar a aplicação da enzima. No entanto, o método de imobilização por reticulação desponta como alternativa aos outros métodos, tanto em relação aos aspectos econômicos como técnicos (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015; SHELDON, 2011; VOBERKOVÁ et al., 2018).

A imobilização por ligação cruzada destaca-se por dispensar o uso de suporte sólido, uma vez que as moléculas da enzima são interconectadas por agentes de reticulação. Os agentes de reticulação são substâncias orgânicas que apresentam compatibilidade com macromoléculas biológicas. Geralmente, são substâncias de baixo peso molecular e dispõem de grupos reativos aos aminoácidos da superfície da enzima (VOBERKOVÁ et al., 2018).

Entre os agentes de reticulação mais empregados em imobilização destaca-se o glutaraldeído, uma substância que apresenta nas extremidades da sua molécula grupos aldeídos que reagem quimicamente como o grupo amino terminal da lisina (SHELDON; SCHOEVAART; LANGEN, 2005). O mecanismo de reação entre o glutaraldeído e a lisina pode ser observado na Figura 6.

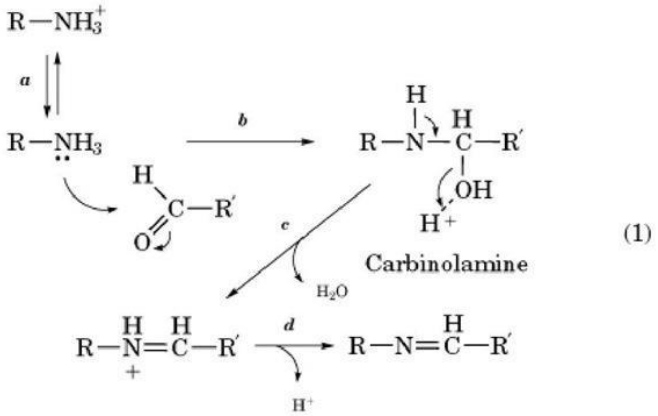

Figura 6. Reação de condensação do glutaraldeído com o grupo amino.

A imobilização sem suporte por reticulação ocorre com a adição do glutaraldeído na solução enzimática (SHELDON; SCHOEVAART; LANGEN, 2005). Outra abordagem inclui duas etapas. A primeira envolve a agregação física ou a cristalização da enzima pela ação de precipitantes (SHUQI et al., 2017). Os precipitantes usuais são sais, solventes orgânicos ou polímeros não iônicos, que alteram o estado de hidratação da enzima ou modificam a constante eletrostática da solução enzimática.

Na segunda etapa os precipitados insolúveis são reticulados e estabilizados pela formação de ligações cruzadas em torno de toda estrutura tridimensional o que confere maior estabilidade mecânica e térmica ao imobilizado (CUI; JIA, 2015; VOBERKOVÁ et al., 2018). Os cristais/agregados formados são robustos, recicláveis, têm tamanhos controláveis (entre 1 e 100 μm), aplicáveis sem perda da atividade e podem ser armazenados por longos períodos se liofilizado (SHELDON, 2011).

A imobilização por confinamento baseia-se na retenção física da enzima dentro de uma matriz polimérica porosa (MOHAMAD et al., 2015). Nessa técnica a polimerização dos monômeros em solução ocorre após adição da enzima na mistura reativa (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2013). À medida que a polimerização se processa a enzima é envolvida por uma estrutura porosa e semipermeável, que permite a passagem de substrato e produtos, mas que mantém a enzima confinada (BRENA; PAULA GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013). A retenção da enzima pode ser feita pelos métodos de aprisionamento em rede ou por encapsulação em membranas poliméricas (SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016).

Preparados poliméricos do tipo sol-gel são frequentemente empregados na imobilização enzimática por aprisionamento(BRENA; PAULA GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013). O processo sol-gel envolve reações de polimerização inorgânica, onde os precursores usualmente utilizados são soluções de sais inorgânicos ou alcóxidos. Após a reação de hidrólise e subsequente condensação dos precursores, tem-se a formação de redes poliméricas (HIRATSUKA; SANTILLI; PULCINELLI, 1995). A rede de polímeros obtidas por sol-gel possibilitam a confecção de imobilizados em filme, o controle do balanço hidrofílico/hidrofóbico e permite a síntese de suportes híbridos.

Polímeros inorgânicos obtidos a partir da condensação de precursores como o trimetoxisilano (TMOS) e propil-metoxisilano (PTMS) estão entre os mais utilizados no método de aprisionamento (SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012). Asgher; kamal; Iqbal, (2012) analisaram o processo sol-gel a partir de uma mistura de TMOS e PTMS em diferentes proporções e imobilizaram lacase nesta matriz. Na polimerização, estes precursores formaram matrizes hidrofóbicas que mantiveram a atividade catalítica da enzima e melhoraram a estabilidade térmica e os parâmetros cinéticos em comparação a enzima livre. No entanto, essa matriz sofre considerável retração durante o processo de secagem, o que leva à fratura do material e ao colapso dos poros, ocasionando a lixiviação da enzima.

A encapsulação em membranas poliméricas apresenta-se como alternativa de imobilização, pois a enzima não se liga irreversivelmente a matriz, portanto não há perda de atividade devido à inativação ou distorção do sítio ativo (SOUZA; et al., 2017). Os biomateriais se destacam como importantes matrizes na encapsulação, principalmente pela biocompatibilidade, biodegradabilidade e fácil manipulação (SÁNCHEZ et al., 2013). Entre os biopolímeros que têm sido utilizados no encapsulamento de enzima, destacam-se agarose, celulose, alginato, entre outros (SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016). A literatura apresenta o alginato como suporte amplamente utilizado na imobilização de diversas enzimas, com aplicação em diversas áreas.

Obtido a partir de extratos de algas marrons (*Laminaria*) e de algumas bactérias (*Pseudomonas*) o alginato é um biopolímero constituído por ligação de unidades glicosídicas entre o ácido α-L-gulurônico e o ácido β-D-manurônico de maneira alternada (figura 7) (SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012). As ligações entre estas unidades formam pequenos oligômeros que são solúveis em meio aquoso, por isso, quando adequadamente dissolvidos em água formam uma matriz gelatinosa. O alginato é bastante utilizado na imobilização enzimática, pois as suas propriedades gelificantes permitem dispersar e aprisionar moléculas da enzima na matriz (SÁNCHEZ et al., 2013; ZDARTA et al., 2018).

A imobilização por aprisionamento ocorre essencialmente pela acomodação da enzima entre os espaços (poros) intermolecular formados durante a polimerização. A polimerização se processa pela atuação de íons bivalente (Ca^{+2}, Cu^{+2}, Zn^{+2} e Mn^{+2}) via um mecanismo chamado polimerização ionotrópica. Neste mecanismo os íons

coordenam a ligação dos elétrons do grupo carboxil (COO^-) do ácido α-L-gulurônico e viabilizam, com isso, o processo de polimerização dos oligômeros de alginato (TING et al., 2014; ZDARTA et al., 2018). Ao mesmo tempo que polimerização do gel promove melhorias nas suas propriedades mecânicas (rigidez) mantém a atividade catalítica da enzima.

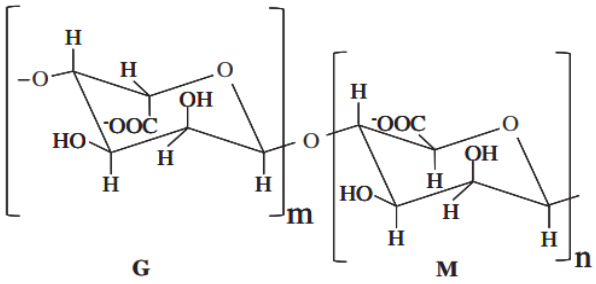

Figura 7. Estrutura química do alginato: (**G**) α-L-gulurônico e (**M**) β-D-manurônico. (Adaptado de Sassolas; Blum; Leca-Bouvier, 2012).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Produzir, imobilizar e caracterizar lacases de *Pleurotus pulmonarius*, utilizando resíduos agroindustriais como suporte da fermentação em estado sólido.

3.2 Específico

● Produzir lacase de *Pleurotus pulmonarius* utilizando fermentação em estado sólido tendo como suportes resíduos do processamento de pupunha e do cacau.

● Imobilizar a lacase em alginato de sódio, verificar a sua eficiência de imobilização e o reuso da enzima imobilizada.

● Caracterizar a lacase na sua forma livre e imobilizada, a partir da determinação de parâmetros como: pH e temperatura ótimas, termoestabilidade, influência de sais e dos parâmetros de Michaelis-Menten.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes

ABTS (ácido 2,2-azino-bis- (3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico), alginato de sódio, glutaraldeído (50% v/v) e os solventes foram adquiridos da Merck. O clorpirifós (> 97%) utilizado nos estudos de degradação foi adquirido da Sigma Aldrich.

4.2 Obtenção e manutenção de *Pleurotus pulmonarius* CCB19

O fungo *Pleurotus pulmonarius* CCB19 foi cedido pelo Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Micro-organismos da Universidade Estadual de Maringá (Paraná, Brasil). As cepas do fungo foram cultivadas em placas de Petri contendo Potato Dextrose Agar (PDA) e incubadas 25°C por 8 dias e posteriormente conservadas a 4 °C até a utilização. As culturas armazenadas foram reativadas a cada 2 meses.

4.3 Produção do extrato enzimático bruto

Para o crescimento do micro-organismo e produção da enzima foram utilizados dois resíduos agroindustriais, provenientes do processamento da pupunha (*Bactris gasipaes*) e da amêndoa de cacau (*Theobroma cacao*). Estes resíduos foram mantidos em estufa de circulação de ar à 40°C por 24 h e após a secagem foram triturados.

A produção enzimática foi realizada por fermentação em estado sólido, utilizando frascos Erlenmeyers (250 mL), contendo uma mistura de 6,4 g de pupunha e 1,6 g de película de amêndoa de cacau, esterilizada em autoclave a 121 ° C por 15 min sob 1 atm. Água destilada estéril foi utilizada para ajustar a umidade do meio em 85%. Aos meios foram adicionados 6 discos com 6 mm de diâmetro contendo o micélio do fungo *P. pulmonarius*. Os frascos foram incubados em BOD a temperatura de 28 ºC por 120 h.

Após o processo fermentativo, foram adicionados 5 mL de tampão citrato de sódio (50 mM, pH 5,0) por grama de substrato fermentado, seguido de filtração a

vácuo e centrifugação a 5.000 g por 10 minutos. O extrato bruto foi concentrado e utilizado no desenvolvimento do trabalho.

4.4 Determinação da atividade de lacase

A atividade enzimática foi determinada em espectrofotômetro (Bel Spectro S-2000 UV-Vis). A metodologia adotada neste trabalho para a determinação da atividade da enzima livre foi descrita por Matos et al. (2014). O ensaio da lacase livre consistiu em 1,7 mL de tampão acetato 50 mM (pH 5,0), com 0,1 mL de extrato enzimático e 0,2 mL de solução de ABTS 10 mM (ε = 3,6 x 10^{-4} $M^{-1}.cm^{-1}$). A mistura foi incubada à temperatura de 40 °C por 5 minutos e a absorbância medida no comprimento de onda de 420 nm. A unidade de atividade (UA) foi definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar 1 µmol de ABTS por minuto de reação. A atividade enzimática foi expressa em $U.L^{-1}$ de acordo com a Equação 2:

$$\text{Atividade Enzimática} = \frac{\frac{\Delta A}{T} . V_1}{\varepsilon . d . v_2} \times 10^3 \qquad (2)$$

Onde, ΔA: variação da absorbância; T: tempo de reação (min); V_1: volume total da reação (mL); ε: coeficiente de absortividade molar ($M^{-1}.cm^{-1}$); d: caminho ótico (cm) e v_2: volume da enzima (mL).

O ensaio para determinar a atividade da lacase imobilizada foi conduzido de maneira similar ao da lacase livre, exceto que foi utilizado 0,1 g de lacase imobilizada na mistura da reação mantida por 30 minutos a 40 °C e sob agitação constante (100 rpm). A atividade enzimática foi expressa em $U.g^{-1}$ de acordo com a Equação 3:

$$Atividade\ Enzimática = \frac{\frac{\Delta A}{T} . V_1}{\varepsilon . d . m_1} \times 10^3 \qquad (3)$$

Onde, ΔA: variação da absorbância; T: tempo de reação (min); V_1: volume total da reação (mL), ε: coeficiente de absortividade molar ($M^{-1}.cm^{-1}$); d: caminho ótico (cm) e m_1: a massa da enzima imobilizada (g).

A concentração de proteína total foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Bradford (BRADFORD, 1976). A albumina de soro bovino (BSA) foi utilizada como padrão.

4.5 Imobilização de lacase

4.5.1 Encapsulação da lacase em alginato

Para a encapsulação da lacase 0,15 g de alginato de sódio foi dissolvido em 8,0 mL de água destilada. Uma solução enzimática (2,0 mL) preparada com 0,2 g extrato concentrado (13.000 $U.L^{-1}$) foi adicionada à solução de alginato de sódio, a mistura obtida foi homogeneizada vidro até a formação do gel, com concentração final de alginato de sódio em 3% (p/v). Para a produção das microesferas, o gel de alginato foi coletado com o auxílio de uma bomba peristáltica sob o fluxo 0,4 rpm. O gel de alginato foi gotejado numa solução de $CaCl_2$ 0,2 M em agitação suave por 1 h. Após o tempo de agitação as microesferas foram filtradas e posteriormente lavadas por duas vezes com $CaCl_2$ 0,05 M.

4.5.2 Reticulação da lacase em glutaraldeído

Para a reticulação da lacase três soluções de glutaraldeído foram preparadas em água destilada nas seguintes concentrações: 1, 2 e 3% (v/v). Foi adicionado 0,2 g extrato concentrado (13.000 $U.L^{-1}$) de lacase em cada uma das soluções de glutaraldeído, obtendo 2,0 mL de solução enzimática mantida sob agitação constante (100 rpm) à 4°C por 2 h. Após este tempo, a lacase reticulada foi adicionada ao alginato de sódio de acordo ao procedimento descrito na seção (4.5.1).

4.5.3 Eficiência de imobilização

As soluções de filtragem e lavagem das microesferas obtidas nos procedimentos de imobilização descritos nas seções 4.5.1 e 4.5.2 foram usadas para avaliar a eficiência do processo de imobilização. A eficiência da imobilização foi definida como a porcentagem de enzima total retida nas microesferas de alginato cálcio e determinada conforme a equação abaixo.

$$Eficiência\ de\ imobilização = \frac{(A_i - A_f)}{A_i} \times 100 \qquad (4)$$

Onde, A_i: atividade inicial da enzima livre; A_f: atividade de lacase dosada na solução de filtragem e nas duas soluções de lavagem. As microesferas foram mantidas em tampão acetato pH 4,0 a 4° C até o uso.

4.5.4 Teste de lixiviação enzimática

O teste de lixiviação enzimática foi determinado adicionando microesferas com lacase imobilizada a um volume conhecido de tampão acetato (pH 4,0) por 48 h. Após esse tempo, as microesferas foram removidas e a solução tampão utilizada para determinar a atividade de lacase liberada das microesferas. A atividade de lacase verificada na solução tampão foi comparada ao valor de atividade de lacase no extrato bruto usado para a imobilização. A lixiviação foi expressa em porcentagem de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Lixiviação enzimática } (\%) = \frac{A_i}{A_f} \times 100 \qquad (5)$$

Onde, A_i: atividade enzimática inicial da lacase livre; A_f: atividade enzimática de lacase determinada na solução tampão.

Entre os métodos de imobilização descritos nas subseções 4.5.1 e 4.5.2 o de maior eficiência de imobilização e a menor lixiviação foi o utilizado para a confecção das microesferas utilizadas nos ensaios subsequentes.

4.6 Caracterização bioquímica da lacase livre e da lacase imobilizada

4.6.1 Efeito do pH sobre a atividade enzimática

O efeito do pH sobre a atividade da lacase livre e imobilizada foi estudado utilizando tampões na faixa de pH entre 3 – 8 à 40°C. Os tampões utilizados neste estudo foram glicina-HCl (pH 3), acetato (pH 4, 5 e 6) e Tris-HCl (pH 7 e 8) com a concentração de 50 mM. O ensaio para determinar a atividade enzimática da lacase livre e da lacase imobilizada foi realizado conforme o procedimento descrito da seção 4.4. O resultado foi expresso em atividade relativa e o maior valor considerado como 100%.

4.6.2 Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática

O efeito da temperatura sobre as atividades da lacase livre e da lacase imobilizada foi avaliado na faixa de temperatura entre 20 - 70 °C e em pH 4,0. O ensaio para determinar a atividade enzimática da lacase livre e da lacase imobilizada foi realizado conforme o procedimento descrito da seção 4.4. O resultado foi expresso em atividade relativa e o maior valor considerado como 100%.

4.6.3 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica foi investigada incubando amostras da lacase livre e a lacase imobilizada em tampão acetato (50 mM) pH 4,0 em temperaturas entre 30 – 60°C. As amostras foram mantidas nas diferentes temperaturas (30 – 60°C) por até 8 horas. Em intervalos regulares alíquotas de 0,1 mL de lacase livre e 0,1 g de lacase imobilizada foram coletadas, suspensas em tampão acetato pH 4,0 e a atividade enzimática determinada conforme descrito da seção 4.4. O resultado foi expresso em atividade relativa e o valor obtido no tempo zero considerado como 100%.

As atividades relativas (%) do estudo da estabilidade térmica foram correlacionados ao modelo de decaimento exponencial de primeira ordem (LIN et al., 2015) algebricamente descrito na equação abaixo:

$$\ln A_t = lnA_0 - k_1 . \, \mathrm{t} \qquad (6)$$

Onde, ln A_t é o logaritmo natural da atividade relativa (%) no tempo t (h), ln A_0 é o logaritmo natural da atividade relativa (%) no tempo t =0 (h) e k_1 (h^{-1}) a constante de decaimento térmico da enzima.

A partir da análise de regressão dos dados experimentais foi estimada a constante de decaimento térmico (k) e os tempos de meia vida ($t_{1/2}$) da lacase livre e da lacase imobilizada para cada temperatura avaliada. O $t_{1/2}$ foi calculado de acordo como a equação abaixo:

$$t_{1/2} = \frac{(lnA_t - \ln A_0)}{k_1} \qquad (7)$$

4.6.4 Efeito de íons e reagentes sobre a atividade enzimática

O efeito da adição de diferentes sais (Li_2SO_4, $NiSO_4$, $CuSO_4$, $MgCl_2$, $MnSO_4$, $CaSO_4$, $ZnSO_4$, $CoCl_2$, $Al(NO_3)_3$ e dos reagentes EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), SDS (dodecil sulfato de sódio) e β-mercaptoetanol sobre a atividade da lacase (livre e lacase imobilizada) foi estudado. Os aditivos, nas concentrações de 1,0 mM e 5,0 mM, foram incubados à 40°C com a enzima em tampão acetato (0,05 M e pH 4,0) por 2 h. Após o tempo de incubação a atividade enzimática foi determinada conforme descrito na seção 4.4. O resultado foi expresso em atividade relativa e o valor obtido no ensaio sem o aditivo considerado como 100%.

4.6.5 Determinação dos parâmetros de Michaelis-Menten

Os parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten K_m (mM) e V_{max} ($mM.min^{-1}$) da lacase livre e da lacase imobilizada foram determinados com o substrato ABTS nas em concentrações de 0,1 e 2,0 mM. Os ensaios foram realizados nas em pH 4,0 (50 mM) e 40 °C. Os valores dos parâmetros cinéticos foram estimados por regressão não linear de acordo com o modelo duplo recíproco de Linewear-Burk apresentado na equação 8 (MINTEER, 2011).

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_m} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \qquad (8)$$

4.6.6 Armazenamento e reuso

A lacase livre e imobilizada foram armazenadas em tampão acetato (pH 4,0) a 4 °C durante 7 dias. Amostras foram coletadas diariamente para determinação da atividade enzimática. O resultado foi expresso em atividade relativa (%) e o valor obtido antes do armazenamento considerado como 100%.

A reutilização da lacase imobilizada foi avaliada determinando a atividade enzimática nas microesferas de alginato conforme descrito da seção 4.4. Após o ensaio as microesferas foram removidas do meio, lavadas sucessivamente com água destilada e mantidas em tampão acetato pH 4,0 (50 mM) por 1 h à 4°C. Logo após à atividade enzimática remanescente foi determinada. Este procedimento foi repetido até a perda completa da atividade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção do extrato bruto enzimático com alta atividade de lacase

A atividade da lacase no extrato enzimático bruto obtida após cinco dias de cultivo foi de 893,5 $U.L^{-1}$. O extrato bruto enzimático foi concentrado em membrana de nitrocelulose, após o procedimento a atividade enzimática e a atividade específica foram de 13.000 $U.L^{-1}$ e 53,7 $U.mg^{-1}$, respectivamente. Este extrato bruto de lacase foi o utilizado para a realização dos experimentos subsequentes.

5.2 Imobilização e lixiviação da lacase

A lacase foi imobilizada em alginato de cálcio e as microesferas obtidas apresentaram o diâmetro entre 2 e 3 mm (Fig. 08). As microesferas devem apresentar o tamanho que permita que o substrato e o produto possam se difundir dentro e fora da matriz de alginato, mas que mantenha a enzima retida no interior dos poros da microesfera (RIAZ et al., 2009).

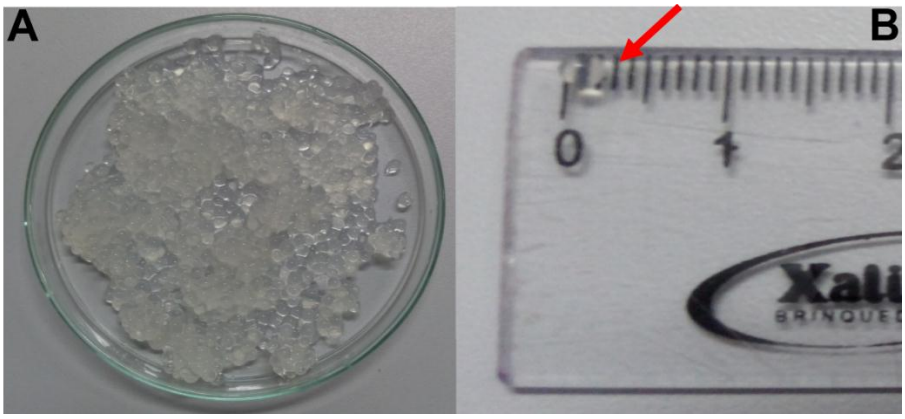

Figura 8. Enzima imobilizada em alginato de cálcio (A) e tamanho médio das microesferas (B).

A imobilização da lacase por aprisionamento (sem reticulação) apresentou menor eficiência de imobilização (44%), quando comparada a imobilização por aprisionamento com reticulação, onde o melhor resultado (79,4%) foi obtido com a concentração de glutaraldeído de 2% (v/v) (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros da lacase imobilizada por aprisionamento (sem reticulação) e por aprisionamento com reticulação.

Métodos de Imobilização				
	Aprisionamento	Aprisionamento com reticulação		
Porcentagem glutaraldeído	-	1%	2%	3%
E. I (%)	44,0 ± 2,0	72,4 ± 1,1	79,4 ± 0,5	59,3 ± 1,3
L. E (%)	26,8 ± 1,5	6,4 ± 1,2	8,5 ±1,5	10,3 ± 2,0

Eficiência de imobilização (E.I) e lixiviação enzimática (L.E).

O menor valor para eficiência de imobilização e o maior valor da lixiviação enzimática observados (Tabela 1) para o aprisionamento (sem reticulação) estão relacionadas com o tamanho dos poros nas microesferas de alginato. A porosidade das beads depende principalmente da concentração de alginato. Daasiê et al., (2014) relatam que concentrações de alginato acima de 3% reduz significativamente a eficiência de imobilização e também foi observado que a estabilidade mecânica das microesferas foi comprometida em concentrações de alginato inferiores à 3%. Sendo assim, no presente estudo foi utilizado as condições de imobilização com alginato 3% padronizadas por Brugnari et al., (2018).

A Tabela 1 mostra que para todas as concentrações de glutaraldeído (1–3%) avaliadas houve queda da lixiviação. Ressaltando que na menor concentração testada (1%), o aprisionamento com reticulação da lacase reduziu consideravelmente em mais de 4 vezes a lixiviação enzimática. O menor valor de lixiviação verificado pode estar relacionado com as ligações cruzadas formadas entre o glutaraldeído e a enzima (BRUGNARI et al., 2018), onde os dois grupos carbonila (C=O) do glutaraldeído reagem com grupo amino ($-NH_3$) dos resíduos de aminoácidos, formando agregados enzimático de maior tamanho e que podem ser mantidos nos poros da matriz de alginato (SHELDON; SCHOEVAART; LANGEN, 2005).

5.3 Efeito do pH e da temperatura sobre a atividade

As atividades relativas em função do pH das lacases livre e imobilizada são mostradas na Figura 9. O pH 4,0 foi o melhor tanto para a lacase na sua forma livre como para a lacase na forma imobilizada.

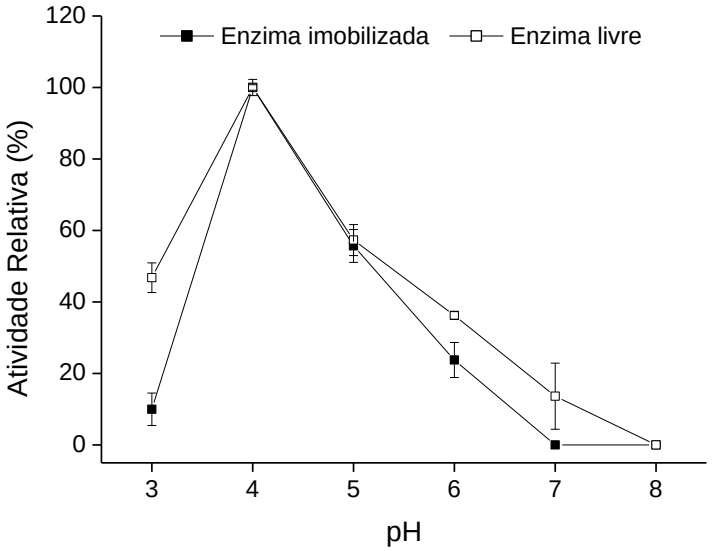

Figura 9. Efeito do pH na atividade da lacase de *P. pulmonarius* a 40 °C. Os dados são apresentados como média ± DP (n = 3)

A maioria das lacases fúngicas apresentam a atividade ótima na de faixa de pH entre 3 e 5 (ATALLA et al., 2013; BALDRIAN, 2006)). Em faixas de pH próximas ao neutro (entre 6 e 8) as lacases, geralmente, reduzem ou perdem completamente a sua atividade (RAMÍREZ-CAVAZOS et al., 2014; WANG et al., 2014). Isto pode ocorrer devido à inibição enzimática causada pela ligação do ânion hidróxido (OH^-) aos íons de CuT_2 e CuT_3 do sítio ativo da lacase, interrompendo, assim, o fluxo interno de elétrons do centro de CuT_1 para os centros de CuT_2 e CuT_3 (XU, 1997).

As atividades relativas da lacase livre e imobilizada em função da temperatura são mostradas na Figura 10. A temperatura ótima para a lacase livre foi a 40 °C e para a lacase imobilizada foi a 50 °C, utilizando o pH ótimo (pH 4,0) encontrado anteriormente. As diferentes temperaturas ótimas observadas na lacase livre (40 °C) e na lacase imobilizada (50 °C) pode estar relacionada às interações da enzima com o gel de alginato, pois a imobilização interfere na flexibilidade da enzima, exigindo

elevadas temperaturas para atingir a conformação adequada e manter a reatividade (KEERTI et al., 2014; MUNJAL; SAWHNEY, 2002).

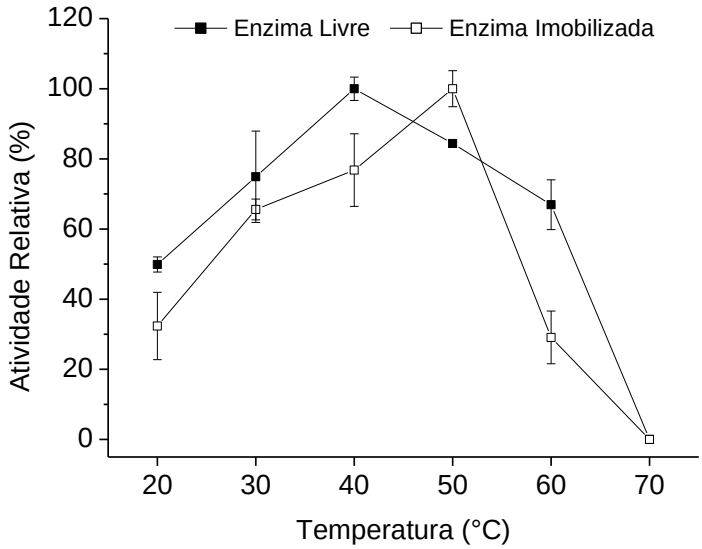

Figura 10. Efeito da temperatura na atividade da lacase de *P. pulmonarius* em pH ótimo (pH 4,0). Os dados são apresentados como média ± DP (n = 3)

Foi verificada a inativação da lacase livre e da lacase imobilizada em temperaturas acima de 70 °C. Estes resultados estão de acordo com os obtidos em outros estudos que também demonstraram a sensibilidade da lacase produzida por fungos a altas temperaturas, onde a enzima, mesmo imobilizada, perde completamente a sua atividade a partir de 70°C. (MAZLAN; HANIFAH, 2017; RAMÍREZ-CAVAZOS et al., 2014). Possivelmente as moléculas da lacase são desnaturadas mesmo imobilizadas em alginato, pois esta matriz polimérica sofre degradação em elevadas temperaturas.

5.4 Estabilidade térmica da lacase

A Figura 10 mostra que para a enzima livre a atividade inicial foi mantida superior a 60% com 7,0 h de incubação à 30 °C e superior a 50% com 0,5 h de incubação à 40 °C (Fig. 11A). Para a enzima imobilizada a atividade inicial foi mantida inferior a 50% com 7,0 h de incubação à 30 °C e superior a 50% com 2,5 h incubação à 40 °C (Fig. 11B). Apesar da imobilização melhorar a estabilidade térmica da lacase à 40 °C a enzima mantém maior estabilidade à 30°C.

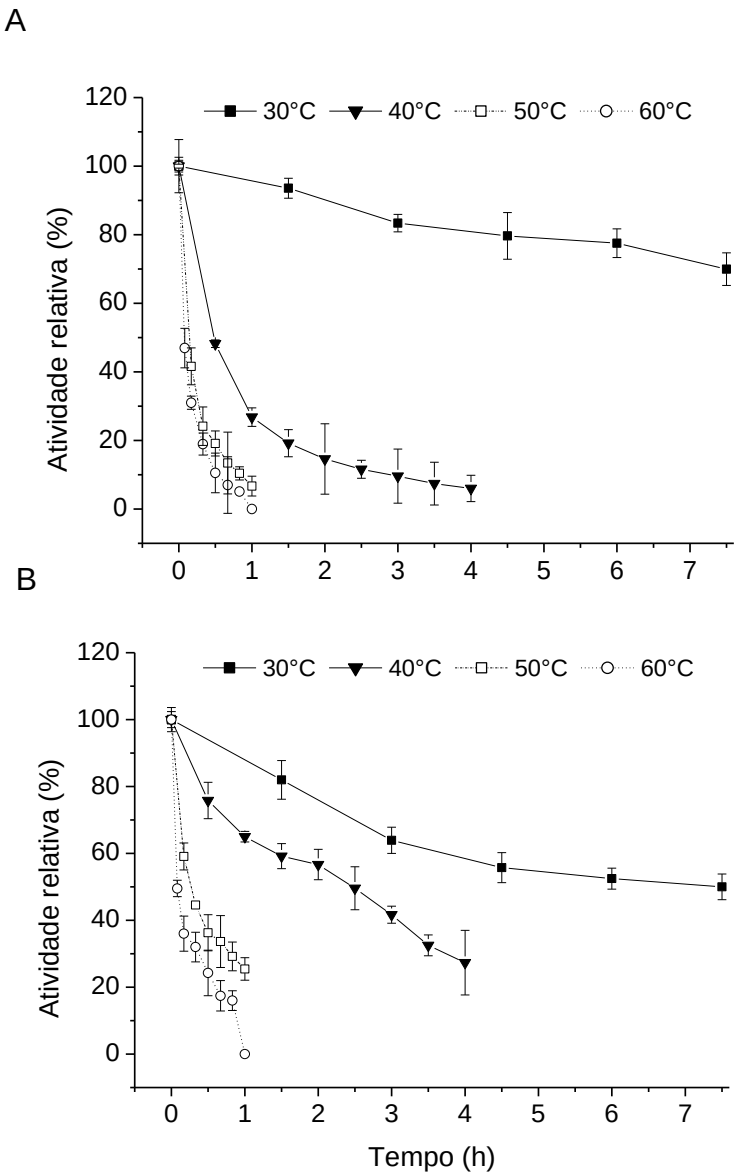

Figura 11. Termoestabilidade da lacase livre (A) e da lacase imobilizada (B) nas condições ótimas de pH (4,0) e em diferentes tempos de incubação. Os dados são apresentados como média ± DP (n = 3).

Estes resultados mostram que ambas as formas da lacase apresentou estabilidade térmica apenas à 30 °C e que na temperatura ótima (40°C) ocorre a perda de atividade em menor tempo de incubação. Estudos têm demostrado que a lacase produzida por fungos do gênero *Pleurotus* são bastante estáveis a temperaturas inferiores ao ótimo. Murugesan et al (2006) relatam que a lacase de *Pleurotus pulmonarius* não apresentou redução da atividade quando incubada à 30° por 1 h. Já Liu et al (2009) reporta a retenção da atividade relativa da lacase de *Pleurotus ostreatus* superior a 70% quando incubada à 30° por 1 h.

A lacase livre manteve apenas 6,7% da atividade inicial com 1 h de incubação à 50 °C e perde completamente a sua atividade à 60°C (Fig. 11A). Enquanto que a lacase imobilizada manteve 25,5% da sua atividade com 1 h de incubação à 50°C e também foi inativada à 60°C (Fig. 11B).

A baixa estabilidade térmica observada na lacase livre e na lacase imobilizada ocorre, provavelmente, porque às altas temperaturas (>40°C) desencadeia a ruptura das ligações químicas (intramoleculares e intermoleculares) da proteína, que resulta em alterações irreversíveis da sua estrutura tridimensional (SHANMUGAM et al., 2018). Consequentemente, estas alterações estruturais comprometem a capacidade catalítica da proteína (TAVARES et al., 2015).

Entre as diversas espécies de fungos da podridão da madeira ocorrem várias isoformas da lacase que se comportam de maneira bastante variada frente a temperatura e, portanto, exibem diferenças quanto termoestabilidade. Apesar de alguns relatos na literatura, as lacases fúngicas normalmente não são estáveis em temperaturas acima de 50°C, especialmente às produzidas por espécies do gênero *Pleurotus* (MARQUES DE SOUZA; PERALTA, 2003). Por outro lado, espécies de outros gêneros como *Trametes, Trichoderma* e *Pycnoporus* são apontadas como fonte de lacases termoestáveis.

Stoilova et al (2010) avaliaram a termoestabilidade da lacase produzida por *Trametes versicolor* e verificaram que a atividade inicial foi mantida superior à 80 % em 9 h de incubação à 50 °C e em torno de 50% após 3 h de incubação à 60 °C. Já shanmugam et al., (2018), ao realizar a caracterização da lacase de *Trichoderma asperellum* (cepa BPLMBT1), mostraram que a atividade residual se manteve maior que 70% com 4 h de incubação em temperaturas entre 50 – 65°C.

As espécies do gênero *Pycnoporus* são destacadas como fontes de lacase altamente termoestáveis. Cavazos et al (2014) obtiveram duas isoformas de lacase (Lac I e Lac II) a partir de *Pycnoporus sanguineus, a* Lac I mantém a atividade residual em torno de 90% e acima de 50% incubados por 14 h nas temperaturas de 50°C e 60°C, respectivamente. Enquanto que a Lac II mantém a atividade residual em 70% quando incubada por 10 h à de 50°C, porém à 60°C, esta isoforma foi menos estável, manteve a atividade relativa superior a 50% por aproximadamente 2h.

Os resultados dos estudos citados contrapõem os obtidos no presente trabalho, já que nas mesmas condições temperatura (50 e 60°C) a lacase de *Pleurotus*

pulmonarius foi inativada em apenas 1h. Apesar da rápida inativação nessa faixa de temperatura, estudos adicionais precisam ser realizados, pois a estabilidade térmica de enzimas imobilizadas pode ser melhorada, seja pela adição surfactantes estabilizadores ao meio reativo ou por alterações na composição do gel (TAVARES et al., 2013).

5.5 Parâmetros da inativação térmica

A figura 12 mostra as diferenças no padrão de decaimento entre a lacase livre e a lacase imobilizada nas temperaturas de 30 a 60 °C. A linearidade dos gráficos de ln A (%) em função do tempo indica que o modelo de decaimento de primeira ordem (equação 6) está adequadamente ajustado ($R^2 \geq 0{,}90$) aos dados experimentais obtidos do estudo de estabilidade térmica (Fig. 11). O ajuste dos dados ao modelo sugere que a transição da enzima do seu estado ativo para o estado desnaturado ocorre em apenas uma etapa (HENLEY; SADANA, 1985; TAVARES et al., 2013).

A análise de regressão dos dados experimentais do estudo da estabilidade térmica permitiu a obtenção das equações que descrevem o comportamento cinético da enzima (livre e imobilizada) para cada uma das temperaturas estudas (30-60°C). Através destas equações foi possível estimar a constante de decaimento térmico (k) e o tempo de meia vida ($t_{1/2}$).

O valor da constante de decaimento térmico (k) está relacionado com a taxa de inativação enzimática, assim baixos valores da constante k indicam a menor tolerância da enzima frente à inativação térmica, consequentemente, menor será o tempo necessário para que a enzima se torne inativa (PAL; KHANUM, 2011).

O tempo meia vida ($t_{1/2}$) de uma enzima é compreendido como o tempo necessárias para que sua atividade seja reduzida para 50% da atividade inicial (TAVARES et al., 2013).

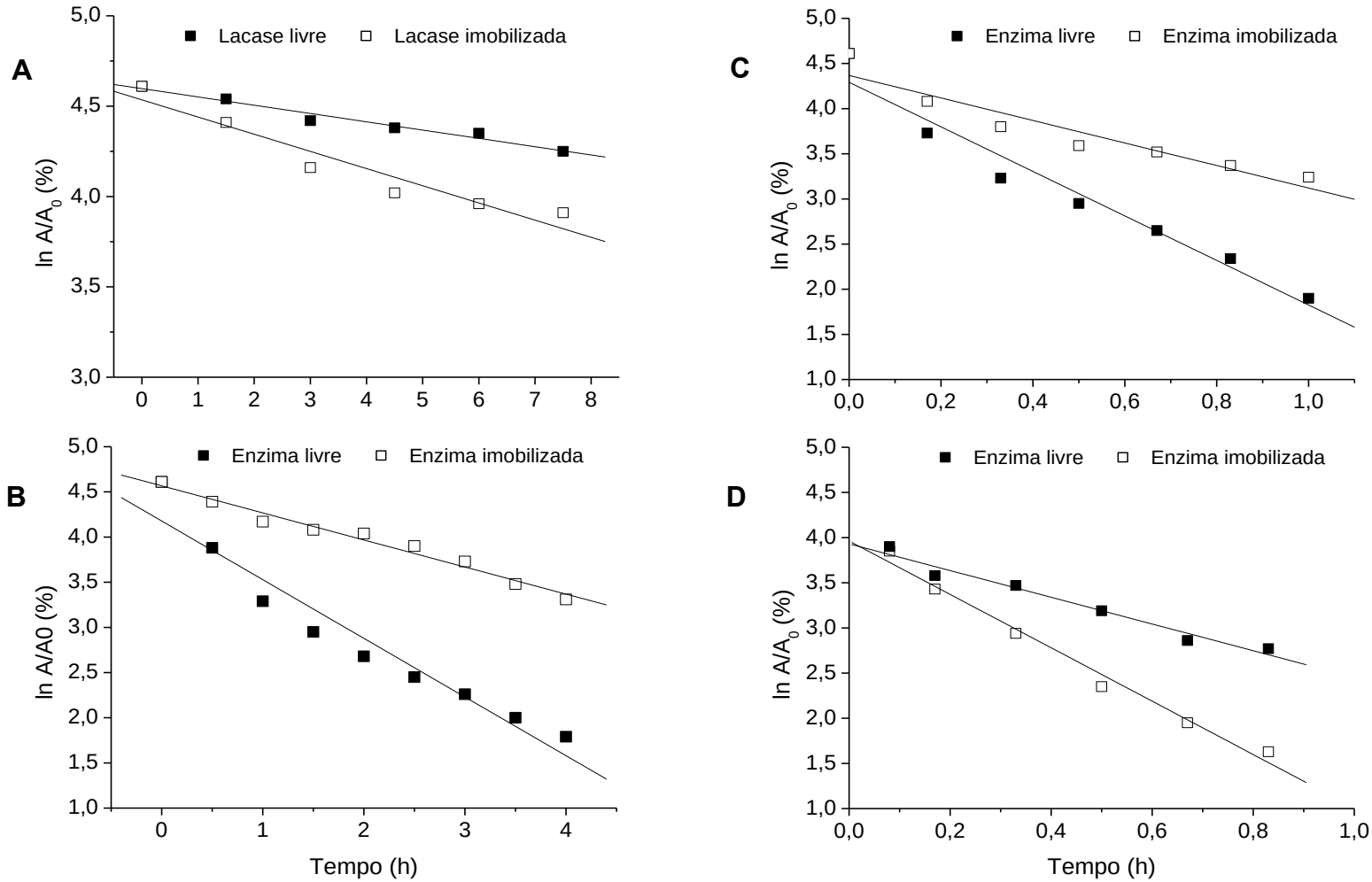

Figura 12. Cinética de desativação da lacase livre e da lacase imobilizada nas temperaturas: 30 °C (A), 40 °C (B), 50 °C (C) e 60 °C (D) em pH (4,0).

Os valores dos parâmetros da inativação térmica (k e $t_{1/2}$) da lacase livre e da lacase imobilizada são mostrados na Tabela 2.

Tabela 02. Parâmetros da inativação térmica da lacase livre e da lacase imobilizada. Constante de decaimento térmico (k_1) e tempo de meia vida ($t_{1/2}$).

Lacase	T (°C)	K_1 (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	R^2
Livre	30	0,0460	14,849	0,970
	40	0,6477	0,405	0,939
	50	2,4550	0,152	0,957
	60	2,9572	0,018	0,985
Imobilizada	30	0,0941	6,567	0,922
	40	0,2993	2,186	0,976
	50	1,2419	0,364	0,905
	60	1,4782	0,013	0,965

A tabela 2 mostra que à 30°C o valor da constante de decaimento (k_1) da lacase imobilizada foi aproximadamente 2,0 vezes superior ao valor determinado para a lacase livre. O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) da lacase imobilizada foi 2,3 vezes inferior ao tempo obtido para lacase livre. Este resultado indica que nesta condição de temperatura (30°C) a imobilização não aumentou a estabilidade térmica da lacase. Provavelmente, a diferença de estabilidade entre as duas formas da enzima está relacionada com a rapidez da resposta catalítica da lacase livre e com a dificuldade da lacase imobilizada alcançar o melhor rearranjo do seu sítio ativo quando mantida em temperaturas abaixo do ponto ótimo (>50°C) (CAO, 2005; GUZIK; HUPERT-KOCUREK; WOJCIESZYNSKA, 2014).

A 40 e a 50°C a lacase imobilizada apresentou os valores de k_1 reduzidos a, aproximadamente, metade dos valores determinados para a lacase livre. Os tempos de meia-vida da lacase imobilizada foram 2,3 e 7,0 vezes maiores aos determinados para lacase livre (Tabela 2). Estes resultados evidenciam o efeito positivo da

imobilização sobre a estabilidade térmica da enzima. As matrizes poliméricas como o alginato exercem um efeito protetor sobre a lacase e atenuam a ação desnaturante da energia térmica, assim garantem que atividade da enzima seja mantida mesmo em temperaturas mais elevadas (FRAZÃO et al., 2014; METIN, 2013).

5.6 Estudo Cinético

Os parâmetros da cinética enzimática da lacase livre e da lacase imobilizada foram determinados através da oxidação do ABTS com suas concentrações variando entre 0,1 a 2 mM. A figura 13 representa as linhas de tendências do ajuste do modelo de Lineweaver-Burk (equação 8) aos dados experimentais.

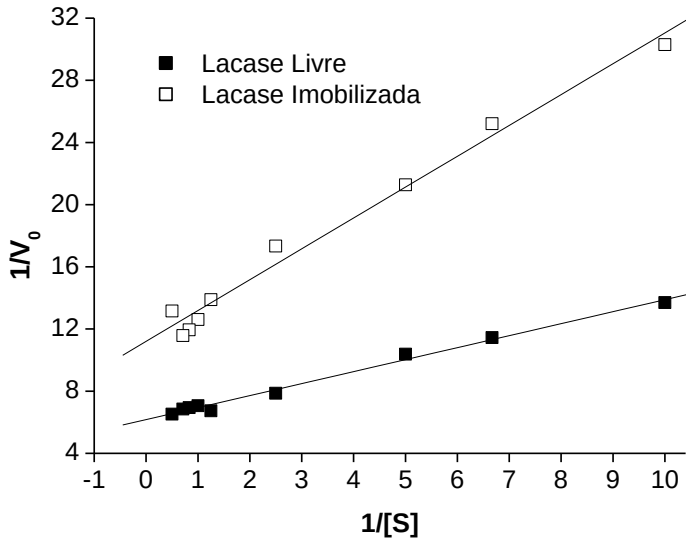

Figura 13. Determinação dos parâmetros cinéticos (km e Vm) pelo método gráfico Lineweaver-Burk da lacase livre e lacase imobilizada à 40°C e pH 4,0.

As equações das linhas de tendência da lacase livre (0,7712x + 6,1743) e da lacase imobilizada (y = 1,9854x + 11,201) foram utilizadas para determinar os valores da constante de Michaelis Menten (k_m) e da velocidade máxima (v_{max}) de ambas as formas da enzima. Os valores dos parâmetros cinéticos são mostrados na tabela 3.

Tabela 03. Parâmetros cinéticos: constante de Michaelis-Menten (k_m) e velocidade máxima (v_{max}) da lacase livre e da lacase imobilizada.

Lacase	**K_m** (mM)	**V_m** (mM.min^{-1})	**R^2**
Livre	0,1249	0,1620	0,992
Imobilizada	0,1773	0,0893	0,984

Na Tabela 3 observa-se que o valor da constante de Michaelis-Menten (k_m) aumentou de 0,1259 mM na lacase livre para 0,1773 mM na lacase imobilizada. Esse parâmetro cinético relaciona-se inversamente com a afinidade da enzima ao substrato (SPINELLI et al., 2013). Assim, o aumento do K_m com a imobilização indica a menor afinidade da lacase ao ABTS. Outros estudos que utilizaram matrizes poliméricas como suporte e a técnica de imobilização enzimática por aprisionamento também apontam o aumento do valor de K_m (BAGEWADI; MULLA; NINNEKAR, 2017; JAISWAL; PANDEY; DWIVEDI, 2016; LASSOUANE et al., 2019). Porém, o aumento do k_m verificado no presente trabalho (1,4 vezes) foi menor que o observado nos outros estudos (3 – 4 vezes).

Entre os fatores que afetam o valor de K_m em sistemas imobilizados estão a redução da flexibilidade necessária para ligação da enzima com o substrato e o impedimento estérico causado pelo suporte, que pode limitar o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima (KUMAR et al., 2017). Em relação a outros tipos de suporte e a estratégias de imobilização Tavares et al., (2013) verificaram um aumento de 12 vezes no valor k_m da lacase imobilizada em sílica modificada por ligação covalente e Spinelli et al., (2013) obtiveram um aumento de 93 vezes do K_m na imobilização em matriz de amberlite por ligação covalente. Estes estudos corroboram a aplicabilidade do alginato e de outras matrizes poliméricas nos procedimentos de imobilização.

A velocidade máxima (v_{max}) foi o outro parâmetro da cinética da reação enzimática investigado. De acordo com modelo de Michaelis-Menten a velocidade da reação enzimática aumenta em função da concentração do substrato. Porém, quando a concentração do substrato equivale à saturação de todas as moléculas da enzima obtém-se, um valor constante e equivalente a velocidade máxima (V_{max}) da reação (MINTEER, 2011). Os dados cinéticos da lacase imobilizada mostram que a V_{max} foi reduzida em 1,8 vezes (Tabela 3). Os processos de imobilização afetam a V_{max} das

reações enzimáticas, principalmente, quando são utilizadas matrizes poliméricas como suporte. A redução no valor da V_{max} também foi relatada por outros autores, Frazão et al., (2014) apontam queda de 1,6 vezes imobilização com matriz de celulose, enquanto que Lassouane et al., (2019) destacam a redução de aproximadamente 8,0 vezes em matriz de alginato. As alterações da V_{max} da enzima imobilizada em comparação com a enzima livre podem ser devido ao problema de transferência de massa, que compromete a difusão do substrato, especialmente os de elevada massa molecular (ABTS) e que também resulta no acúmulo dos produtos de reação no interior das microesferas de alginato (DENG et al., 2019; KUMAR et al., 2017).

5.7 Efeito de sais e reagentes

A influência dos sais e reagentes sobre a atividade enzimática da lacase de *P. pulmonarius* nas enzimas livre e imobilizada foi investigada e as respostas são mostradas na Tabela 4.

Tabela 04. Efeito de íons de aditivos na atividade da lacase livre e da lacase imobilizada.

Aditivos	Atividade relativa (%)			
	Enzima livre		Enzima imobilizada	
	1 mM	5 mM	1 mM	5 mM
Controle	100,0	100,0	100,0	100,0
Li_2SO_4	90,90 ± 4,0	82,1 ± 6,3	102,6 ± 6,8	64,0 ± 1,8
$NiSO_4$	100,9 ± 13,5	75,0 ± 9,9	95,8 ± 5,0	76,0 ± 4,0
$CuSO_4$	190,0 ± 4,8	135,7 ± 3,5	166,7 ± 7,2	112,0 ± 5,2
$MgCl_2$	100,0 ± 12,5	62,5 ± 11	100,0 ± 1,0	64,0 ± 5,4
$MnSO_4$	110 10,9	83,6 ± 11	79,2 ± 1,0	68,3 ± 11,1
$CaSO_4$	100,0 ± 5,0	82,1 ± 4,5	105,3 ± 6,3	68,0 ± 3,3
$ZnSO_4$	105,0 ± 7,1	75,0 ± 11,2	97,4 ± 5,6	64,0 ± 4,8
$CoCl_2$	100,0 ± 11,0	62,5 ± 4,4	97,4 ± 8,7	70,0 ± 1,6
$Al(NO_3)_3$	90,50 ± 9,1	57,1 ± 3,6	107,9 ± 3,7	80,0 ± 1,4
EDTA	94,3 ± 10,7	82,1 ± 5,5	71,1 ± 3,8	74,0 ± 7,2
SDS	69,0 ± 3,3	35,7 ± 8,7	36,8 ± 9,8	20,0 ± 11,5
β-mercaptoetanol	0,0	0,0	0,0	0,0

EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e SDS (dodecil sulfato de sódio).

Foi verificado que na concentração de 1 mM a maioria dos aditivos não exerceram influência sobre a atividade de ambas as formas da enzima, exceto para cobre (Cu^{+2}) que se comportou com ativador e aumentou a atividade relativa das lacases livre e imobilizada em 1,9 e 1,6 vezes, respectivamente. Entretanto, na concentração de 5 mM a maioria dos aditivos exerceram um efeito inibitório sobre as lacases livre. Este efeito também foi observado na lacase imobilizada, sugerindo que o processo de imobilização não protege a enzima da ação inibitória dos aditivos. Porém, com 5 mM o íon cobre (Cu^{+2}) elevou em 1,4 e 1,1 vezes as atividades relativas da enzima livre e imobilizada, respectivamente.

As lacases de origem fúngica apresentam quatro íons Cu^{+2} sem sua estrutura molecular e que são os responsáveis pelas suas propriedades catalítica (HAKULINEN; ROUVINEN, 2015; JONES; SOLOMON, 2015; WONG, 2009). Assim, com a adição de $CuSO_4$ no meio reacional, provavelmente, os íons Cu^{+2} dissociados se ligam a resíduos de aminoácidos do sítio ativo da enzima, participam da oxidação do substrato, e contribuem para o aumento na atividade de lacase (BALDRIAN; GABRIEL, 2002). Outros pesquisadores também constataram o aumento da atividade de lacase após a pré-incubação da enzima em soluções com diferentes concentrações de sais de cobre. Sondhi et al., (2014) obtiveram aumento de 6 e 26% com soluções com 1 e 5 mM de $CuSO_4$, enquanto que Das et al., (2016) verificaram aumento de 35% com solução de 6 mM do mesmo reagente.

No presente estudo as lacases livre e imobilizada mantiveram suas atividades superiores a 60% na presença dos íons Li^{+1}, Ni^{+2}, Mn^{+2}, Mg^{+2}, Ca^{+2}, Zn^{+2}, Co^{+2} e Al^{+3} nas concentrações de 1 e 5 mM. A capacidade da lacase em manter-se funcionalmente ativa na presença de íons metálicos, evidencia seu potencial de aplicação biotecnológica, especialmente em processos onde estes metais estão presentes em altas concentrações, como por exemplo na indústria têxtil, de papel e celulose (DAS et al., 2016; MTIBAÀ et al., 2018; SHRADDHA et al., 2003; SONDHI et al., 2014).

Em relação ao agente quelante avaliado neste estudo, o EDTA na concentração de 1 mM manteve em 94,3 e 71,1 % as atividades relativas das lacases, livre e imobilizada, respectivamente. Na concentração de 5 mM manteve em 82,2% e 74,0% das atividades relativas. Olajuyigbe e Fatokun, (2017) ao avaliar o efeito dos aditivos nas propriedades da lacase livre, também verificaram que o EDTA a 1 mM e

5 mM afetou a atividade da lacase após 30 minutos de incubação e foi mantida em 71%. Resultados semelhantes para a lacase imobilizada foram observados por Jaiswal; Pandey; Dwivedi, (2016), nos quais o EDTA 1 mM apresentou inibição de 20% na atividade enzimática.

O surfactante SDS reduziu a atividade enzimática da lacase livre em 31 e 64,3% e a da lacase imobilizada em 63,2 e 80%, nas concentrações de 1 e 5 mM, respectivamente. A inibição da atividade da lacase por SDS nas concentrações de 1 e 5 mM também foi verificada por Atalla et al. (2013) e por Olajuyigbe e Fatokun, (2017), com redução de 31,0 e 38,5%, respectivamente. O efeito do SDS sobre a atividade da enzima pode estar relacionado a redução das interações hidrofóbicas da proteína e com ligação direta desse aditivo a molécula da enzima.

Também foi observado que o β-mercaptoetanol inibiu completamente a atividade das lacases livre e imobilizada a 1 e 5 mM. Esse aditivo causa a desnaturação de moléculas de lacase. Por sua atuação na clivagem das ligações dissulfeto que produz o efeito inibidor sobre a enzima. Isso implica que as ligações dissulfeto desempenham papel importante na estabilização da conformação enzimática (OLAJUYIGBE; FATOKUN, 2017).

5.8 Efeito do armazenamento e da reutilização

A estabilidade de armazenamento da lacase livre e da lacase imobilizada foi avaliada a 4 °C e em pH 4,0 durante 7 dias. A enzima livre reteve aproximadamente 50 e 36% de sua atividade inicial com 4 e 7 de armazenamento, respectivamente. No entanto, a enzima imobilizada manteve 71 e 67% de sua atividade inicial com 4 e 7 dias de armazenamento (Fig. 14).

Estes resultados mostram que a lacase imobilizada apresentou melhor estabilidade ao armazenamento do que sua forma livre. Outros autores também estudaram a estabilidade de armazenamento da lacase enzima. Daâssi et al., (2014) usaram a lacase de *Coriolopsis gálica* imobilizada em alginato e obtiveram uma atividade residual de aproximadamente 90% após 7 dias de armazenamento. Spinelli et al., (2013) usaram uma lacase *Trametes versicolor* imobilizada em amberlite (IR-120H), obtendo uma atividade residual de 98,6% após 7 dias de armazenamento a 4 °C. Comparado com os resultados da literatura, a estabilidade da lacase imobilizada

do presente estudo foi menor quando armazenada em baixas temperaturas. Porém, mostrou-se mais estável que a lacase livre sob a mesma condição. A maior estabilidade de armazenamento da lacase imobilizada pode ser atribuída ao ambiente de proteção fornecido pelas microesferas de alginato (CHAUDHARI; KAR; SINGHAL, 2015).

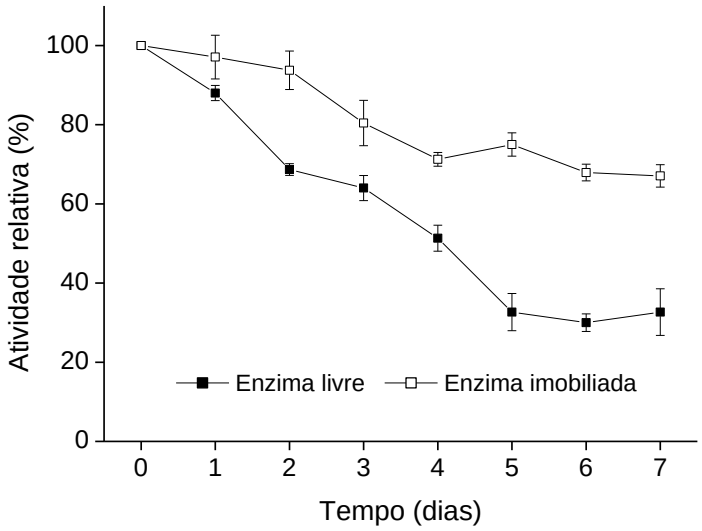

Figura 14. Estabilidade de armazenamento à 4 °C em tampão acetato (pH 4,0) para lacase livre e lacase imobilizada.

A recuperação e reutilização de enzimas imobilizadas representam dois dos aspectos mais relevantes para aplicação da biocatálise em processos industriais, uma vez que possibilitam a redução do custo operacional (KEERTI et al., 2014). Por isso, o potencial de reutilização de uma lacase de *Pleurotus pulmonarius* imobilizada em microesferas de alginato foi avaliado em 6 ciclos sucessivos pela oxidação do ABTS. Os resultados são apresentados na Figura 15.

A partir dos dados contidos na figura 15, pode-se observar que no quinto ciclo o valor atividade relativa da lacase imobilizada foi superior a 70% e caiu para 35% no sexto ciclo. Alterações conformacionais e a obstrução dos poros das microesferas de alginato, seja pelo acúmulo de substrato ou produtos, são recorrentemente apontadas como a causa da redução da atividade enzimática nos ciclos subsequentes (KUMAR et al., 2017; MUNJAL; SAWHNEY, 2002). No entanto, a diminuição da atividade ocorrida em novas reutilizações pode ser devido ao vazamento de enzima das

microesferas de alginato durante a lavagem no final de cada ciclo (REHMAN et al., 2013).

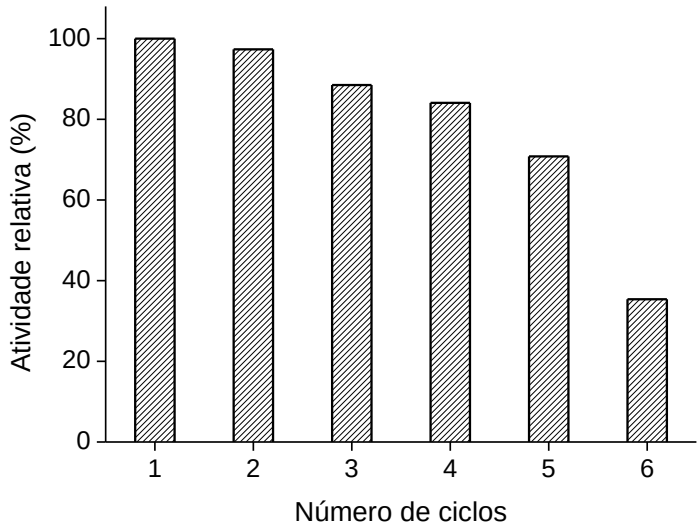

Figura 15. Potencial de reutilização da lacase imobilizada em ciclos de oxidação do ABTS.

Na literatura, existem relatos quanto a reutilização exitosa para vários sistemas imobilizados de lacase. Assim, uma lacase de *Pleurotus ostreatus* imobilizada em MANAE-agarose reteve mais de 90% de sua atividade após 15 ciclos de aplicação do bisfenol-A (BRUGNARI et al., 2018) e uma lacase de *Trametes versicolor* IBL-04 imobilizadas em microesferas de quitosana ativadas com glutaraldeído manteve mais de 60% da sua atividade inicial após 9 ciclos de uso na de remoção de corante (ASGHER; NOREEN; BILAL, 2017). Aparentemente a eficiência da reutilização relaciona-se à origem da enzima, ao tipo de suporte e também com a natureza do substrato utilizado.

6. CONCLUÕES

O processo de imobilização com a lacase reticulada aumentou a eficiência de imobilização de 44% para 79,4% e reduziu em até 4 vez a lixiviação enzimática. Demonstrando que o glutaraldeído contribui para a maior retenção da enzima nas microesferas de alginato de cálcio.

A lacase produzida pelo fungo *Pleurotus pulmonarius* dispõe de características físico-químicas que permitem a utilização da sua forma livre e imobilizada em processos cujo o meio racional apresente faixa de pH entre 4 e 5. No entanto, ambas as formas da enzima não suportam temperaturas superiores a 50 ºC. Além disso, a enzima mostrou tolerância a presença de íons metálicos, surfactante e agentes quelante. Destaca-se ainda que o íon Cu^{+2} atuou com um forte ativador da lacase.

A 40 °C a constante de inativação térmica (k_1) da lacase imobilizada reduziu em 2 vezes e o tempo de meia vida aumentou 2,3 vezes em relação aos valores obtidos para a enzima livre.

A imobilização alterou levemente a cinética enzimática, o valor de k_m aumentou de 0,124 para 0,177 mM e o valor de V_m diminuiu de 0,162 para 0,089 $mM.min^{-1}$ na lacase livre e imobilizada, respectivamente

A lacase imobilizada mostrou maior estabilidade de armazenamento em relação a enzima do livre. Porém outras condições de armazenamento precisam ser verificadas para avaliar a possibilidade de manter a enzima aprisionada na microesfera e ativa por mais de 7 dias.

Na reutilização, a enzima imobilizada apresentou mais de 70% de atividade após 5 ciclos reativos consecutivos, o que comprova enzimas imobilizadas podem ser utilizadas continuamente.

7. PERSPECTIVAS

- Realizar estudos de purificação;

- Estudar a termoestabilidade da lacase livre e imobilizada na presença de surfactantes estabilizadores no meio reativo;

- Avaliar o comportamento cinético da lacase frente a outros substratos;

- Estudar o potencial de aplicação da enzima na degradação de contaminantes ambientais recalcitrantes, como agrotóxicos e corantes.

REFERÊNCIAS

AHMAD, R.; SARDAR, M. Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix. **Biochemistry & Analytical Biochemistry**, v. 04, n. 02, 2015.

ALEXANDRINO, A. M. et al. Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por Pleurotus ostreatus (Jack:Fr). **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 364–368, 2007.

ASGHER, M.; KAMAL, S.; IQBAL, H. M. N. Improvement of Catalytic Efficiency, Thermo-stability and Dye Decolorization Capability of Pleurotus ostreatus IBL-02 laccase by Hydrophobic Sol Gel Entrapment. **Chemistry Central Journal**, v. 6, n. 1, p. 1–10, 2012.

ASGHER, M.; NOREEN, S.; BILAL, M. Enhancing catalytic functionality of Trametes versicolor IBL-04 laccase by immobilization on chitosan microspheres. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 119, p. 1–11, 2017.

ATALLA, M. M. et al. Characterization and kinetic properties of the purified Trematosphaeria mangrovei laccase enzyme. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 20, n. 4, p. 373–381, 2013.

BAGEWADI, Z. K.; MULLA, S. I.; NINNEKAR, H. Z. Purification and immobilization of laccase from Trichoderma harzianum strain HZN10 and its application in dye decolorization. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 139–150, 2017.

BALDRIAN, P. Fungal laccases-occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 215–242, 2006.

BALDRIAN, P.; GABRIEL, J. Copper and cadmium increase laccase activity in Pleurotus ostreatus. **FEMS Microbiology Letters**, v. 206, n. 1, p. 69–74, 2002.

BALLAMINUT, N.; MATHEUS, D. R. Characterization of fungal inoculum used in soil bioremediation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 248–252, 2007.

BAZANELLA, G. C. DOS S. et al. Production of laccase and manganese peroxidase by Pleurotus pulmonarius in solid-state cultures and application in dye decolorization. **Folia Microbiologica**, v. 58, n. 6, p. 641–647, 2013.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram

Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. v. 254, p. 248–254, 1976.

BRENA, B.; PAULA GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of Enzymes : A Literature Survey. In: **Immobilization of Enzymes and Cells**. [s.l: s.n.]. v. 1051p. 15–37.

BRUGNARI, T. et al. A highly reusable MANAE-agarose-immobilized Pleurotus ostreatus laccase for degradation of bisphenol A. **Science of The Total Environment**, v. 634, p. 1346–1351, 2018.

CARVALHO, N. B.; LIMA, Á. S.; SOARES, C. M. F. USO DE SÍLICAS MODIFICADAS PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES. **Quimica Nova**, v. 38, n. 3, p. 399–409, 2015.

CHAUDHARI, S. A.; KAR, J. R.; SINGHAL, R. S. Immobilization of Proteins in Ormosil Gels: Functional Properties and Applications. **Current Organic Chemistry**, v. 19, n. 17, p. 1677–1683, 2015.

CUI, J. D.; JIA, S. R. Optimization protocols and improved strategies of cross-linked enzyme aggregates technology : current development and future challenges. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 35, n. 1, p. 15–28, 2015.

DAS, A. et al. Production, characterization and Congo red dye decolourizing efficiency of a laccase from Pleurotus ostreatus MTCC 142 cultivated on co-substrates of paddy straw and corn husk. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 281–288, 2016.

DAS, N.; MUKHERJEE, M. Cultivation of Pleurotus ostreatus on weed plants. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 14, p. 2723–2726, 2007.

DENG, Z. et al. Immobilization of pectinases into calcium alginate microspheres for fruit juice application. **Food Hydrocolloids**, v. 89, n. November 2018, p. 691–699, 2019.

DIAS, E. S. et al. CULTIVO DO COGUMELO Pleurotus sajor-caju EM DIFERENTES RESÍDUOS AGRÍCOLAS CULTIVATION OF THE MUSHROOM Pleurotus sajor-caju IN DIFFERENT AGRICULTURAL RESIDUES. **Ciênc. agrotec., Lavras**, v. 27, p. 1363–1369, 2003.

DWIVEDI, U. N. et al. Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 2, p. 117–128,

2011.

FANADZO, M. et al. Evaluation of various substrates and supplements for biological efficiency of Pleurotus sajor-caju and Pleurotus ostreatus. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 19, p. 2756–2761, 2010.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. Á.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1808–1825, 2013.

FRAZÃO, C. J. R. et al. Bacterial cellulose as carrier for immobilization of laccase: Optimization and characterization. **Engineering in Life Sciences**, v. 14, n. 5, p. 500–508, 2014.

GIARDINA, P. et al. Laccases: A never-ending story. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 3, p. 369–385, 2010.

GIATTI MARQUES DE SOUZA, C.; ZILLY, A.; PERALTA, R. M. Production of laccase as the sole phenoloxidase by a Brazilian strain of Pleurotus pulmonarius in solid state fermentation. **Journal of Basic Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 83–90, 2002.

GUPTA, V. et al. Functional substitution of domain 3 (T1 copper center) of a novel laccase with Cu ions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, p. 1052–1061, 2019.

HAKULINEN, N.; ROUVINEN, J. Three-dimensional structures of laccases. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 72, p. 857–868, 2015.

HENLEY, J. P.; SADANA, A. Categorization of enzyme deactivations using a series-type mechanism. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, n. 2, p. 50–60, 1985.

HIRATSUKA, R. S.; SANTILLI, C. V.; PULCINELLI, S. H. O PROCESSO SOL-GEL: UMA VISÃO FISICO-QUÍMICA. **Química Nova**, v. 18, n. 2, p. 171–180, 1995.

HÖLKER, U.; HÖFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 2, p. 175–186, 2004.

JAISWAL, N.; PANDEY, V. P.; DWIVEDI, U. N. Immobilization of papaya laccase in chitosan led to improved multipronged stability and dye discoloration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 288–295, 2016.

JONES, S. M.; SOLOMON, E. I. **Electron transfer and reaction mechanism of**

laccasesCellular and Molecular Life Sciences, 2015.

KEERTI et al. Kinetic Characterization and Effect of Immobilized Thermostable β - Glucosidase in Alginate Gel Beads on Sugarcane Juice . **ISRN Biochemistry**, v. 2014, p. 1–8, 2014.

KUMAR, S. et al. International Journal of Biological Macromolecules Improved enzyme properties upon glutaraldehyde cross-linking of alginate entrapped xylanase from Bacillus licheniformis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 24–33, 2017.

LASSOUANE, F. et al. A promising laccase immobilization approach for Bisphenol A removal from aqueous solutions. **Bioresource Technology**, v. 271, n. September 2018, p. 360–367, 2019.

LIN, J. et al. Enhancing catalytic performance of laccase via immobilization on chitosan/CeO2 microspheres. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 1–8, 2015.

MARQUES DE SOUZA, C. G.; PERALTA, R. M. Purification and characterization of the main laccase produced by the white-rot fungus Pleurotus pulmonarius on wheat bran solid state medium. **Journal of Basic Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 278–286, 2003.

MATE, D. M.; ALCALDE, M. Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 1457–1467, 2017.

METIN, A. Ü. Immobilization of laccase onto polyethyleneimine grafted chitosan films: Effect of system parameters. **Macromolecular Research**, v. 21, n. 10, p. 1145–1152, 2013.

MINTEER, S. D. Kinetic Measurements for Enzyme Immobilization Michael. **Methods in molecular biology**, v. 679, p. 230, 2011.

MOHAMAD, N. R. et al. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 205–220, 2015.

MTIBAÀ, R. et al. Purification and characterization of a fungal laccase from the ascomycete Thielavia sp. and its role in the decolorization of a recalcitrant dye. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 1744–1751, 2018.

MUNJAL, N.; SAWHNEY, S. K. Stability and properties of mushroom tyrosinase entrapped in alginate, polyacrylamide and gelatin gels. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 613–619, 2002.

MUNK, L. et al. Can laccases catalyze bond cleavage in lignin? **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 1, p. 13–24, 2015.

OLAJUYIGBE, F. M.; FATOKUN, C. O. Biochemical characterization of an extremely stable pH-versatile laccase from Sporothrix carnis CPF-05. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 535–543, 2017.

PAL, A.; KHANUM, F. Covalent immobilization of xylanase on glutaraldehyde activated alginate beads using response surface methodology: Characterization of immobilized enzyme. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 6, p. 1315–1322, 2011.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 5, p. 81–84, 2003.

PANJIKKARAN, S. T.; MATHEW, D. An environmentally friendly and cost effective technique for the commercial cultivation of oyster mushroom [Pleurotus florida (Mont.) Singer]. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 4, p. 973–976, 2013.

PANT, D.; REDDY, U. G.; ADHOLEYA, A. Cultivation of oyster mushrooms on wheat straw and bagasse substrate amended with distillery effluent. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 267–275, 2006.

PERALTA, R. M. et al. **Enzymes from Basidiomycetes-Peculiar and Efficient Tools for Biotechnology**. [s.l.] Elsevier Inc., 2016.

RAMÍREZ-CAVAZOS, L. I. et al. **Purification and characterization of two thermostable laccases from Pycnoporus sanguineus and potential role in degradation of endocrine disrupting chemicalsJournal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2014.

REHMAN, H. U. et al. Degradation of complex carbohydrate: Immobilization of pectinase from Bacillus licheniformis KIBGE-IB21 using calcium alginate as a support. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1–4, p. 1081–1086, 2013.

RIAZ, A. et al. Immobilization of a thermostable A-amylase on calcium alginate beads from Bacillus subtilis KIBGE-HAR. **Australian Journal of Basic and Applied**

Sciences, v. 3, n. 3, p. 2883–2887, 2009.

RIVERA-HOYOS, C. M. et al. Fungal laccases. **Fungal Biology Reviews**, v. 27, n. 3–4, p. 67–82, 2013.

RODRIGUEZ COUTO, S. Exploitation of biological wastes for the production of value-added products uncler solid-state fermentation conditions. **Biotechnology Journal**, v. 3, n. 7, p. 859–870, 2008.

SÁNCHEZ, P. et al. Encapsulation of Cells in Alginate Gels. In: YORK, S. S. AND B. M. N. (Ed.). . **Immobilization of Enzymes and Cells**. 3º ed. [s.l: s.n.]. v. 1051p. 313–325.

SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 489–511, 2012.

SHANMUGAM, S. et al. Potential of biohydrogen generation using the delignified lignocellulosic biomass by a newly identified thermostable laccase from Trichoderma asperellum strain BPLMBT1. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 7, p. 3618–3628, 2018.

SHARMA, P. et al. Fungal laccases. **Fungal Biology Reviews**, v. 68, n. 6, p. 117–128, 2006.

SHARMA, P.; GOEL, R.; CAPALASH, N. Bacterial laccases. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 6, p. 823–832, 2007.

SHELDON, R. A. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). p. 467–477, 2011.

SHELDON, R. A.; SCHOEVAART, R.; LANGEN, L. M. VAN. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review). **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 23, p. 141–147, 2005.

SHRADDHA et al. Laccase: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 29–60, 2003.

SHUQI, G. et al. State of the art protein engineering approaches using biological macromolecules: a review from immobilization to implementation view point. **International Journal ofBiological Macromolecules**, v. 108, p. 893–901, 2017.

SILVA, C. S. et al. The role of Asp116 in the reductive cleavage of dioxygen to water in CotA laccase : assistance during the proton-transfer mechanism. **Biological Crystallography**, v. 68, p. 186–193, 2012.

SINGH, A. P.; SINGH, T. Biotechnological applications of wood-rotting fungi: A review. **Biomass and Bioenergy**, v. 62, p. 198–206, 2014.

SINGH, G. et al. Laccase from prokaryotes : a new source for an old enzyme. **Rev Environ Sci Biotechnol**, v. 10, p. 309–326, 2011.

SIRISHA, V. L.; JAIN, A.; JAIN, A. Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 79, p. 179–211, 2016.

SONDHI, S. et al. Purification and characterization of an extracellular, thermo-alkali-stable, metal tolerant laccase from Bacillus tequilensis SN4. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. 1–10, 2014.

SOUZA;, L. T. DE A. et al. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. In: **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4**. [s.l: s.n.]. p. 529–568.

SPINELLI, D. et al. Immobilization of fungal (Trametes versicolor) laccase onto Amberlite IR-120 H beads : Optimization and characterization. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 218–223, 2013.

TANIGUCHI, M. et al. Evaluation of pretreatment with Pleurotus ostreatus for enzymatic hydrolysis of rice straw. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 6, p. 637–643, 2005.

TASKIN, E. et al. **Biochar and hydrochar from waste biomass promote the growth and enzyme activity of soil-resident ligninolytic fungiHeliyon**, 2019.

TAVARES, A. P. M. et al. Immobilization of laccase on modified silica: Stabilization, thermal inactivation and kinetic behaviour in 1-ethyl-3-methylimidazolium ethylsulfate ionic liquid. **Bioresource Technology**, v. 131, p. 405–412, 2013.

TAVARES, A. P. M. et al. Laccase immobilization over multi-walled carbon nanotubes: Kinetic, thermodynamic and stability studies. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 454, p. 52–60, 2015.

TING, P. et al. Influence of counteranions on catalytic ability of immobilized laccase in Cu-alginate matrices: Inhibition of chloride and activation of acetate. **Chinese**

Chemical Letters, v. 25, n. 7, p. 983–988, 2014.

VOBERKOVÁ, S. et al. Immobilization of ligninolytic enzymes from white-rot fungi in cross- linked aggregates rkov a Stanislava Vob e. **Chemosphere**, v. 202, p. 694–707, 2018.

WANG, Y. et al. Preparation of active corn peptides from zein through double enzymes immobilized with calcium alginate-chitosan beads. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 10, p. 1682–1690, 2014.

WONG, D. W. S. **Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes**. [s.l: s.n.]. v. 157

XU, F. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 2, p. 924–928, 1997.

YANG, J. et al. Laccases: Production, expression regulation, and applications in pharmaceutical biodegradation. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. MAY, 2017.

YOSHIDA, H. CHEMISTRY OF LACQUER (URUSHI). **Journal of the Chemical Society**, v. 43, p. 472–486, 1983.

ZDARTA, J. et al. Developments in support materials for immobilization of oxidoreductases : A comprehensive review. **Advances in Colloid and Interface Science journal**, v. 258, p. 1–20, 2018.