

Seleção de suportes para imobilização de lipases

Screening of lipase immobilization supports

RESUMO

Ricardo de Sousa Rodrigues
rsrodrigues767@gmail.com

Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Apucarana, Paraná,
Brasil

Alessandra Machado Baron

alessandrab@utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Apucarana, Paraná,
Brasil

Valéria M. Gomes do Nascimento

valeria@assis.unesp.br

Universidade estadual paulista, São
Paulo, Brasil

Patrícia Salomão Garcia

patriciagarcia@utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Apucarana, Paraná,
Brasil

Matheus Martins Canesin

matheuscanesin@hotmail.com

Universidade Tecnológica Federal
do Paraná, Apucarana, Paraná,
Brasil

Lipases de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 passaram por estudos de imobilização utilizando o método de adsorção física ou interfacial. Quatro materiais foram estudados sendo: sílica mesoporosa expandida (SMPE); estrutura metalorgânica constituída por clusters de Fe (III) (MOF); polímero produzido por eletrofiliação a base de quitosana (QE); partícula magnética de cobalto (CoO.Co₂O₃). A imobilização ocorreu com 50mg de suporte em erlenmeyer e 10 mL de solução enzimática (3 mg de proteína/0,1 g de suporte), agitados a 100 rpm (25°C) por 6 h. Através dos sobrenadantes e do material foram realizados estudos de eficiência de imobilização (E) e retenção de atividade (R), onde os melhores resultados de eficiência foram para MOF (90%) e SMPE (73%). Quanto à retenção de atividades os melhores resultados foram também para o MOF (400%) e SMPE (170%). Os métodos analíticos foram baseados na reação de hidrólise do palmitato de p-nitrofenila para dosagem de atividade enzimática e método de Bradford para determinar a concentração proteica, sendo os ensaios feitos em duplicatas.

PALAVRAS-CHAVE: Imobilização. Lipases. Suportes.

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

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



ABSTRACT

Burkholderia lata LBBIO-BL02 lipases underwent immobilization studies using the physical or interfacial adsorption method. Four materials were studied: expanded mesoporous silica (SMPE); metallurgical structure consisting of fe (iii) (MOF) clusters; polymer produced by chitosan-based electrophony (qe); cobalt (iv) magnetic particle (CoO.Co₂O₃). Immobilization occurred with 50 mg erlenmeyer support and 10 ml enzyme solution (3 mg protein / 0.1 g support), stirred at 100 rpm (25 ° c) for 6 h. Through the supernatants and the material were performed immobilization efficiency (E) and activity retention (R) studies, where the best efficiency results were for MOF (90%) and SMPE (73%). In terms of activity retention, the best results were also for MOF (400%) and SMPE (170%). The analytical methods were based on the hydrolysis reaction of p-nitrophenyl palmitate for enzymatic activity measurement and bradford method to determine protein concentration, and the assays were performed in duplicates.

KEYWORDS: Immobilization. Lipases. Support.

INTRODUÇÃO Página | 2

Lipases são enzimas extremamente versáteis quanto a sua possibilidade de aplicação e por essa característica são vistas como promissoras agentes em diversos campos industriais, tais como, bioenergético, alimentício, farmacêutico, biotecnológico, entre outros (ABREU, 2013).

Os biocatalisadores apresentam grandes vantagens frente aos catalisadores inorgânicos, suas principais vantagens são a elevada seletividade, pouca incidência na formação de produtos secundários e estando imobilizados possibilitam sua reutilização sem auxílio de tratamentos químicos ou purificação como os catalisadores convencionais, porém o alto custo de produção e a manutenção da estabilidade estrutural do catalisador durante uma reação química limitam a utilização destes biocatalisadores. Dessa forma, a imobilização é uma alternativa para minimizar estes inconvenientes (DATTA et al., 2013, VILLENEUVE, 2007).

Enzimas imobilizadas apresentam uma série de vantagens se comparadas ao uso de enzimas em sua forma livre, como: (a) permitem a reutilização do biocatalizador; (b) agregam facilidade na separação e purificação dos produtos reacionais; (c) enzimas imobilizadas possuem maior estabilidade frente a variações de temperatura e pH, (d) são economicamente mais viáveis devido ausência da necessidade de purificar o produto reacional; (e) possibilitam um melhor controle das reações químicas e suas variáveis, podendo resultar em um aumento do rendimento reacional quando comparadas as enzimas em sua forma livre. Para essa finalidade, diferentes materiais, inorgânicos e orgânicos, têm sido estudados no intuito de manter ou melhorar a eficiência catalítica destes biocatalisadores além de possibilitar a reutilização. (BILAL et al., 2018; HU et al., 2018; ANSARI; HUSAIN, 2012, GUPTA, BHATTACHARYA, MURTHY, 2013).

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi imobilizar lipases de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02 em diferentes suportes por adsorção.

MATERIAIS E MÉTODOS

As lipases de *Burkholderia lata* LBBIO-BL02, utilizadas no trabalho, foram isoladas no Laboratório de Bioquímica e Bioprocessos (LBBIO) do Departamento de Ciências Biológicas da UNESP – Campus de Assis. A produção de lipases, por fermentação submersa, foi realizada pela professora Dra Valéria Marta Gomes do Nascimento e gentilmente cedida para o grupo Biopase (UTFPR-AP) para estudos de biocatálise.

Em estudos anteriores, as lipases de *B. lata* LBBIO-BL02 apresentaram características desejáveis para a imobilização e aplicação de enzimas em biocatálise. Apresentaram atividade máxima na temperatura de 55°C e se mantiveram relativamente estáveis a 60°C, mantendo 60% de sua atividade inicial após 1h, mantiveram 100% de sua atividade inicial quando em tolueno, n-hexano e n-heptano (1h, 25°C) temperatura para máxima atividade de catálise. Quando incubada em solventes como metanol, etanol e isopropanol em uma razão 50% (v/v), as enzimas apresentaram 78%, 76% e 90% de estabilidade respectivamente (1h, 25°C).

Quanto a estabilidade das enzimas frente a variações de pH, foram estáveis para variações de pH na faixa de 4 a 9, mantendo 100% de sua atividade inicial (1 h, 25°C) (OLIVEIRA, 2017). Além disso, as enzimas foram imobilizadas, até o momento, somente em Celite (OLIVEIRA, 2017), o que justificaria a continuidade dos estudos relacionados à utilização de novos suportes para imobilização das lipases de *B. lata* LBBIO-BL02.

O processo de imobilização utilizado foi o de adsorção interfacial e os materiais utilizados estão descritos no quadro 1.

Quadro 1- Suportes utilizados na imobilização de lipases.

Suportes	Características
a) Óxido magnético de Cobalto CoO.Co ₂ O ₃ .	Material não poroso com propriedades magnéticas.
b) Estrutura metalorgânica (MOF);	Estrutura metalorgânica formada por clusters de íons Fe(III) e moléculas de ácido tereftálico, material microporoso com área específica aproximadamente de 500 m ² /g.
c) Sílica mesoporosa expandida (SMPE);	Sílica mesoporosa com área específica de aproximadamente 320 m ² /g.
d) Polímero produzido por eletro-fiação a base de Quitosana (QE).	Polímero natural, não poroso e hidrofóbico.

Fonte: Autoria própria (2019).

Os suportes (50 mg) foram lavados com 1 mL de tampão fosfato pH 7, 0,05 mol L⁻¹, centrifugados (300 rpm, 5 min) e o sobrenadante separado para verificação do pH.

Para a imobilização, 50 mg do suporte e 10 mL de solução enzimática (3 mg de proteína/0,1 g de suporte), foram colocados em um erlenmeyer (25 mL) e agitados a 100 rpm (25°C) por 6 h. O suporte foi separado por centrifugação (300 rpm, 5 min), lavado com 2 mL de tampão (pH 7, 0,05 mol L⁻¹), seco em dessecador a vácuo por 12 h e armazenado a 4°C. O sobrenadante foi recolhido para dosagem de proteína e atividade lipolítica residual.

Os estudos sobre o processo de imobilização: eficiência de imobilização (E) e Retenção de atividade (R) foram realizados através das equações 1 e 2 respectivamente (YADAV; JADHAV; 2005; BON et al., 1986):

$$E = \frac{(At_i - At_f) \cdot 100}{At_i} \quad (1)$$

$$R = \frac{A_o \cdot 100}{A_T} \quad (2)$$

Sendo: At_i: Atividade inicial frente ao pNPP, anteriormente a imobilização (U); At_f: atividade final total de hidrólise frente ao pNPP no sobrenadante após a imobilização (U); A_o: atividade observada da enzima imobilizada (U g⁻¹ do suporte); A_T: atividade teórica da enzima imobilizada (U g⁻¹ do suporte); U: unidades totais de atividade (μmols do produto min⁻¹).

Para calcular a eficiência de imobilização (E), foi considerado a atividade inicial e final do sobrenadante frente à reação de hidrólise do Palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) em meio aquoso (WINKLER; STUCKMANN, 1979). O meio reacional é formado por 0,5 mL de solução A (3 mg de palmitato de *p*-nitrofenila mL⁻¹ de isopropanol), 4,5 mL da solução B (2 g de Triton X-100; 0,5 g de goma arábica, em 450 mL de tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹ pH 7,0). Desta solução, foram colocados 0,9 mL em uma cubeta. Estabilizada na temperatura a 40°C, adicionou-se 0,1 mL da solução enzimática ou de tampão (branco). A cinética da reação foi acompanhada pela leitura das absorvâncias a 410 nm a cada 40 s durante 5 min. As reações foram feitas em triplicata.

Para o cálculo da retenção de atividade (R), reações de hidrólise do palmitato de *p*-nitrofenila foram realizadas a pH 7,0 e na temperatura de 40 °C, em banho termostaticado, sob agitação manual em erlenmeyers de 25 mL contendo 5 mL de meio reacional (A+B) e iniciada com a adição de 1 mg de enzima imobilizada. A cinética das reações foi seguida em diferentes intervalos de tempo (1 a 5 min) transferindo-se alíquotas de 1 mL para uma cubeta e simultânea leitura das absorvâncias a 410 nm. As reações foram feitas em triplicata.

Durante o procedimento de imobilização a dosagem de proteínas foi acompanhada de acordo com o método de Bradford (1976) que utiliza como solução padrão a proteína de soro albumina bovina (BSA) para a curva de calibração (20 – 100 µg mL⁻¹).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O método de imobilização por adsorção, selecionado neste trabalho, é o mais utilizado, devido a sua simplicidade e por ser economicamente mais vantajoso frente aos outros métodos, consiste na adsorção da enzima em um suporte inerte por atrações eletrostáticas ou hidrofóbicas como forças de van der Waals, ligações de hidrogênio e dipolo-dipolo. A eficiência deste método está relacionada diretamente com fatores como o tamanho da enzima, área superficial do adsorvente, porosidade, tamanho do poro, temperatura e pH da solução enzimática (SECUNDO et al., 2008; KNEZEVIC et al., 2002).

Na avaliação dos materiais disponíveis como suporte para imobilização de lipases, foram efetuados alguns estudos para avaliar a eficiência da imobilização e a retenção da atividade enzimática em meio aquoso na imobilização da lipase de *B. lata* (método da hidrólise do *p*NPP) (Tabela 1). Estes parâmetros são importantes, pois indicam a quantidade de enzima que foi adsorvida nos suportes e quanto da enzima está ativa depois do procedimento de imobilização.

A capacidade de adsorção de proteínas (E de 90%) foi maior quando a enzima foi imobilizada no MOF, seguido da SMPE (73%) e CoO.Co₂O₃ (68%).

Tabela 1 – Eficiência da imobilização e Retenção da atividade em meio aquoso da lipase de *Burkholderia lata* imobilizada em diferentes suportes.

Suporte	E (%) ^a	A _T (U.mg ⁻¹)	A ₀ (U.mg ⁻¹)	R (%) ^b
CoO.Co ₂ O ₃	68	0,7	-	-
MOF	90	0,9	3,6	400
SMPE	73	0,7	1,2	170
QE	-	-	-	-

a) Eficiência (%) – calculada por diferença entre a atividade inicial do extrato bruto e a atividade final do sobrenadante após a imobilização. Ensaios realizados em duplicata.

b) Retenção - atividade real da enzima imobilizada/atividade teórica da enzima imobilizada. Atividade de ambas calculada pelo método do pNPP aquoso. Ensaios realizados em duplicata. Fonte: Autoria própria.

Entretanto, o fato de haver alguma eficiência na imobilização, não garante que a enzima está ativa no suporte, pois este parâmetro apenas mostra o desaparecimento da atividade no sobrenadante após a imobilização, por isso, a comparação da eficiência de imobilização com outros trabalhos deve ser evitada. Para analisar se a enzima estava ativa após a imobilização, foram feitos os ensaios de atividade da enzima imobilizada (A₀), utilizando-se o método da hidrólise do pNPP em meio aquoso.

A retenção da atividade (R= atividade real da enzima imobilizada/atividade teórica da enzima imobilizada) foi maior que 100% para o MOF e SMPE. Este parâmetro indica quanto da enzima está ativa no suporte após o processo de imobilização em comparação com a enzima livre. Os valores de retenção são dependentes da imobilização, do suporte e do meio reacional. Retenções distintas de 100% indicam que houve modificações estruturais na enzima favoráveis ou não à catálise, após a imobilização. No caso deste trabalho, os valores de retenção indicaram que durante a imobilização, a enzima sofreu ativação interfacial, ou seja, as mudanças conformacionais da enzima foram favoráveis à catálise.

CONCLUSÃO

Foi possível realizar a imobilização de lipases de *B. lata* utilizando o método de adsorção física ou interfacial. A manutenção da atividade enzimática ocorreu em 2 dos 4 suportes estudados, sendo eles: MOF (400%) e SMPE (170%). Os materiais além possibilitarem a imobilização contribuíram para um ganho de atividade enzimática por exposição do sítio ativo da enzima.

Quanto a eficiência de imobilização 3 dos 4 materiais mostraram capacidade de adsorver a enzima, porém, apesar do CoO.Co₂O₃. apresentar eficiência de imobilização de 68%, o cálculo de retenção de atividade indicou que as enzimas ativas anteriormente a imobilização de alguma forma perderam grande parte de sua atividade inicial.

REFERÊNCIAS

ABREU, L. **Influência de diferentes estratégias de cultivo na produção de lipases por *staphylococcus warneri* EX17 e propriedades desta enzima após imobilização em suportes hidrofóbicos.** Dissertação de mestrado em microbiologia Agrícola e do ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013. Disponível em: <<https://lume.ufrgs.br/handle/10183/77070>>. Acesso em: 06 Jul. 2019.

AL-DURI, B.; YONG, Y. P. Lipase Immobilization: an equilibrium study on lipases immobilized on hydrophobic supports. **Bioscience Biotechnol. Biochem.**, v. 69, p. 833-835, 2005. Disponível em: Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X99000509>>. Acesso em: 06 Jul. 2019.

ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. **Biotechnology advances.** V. 30, p. 512-532, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975011001583>>. Acesso em: 5 Jul. 2019.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v 72, p. 54-248, 1976. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975011001583>>. Acesso em: 06 Jul. 2019.

KNEZEVIC, Z.; BOBIC, S.; MILUTINOVIC, A.; OBRADOVIC, B.; MOJOVIC, L.; BURGARSKI, B. Alginate-immobilized lipase by electrostatic extrusion for the purpose of palm oil hydrolysis in lecithin/isooctane system. **Process Biochem.**, V. 38, p. 313-318, 2002. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959202000857>>. Acesso em: 05 Jul. 2019.

OLIVEIRA, H. B. **Produção e Purificação da Lipase de Burkholderia Lata LBIBLO2, sua caracterização Cinética e Aplicação em Reações de Biocatálise de Interesse Farmacológico e Industrial.** Tese de Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2017. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/150568>>. Acesso em: 07 Jul. 2019.

WINKLER, U.K.; STUCKMANN, M. Glycogen, Hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **J. Bacteriol.**, v. 138, p. 663-670, 1979. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/222724>>. Acesso em: 07 Jul. 2019.