

EFEITO DO PH NO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE THERMOMYCES LANUGINOSUS EM HA:FE₃O₄

Hanna Gomes Tavares¹, Julianna dos Santos Viana¹, João Otávio D. Malafatti², Elaine Cristina Paris³, Ana Iraidy Santa Brígida⁴

¹Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, ²Universidade Federal de São Carlos,

³Embrapa Instrumentação, elaine.paris@embrapa.br, ⁴Embrapa Agroindústria de Alimentos, ana.iraiddy@embrapa.br

Classificação: Processos de imobilização de biomoléculas e funcionalização em nanopartículas

Resumo

Partículas nanoestruturadas, em especial a base de óxido de ferro, recentemente, tem sido bastante aplicadas na imobilização de lipases. No presente trabalho, avaliou-se a influência do pH de imobilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus* em suportes nanoestruturados de hidroxiapatita e óxido de ferro. Para tanto, tampão fosfato e citrato fosfato foram utilizados para preparar solução de LTL em valores distintos de pH. A imobilização ocorreu por adsorção, em sistema agitado de banho-finito, por 5h. Atividade da enzima livre e imobilizada foi determinada utilizando p-nitrofenil laurato como substrato. E rendimento e eficiência de imobilização foram calculados. O processo de imobilização mostrou-se dependente do pH, indicando a influência de forças eletrostáticas. O pH de imobilização mais adequado para adsorver lipase de *T. lanuginosus* em suporte nanoestruturado de hidroxiapatita e magnetita, nas condições de estudo, foi pH 5, por apresentar maior atividade hidrolítica (543±52 U/g de suporte) e atividade específica (343,8 U/mg de proteína) no derivado com 13,7% de eficiência.

Palavras-chave: Adsorção; Enzima; Magnetita; Hidroxiapatita; Suporte nanoestruturado

EFFECT OF PH ON THE IMMOBILIZATION OF LIPASE FROM THERMOMYCES LANUGINOSUS ON HA:FE₃O₄

Abstract

Nanostructured particles, especially based on iron oxide, have recently been widely applied in the immobilization of lipases. In the present work, the influence of pH on the immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on nano-structured supports of hydroxyapatite and iron oxide was evaluated. For this purpose, phosphate buffer and citrate phosphate were used to prepare LTL solution at different pH values. The immobilization occurred by adsorption, in a stirred bath-finite system, for 5h. Activity of the free and immobilized enzyme was determined using p-nitrophenyl laurate as substrate. And immobilization efficiency and yield were calculated. The immobilization process was pH-dependent, indicating the influence of electrostatic forces. The best immobilization pH to adsorb lipase from *T. lanuginosus* on nanostructured hydroxyapatite and magnetite under studied conditions was pH 5, due to the higher hydrolytic activity (543 ± 52 U / g of support) and specific activity (343.8 U/mg protein) for immobilized enzyme with 13.7% of efficiency.

Keywords: Adsorption; Enzyme; Magnetite; Hydroxyapatite; Nanostructured support

1 INTRODUÇÃO

A estabilização de enzimas é um fator crucial para tornar o biocatalisador aplicável industrialmente. Para tanto, investimento em pesquisas visando melhor método de estabilizar uma enzima em potencial é realizado. As rotas vão desde determinar uma formulação estabilizadora adequada para um dado extrato, ao uso de engenharia de proteínas, passando, também pela estratégia de imobilização. A imobilização possibilita o reuso da enzima, como também, pode melhorar a estabilidade e a atividade, elevar o grau de pureza do produto de interesse, além da possibilidade do desenvolvimento de processos contínuos, aumentando a produtividade e reduzindo os custos de produção (FERNANDES-LAFUENTE, 2010).

A enzima pode ser imobilizada em diversos suportes de forma a melhorar a sua estabilidade e manter o seu poder catalítico. Dentre os suportes para imobilização conhecidos, um que tem ganhado bastante destaque nos últimos anos são as nanopartículas magnéticas. Partículas nanoestruturadas, em especial a base de óxido de ferro, vem sendo aplicadas na imobilização de enzimas com resultados impactantes como alta estabilidade operacional (GHASEMI et al., 2014; SARNO et al., 2017; WANG et al., 2015). Wang et al. (2015), por exemplo, imobilizaram lipase de *Thermomyces lanuginosus* em suporte nanoestruturado de óxido de ferro com quitosana. O rendimento de imobilização máximo foi de 85% e, após definir condições otimizadas de imobilização, produziram um derivado capaz de reter 70% da atividade inicial após 10 ciclos reacionais.

As lipases estão entre as enzimas mais utilizadas na biocatálise devido ao seu baixo custo frente a outras enzimas, à sua grande disponibilidade, à sua ampla especificidade acoplada em certos casos, e a uma alta seletividade enantiométrica presente em algumas lipases (FERNANDES-LAFUENTE, 2010). Neste contexto, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a influência do pH de imobilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus* em suportes nanoestruturados de hidroxiapatita e óxido de ferro.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Extrato comercial de lipase de *Thermomyces lanuginosus* (lipolase®) foi doado pela Novozymes. Reagentes como p-nitro fenil laurato, albumina de soro bovino e dimetilsulfóxido foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co. Outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2 Síntese do suporte magnético nanoestruturado

Em água deionizada sob fluxo de N₂ foram adicionados FeCl₂.4H₂O e FeCl₃.6H₂O em quantidades estequiométricas, sendo o sistema mantido em agitação até a solução ficar homogênea. A seguir, gotejou-se uma solução 32% de NH₄OH até pH 14. Então, à suspensão resultante foi adicionada solução 0,1 M de ácido cítrico e a temperatura foi mantida em 90°C por 1,5 h. O precipitado obtido foi lavado até pH neutro. A seguir, o precipitado foi redisperso em água deionizada sob fluxo de N₂. A esta suspensão foram adicionados nitrato de cálcio tetra hidratado e fosfato de amônio em quantidades estequiométricas sob agitação. As concentrações dos reagentes foram dependentes das relações em massa de hidroxiapatita:magnetita (HA:Fe₃O₄), sendo iguais a 1:1. O sistema reacional foi mantido em pH 11 pela adição de NH₄OH e a suspensão foi aquecida a 90°C por 2 h. O precipitado resultante (suporte magnético nanoestruturado) foi centrifugado, lavado até pH neutro e seco em estufa.

2.3 Método de imobilização

A enzima comercial foi diluída na proporção volumétrica de 1:50 em tampão. O processo de imobilização ocorreu usando a técnica do banho finito, sob agitação, a 25°C, em agitador rotatório. A proporção de suporte para solução enzimática foi de 3,5 mg de nanopartícula para 1 ml de solução. O pH do meio foi variado utilizando tampão fosfato de sódio 10mM no pH 8, em tampão citrato-fosfato 10mM na faixa de pH de 4 a 7. Após 5 h de imobilização, o derivado foi separado do sobrenadante final fazendo uso de um ímã, sendo as amostras de sobrenadante e derivado reservadas análises posteriores (medida de atividade e determinação do teor de proteína). As enzimas imobilizadas foram lavadas três vezes com tampão fosfato de sódio 50 mM antes da determinação da atividade. Os parâmetros de imobilização Proteína adsorvida, Atividade recuperada e Eficiência de imobilização foram calculados conforme Equações 1, 2 e 3, respectivamente:

$$\text{Prot. Ads.} = \frac{[C_{Pi}] - [C_{Pf}]}{[M_S]} \cdot V_E \quad (1)$$

onde C_{Pi} é concentração de proteína no sobrenadante inicial (mg/ml), C_{Pf} é concentração de proteína no sobrenadante final (mg/ml), V_E é o volume total de solução enzimática (ml) e M_S é a massa de suporte (g).

$$\text{Ativ. Rec.} = \frac{[A_{EI}] - [A_{ESF}]}{[A_{EO}]} \cdot 100 \quad (2)$$

onde A_{EI} é a atividade da enzima imobilizada (U), A_{EO} é a atividade total de enzima oferecida (U) e A_{ESF} é atividade da enzima no sobrenadante final (U).

$$\text{Eficiência} = \frac{[\text{CPi}] - [\text{CPf}]}{[\text{CPi}]} \cdot 100 \quad (3)$$

onde CPi é concentração de proteína no sobrenadante inicial (mg/ml) e CPf é concentração de proteína no sobrenadante final (mg/ml).

2.4 Medida de atividade e Determinação do teor de proteína adsorvida

O p-nitro fenil laurato (560 μM) foi utilizado como substrato padrão neste trabalho. A reação de hidrólise ocorreu à temperatura ambiente e foi acompanhada pela formação de p-nitro fenol em espectrofotômetro a 410nm (λ). Ao sistema reacional, adicionou-se 100 μl de solução de enzima ou de suspensão do derivado em tampão de fosfato de sódio 50mM pH 7. Para esta metodologia, uma unidade (U) de atividade enzimática hidrolítica foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de p-nitrofenol por minuto nas condições propostas. Com base nos valores de atividade obtidos, a atividade recuperada foi calculada.

A determinação do teor de proteína seguiu a metodologia de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino como padrão. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595nm. Com base nos valores obtidos, o teor de proteína imobilizada e a eficiência de imobilização foram calculados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito do pH do meio durante a adsorção de lipase em nanopartículas foi avaliado para a adsorção de lipase de *T. lanuginosus* em suporte nanoestruturado de hidroxiapatita e magnetita (Figura 1). Maior atividade no derivado (543 \pm 52 U/g de suporte) foi observada em pH 5. Quanto ao teor de proteína adsorvida e à eficiência de imobilização, estes foram maiores para pH 4 (2,88 mg/g e 26%, respectivamente), apresentando um perfil decrescente com o aumento do pH. Experimentos anteriores mostraram que o ponto isoelétrico do suporte utilizado é próximo a 2,5. E, como o ponto isoelétrico desta lipase é 4,4 (WANG et al., 2015), observa-se maior adsorção de proteína em pH 4, onde suporte e enzima encontram-se com cargas opostas. A condição de maior adsorção, promovida pelas forças eletrostáticas, não implica necessariamente em maior atividade no derivado nem maior atividade recuperada, como pôde ser observado na Figura 1. O efeito do pH de imobilização também foi investigado para a adsorção de lipase de *T. lanuginosus* em suporte de Fe₃O₄/quitosana utilizando tampão citrato no preparo das soluções enzimáticas (WANG et al., 2015). Maior quantidade de proteína imobilizada e atividade do imobilizado foram obtidas a pH 5. Comparando com o presente trabalho, apesar da proximidade dos valores de pH ótimo de imobilização, o percentual de proteína imobilizada foram bem diferentes. Utilizando uma relação enzima: suporte de 13 mg/g, Wang et al (2015) promoveu a imobilização de 90% da enzima oferecida, valor bem alto frente ao obtido neste trabalho (26%), onde aplicou-se 11 mg de enzima para 1 g de suporte. Alta eficiência de imobilização também foi observada por Ghasemi et al. (2014), em estudos de imobilização de lipase de *T. lanuginosus* por ligação covalente em suporte de Fe₃O₄/ZnO, onde 94% das proteínas oferecidas foram imobilizadas e 86% da atividade de lipase oferecida foi expressa no derivado.

Quanto à atividade recuperada, que faz referência ao percentual de atividade imobilizada expressa e a atividade teoricamente imobilizada, esta apresentou valores muito baixos indicando que, independente do pH, a maioria das lipases imobilizadas perderam sua atividade. Em qualquer das condições estudadas, não houve superativação das lipase, ao contrário do observado por Sarno et al. (2017) que ao imobilizar em pH 7 lipase de *T. lanuginosus* em nanopartículas de Fe₃O₄ funcionalizadas com ácido cítrico apresentou, no derivado, 144% da atividade de lipase oferecida. Maior eficiência na imobilização de proteínas foi observada em pH 7 e pH 4.

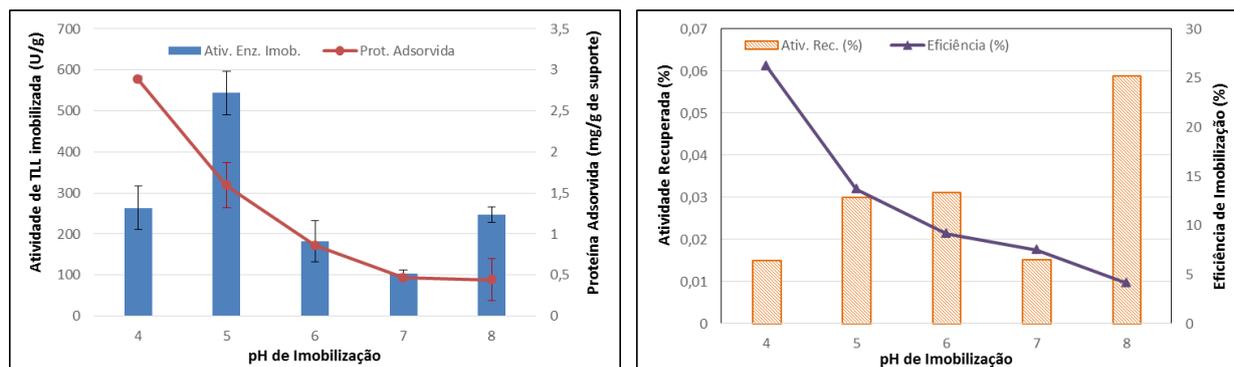


Figura 1. Influência do pH na imobilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus* em suporte nanoestruturado de HA:Fe₃O₄ avaliando: (a) Atividade do imobilizado e Proteína Adsorvida; e (b) Atividade Recuperada e Eficiência de Imobilização.

4 CONCLUSÃO

Com base nos valores de atividade do imobilizado, proteína adsorvida, eficiência de imobilização e atividade recuperada pode-se concluir que, além das forças de Van der Waals, encontram-se presentes as forças eletrostáticas atuando neste processo de imobilização. E o pH de imobilização mais adequado para adsorver lipase de *T. lanuginosus* em suporte nanoestruturado de hidroxiapatita e magnetita, nas condições de estudo, foi pH 5, por apresentar maior atividade hidrolítica (543±52 U/g de suporte) e atividade específica (343,8 U/mg de proteína) no derivado com 13,7% de eficiência de imobilização das proteínas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Embrapa pelo auxílio financeiro e ao CNPq pela bolsa de iniciação científica concedida à Hanna Gomes Tavares.

REFERÊNCIAS

- 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. 248-254, 1976.
- FERNANDES-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v. 62, p. 197-212, 2010.
- GHASEMI, S. et al. Immobilization of lipase on Fe₃O₄/ZnO core/shell magnetic nanoparticles and catalysis of Michael-type addition to chalcone derivatives. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. v. 100, p. 121-128, 2014.
- SARNO, M. et al. High activity and selectivity immobilized lipase on Fe₃O₄ nanoparticles for banana flavour synthesis. *Process Biochemistry*. v. 56, p. 98-108, 2017.
- WANG, X.-Y. et al. Preparation Fe₃O₄@chitosan magnetic particles for covalent immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *International Journal of Biological Macromolecules*. v. 75, p. 44-50, 2015.