

ESTABILIZAÇÃO DA FORMA ABERTA DE LECITASE ATRAVÉS DA MODIFICAÇÃO FÍSICA COM POLÍMEROS IÔNICOS

J.C.S. DOS SANTOS^{1,2}, C.GARCIA-GALÁN¹, R. C. RODRIGUES³, H. B. SANT'ANA², L. R. B. GONÇALVES², ROBERTO FERNÁNDEZ-LAFUENTE¹

¹Universidad Autónoma de Madrid. Instituto de Catálisis y Petroleoquímica-CSIC.

²Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química.

³Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos.
E-mail para contato: jsleiton@gmail.com

RESUMO – Lecitase Ultra é uma fosfolipase A1, uma enzima que foi imobilizada covalentemente em brometo de cianogênio-agarose (CNBr), mantendo 70% da atividade inicial. A atividade da enzima imobilizada, Lecitase-CNBr, na presença de detergentes, tais como Triton X-100, dodecil sulfato de sódio (SDS), cetiltrimetil brometo de amônio (CTAB) foi melhorada em cerca de até 800% quando utilizado CTAB. No entanto, CTAB e Triton-X100 apresentaram um efeito negativo sobre a estabilidade da enzima, mesmo quando foram usados em baixas concentrações (0,01% (v/v)), e nem o detergente SDS pode ser usado por longos períodos na concentração de 1%. O revestimento da enzima imobilizada com polietilenimina (PEI), em tampão aquoso, produziu um aumento de 3 vezes na atividade da enzima. No entanto, na presença de SDS, a 0,1% (v/v), este revestimento produziu um aumento de 50 vezes na atividade da enzima. Usando PEI e 0,01% (v/v) de CTAB, a atividade Lecitase diminuiu em 10%.

1. INTRODUÇÃO

O melhoramento da atividade enzimática é um dos principais focos no desenvolvimento de novos biocatalisadores. Este aumento de atividade é conseguido pela modificação da enzima utilizando diversas ferramentas, tais como: mutagênese dirigida, evolução dirigida, modificação química, dentre outros (SANTOS *et al.* 2014b).

O revestimento de enzimas em fase sólida com polímeros iônicos é um método bastante simples e rápido para o melhoramento da atividade de enzimas, como temos referencia nos trabalhos de Garcia-Galan *et al.* (2014) e Santos *et al.* (2014 a,b).

Lecitase Ultra é uma fosfolipase A1 artificial. Uma enzima que tem sido obtida a partir da fusão dos genes da lipase de *Thermomyces lanuginosus*, como forma de obter uma boa estabilidade, e a fosfolipase de *Fusarium oxysporum*, objetivando uma atividade de fosfolipase.

Em alguns aspectos, Lecitase Ultra comporta-se como uma enzima lipase padrão, apresentando uma capacidade de se tornar adsorvida em superfícies hidrofóbicas em baixa força iônica, segundo De Maria *et al.* (2007) e Fernandez-Lorente *et al.* (2007). Assim, no presente trabalho, buscamos obter a

estabilização da conformação aberta de Lecitase, através da modificação física, com polímeros iônicos, após ativação com detergentes.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A Lecitase foi doada da *Novozymes* (Espanha) (16 mg de proteína / mL ter um pNPB atividade de 5,6 U / mg de proteína). O Brometo de cianogênio reticulado 4% agarose (CNBr) da *GE Healthcare* (Pollards Wood, UK). A Polietilenimina (ramificada, Mn 10000, Mw 25000 Da), o sulfato de dextrano (DS, média Mw, 9000 - 20000 Da), o butirato de p-nitrofenilo (pNPB), o Triton X-100, dodecil sulfato de sódio (SDS), o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e o éter p-nitrofenilfosfato (D-pNPP) da *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO, EUA).

2.1. Determinação da atividade da enzima

Este ensaio foi realizado através da medição do aumento da absorbância, a 348 nm, produzido pela liberação de p-nitrofenol na hidrólise de 0,4 mM de p-nitrophenylbutyrate (p-NPB), em fosfato de sódio 100 mM, a pH 7,0 e 25 °C (sob estas ϵ condições é $5150 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Uma unidade internacional de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μmol de p-NPB por minuto, sob as condições descritas anteriormente. A concentração de proteína foi determinada utilizando o método de Bradford (1976), e a de albumina de soro bovino foi utilizada como referência.

2.2. Imobilização de Lecitase em CNBr -agarose

Um volume de 2,8 ml de Lecitase comercial foi diluída em 67,5 mL de fosfato de sódio 5 mM, contendo 0,05% (m/v) de dodecil sulfato de sódio, a pH 7 e 4 °C. Em seguida, foi adicionado 15 g de CNBr e a atividade de sobrenadante e suspensão foram seguidas usando p-NPB. A imobilização da enzima foi determinada por incubação do suporte com etanonamina 1M, a pH 8, durante 12 h. Ao final, a preparação imobilizada foi lavada com água destilada abundante.

2.3. Revestimento de Lecitase imobilizada com polímero iônico

O protocolo foi seguido para o revestimento de Lecitase imobilizada por polímeros iônicos, como demonstrado nos trabalhos de Santos *et al.* (2014 a). Foram adicionadas 10 g de Lecitase imobilizadas a 100 ml de PEI, a um pH de 7 ou DS a pH 5 (1mg/mL). Em alguns casos, a concentração de detergente foi adicionada 2 minutos antes de adicionar o polímero, mantendo-se esta mistura sob agitação suave, durante um período máximo de 24 horas. A atividade durante a incubação foi seguida pelo protocolo de atividade de p-NPB como descrito acima.

2.4. A análise do efeito dos detergentes sobre a estabilidade dos derivados de CNBr-Lecitase

Para verificar a estabilidade dos derivados de enzima na presença de detergentes, 1 g de enzima imobilizada foi suspenso em 5 mL de 10 mM de fosfato de sódio, a pH 7 a 25 °C. Periodicamente, foram retiradas amostras, e a atividade foi medida usando p-NPB. Uma suspensão de CNBr Lecitase, na ausência de detergente, foi usada como referencia. Foi considerado 100% do valor da atividade obtida, usando a suspensão de referência, e adicionando à mistura de reação a quantidade equivalente de detergente em cada amostra (para discriminar/ os efeitos inibitórios de ativação do detergente problema nas presentes suspensões).

3. RESULTADOS

3.1. Efeito dos detergentes sobre a atividade enzimática

Três detergentes com características diferentes foram utilizados para verificar o efeito na atividade enzimática, são eles: CTAB, um surfactante catiônico; SDS, um agente tensoativo aniônico; e Triton X-100, um surfactante não iônico. A **Figura 1** nos mostra os efeitos sobre a atividade enzimática de cada detergente. No intervalo de concentrações estudadas, a preparação CNBr-Lecitase foi hiperativada na maioria dos casos. A maior hiperativação foi detectada quando utilizado CTAB (em quase 8 vezes), além disso, foi observado que o efeito aumentou junto com o aumento da concentração de detergente. Usando SDS, em baixas concentrações, foi obtido um efeito positivo sobre a atividade enzimática, ocorrendo assim um o aumento da atividade por duas vezes, quando foi utilizada uma concentração de 0,01% desse detergente. No entanto, a 0,1% de SDS, a atividade foi menor do que na ausência de SDS. Com Triton X-100, utilizando baixas concentrações, percebeu-se um pequeno efeito sobre a atividade da enzima. Contudo quando foi usada uma concentração de 0,1 % desse detergente, a atividade foi quase três vezes maior do que a atividade do derivado controle.

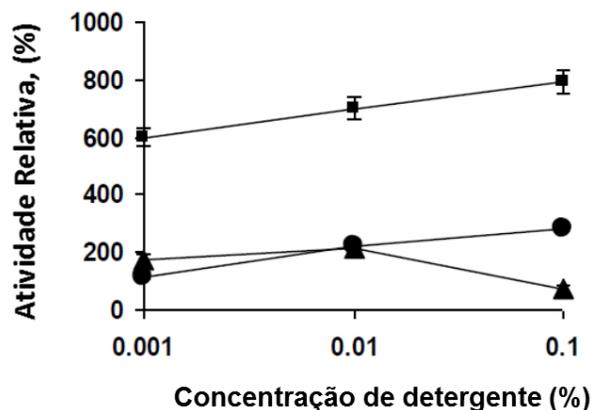


Figura 1 - Efeito dos detergentes na atividade da Lecitase imobilizada. Atividade foi determinada utilizando pNPB como indicado na seção de métodos.
Triângulos: SDS, quadrados: CTAB, Círculos: Triton X-100.

Além disso, a preparação enzimática foi incubada na presença destes detergentes, objetivando verificar o seu efeito sobre a estabilidade da enzima (Tabela 1). Utilizando 0,1% de SDS, a atividade enzimática observada, depois de 24 h, foi de quase 100%, enquanto que, com 0,1 % de Triton X-100, a atividade diminuiu lentamente, com CTAB, a atividade diminuiu rapidamente. A atividade recuperada, após 24 horas, foi de 80% utilizando Triton X-100, e 10% usando CTAB. A atividade recuperada assim foi maior quando foi utilizada uma concentração de 0,01%, para ambos os detergentes.

Tabela 1- Efeito da presença de detergentes na atividade de CNBr-Lecitase. CNBr-Lecitase foi incubado a pH 7 e 25°C em 25mM de fosfato de sódio, com concentração indicada de detergente, durante 24 h. Em seguida, as preparações foram lavadas e a atividade do biocatalisador foi medida utilizando pNPB (ver métodos).

* 100 é a atividade inicial do biocatalisador.

Detergente	Concentração (%), (v/v)	Atividade recuperada(%)*
Ausente	-	100
Triton X-100	0.1	60±3
Triton X-100	0.01	80±3
SDS 0.1	0.1	100±5
SDS 0.01	0.01	100±4
CTAB	0.1	>10
CTAB	0.01	60±2

Embora, os três detergentes apresentassem efeitos positivos sobre a atividade da enzima, a presença destes na solução tinha efeito negativo sobre a estabilidade da enzima; o efeito foi mais significativo, fora com o detergente mais hiperativante (CTAB). Usando SDS, foi observado um maior efeito de hiperativação, quando utilizado uma concentração máxima, de até 0,1%, desse detergente. No entanto, a concentração máxima que pode ser utilizada, por um período de tempo prolongado, fora de 0,01%. Os efeitos positivos dos detergentes sobre a atividade da lipase é o mais provável, pelo menos parcialmente, devido à estabilização da conformação aberta da enzima, embora algumas outras alterações positivas na estrutura da enzima não possam ser desconsideradas. Os efeitos negativos poderiam incidir devido a uma distorção da estrutura da enzima, ou da inibição da atividade enzimática.

3.2. Efeito da incubação da enzima imobilizada na presença de polímeros e detergentes.

A preparação CNBr-Lecitase foi incubada, em diferentes concentrações de detergentes, seguida pela adição de DS ou PEI para estabilizar a enzima modificada. A **Figura 2** mostra a incubação da enzima imobilizada com diferentes concentrações de SDS.

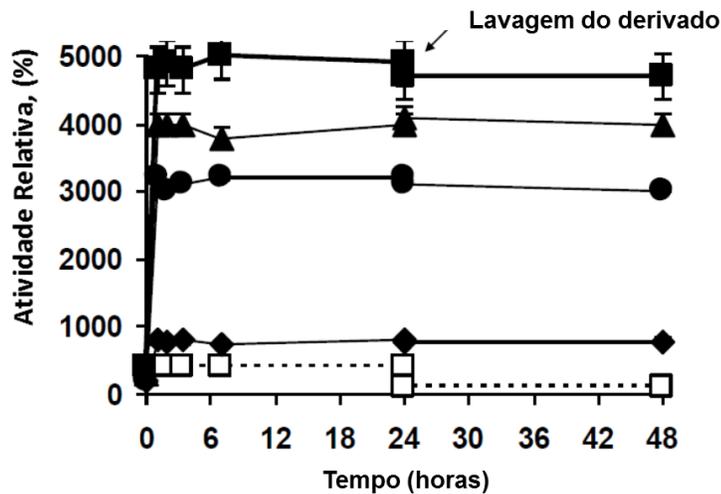


Figura 2. Efeito da concentração de SDS e do tempo de incubação sobre a atividade de Lecitase imobilizada na presença ou ausência de PEI. Os experimentos foram realizados como descrito na seção de Métodos. PEI foi adicionado após 10 minutos de incubação com o detergente. Linha tracejada, quadrados vazios: CNBr-Lecitase incubadas com 0,1% de SDS, losango: CNBr-Lecitase incubadas com 0,002% de SDS e PEI, círculos: CNBr-Lecitase incubadas com 0,01% SDS e PEI, Triângulos: CNBr Lecitase incubadas com 0,05% de SDS e PEI, Quadrados: CNBr Lecitase incubadas com 0,1% SDS e PEI.

Na ausência de polímero, a adição de surfactante aumenta a atividade da enzima cerca de 2 vezes, e a atividade manteve-se praticamente inalterada após 24h de incubação, com uma concentração máxima utilizada de SDS de 0,1%. Depois da lavagem da enzima numa solução tampão, a atividade inicial foi recuperada, perdendo a "hiperativação", causada pela presença de detergente.

Quando PEI é adicionado à suspensão de enzima, depois de vários minutos de incubação em SDS, a atividade aumentou fortemente, e este aumento na atividade é mais elevado se compararmos quando aumentamos a concentração de SDS, onde após 30 minutos, a atividade permaneceu inalterada durante 24 horas. Enquanto o revestimento da enzima imobilizada com PEI, na ausência de detergente, induziu um aumento de 3 vezes na atividade, de acordo com o trabalho de Santos *et al.* (2014 a), a presença de 0,1% de SDS antes da adição de PEI, melhorou a atividade enzimática em, aproximadamente, 45-50 vezes.

Depois de lavar com água as preparações enzimáticas tratadas com os polímeros, a atividade da enzima imobilizada, revestida com PEI, na presença de SDS, manteve-se similarmente a níveis de hiperativação, mesmo após um mês de incubação a 25°C, e a um pH de 7. Já o revestimento de CNBr-Lecitase com DS levou a um decréscimo de, aproximadamente, 50% da atividade inicial na presença ou ausência de qualquer concentração de SDS, mesmo depois de lavar os derivados para eliminação do detergente (Tabela 2).

Usando 0,01 % (v/v) de CTAB, na ausência de polímeros iônicos, a atividade diminuiu a 70%,

aproximadamente, após 24 h (Tabela 2). No entanto, foi observado que quando o PEI é adicionado à solução contendo CTAB, ocorre uma hiperativação inicial, semelhante à encontrada usando PEI na ausência de surfactantes (resultados não mostrados), mas, após 24h, a atividade foi menor que o CNBr-Lecitase sem polímeros. Posteriormente a lavagem, para eliminar o detergente, foi verificada uma diminuição da atividade em cerca de 10% (Tabela 2). Entretanto, ao usar DS, os resultados eram bem diferentes. Neste caso, o uso de 0,01% de CTAB causou uma hiperativação (150 %), verificada depois de lavar as preparações (Tabela 2).

Tabela 2 – Atividade recuperada dos derivados de CNBr- Lecitase incubados em polímeros e /ou detergentes. O revestimento da enzima é descrito na seção de métodos. Atividade foi determinada utilizando pNPB como o substrato. O polímero foi adicionado à suspensão depois de incubação com o detergente. A atividade é dada como atividade relativa (100 corresponde a enzima não modificada) após 24 h de incubação no detergente e/ou polímero, lavagem com água e incubação a 25°C em tampão durante mais 24 h.

Detergente	Concentração (%) (v/v)	Polímero	Atividade relativa
Ausente	-	Ausente	100±5
Ausente	-	PEI	300±10
Ausente	-	DS	50±2
SDS	0,1	Ausente	100±5
SDS	0,002	PEI	800±30
SDS	0,01	PEI	3,000±100
SDS	0,05	PEI	4,000±150
SDS	0,1	PEI	5,000±150
SDS	0,002	DS	50±3
SDS	0,01	DS	45±2
SDS	0,05	DS	55±2
SDS	0,1	DS	50±2
CTAB	0,01	Ausente	70±5
CTAB	0,01	PEI	10±0.2
CTAB	0,01	DS	150±5
Triton X-100	0,01	Ausente	85±5
Triton X-100	0,01	PEI	400±20
Triton X-100	0,01	DS	15±3

Usando 0,01 % (v/v) de Triton X - 100, na ausência de polímeros, a atividade diminuiu ligeiramente após 24 h (15-20 %) (Tabela 2). Na presença de PEI, a atividade do biocatalisador foi 4 vezes mais elevada, um pouco maior do que quando foi utilizado PEI na ausência de surfactante (Tabela 2). Ao utilizar DS depois de incubar com Triton X - 100, foi observada uma atividade final de cerca de 15% menor, do que quando usando DS na ausência de detergente (Tabela 2).

Mesmo levando em conta a natureza iônica dos polímeros e dos detergentes, é difícil encontrar padrões para explicar os resultados. O SDS tem efeitos positivos, principalmente, com PEI, enquanto que o CTAB (que tem um efeito negativo sobre a estabilidade da enzima) apresenta certo efeito positivo sobre a atividade da enzima utilizando DS, o que é surpreendente, porque o DS tinha um efeito negativo sobre a atividade enzimática, e seria de esperar que favorecesse a acumulação de CTAB no ambiente com enzima.

Aparentemente, muitos fatores estão a contribuir simultaneamente para o sistema e, portanto, uma explicação simples destes resultados não pode ser dada; os efeitos individuais do detergente e polímeros em estrutura global da enzima podem ser muito difíceis de explicar e prever, como o seu efeito conjunto pode ser quase impossível de interpretar. No entanto, em alguns casos, certa hiperativação importante foi identificada.

Assim, utilizando-se p-NPB como substrato, o efeito mais positivo sobre a atividade da enzima se deu utilizando SDS, seguido por revestimento de PEI, produzindo um derivado de CNBr-Lecitase, proposto cerca de 50 vezes mais ativo do que a preparação sem polímeros.

4. CONCLUSÃO

A atividade dos derivados de CNBr-Lecitase pode ser aumentada pela incubação com baixas concentrações de detergentes, assim a atividade final é resultante de vários fatores, desde a estabilização da forma aberta da lipase à inibição da enzima, e mesmo à distorção. No entanto, em adição, complicações no uso industrial, detergentes demonstram alguns efeitos deletérios em propriedades da Lecitase, afetando, principalmente, a sua estabilidade. A incubação das preparações em soluções de detergente, junto ao revestimento da enzima com polímeros iônicos, nos permitiu obter preparações hiperativadas. No entanto, foi necessário selecionar o polímero e o detergente apropriado para maximizar os efeitos positivos, e essa seleção deve ser baseada em estudo empírico, devido à complexidade do processo envolvido. Além disso, espera-se que esta estratégia possa ser útil, para obtenção de preparações de lipase hiperativada de outras preparações de enzimas imobilizadas covalentemente.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao apoio do Governo Espanhol e ao CNPq (Brasil), pelas bolsas de doutorado para Ms. García-Galán (Governo Espanhol) e o Sr. dos Santos (CNPq, Brasil). Os autores gostariam de agradecer ao Sr. Ramiro Martínez (*Novozymes*, Espanha) por gentilmente fornecer as enzimas usadas na pesquisa.

6. REFERÊNCIAS

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, v.72, p. 248–254, 1976.

DE MARIA, L.; VIND, J.; OXENBØLL, K.M.; SVENDSEN, A.; PATKAR, S.; Phospholipases and their industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v.74, p.290-300, 2007.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J.M.; CABRERA, Z.; GUISÁN, J.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports. *Enz. Microb. Technol.*, v. 41, p. 565–569, 2007.

GARCIA-GALANA, C.; SANTOS, J.C.S.; BARBOSA, O.; TORRES, R.; PEREIRA, E. B.; CORBERAN, V. C.; GONÇALVES, L.R.B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Tuning of Lecitase features via solid-phase chemical modification: Effect of the immobilization protocol. *Process. Biochem.*, v.49, p. 604–616, 2014.

^aSANTOS, J.C.S.; GARCIA-GALAN, C.; RODRIGUES, R.C.; SANTA'ANA, H.B.; GONÇALVES, L.R.B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improving the catalytic properties of immobilized Lecitase via physical coating with ionic polymers. *Enz. Microb. Techn.* v.60, p.1–8, 2014.

^bSANTOS, J.C.S.; GARCIA-GALAN, C.; RODRIGUES, R.C.; SANTA'ANA, H.B.; GONÇALVES, L.R.B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Stabilizing hyperactivated lecitase structures through physical treatment with ionic polymers.. *Process. Biochem.* manuscript accepted, 2014.