



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

ESTABILIZAÇÃO DE LECITASE ULTRA POR IMOBILIZAÇÃO EM SUPORTE MACROPOROSO

PINHEIRO MP¹, FERNANDEZ-LAFUENTE R², GONÇALVES LRG¹ e SANTOS JCS^{3*}

¹ Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química

² Universidad Autonoma de Madrid, Departamento de biocatalisis, ICP-CSIC

³ Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável -IEDS
E-mail para contato: maisap.pinheiro@gmail.com

RESUMO – A enzima *Lecitase Ultra* foi imobilizada através de diferentes estratégias no suporte *Immobead-350* com o intuito de avaliar os parâmetros de imobilização e a estabilidade térmica e em solvente dos biocatalisadores produzidos. Foram estudadas as melhores condições de imobilização nos pHs 7 e 10. Através dos parâmetros avaliados, observou-se que o biocatalisador formado pela imobilização da enzima direto a pH 7 (durante 3 horas) apresentou a maior atividade do derivado ($At_D = 16,1$ U/g), contudo as demais preparações também exibiram elevadas atividades. No ensaio de inativação térmica e na presença de solvente, o derivado *Leci-2p* (24 h/pH10) foi considerado o mais estável, pois apresentou elevados tempos de meia-vida em todas as condições, sendo maior que os demais a pH 10 (50 °C) e na presença de acetonitrila 30 % ($t_{1/2} = 61,9$ e 198 minutos, respectivamente).

1. INTRODUÇÃO

A imobilização de enzimas em suportes sólidos tem sido um requerimento indispensável para a aplicação desses biocatalisadores no meio industrial, uma vez que essa estratégia soluciona os problemas associados com a solubilização de enzimas, permitindo a recuperação do biocatalisador, possibilitando seu uso em reatores contínuos e reduzindo os custos de separação do produto (GARCIA-GALAN et al., 2011).

Diante da grande disponibilidade de suportes para imobilização enzimática, os macroporosos se destacam por permitir a imobilização de uma grande quantidade de enzimas, mantendo-as completamente dispersas e impossibilitadas de interagir com qualquer interface externa, estabilizando, assim, a proteína imobilizada e prevenindo a agregação, autólise ou até mesmo proteólise por proteases do extrato (que podem também estar dispersas e imobilizadas) (BEZERRA et al., 2015).

Nesse trabalho, o suporte escolhido para imobilização enzimática foi o *Immobead-350*, um polímero acrílico macroporoso, altamente hidrofóbico, e funcionalizado com grupos epóxi.



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

Os ligantes epóxi são bastante utilizados para imobilização de enzimas porque permanecem estáveis durante longos períodos de armazenamento e são capazes de reagir com diferentes grupos presentes na superfície da proteína, como amino, tiol, fenólico e imidazol. (DHAKE et al., 2012; MATTE et al., 2017).

Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi imobilizar a Lecitase Ultra no suporte Immobead-350 através de diferentes protocolos de imobilização, visando estudar as melhores condições de imobilização e a estabilidade dos biocatalisadores produzidos. A enzima Lecitase Ultra (LU) é uma nova lipase microbiana obtida pela fusão dos genes de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) e da fosfolipase de *Fusarium oxysporum*. Essa enzima possui a peculiaridade de apresentar, aproximadamente, a estabilidade da lipase de (TLL) e a atividade da fosfolipase de *F. oxysporum* (GARCIA-GALAN et al., 2014a).

2. METODOLOGIA

2.1. Determinação da atividade enzimática

A atividade da enzima solúvel ou suspensão foi determinada de acordo com a metodologia descrita por (GARCIA-GALAN et al., 2014b), com algumas modificações. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1 μmol de *p*-NPB por minuto a 25 °C, pH 7. Os parâmetros de imobilização foram calculados de acordo com DOS SANTOS et al., (2017).

2.2. Imobilização em Immobead-350

2.2.1. Imobilização por adsorção

Um total de 1 g de suporte foi ressuspenso em 10 mL de solução enzimática (concentração máxima de proteína de 10 mg/ mL), preparadas em tampão fosfato de sódio (pH 7 - 25 mM) a 25 °C, sob agitação suave durante 2 h. Após a imobilização, as preparações enzimáticas foram lavadas com tampão fosfato de sódio 25 mM - pH 7 para eliminar qualquer proteína remanescente que não tenha se ligado ao suporte. O derivado foi denominado Leci-Ads.

2.2.2. Estratégia de dois passos de imobilização

O processo de imobilização no suporte Immobead-350 se deu por um mecanismo de dois passos. Inicialmente, um grama do suporte foi suspenso em 10 mL de solução enzimática (concentração máxima de proteína de 10 mg / mL) na presença de tampão fosfato de sódio, pH 7,0 (25 mM), a 25 °C durante um período de 3 h. Após essa etapa, o derivado foi ressuspenso em tampão bicarbonato de sódio, pH 10 (25 mM - razão 1:10 m/v) e diferentes tempos de incubação foram testados (1, 5, 16 e 24 horas). Após a imobilização, as diferentes preparações foram incubadas em solução de EDA 1M, pH 10 por 18 horas, a 25 °C. A nomenclatura do derivado é Leci-2p.

2.2.3. Imobilização direto a pH 10

Um grama do suporte foi suspenso em 10 mL de solução enzimática (concentração



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

máxima de proteína de 10 mg / mL) na presença de tampão bicarbonato de sódio, pH 10,0 (25 mM), a 25 °C durante um período de 24 h. Após a imobilização, o derivado foi incubado em solução de EDA 1M, pH 10 por 18 horas. O derivado foi denominado Leci-CVL.

2.3. Inativação térmica e na presença de solvente

Para verificar o efeito da temperatura sobre a estabilidade dos derivados, suspenderam-se 0,1 g do biocatalisador em 1 mL de diferentes soluções tampão (citrato - pH 5, fosfato de sódio - pH 7 e bicarbonato de sódio - pH 10), ambos 25 mM, na temperatura de 50 °C. Para determinar a estabilidade em solvente, 0,1 g dos derivados foram incubados em 1 mL de solução 30 % de acetonitrila/70 % de tampão Tris HCl 100 mM, a pH 7. Amostras foram retiradas periodicamente e a atividade foi medida usando *p*-NPB como substrato. Meia-vidas foram calculadas utilizando o método de ajuste exponencial não-linear de Sadana e Henley (SADANA; HENLEY, 1987).

3. RESULTADOS

3.1. Efeito do pH na imobilização enzimática

A Tabela 1 apresenta os parâmetros de imobilização das três diferentes estratégias estudadas nesse trabalho. De acordo com esses dados, todos os derivados apresentaram elevados rendimentos de imobilização, confirmando que praticamente toda a enzima foi imobilizada nas diferentes estratégias de imobilização. Com relação à atividade do derivado, o maior valor foi obtido na imobilização direto a pH 7,0 ($At_d = 16,13$ U/g), porém não houve diferenças significativas entre as atividades dos derivados das três preparações.

Tabela 1 - Parâmetros de imobilização da Lecitase imobilizada em diferentes pHs (7 e 10 – 25 mM) no suporte Immobead-350, 25°C, por 24 horas.

pH de imobilização/ 25°C	At_i (U/g)	At_f (U/g)	At_d (U/g)	RI (%)
pH 7	138,3 ± 1,7	22,7 ± 2,7	16,1 ± 0,2	83,5
pH 7 → pH 10	138,3 ± 1,7	22,7 ± 2,7	15,4 ± 0,2	83,5
pH 10	148,3 ± 1,2	27,6 ± 3,1	14,6 ± 0,2	80,6

3.1. Estabilidade térmica e em solvente

No ensaio de estabilidade térmica e na presença de solvente orgânico (acetonitrila 30%), o derivado Leci-Ads apresentou maiores tempos de meia-vida que o derivado Leci-CVL, em condições mais severas, como incubação em pH 10 e na presença de acetonitrila 30 %, sendo cerca de 1,1 e 4,4 vezes mais estável, respectivamente. No entanto, o derivado Leci-2p (24 h/pH10) apresentou elevados tempos de meia-vida em todas as condições e, no geral, pode ser considerado o biocatalisador mais estável frente aos demais. Os resultados estão apresentados na Tabela2.



XXII CONGRESSO
BRASILEIRO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
23 a 26 de Setembro de 2018
Hotel Maksoud Plaza
São Paulo – SP



XVII ENCONTRO BRASILEIRO
SOBRE O ENSINO DE
ENGENHARIA QUÍMICA
27 a 28 de Setembro de 2018
USP
São Paulo – SP

Tabela 2 - Tempos de meia-vida em diferentes condições (expresso em minutos) da Lecitase imobilizada em IB-350, sob diferentes condições de inativação.

Amostras	Condições de inativação			
	pH 5,0 (25mM)- 50°C	pH 7,0 - 50°C	pH 10 - 50°C	Acetonitrila 30% - 25°C
Leci-Ads	184,8 ± 7,1	106,6 ± 7,9	21,6 ± 1,1	84,5 ± 2,1
Leci-CVL	190,2 ± 10,2	96,2 ± 2,1	18,7 ± 0,7	29,0 ± 1,7
Leci-2p (1 h/pH10)	102,1 ± 5,6	53,4 ± 2,7	55,4 ± 3,4	102 ± 9,5
Leci-2p (8 h/pH10)	85,7 ± 7,8	60,6 ± 5,2	52,4 ± 3,5	84,9 ± 7,2
Leci-2p (16 h/pH10)	83,9 ± 6,1	60,2 ± 4,4	46,8 ± 2,2	82,3 ± 8,1
Leci-2p (24 h/pH10)	127,7 ± 4,3	88,7 ± 5,7	61,9 ± 5,1	198,0 ± 12,2

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, é possível concluir que as diferentes estratégias de imobilização da Lecitase no suporte IB-350 foram bem-sucedidas, visto à elevada atividade e estabilidade dos derivados preparados.

5. REFERÊNCIAS

- BEZERRA, C. S. et al. Enzyme immobilization onto renewable polymeric matrixes: Past, present, and future trends. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 42125, p. 1–15, 2015.
- DHAKE, K. P. et al. Immobilization of steapsin lipase on macroporous imobead-350 for biodiesel production in solvent free system. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 17, n. 5, p. 959–965, 2012.
- DOS SANTOS, J. C. S. et al. Immobilization of CALB on activated chitosan: Application to enzymatic synthesis in supercritical and near-critical carbon dioxide. **Biotechnology Reports**, v. 14, p. 16–26, 2017.
- GARCIA-GALAN, C. et al. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, n. 16, p. 2885–2904, 2011.
- GARCIA-GALAN, C. et al. Tuning of Lecitase features via solid-phase chemical modification: Effect of the immobilization protocol. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 604–616, 2014a.
- GARCIA-GALAN, C. et al. Evaluation of styrene-divinylbenzene beads as a support to immobilize lipases. **Molecules**, v. 19, n. 6, p. 7629–7645, 2014b.
- MATTE, C. R. et al. Physical-Chemical Properties of the Support Imobead 150 Before and After the Immobilization Process of Lipase. **J. Braz. Chem. Soc**, v. 28, n. 8, p. 1430–1439, 2017.
- SADANA, A.; HENLEY, J. P. Analysis of enzyme deactivations by a series-type mechanism: influence of modification on the activity and stability of enzymes. **Ann N Y Acad Sci**, v. 501, p. 73–79, 1987.