



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

EFEITO DA PRESENÇA DE TRITON NA ESTABILIDADE DA LIPASE DE *Candida sp.* IMOBILIZADA NO SUPORTE MACROPOROSO IMMOBEAD-350

M. P. PINHEIRO¹, N. S. RIOS², J. C. S. dos SANTOS³ e L. R. B. GONÇALVES⁴

¹ Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

² Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química

³ Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química

⁴ Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira- Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável

E-mail para contato: maisap.pinheiro@gmail.com

RESUMO – A estratégia de imobilização de enzimas é estudada com o objetivo de produzir biocatalisadores mais estáveis que poderão ser utilizados em reações de elevado interesse industrial. A lipase de *Candida antártica* do tipo B expressa em *Aspergillus niger* foi imobilizada em ImmoBead-350. Mecanismos de imobilização foram avaliados para facilitar a ligação covalente enzima/suporte, através da adição de Triton X-100. Quanto à estabilidade, os derivados preparados foram testados nos pHs 5, 7 e 10, à temperatura de 70 °C, 60 °C e 50 °C, respectivamente, e, também, na presença de acetonitrila e dioxano, ambos a 30%, à temperatura de 65°C. A condição mais estável para o biocatalisador foi a pH 5,0, na temperatura de 70°C, o qual apresentou um tempo de meia vida ($t_{1/2}$) de 68 minutos. Assim, a presença de Triton no meio facilitou a ligação covalente enzima/suporte e produziu-se um biocatalisador estável sob condições ambientais diversas.

1. INTRODUÇÃO

Lipases (triglicerol acilhidrolases EC.3.1.1.3) são enzimas que pertencem à classe das hidrolases (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999), cuja função natural é a clivagem de ligações éster em triglicerídeos, com o consumo de moléculas de água (hidrólise) (POPPE *et al.*, 2013). Elas estão entre as enzimas mais utilizadas na biocatálise, devido à sua ampla especificidade, a ampla gama de reações que podem catalisar e a sua excelente estabilidade em diferentes meios reacionais (ADLERCREUTZ, 2013; JAEGER; EGGERT, 2002; ZHANG *et al.*, 2014).

A utilização de enzimas livres tem sido limitada devido à sua natureza consideravelmente instável às condições rigorosas de pH e temperatura (BETIGERI; NEAU, 2002). A reutilização de enzimas (principalmente lipases) tem aliado vantagens práticas e econômicas através da utilização de

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO





XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

tecnologias de imobilização, que permitem separar as enzimas do meio reacional e facilitar a separação de produtos (SHELDON; VAN PELT, 2013). A imobilização, quando projetada adequadamente, pode ser uma técnica eficaz para melhorar quase todas as propriedades da enzima, tais como: estabilidade, atividade, redução da inibição, especificidade e seletividade (BEZERRA *et al.*, 2015; MATEO *et al.*, 2007).

O Immobead-350 é um polímero acrílico macroporoso, composto por esferas inertes na natureza (HANEFELD; GARDOSI; MAGNER, 2009), adequado para a imobilização covalente de uma variedade de enzimas, pois possui esferas funcionalizadas com ligantes epóxi que reagem principalmente com grupos amino de lisinas presentes na superfície da enzima (BABICH *et al.*, 2012). Algumas vantagens da imobilização de enzimas no interior de um sólido com estrutura porosa é que ele permite que as moléculas de enzima estejam completamente dispersas e impossibilitadas de interagir com qualquer interface externa (SANTOS *et al.*, 2015). Dessa forma, esta imobilização irá estabilizar a enzima prevenindo a agregação, autólise ou até mesmo proteólise por proteases do extrato (que também estarão dispersas e imobilizadas) (BEZERRA *et al.*, 2015; MATEO *et al.*, 2007).

No presente trabalho, a lipase de *Candida sp.* expressa em *Aspergillus niger* foi imobilizada covalentemente em Immobead-350 (IB-350) e as condições de imobilização foram testadas quanto à presença e ausência do detergente Triton X-100, como também foi estudada a estabilidade do biocatalisador em diferentes temperaturas, e na presença de solventes orgânicos.

2. METODOLOGIA

2.1. Obtenção da enzima e do suporte

A lipase recombinante de *Candida sp.* expressa em *Aspergillus niger* é um tipo de lipase de *Candida antarctica* do tipo B (CALB), uma enzima comercial obtida da empresa Sigma-Aldrich. O suporte utilizado na produção do biocatalisador também é comercial e foi fornecido pela empresa Chiral Vision.

2.2. Pré-tratamento do Suporte

O pré-tratamento consistiu em um procedimento de hidratação para retirar o ar aprisionado dentro das esferas de Immobead-350, onde 2 g de do suporte foram tratados com 25 mL de etanol (95%) por 4h. Durante esse tempo as esferas de IB-350 foram cuidadosamente decantadas. Em seguida, o suporte foi filtrado e lavado 4 a 5 vezes com água destilada (20 mL) e então equilibrado em tampão fosfato de sódio (25mM - pH 7,0) A metodologia foi baseada no trabalho de DHAKE, (2012), com modificações.

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO



2.3. Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteína da CALB foi quantificada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), que baseia-se na ligação do corante Comassie Brilliant Blue G-250 à proteína. Albumina Bovina Cristalina (BSA) foi utilizada como padrão para construir a curva de calibração.

2.4. Determinação da atividade enzimática

A atividade da CALB solúvel e imobilizada foi determinada de acordo com uma metodologia descrita por GARCIA-GALAN *et al.*, (2014), com modificações. A medida foi realizada por meio da hidrólise do substrato *p*-nitrofenol butirato (*p*-NPB) 50mM, em acetonitrila, a pH 7 e 25 ° C (ϵ sob estas condições 10,052 mol⁻¹.cm⁻¹). O produto, *p*-nitrofenol, liberado durante a hidrólise do *p*-NPB, tem uma coloração amarelada, que é medida a 400 nm. Neste trabalho, uma unidade (U) é a quantidade de enzima capaz de hidrolisar um μ mol de substrato por minuto a um pH 7 e 25 ° C.

2.5. Determinação dos Parâmetros de Imobilização

Os parâmetros de imobilização utilizados nesse trabalho foram calculados segundo as equações a seguir. Inicialmente, o cálculo da atividade oferecida representado pela equação 1:

$$At = \left(\left(\frac{\alpha \cdot f \cdot Vr \cdot D}{V_e} \right) / (B) \right) \cdot C_0 \quad (1)$$

onde At é a atividade enzimática (U.g⁻¹), α é a taxa de consumo do *p*- NPB (abs.min⁻¹), *f* é o fator da curva de calibração do PNP (μ mol/(mL.abs)), Vr é o volume de reação (mL), D representa a diluição da solução enzimática (mL/mL), Ve é o volume de solução enzimática (mL), B é o Bradford (6,06 mg.mL⁻¹) e C₀ é a carga oferecida (mg P . g⁻¹suporte).

A atividade do derivado foi calculada segundo uma variação da equação (1), determinada pela equação 2 a seguir:

$$\text{Atividade do derivado (At}_d) = \alpha \cdot f \cdot \left(\frac{Vr}{Ve} \right) \cdot \left(\frac{Vs}{Mb} \right) \quad (2)$$

onde V_s é o volume de solução enzimática (ml) e M_b é a massa do biocatalisador (g), ambos utilizados na imobilização.

O rendimento de imobilização (RI %), em termos de atividade hidrolítica, foi calculado pela equação 3:

$$RI (\%) = \frac{At_{of_i} - At_f}{At_{of_i}} \cdot 100 \quad (3)$$

Em que At_{of_i} é a atividade oferecida no início do curso de imobilização ($U \cdot g^{-1}$) e At_f é a atividade após o processo de imobilização ($U \cdot g^{-1}$).

2.6. Influência da Presença de Triton X-100 na Imobilização

Para verificar a influência do Triton X-100 no processo de imobilização foram realizados testes de imobilização na presença e ausência do detergente. Nesse experimento, 0,1 g de suporte foi adicionado a uma solução 0,01 % de Triton X-100, contendo 1,0 mg de proteína / mL de tampão bicarbonato de sódio 25 mM, pH 10, 1/10 m/v. A outra imobilização ocorreu na mesma carga de 10 mg de proteína / g de suporte, mas sem a adição do detergente, ambas foram realizadas à 25 °C. As atividades dos derivados foram determinadas utilizando-se a hidrólise do *p*-NPB. Os parâmetros de imobilização foram calculados para comparar a eficiência dos derivados.

2.7. Estabilidade Térmica

Para verificar o efeito da temperatura sobre a estabilidade, as lipases solúvel e imobilizada foram incubados em 1 mL dos tampões citrato a pH 5, fosfato de sódio a pH 7 e bicarbonato de sódio a pH 10, ambos 25 mM, em diferentes temperaturas. As amostras foram retiradas periodicamente e a atividade foi medida utilizando-se o *p*-NPB. A constante de inativação térmica foi calculada pela equação 4, utilizando o método de ajuste exponencial não-linear de SADANA; HENLEY, (1987).

$$AR = (1 - \alpha) \cdot e^{-k_d \cdot t} + \alpha \quad (4)$$

AR é a Atividade Relativa (A/A_0); α é razão entre a atividade enzimática do estado final (A) e a atividade enzimática do estado inicial (A_0); K_d é a constante de inativação térmica de primeira ordem (h^{-1}) e t é o tempo de incubação da solução enzimática (h).

O tempo de meia-vida da enzima, definido como o tempo necessário para que ocorra uma redução de 50% da atividade inicial, foi calculado pela equação 5.

$$t_{1/2} = \frac{\ln(0,5 - \alpha)}{k_d \cdot (1 - \alpha)} \quad (5)$$

Em que $t_{1/2}$ é o tempo de meia-vida da enzima.

2.8. Estabilidade em Solvente

Nesse ensaio, os solventes dioxano e acetonitrila foram diluídos separadamente em uma solução 30 % de solvente / 70 % de tampão Tris HCl 100mM a pH 7, respectivamente, a 25 °C. Para determinar a estabilidade em solvente, as lipases solúvel e imobilizada foram incubados em 1 mL de solução solvente 30%, à temperatura de 65°C, para proceder à sua inativação. Periodicamente, as amostras foram retiradas e a atividade foi medida utilizando o *p*-NPB. Os tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) também foram determinados pela aplicação do modelo de decaimento exponencial não linear de Sadana e Henley (1987).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Imobilização na presença de triton X-100

A tabela 1 mostra que a presença de Triton X-100, na concentração de 0,01%, promoveu um aumento na atividade da CALB imobilizada ($At_d = 5,29 \pm 0,58$ U/g) em ImmoBead-350, esse valor é quase duas vezes superior ao da imobilização na ausência do Triton X-100, mostrando que o detergente promove uma hiperativação da enzima, conseqüentemente melhorando sua atividade. As duas imobilizações apresentaram valores semelhantes de rendimento de imobilização ($RI \% = 98,54$), isso sugere que a enzima foi quase totalmente imobilizada no suporte, nas duas condições.

Tabela 1 – Parâmetros de imobilização do derivado (10mg / g de suporte) na ausência e presença de Triton X-100 0,01%.

	At_i (U/g)	At_r (U/g)	At_d (U/g)	RI (%)
Ausência de triton	241,41 \pm 0,29	3,54 \pm 1,40	3,71 \pm 1,65	98,54
Presença de triton	295,67 \pm 18,60	3,43 \pm 0,40	5,29 \pm 0,58	98,84

Segundo FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, (2008), a utilização de Triton X-100 em baixas concentrações parece ser uma estratégia simples e eficaz para aumentar de forma significativa à atividade da enzima na ausência de interfaces adicionais, quando se utiliza lipases imobilizadas. O detergente pode também induzir mudanças conformacionais na sua estrutura, permitindo que os grupos hidrofóbicos anteriormente confinados tornem-se expostos, favorecendo o acesso do substrato ao sítio ativo da lipase (PALOMO *et al.*, 2003). Desta forma, a imobilização covalente na ausência de detergente pode ser complexa, com monômeros e dímeros sendo imobilizados (DOS SANTOS *et al.*, 2015).

3.2. Estabilidade térmica e em solvente

A fim de avaliar o comportamento da lipase solúvel, e imobilizada, os experimentos foram realizados a 50 °C, 60 °C, e 70 °C, em valores de pH de 10, 7 e 5, respectivamente, como descrito na seção 2.7. A Tabela 2 a seguir mostra que a estabilidade térmica da CALB imobilizada covalentemente é muito maior do que a da lipase solúvel, isso se deve à natureza consideravelmente instável às condições rigorosas de pH e temperatura das enzimas solúveis (BETIGERI; NEAU, 2002).

A melhor condição de estabilidade da CALB imobilizada em IB-350 foi a pH 5,0 / 70°C, na qual o tempo de meia-vida é 13 vezes maior que o da lipase solúvel. Assim, essa condição pode ser explicada pela forte interação entre as moléculas de enzima e suporte, que, devido à estabilização da sua estrutura tridimensional, impediram à inativação da enzima (LIMA *et al.*, 2015).

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

Amostras	Condições de inativação				
	pH 5,0 - 70°C	pH 7,0 - 60°C	pH 10 - 50°C	Dioxano 30% - 65°C	Acetonitrila 30% - 65°C
CALB-IB-350	68	57,5	29	42,3	27,8
CALB solúvel	5	12	6	3,8	6,3

As meias-vidas foram calculados utilizando o método de ajuste exponencial não-linear de Sadana e Henley (1987). BRÍGIDA *et al.*, (2007), definiu como o tempo necessário para que a enzima perca 50% da sua atividade inicial.

De acordo com PETERSON *et al.*, (2007), a estabilidade térmica é frequentemente um fator chave no sucesso de processos biológicos, e isso independe das condições de tais processos, uma vez que as velocidades de reação tipicamente aumentam exponencialmente com a temperatura até o ponto de desnaturação da enzima. A imobilização é uma técnica utilizada não só para tornar as enzimas insolúveis, mas também para estabilizá-las. Dependendo da força de ligação, uma maior rigidez da estrutura terciária pode ser obtida. Como resultado, a enzima imobilizada pode mostrar uma maior estabilidade contra o calor, solventes orgânicos, e outros agentes desnaturantes (DE LIMA *et al.*, 2013).

3.3. Estabilidade em solvente

Na estabilidade em solvente, os derivados de enzimas foram incubados em soluções de dioxano 30% e acetonitrila 30%, ambas em 70 % de tampão Tris HCl, a pH 7, sob a mesma temperatura (65°C). A tabela 5.5 mostra que os resultados da estabilidade em solventes orgânicos foram relativamente diferentes da estabilidade térmica. Nesse caso, a alta temperatura aliada à presença do solvente orgânico promoveu uma redução na estabilidade dos derivados e, principalmente, da enzima solúvel, que apresentou baixos valores de meia-vida. A amostra mais estável foi CALB imobilizada em IB-350, na presença de dioxano 30%, mostrando que esse solvente não tem um efeito negativo pronunciado sobre a estabilidade do derivado quanto acetonitrila 30%. Já os preparados de enzimas solúveis tiveram uma resposta contrária, a lipase foi mais estável na presença de acetonitrila.

A diferente estabilidade das enzimas imobilizadas em diferentes valores de pH, de temperatura, e na presença de diferentes solventes orgânicos, sugere que a inativação da CALB não segue o mesmo percurso em condições distintas de inativação, algumas regiões da proteína são mais relevantes sobre a estabilidade em determinadas condições, enquanto outras áreas podem ser mais relevantes sobre outras condições experimentais (GARCIA-GALAN *et al.*, 2014).

5. CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que a presença de Triton X-100 melhorou a atividade e estabilidade do



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

biocatalisador, por favorecer a interação da enzima com o suporte. Além disso, o biocatalisador se mostrou altamente estável, pois apresentou elevados tempos de meia-vida, em diferentes condições de inativação, quando comparado à baixa estabilidade da lipase solúvel, obtendo-se um maior valor na condição de pH 5,0, a 70°C ($t_{1/2} = 68$ minutos), enquanto o tempo de meia-vida da lipase solúvel foi de apenas 5 minutos

6. REFERÊNCIAS

ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6406–36, 2013.

BABICH, L. *et al.* Continuous-flow reactor-based enzymatic synthesis of phosphorylated compounds on a large scale. **Chemistry - A European Journal**, v. 18, n. 21, p. 6604–6609, 2012.

BETIGERI, S. S.; NEAU, S. H. Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads. **Biomaterials**. v. 23, p. 3627–3636, 2002.

BEZERRA, C. S. *et al.* Enzyme immobilization onto renewable polymeric matrixes: Past, present, and future trends. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 42125, p. n/a–n/a, 2015.

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.

BRÍGIDA, A. I. S. *et al.* Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment to green coconut fiber. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 137-140, n. 1-12, p. 67–80, 2007.

DE LIMA, L. N. *et al.* Immobilization and stabilization of a bimolecular aggregate of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* by multipoint covalent attachment. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 1, p. 118–123, 2013.

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.* Evaluation of divinylsulfone activated agarose to immobilize lipases and to tune their catalytic properties. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 6, p. 918–927, 2015.

FERNANDEZ-LORENTE, G. *et al.* Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 10, p.

PROMOÇÃO



REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO





XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

1061–1067, 2008.

GARCIA-GALAN, C. *et al.* Evaluation of styrene-divinylbenzene beads as a support to immobilize lipases. **Molecules**, v. 19, n. 6, p. 7629–7645, 2014.

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chem. Soc. Rev.**, v. 38, n. 2, p. 453–468, 2009.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, p. 315–351, 1999.

JAEGER, K.-E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 390 – 397, 2002.

LIMA, L. N. *et al.* Immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase on hydrophobic supports and application in biodiesel synthesis by transesterification of vegetable oils in solvent-free systems. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, p. 523–535, 2015.

MATEO, C. *et al.* Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451–1463, 2007.

PALOMO, J. M. *et al.* General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 1, p. 1–6, 2003.

PETERSON, M. E. *et al.* The dependence of enzyme activity on temperature : determination and validation of parameters. v. 337, p. 331–337, 2007.

POPPE, J. K. *et al.* Multipoint covalent immobilization of lipases on aldehyde-activated support: Characterization and application in transesterification reaction. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 94, p. 57–62, 2013.

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.

SANTOS, J. C. S. DOS *et al.* Importance of the Support Properties for Immobilization or Purification of Enzymes. **ChemCatChem**, v. 7, n. 16, p. n/a–n/a, 2015.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 2013.

ZHANG, J. *et al.* Recent developments in lipase-catalyzed synthesis of polymeric materials. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 5, p. 797–806, 2014.

PROMOÇÃO



REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO





XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

PROMOÇÃO



REALIZAÇÃO



ORGANIZAÇÃO

