

MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE LECITASE ULTRA EM FASE SÓLIDA: EFEITO DO PROTOCOLO DE IMOBILIZAÇÃO

J.C.S. DOS SANTOS^{1,2}, C.GARCIA-GALÁN¹, O. BARBOSA³, 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.

³Universidad Industrial de Santander, Escuela de Química,

E-mail para contato: jsleiton@gmail.com

RESUMO – Lecitase Ultra foi imobilizada por meio de duas estratégias diferentes: ligação covalente em brometo de cianogênio-agarose e por ativação interfacial em octil-agarose. Os derivados foram submetidos a diferentes modificações químicas (aminação, glutaraldeído ou ácido 2,4,6-trinitrobenzensulfônico (TNBS)), a fim de verificar o efeito nas propriedades catalíticas das enzimas imobilizadas. A modificação com glutaraldeído da enzima imobilizada ou modificada e aminada permitiu melhorar a estabilidade da enzima imobilizada, tanto em pH7 e 9 (em torno de 10 vezes), mas apenas a enzima aminada melhorou a estabilidade em pH5. A aminação melhorou a estabilidade de octil-Lecitase, ao mesmo tempo em que reduziu a estabilidade da imobilizada por covalência. E a modificação com TNBS apenas melhora a estabilidade da enzima imobilizada covalentemente, por um fator de 10 vezes, em pH9.

1. INTRODUÇÃO

As fosfolipases A1 hidrolisam o grupo 1-acilo de um fosfolípido a um lisofosfolípido e a um ácido graxo livre. Uma enzima com atividade de fosfolipase A1, nomeadamente Lecitase Ultra[®], foi patenteada e disponibilizada comercialmente, esta enzima é uma preparação obtida a partir da fusão dos genes da lipase de *Thermomyces lanuginosus* e a fosfolipase de *Fusarium oxysporum*. Essa nova enzima apresenta estabilidade da lipase de *T. lanuginosus* e a atividade da enzima de *F. oxysporum*, de acordo com Garcia-Galan *et al.* (2014) e De Maria *et al.* (2007).

Neste trabalho foram estudados os efeitos de diferentes modificações químicas sobre as diversas características catalíticas de Lecitase. Esta enzima, como as lipases, tem um mecanismo catalítico chamado ativação interfacial, que seria uma tampa que cobre o centro ativo no meio homogêneo (forma fechada) em equilíbrio com uma forma em que o centro ativo é exposto ao meio (forma aberta), de acordo com estudos de Garcia-Galan *et al.* (2014).

A modificação química foi realizada em Lecitase imobilizada, isto simplifica o processo, evita a precipitação da proteína, durante ou depois da modificação, e pode até mesmo permitir a pré-estabilização da enzima, como temos referência no trabalho de Rodrigues *et al.* (2011).

Nesse contexto, três modificações químicas diferentes foram estudadas, onde a primeira fora a modificação dos grupos carboxílicos expostos da enzima com etilenodiamina (EDA), após a ativação com carbodiimida (cloridrato de dezembro, N - 3 - dimetilaminopropil - N' - etilcarbodiimida) Carraway *et al.* (1969). E a segunda modificação fora a de grupos amino primários de superfície da proteína de 2,3,4 - trinitrobenzenesulfonato (TNBS), esta modificação é altamente específica de grupos amino primários, e, tradicionalmente, empregada para quantificar esses grupos em proteínas e suportes segundo Mendes *et al.* (2011).

A terceira modificação consistiu no tratamento com glutaraldeído. Onde as modificações com glutaraldeído e TNBS baseiam-se na reação com os grupos amino primários, elas foram também realizadas em enzimas anteriormente aminadas, para maximizar os seus possíveis efeitos, como por exemplo, as ligações cruzadas inter- ou intramoleculares.

A hipótese é que essas modificações químicas podem produzir alterações conformacionais gerais na estrutura da enzima ou alterar os movimentos da tampa, em ambos os casos, ajustando as características finais da enzima. Estas alterações podem ser diferentes, dependendo da estratégia de imobilização usada, segundo Garcia-Galan *et al.* (2014).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Lecitase foi obtida a partir da empresa *Novozymes* (Espanha). Octil-agarose e brometo de cianogênio reticulado 4% agarose (CNBr) foram obtidos da GE Healthcare. Etilenodiamina (EDA), N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilcarbodiimida (DEC), ácido 2,4,6-trinitrobenzensulfônico (TNBS), glutaraldeído (solução aquosa a 50%), p-nitrophenylbutyrate (p-NPB), Triton X-100, dodecil sulfato de sódio (SDS), brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), R e S-metil mandelato e fenilacetato de metilo foram oriundos da empresa *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO, EUA). O glutaraldeído (25% (v / v) estabilizadas em etanol) foi da *Fluka*. Todos os reagentes e solventes eram de grau analítico.

2.1. Determinação da atividade da enzima

Este ensaio foi realizado através da medição do aumento da absorbância a 348 nm produzidos 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.

Na determinação dos efeitos do valor do pH sobre a atividade da enzima, o protocolo seguido foi semelhante, mas o tampão nas medições foi alterado, de acordo com o valor de pH como: acetato de sódio a pH 5, fosfato de sódio a pH 6-8 e borato de sódio a pH 9 e pH 10.

2.2. Imobilização de Lecitase em octil-agarose

Lecitase foi imobilizada em octil-agarose, em baixa força iônica, de acordo com Fernández-Lorente *et al.* (2007). Cerca de 2,8 mL de extrato comercial (16 mg de proteína/mL, com uma atividade pNPB de 5,6 U / mg de proteína) foram diluídos em 67,5 mL de fosfato de sódio 5 mM a pH 7, e em seguida, foi adicionado 15 g de octil-agarose. A atividade de sobrenadante e a suspensão foram seguidas usando pNPB. Depois, a suspensão foi filtrada, e a lipase imobilizada foi lavada várias vezes com água destilada.

2.3. 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. A atividade de sobrenadante e a suspensão foram seguidas usando p-NPB. A imobilização da enzima foi terminada por incubação do suporte com etanonamina 1M, a pH 8, durante 12 h. Ao final, a preparação imobilizada foi lavada com água destilada abundante.

2.4. Modificação química de Lecitase imobilizada

2.4.1. Aaminação em fase sólida de Lecitase

Dez gramas de Lecitase imobilizada, Lecitase-TNBS ou Lecitase-GLU foram adicionadas a 100 mL de 1M, a pH 4,75 EDA, sob agitação contínua, como descrito no trabalho de Galvis *et al.* (2012). A modificação começou a partir da adição de DEC sólido (para uma concentração final de 10 mM). Após 2 h de agitação suave a 25°C, os derivados aminados tinham mais do que 95% dos grupos carboxílicos expostos modificados, como apresentado no trabalho de Carraway *et al.* (1969).

2.4.2. Modificação dos grupos amino primários de Lecitase imobilizada com TNBS

A medida de 12 g de Lecitase imobilizada ou Lecitase-EDA foi adicionada a 100 mL de uma solução de 0,1% (m/v) TNBS em fosfato de sódio a pH 8,0, e a mistura foi incubada durante 60 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, a preparação de enzima modificada foi lavada com água destilada. A cor desenvolvida não aumentou quando a concentração e volume de TNBS foram dobrados, o que sugere que 100% dos grupos amino primários expostos na proteína tinham sido modificados.

2.4.3. Modificação de Lecitase imobilizada com Glutaraldeído

A Lecitase imobilizada preparada como descrito, anteriormente, bem como Lecitase-EDA, foram incubadas com 0,1% (v/v) de solução de glutaraldeído em tampão fosfato de sódio 25 mM a pH 7 e 25 °C durante 1h, sob agitação suave. Estas condições permitem modificar completamente os grupos amino primários da enzima com apenas uma molécula de glutaraldeído. A suspensão foi então filtrada e lavada com água para remover o excesso de glutaraldeído.

3. RESULTADOS

3.1. Imobilização de Lecitase em octil-agarose e CNBr

A Fig. 1a mostra o curso de imobilização de Lecitase em octil-agarose e CNBr-agarose. Em octil-agarose, a maior parte das enzimas já se encontram imobilizadas depois de 0,5 h, e o aumento da atividade em mais do que um fator de 2 vezes.

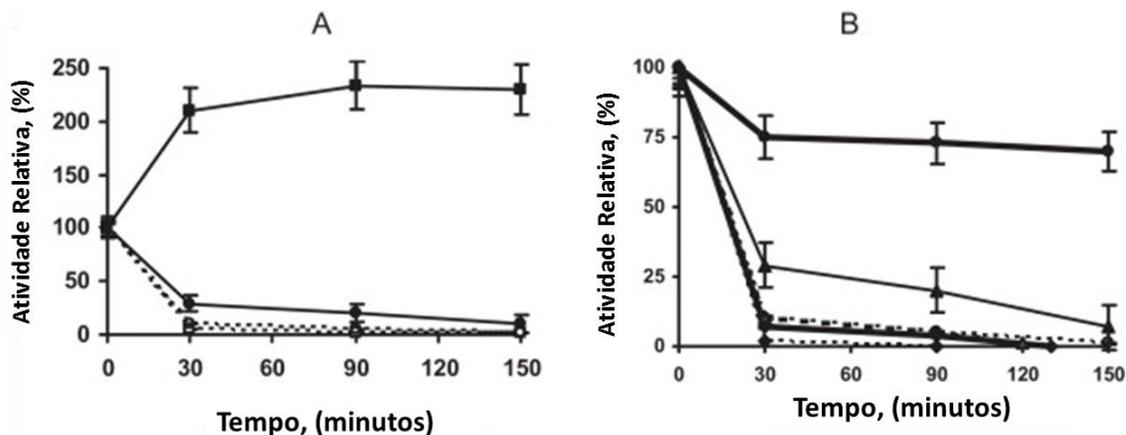


Figura 1 - Cursos de imobilização de Lecitase em octil-agarose e CNBr. As condições experimentais estão detalhadas na Seção 2. (A) Imobilização, na ausência de SDS. Quadrados: octil-agarose; círculos: CNBr-agarose. As linhas sólidas: suspensão, as linhas tracejadas: sobrenadantes. (B) Efeito de SDS sobre os cursos de imobilização de Lecitase em CNBr-agarose. Triângulos: 0,05% SDS (v/v); Losango: SDS a 0,1% (v/v).

Quando a imobilização da enzima ocorre em CNBr, a enzima também é rapidamente incorporada no suporte (mais do que 90%), mas a atividade sofre uma queda drástica (menos do que 5% da atividade inicial é observada no suporte). A inativação da enzima segue de perto a imobilização, isto é surpreendente, já que as condições de imobilização são muito leves e não se deve esperar uma intensa reação enzima/suporte.

Tentando melhorar a recuperação da atividade enzimática em CNBr, foram realizados ensaios com vários detergentes, tentando encontrar um que poderia manter a forma aberta da Lecitase e manter também a enzima na forma monomérica, tendo um baixo impacto sobre a sua estabilidade. Verificou-se que o SDS era o único com um menor efeito sobre a estabilidade da Lecitase (resultados não mostrados). A Figura 1b mostra o efeito da presença de diferentes concentrações de SDS durante a imobilização na atividade da enzima. A taxa de imobilização permaneceu muito alta, e usando 0,05 % de SDS durante a imobilização, aproximadamente 70 % da atividade da enzima inicial após 2,5 h de imobilização foram recuperadas.

Os efeitos do detergente podem ser vários. Por um lado, algumas áreas da enzima podiam ser bloqueadas por este detergente evitando a imobilização por essa área, e até mesmo impedir a reação de um grupo. Por outro lado, um detergente pode estabilizar a forma aberta da lipase, se o problema após a imobilização na CNBr é a dificuldade crescente para a abertura da forma de enzima, a imobilização na presença de detergente pode resolver. Além disso, se a Lecitase tende a formar

dímeros, como muitas lipases fazem, o detergente irá quebra-los e permitir imobilizar a forma monomérica da enzima.

Estas condições de imobilização foram utilizadas como os padrões para a preparação dos biocatalisadores utilizados neste trabalho.

3.2. Efeito das modificações químicas sobre a atividade da enzima

Ambas as preparações de enzima foram submetidas às modificações químicas descritas na seção 2. O efeito sobre a atividade da enzima, sob condições padrão, pode ser encontrado na Tabela 1.

Tabela 1. Efeito das modificações químicas sobre as atividades em pNPB das diferentes preparações. A atividade foi determinada a pH 7 e 25 °C, tal como indicado na seção 2. GLUTA, glutaraldeído. A atividade é apresentada em U/mg.

| Biocatalisador | Modificação química | | | | | | | |
|----------------|---------------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| | nenhuma modificação | EDA | TNBS | GLUTA | EDA-TNBS | EDA-GLUTA | TNBS-EDA | GLUTA-EDA |
| Octyl-Lecitase | 26 ± 1 | 35 ± 1 | 12.5 ± 0.5 | 18. ± 1 | 20.5 ± 1 | 16.5 ± 1 | 11.5 ± 0.6 | 15.2 ± 1 |
| CNBr-Lecitase | 0.9 ± 0.05 | 1.1 ± 0.05 | 2.4 ± 0.1 | 0.54 ± 0.04 | 0.45 ± 0.03 | 0.26 ± 0.02 | 0.32 ± 0.02 | 0.4 ± 0.03 |

Usando octil - Lecitase, a aminação produziu um aumento da atividade da enzima cerca de 35%, enquanto que com TNBS foram quase 50% de recuperação da atividade, e com glutaraldeído produziu uma diminuição, por volta de 70 %, na atividade da enzima .

A modificação da enzima aminada com TNBS diminuiu a atividade em 40%, um pouco menos do que com octil - Lecitase não modificada, embora agora o número de grupos modificados seja muito maior. O tratamento com glutaraldeído deste biocatalisador reduziu a atividade em cerca de 50 %, na verdade, esta modificação reverteu o efeito positivo da aminação, e foi menos ativa do que a enzima apenas modificada com glutaraldeído.

Por outro lado, a aminação da enzima modificada com TNBS ou glutaraldeído causou uma ligeira diminuição na atividade da enzima. A situação era diferente usando a enzima imobilizada covalentemente. Em primeiro lugar, a atividade inicial é muito mais baixa do que utilizando octil - agarose, por um fator de quase 30 vezes (medidas realizadas na ausência de detergente).

A aminação produziu uma ligeira melhoria na atividade da enzima, enquanto que a modificação com glutaraldeído diminuiu a atividade em 40%, no entanto, a modificação com TNBS aumentou a atividade em um fator de 2,5 vezes. O glutaraldeído ou tratamento com TNBS da enzima aminada produziu uma diminuição acentuada na atividade da enzima (20 e 40 % de recuperação de atividade, respectivamente), muito mais importante do que o uso da enzima não modificada.

A aminação da enzima modificada com TNBS produziu a perda de todo o efeito positivo da modificação de TNBS, e ainda promoveu uma maior diminuição da atividade da enzima (a atividade

caiu 2,5 - 0,32 U/mg). Isto é surpreendente, considerando que ambas as modificações independentes têm efeitos positivos sobre a atividade da enzima. A aminação da enzima modificada com glutaraldeído, também tem um efeito negativo na atividade, mas não de modo negativo.

Assim, os efeitos das modificações químicas nas características da enzima dependem fortemente da estratégia de imobilização, em alguns casos, a alteração cumulativa tem um menor impacto sobre a atividade da enzima, que cada uma das modificações individuais ou mesmo oposta. Considerando que a expectativa de alterar o delicado equilíbrio das forças que estabilizam a forma aberta da lipase, uma explicação específica para cada um dos resultados individuais pode ser quase impossível.

No entanto, as diferenças nas preparações imobilizadas pode ser pelo menos uma explicação parcial para o efeito diferente da modificação química da enzima imobilizada covalentemente e da Lecitase imobilizada por interação iônica interfacial. Lecitase imobilizada em octil-agarose estabilizou a forma aberta. Isso significa que qualquer efeito da modificação química fundada em mudanças no equilíbrio da forma aberta/fechada será minimizado. Além disso, a área de moléculas de enzima imobilizada está em contato estreito com a superfície do suporte hidrofóbico, e este pode alterar a sua reatividade (em alguns casos, pode ser que o grupo não esteja acessível para a modificação, e em outros, a partição pode aumentar ou diminuir sua aparente reatividade).

3.3. Efeito do pH sobre a atividade das diferentes preparações de Lecitase

A Figura 2a mostra o perfil de pH/atividade das preparações de octil- e CNBr- Lecitase. Os perfis são muito diferentes, embora a enzima imobilizada, covalentemente, tenha um ótimo de atividade claro a pH 6 e retém apenas cerca de 40% de atividade a pH 10, a preparação de octil não tem um valor de pH ótimo claro no intervalo estudado, a atividade a partir do pH 8 - 10, com uma certa tendência para aumentar a atividade até ao valor de pH mais elevado (valores de pH mais elevados apresentavam uma hidrólise química demasiado rápida do pNPB). Considerando que a preparação octil-Lecitase já estabiliza a forma aberta da enzima, a importância do movimento no valor do pH sobre os derivados de CNBr pode ser uma explicação provável para estes resultados muito diferentes.

Sobre as preparações de octil, (Figura 2b), a aminação quase deixa o perfil inalterado. Isso foi muito surpreendente, considerando a mudança radical das interações iônicas, comparando a enzima modificada e não modificada, e a mudança dramática que esta modificação química deve produzir sobre a forma como o pH pode afetar essas interações. A Modificação com TNBS diminuiu a atividade a valores de pH inferior a 8 e o efeito é mais significativa a valores de pH ácido (a pH de 5 os derivados de octil modificados com TNBS mantiveram apenas 15% da atividade, enquanto o não modificado manteve 61%). A modificação com glutaraldeído produziu um perfil de atividade /pH mais estreito, aparecendo um máximo atividade claro em pH 8, com uma redução mais significativa da atividade, tanto em valores ácido, como em valores básicos de pH.

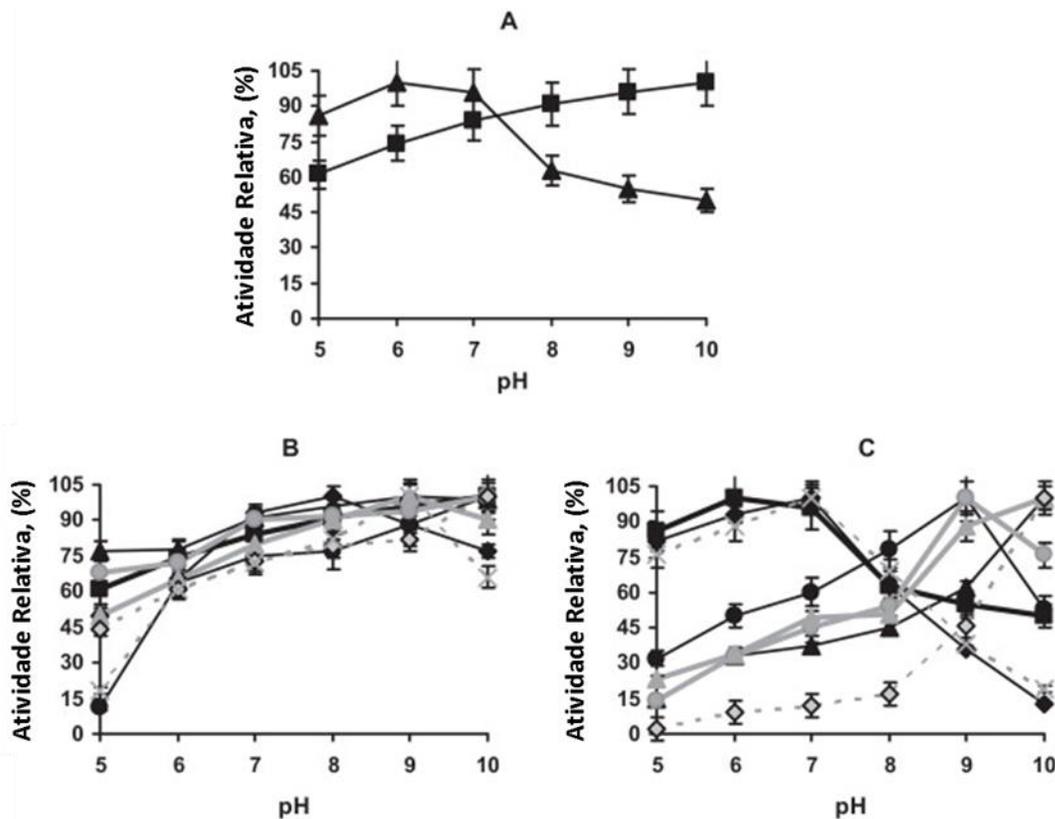


Figura 2 - Efeito do pH sobre a atividade frente a pNPB das diferentes preparações de Lecitase. Experimentos foram realizados conforme descrito na Seção 2 (A) Efeito do protocolo de imobilização: octil-Lecitase: quadrados; CNBr- Lecitase: triângulos. (B) (octil-Lecitase) e (C), (CNBr Lecitase). Efeito da modificação química. Uma modificação: linhas pretas sólidas. quadrado: nenhuma modificação; Triângulos: EDA, Círculos: TNBS, losango: GLUTA. Modificação da Lecitase aminada: linhas cinza sólida. Circulo cinza: TNBS, Circles: GLUTA. Amination de Lecitase modificada: linha cinza tracejada. Losango cinza: TNBS; cruz cinzenta: GLUTA.

A Figura 2c nos mostra o efeito (pH/atividade) das modificações de Lecitase imobilizada sobre CNBr. Neste caso, as alterações são muito mais evidentes do que quando se utiliza octil-Lecitase. Os resultados obtidos mostram como o efeito de uma modificação química é fortemente dependente do valor de pH, algumas modificações são positivas a um valor de pH, e podem tornar-se muito negativa em outro. O efeito do pH sobre a atividade da enzima depende da estratégia empregada na imobilização; as explicações possíveis podem ser alguns dos detalhados nos pontos anteriores.

4. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que as propriedades de Lecitase podem ser facilmente alteradas através da imobilização ou modificação química. Assim, a imobilização e a

modificação química parecem ser uma poderosa estratégia para melhorar as propriedades da Lecitase.

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.
- CARRAWAY, K.L.; SPOERL, P.; KOSHLAND JR., D.E. Carboxyl group modification in chymotrypsin and chymotrypsinogen. *J. Mol. Biol.*, v. 42, p. 133–137, 1969.
- DE MARIA, L.; VIND, J.; OXENBØLL, K. M.; SVENDSEN, A.; PATKAR, S. Phospholipases and their industrial applications. *Appl. Microb. 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.
- GALVIS, M.; BARBOSA, O.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Effect of solid-phase chemical modification on the features of the lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *Process. Biochem.*, v. 47, p.460–466, 2012.
- 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.
- MENDES, A. A.; CASTRO, H. F.; RODRIGUES, D. S.; ADRIANO, W. S.; TARDIOLI, P. W.; MAMMARELLA, E. J.;GIORDANO, R.C.; GIORDANO, R. L. C. Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 38, p.1055–1066, 2011.
- RODRIGUES, R.C.; BERENQUER-MURCIA, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Coupling chemical modification and immobilization to improve the catalytic performance of enzymes. *Adv. Synth. Catal.*, v. 353, p. 2216–2238, 2011.