

APERFEIÇOAMENTO DAS PROPRIEDADES CATALÍTICAS DE LECITASE IMOBILIZADA UTILIZANDO 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 foi imobilizada em brometo de cianogênio-agarose (através de ligação covalente) e em octil-agarose (através de ativação interfacial). As preparações imobilizadas foram incubadas em soluções de dextrano sulfato (DS) ou polietilenimina (PEI), para o revestimento de superfície da enzima. Em seguida, a atividade sob diferentes condições experimentais foi avaliada. A incubação com DS produziu uma diminuição significativa da atividade, usando CNBr-Lecitase, cerca de 50% e usando octil-Lecitase, foi de apenas cerca de 30%. A incubação com PEI produziu um efeito completamente diferente, usando octil-Lecitase a atividade aumentou em 30% enquanto com CNBr-Lecitase aumento mais duas vezes. Assim, os efeitos do revestimento com polímeros iônicos depende fortemente das condições experimentais e da técnica de imobilização utilizada.

1. INTRODUÇÃO

Lecitase Ultra é uma fosfolipase A1 quimera artificial, desenvolvida principalmente para processos de degomagem, embora fosfolipases A1 tenham usos diferentes na indústria. Esta enzima tem sido obtida a partir da fusão dos genes do lipase de *Thermomyces lanuginosus* (para obter uma boa estabilidade) e a fosfolipase de *Fusarium oxysporum* (para obter uma atividade de fosfolipase). Em alguns aspectos, Lecitase Ultra comporta-se como uma enzima lipase padrão, com a capacidade de se tornarem adsorvidas em superfícies hidrofóbicas em baixa força iônica (por exemplo, suportes hidrófobos) e apresentando uma ampla especificidade, segundo De Maria *et al.* (2007) e Fernandez-Lorente *et al.* (2007).

As propriedades das lipases (seletividade, especificidade) podem ser modulados. A modificação química é uma ferramenta poderosa para modular as propriedades das lipases, como alguns relatos na literatura mostrando o potencial dessa estratégia, como mostra Barbosa *et al.* (2012); Garcia-Galan *et al.* (2014) e Santos *et al.* (2014).

Assim, neste trabalho, mostramos as mudanças na atividade de Lecitase Ultra, especificidade e estabilidade, após o revestimento com dois polímeros diferentes, dextrano sulfato (DS) ou polietilenimina (PEI). A fim de verificar o efeito do protocolo de imobilização na modulação das

propriedades da enzima através de revestimento com polímero, foi utilizado uma estratégia de imobilização onde a forma aberta da enzima é estabilizada (utilizando imobilização reversível através da ativação interfacial em octil agarose) e uma outra em que ligação covalente é efetuada (usando brometo de cianogênio de agarose sob condições suaves para reduzir o número de ligações de enzima /suporte) como descrito nos trabalhos de Fernandez-Lafuente *et al.* (1998) e Santos *et al.* (2014).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Lecitase foi da Novozymes (Espanha). Octil-agarose e brometo de cianogênio reticulado 4% agarose (CNBr) eram da GE Healthcare. Polietilenimina (Mn 10000, Mw 25000), sulfato de dextrano (9000, 20000 Av. wt), p-nitrofenil butirato (p-NPB), R e S-metil mandelato, hexanoato de etilo, éter de p-nitrofenilfosfato (D-pNPP) e fenilacetato de metilo foram da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Glutaraldeído (25%, v/v estabilizado 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 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: de 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). 2,8 mL de extrato comercial (16 mg de proteína / mL, com uma atividade pNPB de 5,6 U / mg de proteína) foi diluída em 67,5 mL de fosfato de sódio 5 mM a pH 7. Em seguida, foi adicionado 15 g de octil-agarose. Atividade de sobrenadante e suspensão foi seguida 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. Atividade de sobrenadante e suspensão foi seguida usando pNPB. A imobilização da enzima foi terminada por incubação do suporte com etanonamina 1M, a pH 8, durante 12 h. Finalmente, a preparação imobilizada foi lavada com água destilada abundante.

2.4. Revestimento de Lecitase imobilizada com polímero iônico

Uma massa de 10 g de Lecitase imobilizada foi adicionada a 100 mL de PEI a pH 7 ou a pH 5 de soluções DS a concentração do polímero desejado. Atividade durante a incubação foi seguida pela atividade de pNPB, como no protocolo descrito acima.

2.5. Inativação térmica de diferentes preparações de Lecitase imobilizada

Para verificar a estabilidade dos derivados, 1g de enzima imobilizada foi suspenso em 5 mL de 10 mM de acetato de sódio a pH 5, fosfato de sódio a pH 7 ou carbonato de sódio, a pH 9, a diferentes temperaturas. Periodicamente, foram retiradas amostras e a atividade foi medida utilizando-se pNPB. As meias-vidas foram calculadas a partir dos cursos de inativação observados.

2.6. Inativação de diferentes preparações de Lecitase em presença de co-solvente orgânico

Preparações de enzima foram incubados em mistura de acetonitrilo a 30% em 100 mM de Tris-HCl a 7 e 25 °C para prosseguir com a desativação. Periodicamente, foram retiradas amostras e a atividade foi medida utilizando-se pNPB. As meias-vidas foram calculadas a partir dos cursos de inativação observados.

3. RESULTADOS

3.1. Efeito do revestimento com DS e PEI na atividade da Lecitase Ultra

Em primeiro lugar, os efeitos na atividade enzimática dos dois polímeros iônicos solúveis foram analisados. Enzima livre e PEI foram misturados, e um incremento inicial de atividade da enzima (após 2 horas da atividade chegou a 200%) foi encontrado, mas mais tarde a atividade da enzima diminuíram até valores próximos aos iniciais. Usando DS e enzima livre, a atividade permaneceu inalterada após 24 h. Apesar de não apreciar aumento da solução (usamos 0,05 mg de proteína/ ml), a possibilidade de algum tipo de agregação que poderia mascarar os efeitos do revestimento de polímero não podem ser descartadas. Então, decidimos focar no uso da enzima imobilizada, onde a formação de agregados não é possível.

A Figura 1 mostra o efeito sobre a atividade da enzima durante incubação de CNBr e octil-Lecitase em recipiente contendo soluções de PEI ou DS, com 50 mg de polímero por g de suporte. Incubação com DS produziu uma significativa diminuição na atividade. Usando CNBr Lecitase, após uma primeira queda rápida de cerca de 50%, a atividade foi estabilizada após 24 h de incubação. Usando octil-Lecitase, a diminuição da atividade foi de apenas cerca de 30%.

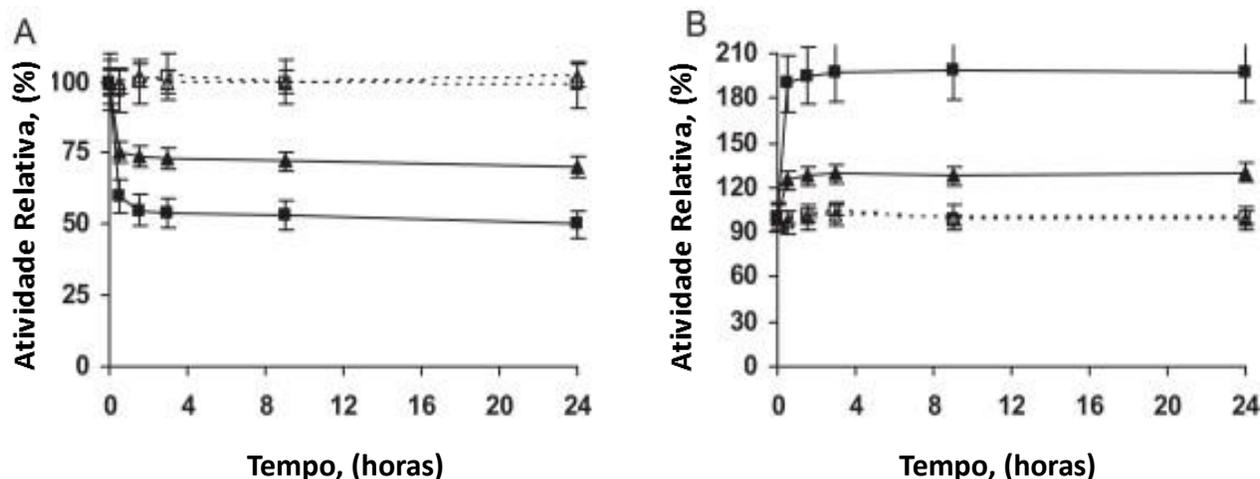


Figura 1 - Efeito sobre a atividade enzimática da incubação de diferentes preparações de Lecitase imobilizada com polímero iônico com. A quantidade de polímero foi de 50 mg/g de biocatalisador, e a incubação foi realizada a pH 7 (PEI de 25 kDa) ou de pH 5 (DS de 20 kDa) e 25 °C. Outras condições são descritas na seção métodos. Incubação com DS é mostrado no painel A, a incubação com PEI é mostrado no painel B. Quadrados: CNBr Lecitase, Triângulos: Octil-Lecitase. Linha sólida: presença de polímero. A linha tracejada: ausência de polímero.

A incubação com PEI produziu um efeito completamente diferente. A atividade de ambas as preparações de enzimas imobilizadas aumentou nos primeiros minutos. Octil - Lecitase aumentou a atividade em 30%, enquanto a CNBr - Lecitase o aumento da atividade foi mais do que duas vezes.

A enzima imobilizada covalentemente era mais sensível para o revestimento de polímero, tanto no efeito negativo de DS e no efeito positivo de PEI. Isto poderia ser explicado por várias razões. Primeiro, as regiões da proteína de exposição para a modificação pode ser diferente nas duas enzimas imobilizadas (o polímero é muito volumoso e não pode interagir com os domínios da proteína orientada para a superfície de suporte), e as possíveis alterações conformacionais provocadas pelos revestimentos podem ser diferentes. Em segundo lugar, a enzima imobilizada em agarose octil já tenha estabilizado a forma aberta, se os efeitos do polímero afetam a abertura/fechamento da enzima, este efeito pode ser perdido.

O efeito diferente dos dois polímeros pode estar relacionado com a diferença das áreas envolvidas dentro da modificação enzimática, há mais zonas catiônicas para DS e mais áreas aniônicas para os revestimentos com PEI, que aparentemente, tem um efeito completamente diferente da atividade da enzima.

3.2. Efeito sobre o perfil de atividade /pH

A Figura 2 mostra o perfil de 6 preparações de Lecitase sobre o perfil de atividade/pH. Octil- e CNBr Lecitase têm perfis muito diferentes; a preparação de octil tem a atividade máxima a pH mais elevado, o pH 10 (utilização de um pH mais elevado é difícil devido à hidrólise química de pNPB),

enquanto que a preparação covalente tem a atividade máxima a um pH de 8. Usando CNBr Lecitase, as alterações do perfil de pH/atividade, derivada a partir do revestimento com o polímero são muito mais relevante.

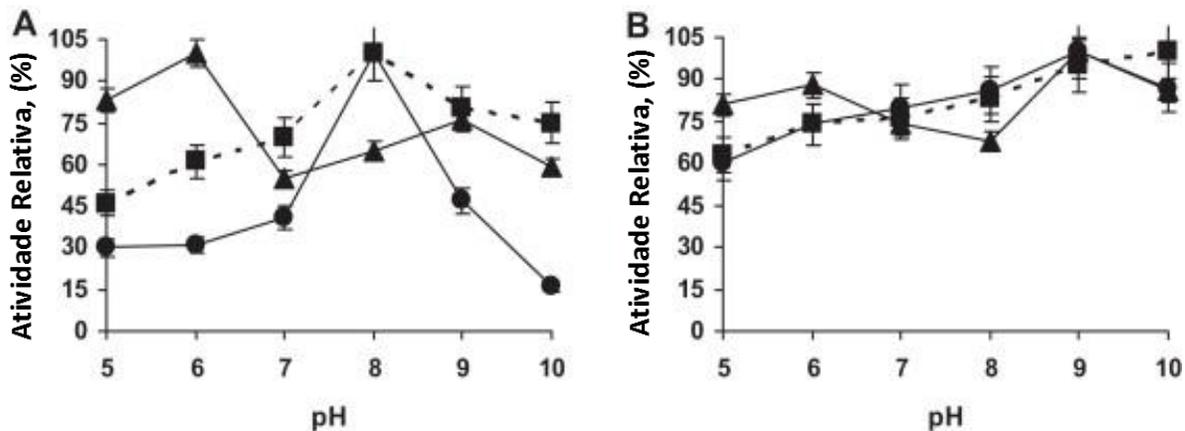


Figura 2. Efeito do pH sobre a atividade com pNPB de diferentes preparações de Lecitase. A atividade foi determinada como descrito na seção Métodos, a 25°C. 100% foi a atividade máxima relativa para cada biocatalisador. Painel A: CNBr Lecitase, Painel B: octil-Lecitase. Quadrado, linha tracejada: preparação não modificada; Triângulos, linha sólida: PEI revestido biocatalisador; Círculos: biocatalisador DS revestido.

Para octil-Lecitase revestida com PEI, o pH ideal foi de 9. A atividade aumentou entre pH de 5-6, diminuindo depois disso até atingir um novo máximo de pH 9. Estes dois valores máximos observados com ambas as preparações revestidas com PEI pode ser devido mudanças na intensidade da adsorção PEI sobre a enzima.

Usando o DS para o revestimento da enzima, a preparação com octil também possui a atividade máxima a pH 9 com uma queda na atividade a pH 10, enquanto que a preparação covalente tem o seu máximo com um pH 8, um máximo mais claro do que o uso de qualquer outra forma de preparação.

Assim, o tipo de polímero e a mudança de protocolo de imobilização a forma final da curva de Lecitase Ultra em atividade/pH, e o efeito é diferente utilizando ligação covalente ou a enzima adsorvida (no primeiro caso, as alterações são muito mais evidente).

3.3. Estabilidade das diferentes preparações sob diferentes condições

A Tabela 1 apresenta a meia-vida das 6 preparações de Lecitase imobilizada após inativação térmica a diferentes valores de pH. O revestimento da enzima pode ter qualquer tipo de efeito sobre a estabilidade da enzima, principalmente na produção de alterações graves na atividade enzimática. Por exemplo, se a atividade aumenta pelo revestimento e este polímero move-se, devido às condições experimentais, o efeito hiperativante pode perder-se a temperatura drástica e produzir uma “aparente” inativação da enzima.

Tabela 1 - Estabilidade térmica das diferentes preparações de Lecitase em diferentes condições. As meias-vidas são dadas em horas. Outras especificações estão descritos na seção métodos.

Biocatalyst	pH 5 (50 °C)	pH 7 (55 °C)	pH 9 (53 °C)
Octyl	1.5 ± 0.1	1 ± 0.1	0.70 ± 0.05
Octyl-PEI	9.1 ± 0.5	2.4 ± 0.3	0.75 ± 0.05
Octyl-DS	4.1 ± 0.2	0.6 ± 0.05	0.85 ± 0.05
CNBr	0.4 ± 0.05	0.5 ± 0.05	0.65 ± 0.05
CNBr-PEI	2.7 ± 0.1	0.6 ± 0.05	0.55 ± 0.05
CNBr-DS	1.4 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.80 ± 0.1

A Tabela 1 mostra que, em geral, alguns efeitos de estabilização podem ser encontrados após o revestimento de enzimas, o que sugere que este efeito hiperativante não foi perdido por incubação sob tais condições. Mais uma vez, isto depende da preparação do derivado e do polímero utilizado. A pH 5, o revestimento de PEI aumentou significativamente a estabilidade de ambas as preparações de enzima (em cerca de 6 vezes), enquanto o revestimento DS tem um efeito mais baixo (3-4 vezes). A pH7, o revestimento com PEI melhora por um fator de duas vezes a meia-vida da preparação em octil, enquanto que com DS melhorou 3 vezes a estabilidade da preparação covalente e reduziu pela metade a estabilidade da preparação de octil. A pH 9, apenas um aumento de 3 vezes na estabilidade da preparação covalente pode ser encontrado usando o revestimento com DS.

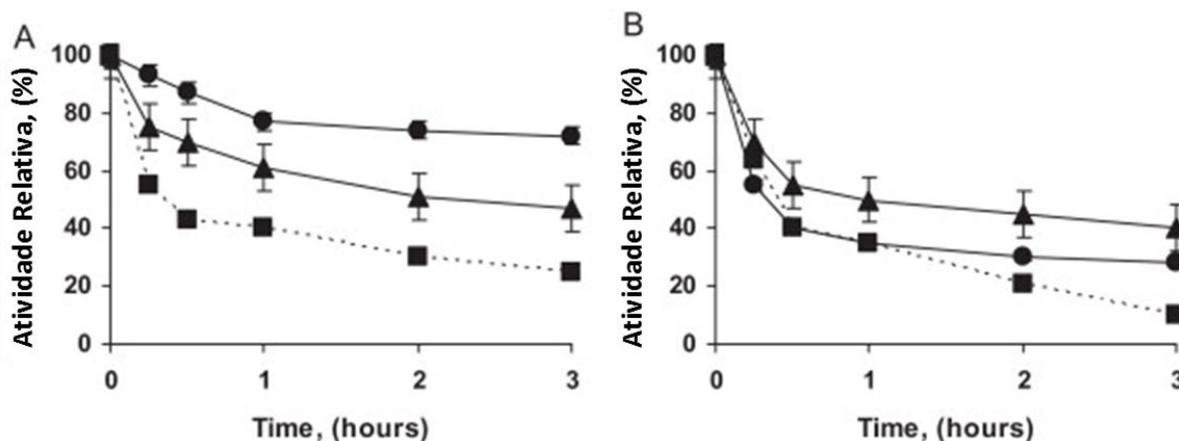


Figura 3 - Curso Inativação de diferentes preparações de Lecitase em 30% acetonitrilo. A incubação foi realizada como indicado na secção de Métodos. 100% foi a atividade inicial para cada biocatalisador. Painel A: CNBr Lecitase; Painel B: Octil-Lecitase. Quadrado, linha tracejada: preparação não modificada; Triângulos, linha sólida: PEI revestido biocatalisador; Círculos: biocatalisador DS revestido.

A Figura 3 mostra a inativação dos 6 biocatalisadores em 30% de acetonitrilo (escolhido por ter uma taxa de inativação suficientemente rápida). CNBr Lecitase tinha uma estabilidade melhorada após incubação com ambos os polímeros, por 6-7 vezes usando PEI e por cerca de 30 vezes usando DS.

O efeito positivo do revestimento do polímero pode estar relacionado com uma hidrofilição da enzima com o nano-ambiente, que pode produzir alguma partição do solvente orgânico para longe da enzima como mostrado nos trabalhos de Wilson *et al.* (2004) e Fernandez-Lafuente *et al.* (1999).

Como a enzima pode ser exposta a uma concentração mais baixa de solvente, o que produz uma melhoria significativa na estabilidade da enzima. Por outro lado, este efeito foi mais baixa em octil-Lecitase provavelmente porque a enzima pode ser desorvida a partir do suporte utilizando esta concentração de solvente (certa quantidade de proteína podia ser detectada no sobrenadante após inativação).

4. CONCLUSÃO

A incubação de Lecitase imobilizada em soluções de polímeros iônicos permite revestir as enzimas com o polímero, e este revestimento produziu alterações muito significativas nas propriedades da enzima. O revestimento com ambos DS e PEI produziu alguns efeitos benéficos sobre a estabilidade da enzima sob certas condições. Mais uma vez, este efeito positivo depende da preparação e das condições de inativação. Tendo em vista a melhoria da atividade em que o revestimento de PEI produziu em Lecitase, este efeito positivo do revestimento de polímero sobre a estabilidade da enzima sugere que o polímero pode permanecer adsorvido à enzima, mesmo a alta temperatura.

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

- BARBOSA, O.; RUIZ, M.; ORTIZ, C.; FERNÁNDEZ, M.; TORRES, R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; Modulation of the properties of immobilized CALB by chemical modification with 2,3,4-trinitrobenzenesulfonate or ethylenediamine. Advantages of using adsorbed lipases on hydrophobic supports. *Process. Biochem.*, v.47, p. 867–876, 2012.
- 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.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ARMISÉN, P.; SABUQUILLO, P.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J.M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chem. Phys. Lipids.* v.93, p.185–197, 1998.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R. ; ROSELL, C.M. ; CAANAN-HADEN, L.; RODES, L. ; GUISAN, J.M. Facile synthesis of artificial enzyme nano-environments via solid-phase chemistry of immobilized derivatives: dramatic stabilization of penicillin acylase versus organic solvents. *Enz. Microb. Technol.*, v.24, p. 96–103, 1999.
- 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.
- SANTOS, 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. Technol.* v.60, p.1–8, 2014.
- WILSON, L.; ILLANES, A.; ABIAN, O. ; PESSELA, B.C.C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J.M.. Co-aggregation of penicillin G acylase and polyionic polymers: an easy methodology to prepare enzyme biocatalysts stable in organic media. *Biomacromol.*, v.5, p.852–857, 2004.