

Efeitos de surfactantes na atividade catalítica da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01

Márcio de Barros¹, Maria Inês Rezende¹, Milena Martins Andrade², e Aneli M. Barbosa³

¹Universidade Estadual de Londrina - UEL – Departamento de Bioquímica e Biotecnologia
Caixa Postal 10011 – 86057-970 Londrina – PR E-mail:marciodebarros@hotmail.com

²Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – Coordenação de Licenciatura em Química
86812-460 – Apucarana – PR.

³Universidade Estadual de Londrina – UEL -Departamento de Química Caixa Postal 10011 – 86057-970
Londrina – PR

RESUMO

Lipases são proteínas com atividade catalítica que hidrolisam triacilgliceróis a ácido graxos e glicerol. Devido às suas peculiaridades, estas enzimas são promissoras para aplicação em diversos segmentos da indústria. Dando continuidade à pesquisa sobre a aplicação tecnológica da lipase de Botryosphaeria ribis EC-01, neste trabalho sua atividade foi avaliada em meio reacional contendo diferentes surfactantes com ou sem adição de íon Ca^{2+} , o qual pode ou não ativar a atividade de lipases. Observou-se que a atividade da lipase do B. ribis EC-01 diminuiu na presença dos surfactantes Brometo de cetiltrimetil amônio(CTAB) e Tween 80e manteve cerca de 45% da atividade em 12,4 mM de SDS. O íon Ca^{2+} não foi efetivo para manter ou elevar a atividade desta lipase nos surfactantes avaliados.

Palavras-chave: lipase, *Botryosphaeria ribis* EC-01, surfactante, íon cálcio.

INTRODUÇÃO

As lipases(EC 3.1.1.3; triacilglicerolacil hidrolases) são enzimas que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis a ácidos graxos e glicerol na interface entre as fases aquosa e lipídica (Jaeger;Eggert, 2002). Estas enzimas são promissoras para aplicações biotecnológicas por sua versatilidade em realizar reações de hidrólise e síntese, muitas vezes quimio, regio ou enantiosseletivas (Barros et al. 2010). As interações tensoativas de enzimas em soluções aquosas têm sido extensivamente estudadas para aplicações tecnológicas, uma vez que as interações entre proteínas e lipídeos devem ser compatíveis (Mendes et al. 2012). Neste estudo foi avaliado o efeito de três surfactantes (CTAB, Tween 80 e SDS) na atividade da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 com ou sem adição de íons cálcio.

MATERIAL E MÉTODOS

Materiais

Dodecil sulfato de sódio (SDS), brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB), Tween 80, palmitato de *p*-nitrofenila foram obtidos de Sigma-Aldrich (EUA).

Produção da Lipase pelo micro-organismo *Botryosphaeria ribis* EC-01

O fungo *ascomiceto* *B. ribis* (número de acesso Gen Bank DQ852308) foi mantido em batata-dextrose ágar a 4 °C e transferido para placas de Petri com meio mínimo de Vogel, glicose 1%

(m/v) e ágar 2% (m/v) por 5 dias a 28 °C. Sessenta e quatro esferas de ~0,7 cm de diâmetro, previamente colonizadas, com *B. ribis* EC-01 foram inoculadas em cada frasco de Erlenmeyer (2 L) contendo 400 mL de meio de Vogel e 1 % (v/v) de óleo de soja. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 180 rpm e 28 °C por 5 dias. Os cultivos foram interrompidos por centrifugação a 1500xg/15 min. a 4°C. Os sobrenadantes foram filtrados em papel Whatmann N°1 pregueado, em banho de gelo. Os filtrados foram dialisados contra água destilada a 4°C por 48 h com várias trocas de água, e em seguida, tratados com sulfato de amônio, sob agitação lenta e constante, até a saturação de 60% 4°C. A mistura permaneceu por 2 h a 4°C para total precipitação das proteínas. Após esse período, a mistura foi centrifugada (1000xg/15 min. a 4°C) e o precipitado obtido foi ressuscitado em água destilada, dialisado e então armazenado a -18°C, para futuras determinações analíticas.

Determinação da atividade de lipase

A atividade de lipase foi determinada por espectrofotometria, utilizando-se o palmitato de *p*-Nitrofenila como substrato a pH 8,0 e 55 °C, por 2 minutos, a 410 nm (Messias *et al.*, 2009). A unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de *p*-NP, em µmol, liberado por minuto, por mL da solução de enzima.

Efeitos de surfactantes na atividade da enzima

O efeito de surfactantes na atividade da lipase de *B. ribis* EC-01 foi avaliado determinando-se a atividade lipolítica da enzima no meio reacional contendo os surfactantes: Brometo decetiltrimetil amônio (CTAB), Tween 80 e Dodecil sulfato de sódio (SDS) com concentrações de 0 a 50 mM sem ou com adição de Ca²⁺ (1 e 5 mM).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Figuras 1, 2 e 3 demostram o efeito dos surfactantes CTAB, SDS e Tween 80 sem ou com adição do íon Ca²⁺ na atividade da lipase de *B. ribis* EC-01, respectivamente. Os surfactantes CTAB e Tween 80 apresentaram efeito negativo na atividade catalítica da lipase de *B. ribis* EC-01 em pequenas concentrações (1,5 mM). No entanto, pode-se observar que cerca de 45% da atividade enzimática foi mantida até 12,4 mM de SDS (Figura 2). Segundo Reis *et al.* (2009), geralmente as lipases apresentam aumento de sua atividade catalítica quando surfactantes neutros (como o Tween 80) e catiônicos (como CTAB) estão presentes, porém na presença de aniônicos (como o SDS), a lipase de *B. ribis* EC-01 mostrou-se mais ativa. Este indício pode ser importante para futuras aplicações em formulações de detergentes.

A lipase da semente de *Pachira aquatica* estudada por Polizelli et al. (2008) apresentou aumento de sua atividade catalítica quando na presença de CTAB, mesmo em altas concentrações (50 mM), porém decréscimo da mesma quando na presença de SDS. Para o Tween 80 obtiveram resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho. Os autores avaliaram também a atividade da enzima nos surfactante juntamente com o Ca²⁺, onde observaram um efeito negativo da adição do cálcio junto aos surfactantes na atividade lipolítica da enzima. Fato também observado neste trabalho.

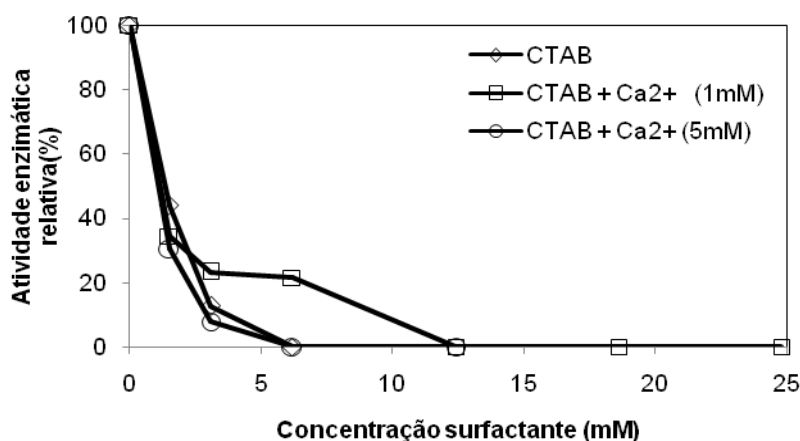


Figura 1: Efeito de diferentes concentrações de CTAB com e sem adição de íons cálcio na atividade catalítica da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01. Cada ponto constitui a média de triplicatas \pm SD.

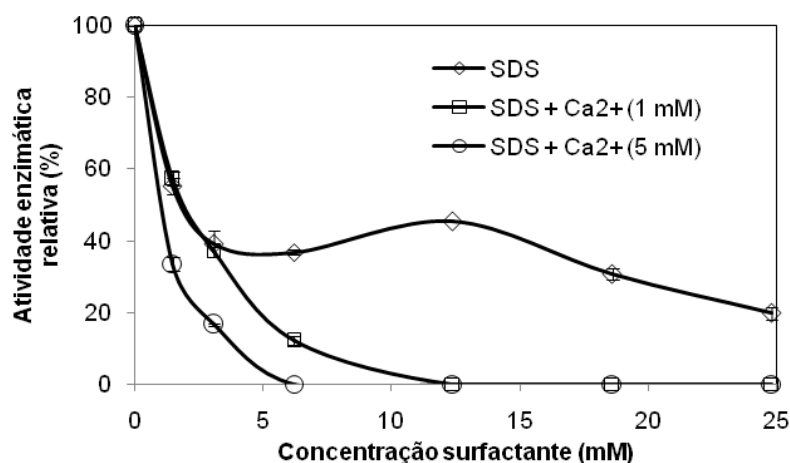


Figura 2: Efeito de diferentes concentrações de SDS com e sem adição de íons cálcio na atividade da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01. Cada ponto é uma média de triplicatas \pm SD.

Trabalhos na literatura relatam que o íon Ca^{2+} pode, em alguns casos, elevar a atividade de lipases em meio contendo surfactantes e contribuir para aumentar a atividade e estabilidade da enzima durante o processo reacional (Diaz et al. 2007; Polizelli et al. 2008; Mendes et al. 2012).

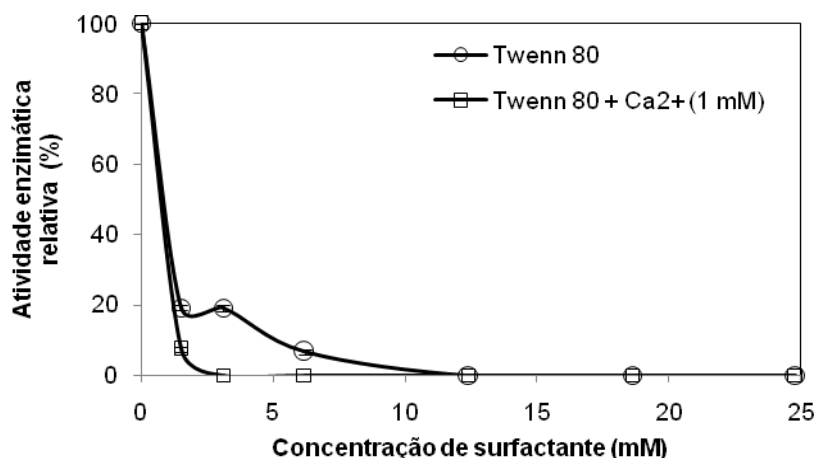


Figura 3: Efeito de diferentes concentrações de Tween 80 com e sem adição de íons cálcio na atividade da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01. Cada ponto é uma média de triplicatas \pm SD.

CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram que concentrações crescentes dos surfactantes Tween 80 e CTAB apresentaram efeito negativo na atividade da lipase de *B. ribis* EC-01, independentemente da adição de Ca^{2+} . Entretanto na presença de SDS, a lipase foi mais ativa tendo mantido cerca de 40 % de sua atividade, em altas concentrações, sem a presença de Ca^{2+} no meio reacional. Estes resultados são promissores para estudos futuros envolvendo esta lipase em formulações de detergentes já que este surfactante é amplamente utilizado.

REFERÊNCIAS

- BARROS, M., FLEURI, F.F., MACEDO, G.G. Seed Lipases: sources, applications and properties – a review. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 27 p. 15-29, 2010.
- JAEGER, K.E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, p.390-397,2002.
- MENDES, A. A., OLIVEIRA, P. C., DE CASTRO, H. F. Properties and biotechnological applications pancreatic lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 78, p. 119-134, 2012.
- MESSIAS, J.M.; COSTA, B.Z.; LIMA, V.M.G; DEKKER, R.F.H.; REZENDE, M.I.; KRIEGER, N.; BARBOSA, A.M. 2009. Screening *Botryosphaeria* species for lipases: Production of lipase by *Botryosphaeria ribis* EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. *Enzyme and. Microbial Technology*, v. 45, p. 426-431.
- OTERO, C., FERNANDEZ-PÉREZA, M., HERMOSOB, J.A., RIPOLL, M.M. Activation in the family of *Candida rugosa* lipases by polyethylene glycol. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 32 p. 225–229, 2005.
- Polizelli, P.P., Tiera, M.J., Bonilla-Rodriguez, G.O. Effect of Surfactants and Polyethylene Glycol on the Activity and Stability of a Lipase from Oilseeds of *Pachira aquatica*. *Journal American of Chemical Society* , v. 85, p. 749-753, 2008.
- REIS, P., HOLMBERG, K., WATZKE, H., LESER, M.E., MILLER, R. Lipases at interfaces: A review. *Advances in Colloid and interface Science*, v. 147-148, p.237-250, 2009.