

ADSORÇÃO FÍSICA DE LIPASE MICROBIANA EM MATRIZ HIDROFÓBICA: DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E TERMODINÂMICOS DOS BIOCATALISADORES PREPARADOS

J. J. BASSI, M. C. C. CUCATTI, F. A. P. LAGE e A. A. MENDES

Universidade Federal de Alfenas, Instituto de Química
E-mail para contato: adriano.mendes@unifal-mg.edu.br

RESUMO – Lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) foi imobilizada em partículas de poli-hidroxibutirato (PHB) para a preparação de biocatalisadores ativos. Neste estudo, foram oferecidos carregamentos de proteína de 0,5 a 100 mg/g de suporte. A adsorção da enzima seguiu o modelo de Langmuir ($R^2=0,9704$). Máxima atividade hidrolítica de 1300 UI/g de suporte e concentração de proteína imobilizada de $26,5 \pm 1,80$ mg/g foi alcançada. A imobilização da enzima realizada com carregamentos de proteína inferior a 3 mg exibiu hiperativação (atividade recuperada acima de 100%). A enzima livre mostrou máxima atividade hidrolítica em pH 8,0 e 60°C, enquanto que o biocatalisador preparado a pH 7,5 e 65°C. A imobilização aumentou ligeiramente a estabilidade térmica da enzima no intervalo de temperatura entre 30 e 50°C, confirmado por determinação dos parâmetros termodinâmicos energia livre de Gibbs (ΔG^0), entalpia (ΔH^0) e entropia (ΔS^0).

1. INTRODUÇÃO

Lipases são enzimas que atuam na interface orgânica-aquosa, catalisando a hidrólise de lipídeos para liberar ácidos orgânicos e glicerol, podendo a reação inversa (síntese) ocorrer em ambientes não aquosos. Este fenômeno é devido à sua capacidade de utilização em uma ampla gama de substratos, à sua estabilidade na presença de solventes orgânicos e à sua seletividade (Adlercreutz, 2013). Para que estas enzimas sejam empregadas em um determinado processo industrial, é necessária a sua reutilização e o aumento de sua estabilidade térmica. Neste contexto, diferentes técnicas de imobilização têm sido desenvolvidas para fornecer estabilidade às enzimas e facilitar a sua recuperação e reutilização (Miranda *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2014). Dentre os procedimentos de imobilização de lipases, a adsorção em suportes hidrofóbicos é uma estratégia bastante promissora porque permite a reutilização do suporte por dessorção de moléculas de enzimas inativas do microambiente do biocatalisador por diferentes compostos (detergentes, guanidina, etc) (Hernández *et al.*, 2011). Além disso, esta estratégia estabiliza moléculas de lipase na conformação aberta, promove a hiperativação e produz biocatalisadores altamente estáveis em diferentes condições experimentais.

O objetivo do presente estudo consiste na imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) em partículas mesoporosas de poli-hidroxibutirato (PHB), um suporte altamente hidrofóbico,

biodegradável e de baixo custo, para a obtenção de biocatalisadores ativos para posterior aplicação em reações de síntese de ésteres. Neste estudo, as propriedades catalíticas, bioquímicas e termodinâmicas dos biocatalisadores preparados foram determinadas pela hidrólise da emulsão de azeite de oliva.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

Lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) foi adquirida comercialmente da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA). LTL é uma solução enzimática com atividade hidrolítica de 220 UI/mL e concentração de proteína de 18 mg/mL. Partículas mesoporosas de poli-hidroxibutirato (PHB) (área superficial de 17 m²/g e diâmetro de poro de 3,1 nm) foram adquiridos da PHB Industrial (São Paulo/SP). Azeite de oliva (Carbonell) com baixa acidez (<0,2% m/m) foi adquirido em mercado local. Goma arábica foi adquirida da Synth (São Paulo/SP). Todos os outros reagentes empregados foram de grau analítico adquiridos das empresas Vetec Química e Synth (São Paulo/SP).

2.2. Preparação de biocatalisadores por adsorção física em PHB

A imobilização da lipase em PHB foi realizada em tampão fosfato de sódio pH 7,0 (5 mM) com diferentes carregamentos de proteína entre 0,5 e 100 mg/g de suporte (Miranda *et al.*, 2014). A suspensão suporte:solução enzimática (relação 1:20) foi mantida por 12 h a 25°C sob agitação em shaker (200 rpm). Ao final, o biocatalisador preparado foi filtrado e lavado com água destilada. Neste estudo, dois modelos de isotermas foram usados para ajustar os dados experimentais de adsorção de LTL em partículas de PHB: Langmuir e Freundlich (Foo e Hameed, 2010). Os dados foram analisados usando o software Origin Pro versão 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA). A concentração de proteína imobilizada (PI) foi quantificada com base na concentração inicialmente oferecida e a concentração residual presente no sobrenadante após a imobilização, determinada pelo método de Bradford (1976), empregando albumina sérica bovina como padrão. A atividade recuperada (AR) foi determinada pela relação entre a atividade hidrolítica dos biocatalisadores preparados (AH) e a atividade desaparecida no sobrenadante após a imobilização. A atividade hidrolítica foi determinada pelo método de hidrólise do azeite de oliva emulsificado com goma arábica a pH 8,0 (tampão fosfato de sódio 100 mM), 37 °C por 5 min de reação sob agitação em shaker (200 rpm), conforme metodologia descrita por Miranda *et al.* (2014).

2.3. Caracterização das propriedades bioquímicas de LTL solúvel e imobilizada

O efeito do pH na atividade catalítica de LTL solúvel e imobilizada foi determinada pela hidrólise da emulsão de azeite de oliva a 37 °C no intervalo de 5.0 a 9.0 (pH 5,0 - tampão de acetato de sódio 100 mM; pH 5,5-8,5 - tampão de fosfato de sódio 100 mM, pH 9,0 - tampão de bicarbonato de sódio 100 mM). A influência da temperatura foi determinada em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 8,0 (LTL solúvel) e 7,5 (LTL imobilizada) no intervalo de 30 a 70 °C. Os resultados obtidos foram plotados e a máxima atividade hidrolítica foi adotada como 100%. Neste estudo, foi empregado o biocatalisador preparado com carregamento de proteína de 5 mg/g de PHB.

2.4. Ensaios de estabilidade térmica dos biocatalisadores preparados: Determinação dos parâmetros termodinâmicos

Lipase solúvel e imobilizada, preparada com carregamento de proteína de 5 mg/g de PHB, foi incubada na presença em tampão fosfato de sódio pH 8 (100 mM) em diferentes temperaturas que variaram de 35 a 50 °C. Em tempos pré-determinados, amostras foram retiradas e determinadas as atividades hidrolíticas residuais (hidrólise da emulsão de azeite de oliva). As constantes de inativação térmica (k_d) e meia-vida ($t_{1/2}$) foram determinadas pelo modelo de decaimento não-linear (Sadana e Henley, 1987). Os parâmetros termodinâmicos como energia livre de Gibbs (ΔG^0), entalpia (ΔH^0) e entropia (ΔS^0) foram determinados de acordo com metodologia descrita por Kumar *et al.* (2013).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Determinação das propriedades catalíticas dos biocatalisadores preparados

De acordo com os resultados sumarizados na Tabela 1, máxima concentração de proteína imobilizada de $26,5 \pm 1,8$ mg/g de PHB foi alcançada para o biocatalisador preparado com máximo carregamento de proteína (100 mg/g de PHB). Com relação à atividade hidrolítica, o biocatalisador preparado por oferecendo máximo carregamento de proteína também apresentou máxima atividade, da ordem de 1300 UI/g de PHB. Entretanto, carregamentos acima de 40 mg de proteína/g de suporte não promoveram um aumento significativo nas propriedades catalíticas dos biocatalisadores como atividade hidrolítica e proteína imobilizada devido à saturação do suporte.

Tabela 1 – Propriedades catalíticas dos biocatalisadores preparados por imobilização de LTL em PHB

Carregamento de proteína (mg/g de suporte)	Propriedades Catalíticas		
	PI (mg/g de PHB)	AH (UI/g de biocatalisador)	AR (%)
0,5	$0,48 \pm 0,0$	$122,6 \pm 5,3$	$114,9 \pm 3,7$
2	$1,81 \pm 0,0$	$432,0 \pm 25,4$	$108,3 \pm 5,2$
3	$2,82 \pm 0,1$	$644,0 \pm 47,6$	$103,6 \pm 3,6$
5	$4,95 \pm 0,1$	$879,8 \pm 22,9$	$80,7 \pm 0,7$
8,5	$7,75 \pm 0,4$	$897,0 \pm 22,0$	$52,6 \pm 1,3$
15	$13,6 \pm 0,1$	$995,6 \pm 64,8$	$33,2 \pm 2,0$
25	$22,2 \pm 1,5$	$1038,0 \pm 14,0$	$21,5 \pm 2,1$
40	$24,7 \pm 1,1$	$1240,5 \pm 29,2$	$24,6 \pm 0,6$
60	$25,5 \pm 1,5$	$1300,0 \pm 60,3$	$23,8 \pm 0,3$
80	$26,0 \pm 0,6$	$1268,8 \pm 18,6$	$22,0 \pm 0,4$
100	$26,5 \pm 1,8$	$1308,3 \pm 10,4$	$22,6 \pm 1,4$

PI: proteína imobilizada; AH: atividade hidrolítica do derivado; AR: atividade recuperada.

Os biocatalisadores preparados em baixos carregamentos, inferior a 3 mg/g de PHB, exibiram hiperativação (atividade recuperada acima de 100%), como previamente descrito por Hernandez *et al.* (2011). Entretanto, aqueles preparados acima de 25 mg de proteína/g de PHB apresentaram

drástica redução da atividade recuperada, inferior a 25%, devido a efeitos difusivos (menor acessibilidade de moléculas de substratos ao microambiente do suporte) (Silva *et al.*, 2014).

Os dados experimentais da concentração de proteína imobilizada por adsorção física foram analisados pela aplicação de dois modelos de isotermas como Langmuir e Freundlich. De acordo com a Figura 1, o processo de imobilização de LTL em PHB foi adequadamente explicado pelo modelo de isoterma de Langmuir ($R^2=0,9704$), mostrando que a imobilização de LTL procedeu via monocamadas de moléculas de lipase sobre a superfície do suporte (Silva *et al.*, 2014). Os valores teóricos da constante de Langmuir (K_L) e máxima concentração de proteína adsorvida em partículas de PHB ($q_{máx}$) foram respectivamente 0,0668 mg/L e 27,0 mg/g de PHB, similar ao valor de $q_{máx}$ experimental mostrado na Tabela 1 ($26,5 \pm 1,8$ mg de proteína/g de PHB). O parâmetro $q_{máx}$ obtido a partir do modelo de isoterma de Langmuir revela uma elevada capacidade de PHB na imobilização de lipase. Este valor é similar ao encontrado para a imobilização de lipase de pâncreas de porco (LPP) em partículas de PHB por adsorção física (Silva *et al.*, 2014).

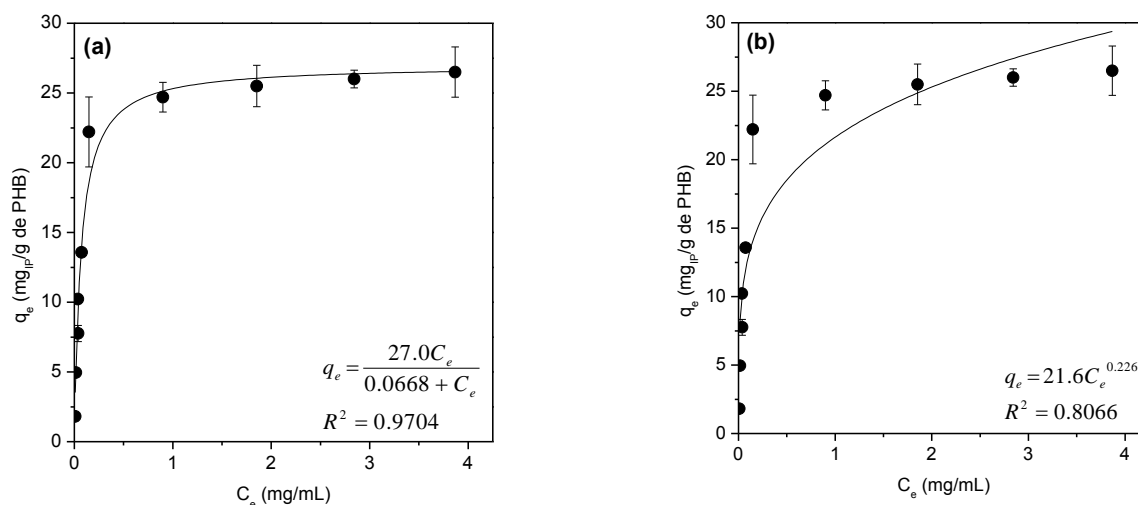


Figura 1 – Isotermas de adsorção de lipase em partículas de PHB: Langmuir (a) e Freundlich (b).

3.2. Influência do pH e temperatura na atividade hidrolítica dos biocatalisadores

O efeito do pH na atividade hidrolítica de LTL nas formas solúvel e imobilizada é mostrada na Figura 2. De acordo com os resultados obtidos, o pH ótimo da lipase solúvel foi 8,0. Entretanto, após o processo de imobilização, o pH ótimo da enzima deslocou 0,5 unidade para região ácida (pH ótimo=7,5). A Figura 2 também mostra que a lipase imobilizada foi menos ativa na faixa de pH de 4,0-6,5 e região alcalina acima de pH 8,0. No entanto, o biocatalisador preparado foi mais ativo próximo à neutralidade. Com relação ao efeito da temperatura, lipase solúvel exibiu máxima atividade catalítica a 60 °C, enquanto que a lipase imobilizada a 65 °C (Figura 3). Esses resultados mostram que o processo de imobilização conduziu a um aumento na rigidez da estrutura nativa da enzima.

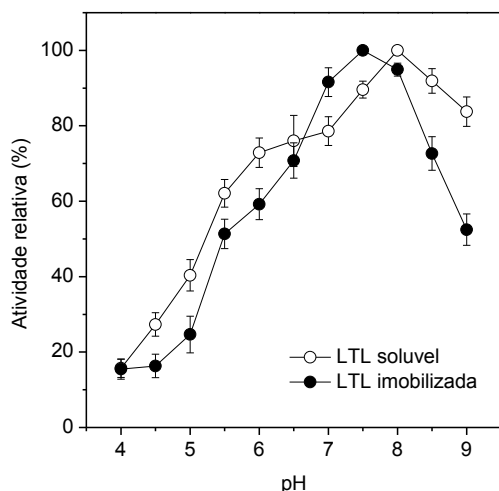


Figura 2 – Efeito do pH na atividade hidrolítica da lipase LTL solúvel e imobilizada.

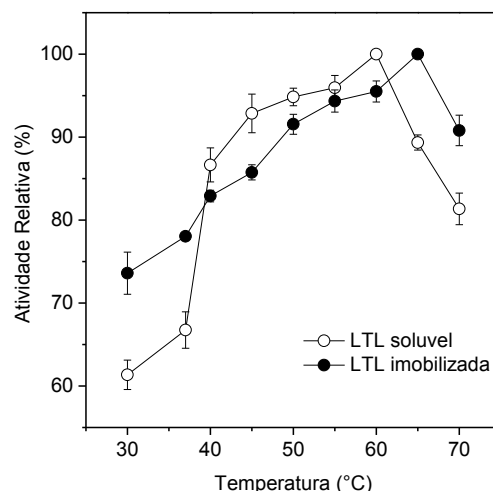


Figura 3 – Efeito da temperatura na atividade hidrolítica da lipase LTL solúvel e imobilizada.

3.3. Testes de estabilidade térmica e determinação de parâmetros termodinâmicos

Os perfis cinéticos de inativação da lipase solúvel e imobilizada são mostrados na Figura 4a,b. O aumento da temperatura de incubação também aumentou a inativação dos biocatalisadores nas formas solúvel e imobilizada, como esperado. A lipase imobilizada foi ligeiramente mais estável que a lipase na forma solúvel por incubação a 35, 40 e 45 °C, como mostrado abaixo. Por outro lado, ambos os biocatalisadores apresentaram perfil semelhante de inativação a 50 °C (Figura 4b), mantendo cerca de 20% de suas atividades iniciais após 10 min de incubação.

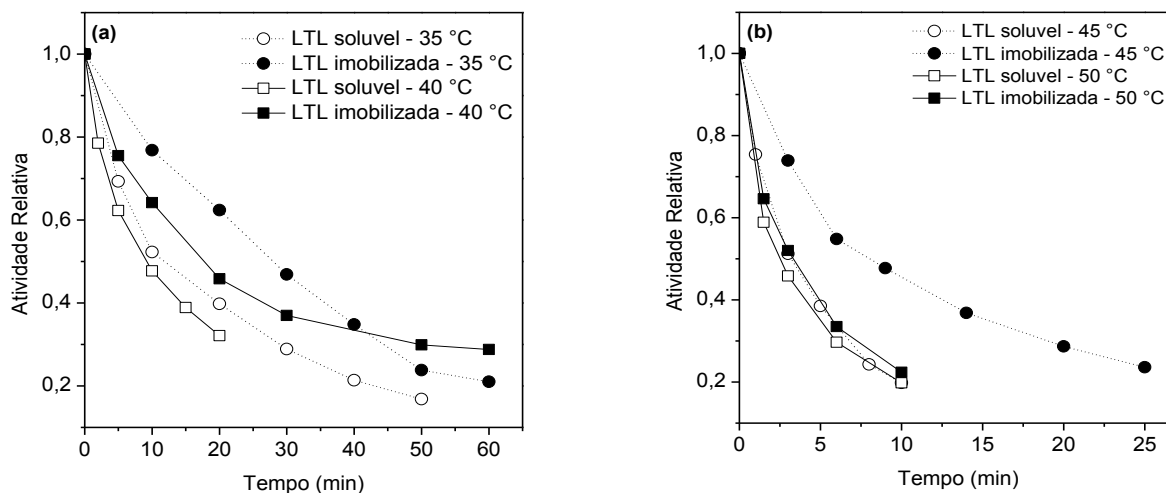


Figura 4 – Estabilidade térmica de lipase de *T. lanuginosus* (LTL) solúvel e imobilizada em PHB por incubação em pH 8,0 em diferentes temperaturas: 35 e 40 °C (a) e 45 e 50 °C (b).

Com os dados experimentais obtidos nos testes de inativação térmica, foi possível determinar os valores de constante de inativação térmica (k_d) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) dos biocatalisadores nas diferentes temperaturas de incubação pelo método de decaimento não-linear proposto por Sadana e Henley (1987). Os valores de k_d e $t_{1/2}$ estão sumarizados na Tabela 2. Para a lipase solúvel e imobilizada, os valores de k_d variaram entre $0,0815\text{--}0,426\text{ min}^{-1}$ e $0,0224\text{--}0,343\text{ min}^{-1}$ para menor e maior temperatura de incubação, respectivamente. Consequentemente, os valores do tempo de meia-vida para a lipase solúvel foram inferiores aos obtidos para a lipase imobilizada (Tabela 2), mostrando que a lipase imobilizada foi ligeiramente mais estável termicamente que a lipase na forma solúvel. Resultados semelhantes têm sido reportados por Kumar *et al.* (2013) e Tran *et al.* (2014) na imobilização de lipases microbianas em suportes ativados por diferentes estratégias.

Tabela 2 – Determinação de parâmetros de inativação térmica e termodinâmicos da lipase na forma solúvel e imobilizada incubadas em diferentes temperaturas.

Parâmetros	Biocatalisador	Temperatura (°C)			
		35	40	45	50
k_d (min^{-1})	Solúvel	0,0815	0,158	0,294	0,426
	Imobilizado	0,0224	0,0723	0,134	0,343
$t_{1/2}$ (min)	Solúvel	9,98	8,23	3,11	2,36
	Imobilizado	11,8	16,5	7,80	2,96
ΔH^0 (kJ/mol)	Solúvel	11,1	11,1	11,1	11,1
	Imobilizado	17,8	17,8	17,8	17,8
ΔG^0 (kJ/mol)	Solúvel	92,4	92,2	92,1	92,6
	Imobilizado	95,7	94,3	94,2	93,2
ΔS^0 (J/mol.K)	Solúvel	-264	-259	-255	-252
	Imobilizado	-254	-244	-240	-233

k_d : constante de inativação térmica; $t_{1/2}$: tempo de meia-vida; ΔH^0 : entalpia; ΔG^0 : energia livre de Gibbs; ΔS^0 : entropia.

A estimativa de parâmetros termodinâmicos fornece informações importantes sobre o mecanismo de inativação da enzima. Como mostrado na Figura 5, valores de energia de inativação térmica (E_d) para a lipase nas formas solúvel e imobilizada em PHB foi de 11,1 e 17,8 kJ/mol, respectivamente. E_d representa a energia necessária para iniciar a reação de inativação. Com base nestes resultados, o valor de E_d para a enzima imobilizada foi maior do que a lipase solúvel, confirmando que a lipase imobilizada foi mais estável termicamente que a sua forma solúvel. Assim, a inativação térmica das moléculas da lipase imobilizada requer uma maior energia de inativação devido à menor flexibilidade conformacional da estrutura tridimensional da enzima após o processo de imobilização (Kumar *et al.*, 2013; Tran *et al.*, 2014; Mendes *et al.*, 2014).

Com os valores determinados de energia de inativação térmica (E_d) para a lipase nas formas solúvel e imobilizada, foi possível determinar os parâmetros termodinâmicos como por meio de cálculos teóricos previamente reportados por Kumar *et al.* (2013) e Tran *et al.* (2014). Os valores destes parâmetros são mostrados na Tabela 2.

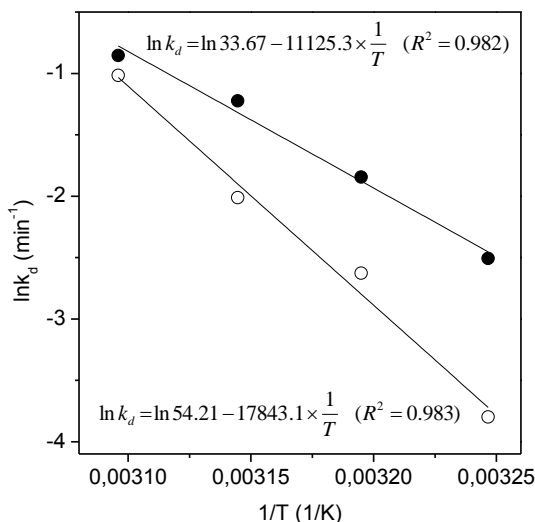


Figura 5 – Determinação da energia de inativação térmica (E_d) para a lipase na forma solúvel (○) e imobilizada (●).

De acordo com os resultados sumarizados na Tabela 2, os valores obtidos de ΔH^0 para a lipase solúvel e imobilizada não foram afetados pelos diferentes valores de temperatura de incubação. No entanto, a lipase imobilizada exibiu maior valor de entalpia em relação à lipase solúvel, 11,1 e 17,8 kJ/mol, respectivamente. O biocatalisador preparado apresentou também valores mais elevados de ΔG^0 do que a lipase solúvel. Estes resultados indicam um aumento da resistência da enzima imobilizada à inativação térmica (Miranda *et al.*, 2014; Tran *et al.*, 2014). Como mostrado na Tabela 2, os valores negativos obtidos para ΔS^0 variaram entre -264 e -252 J/mol.K e -254 e -233 J/mol.K respectivamente para a lipase solúvel e imobilizada TLL. Estes valores mostram que o biocatalisador preparado por imobilização por adsorção física em partículas hidrofóbicas de PHB foi termodinamicamente mais estável que a lipase solúvel (Kumar *et al.*, 2013). Estes resultados confirmam uma ligeira melhoria da estabilização térmica de LTL imobilizada em comparação à enzima na forma solúvel. Resultados semelhantes foram descritos anteriormente para a ligação covalente de lipase parcialmente purificada de *Bacillus* sp. DVL2 em esferas de óxido de alumínio previamente ativadas por glutaraldeído (Kumar *et al.*, 2013) e adsorção física de lipase de *Burkholderia* sp. em partículas modificadas quimicamente de Celite (Tran *et al.*, 2014).

5. CONCLUSÕES

A imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* (LTL) por adsorção física em partículas mesoporosas de PHB, um suporte altamente hidrofóbico, de baixo custo e renovável, permitiu obter biocatalisadores com elevada concentração de proteína imobilizada ($26,5 \pm 1,8$ mg/g de PHB) e atividade hidrolítica, da ordem de 1300 UI/g de PHB. O processo de imobilização obedeceu o modelo de isoterma de Langmuir, processo de adsorção de moléculas de enzima na forma de monocamadas sobre a superfície do suporte. A imobilização da enzima em suporte hidrofóbico alterou as propriedades catalíticas da enzima, visto que os valores ótimos de pH e temperatura foram

modificados após o procedimento de imobilização. Testes de estabilidade por incubação em diferentes temperaturas revelam uma melhor estabilização da estrutura nativa da enzima após a imobilização, na qual foi confirmada pela determinação de parâmetros termodinâmicos. Estes resultados mostram que o suporte testado é promissor na preparação de biocatalisadores ativos e estáveis para posterior aplicação em reações de interesse industrial.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPEMIG (Processo APQ-00968-12), CNPq (Processo 475289/2012–9), CAPES e FINEP pelo suporte financeiro. Os autores também agradecem à FAPEMIG pela concessão de bolsas à J. J. Bassi.

7. REFERÊNCIAS

- ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. *Chem. Soc. Rev.*, v. 42, p. 6406–6436, 2013.
- BRADFORD, A.A. 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.
- FOO, K.Y.; HAMEED, B.H. Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. *Chem. Eng. J.*, v. 156, p. 2-10, 2010.
- HERNÁNDEZ, K.; GARCIA-GALAN, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Simple and efficient immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on porous styrene–divinylbenzene beads. *Enzyme Microb. Technol.*, v. 49, p. 72-78, 2011.
- KUMAR, D.; NAGAR, S.; BHUSHAN, I.; KUMAR, L.; PARSHAD, R.; GUPTA, V.K. Covalent immobilization of organic solvent tolerant lipase on aluminum oxide pellets and its potential application in esterification reaction. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, v. 87, 51-61, 2013.
- MIRANDA, J.S.; SILVA, N.C.A.; BASSI, J.J.; CORRADINI, M.C.C.; LAGE, F.A.P.; HIRATA, D.B.; MENDES, A.A. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase on mesoporous poly-hydroxybutyrate particles and application in alkyl esters synthesis: Isotherm, thermodynamic and mass transfer studies. *Chem. Eng. J.* (2014). Trabalho aceito para publicação.
- SADANA, A.; HENLEY, J.P. Single-step unimolecular non-first-order enzyme deactivation kinetics. *Biotechnol. Bioeng.*, v. 30, p. 717-723, 1987.
- SILVA, N.C.A.; MIRANDA, J.S.; BOLINA, I.C.A.; SILVA, W.C.; HIRATA, D.B.; CASTRO, H.F.; MENDES, A.A. Immobilization of porcine pancreatic lipase on poly-hydroxybutyrate particles for the production of ethyl esters from macaw palm oils and pineapple flavor. *Biochem. Eng. J.*, v. 82, p. 139-149, 2014.
- TRAN, D.T.; CHANG, J.S. Kinetics of enzymatic transesterification and thermal deactivation using immobilized *Burkholderia* lipase as catalyst. *Bioprocess. Biosyst. Eng.*, v. 37, p. 481-491, 2014.