

## IMOBILIZAÇÃO COVALENTE MULTIPONTUAL E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA LIPASE DE *Aspergillus niger* EM PÓ DE SABUGO DE MILHO.

V. G. BATISTA<sup>1</sup>, R. MONTI<sup>2</sup>, J. P. M. GALÁN<sup>3</sup>, A. V. DE PAULA<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Univ Estadual Paulista, UNESP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas

<sup>2</sup> Univ Estadual Paulista, UNESP, Departamento de Alimentos e Nutrição

<sup>3</sup> Universidad de Antioquia, UdeA, Escuela de Nutrición y Dietética

<sup>4</sup> Univ Estadual Paulista, UNESP, Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia

E-mail para contato: viguerso97@gmail.com, ariela@fcfar.unesp.br

**RESUMO** – O Brasil é um dos maiores produtores de milho do mundo e o grande volume de produção implica na geração de muitos resíduos. Um deles é o pó do sabugo, um material lignocelulósico com grande potencial para ser utilizado como suporte em imobilização de enzimas. Neste contexto, este trabalho teve por objetivo imobilizar a lipase de *Aspergillus niger* em pó de sabugo de milho, empregando-se o método de ligação covalente multipontual, e caracterizar o derivado imobilizado com relação aos seus valores ótimos de pH, temperatura e estabilidade (térmica e ao pH). Para isso, o suporte utilizado foi previamente funcionalizado com grupamentos glixil, fornecendo um rendimento de imobilização de 39%. O derivado imobilizado por ligação covalente apresentou pH ótimo de 6,5 e temperatura ótima de 35°C. Com relação à estabilidade térmica, o biocatalisador apresentou maior estabilidade em temperaturas de até 45°C. Finalmente, o biocatalisador apresentou boa estabilidade em faixas de pH alcalino. Portanto, esta metodologia de imobilização mostrou-se adequada para imobilização da lipase de *Aspergillus niger*, permitindo a obtenção de um derivado imobilizado com satisfatória estabilidade.

### 1. INTRODUÇÃO:

A utilização de enzimas em processos industriais é vantajosa, pois possibilita a redução da geração de rejeitos industriais prejudiciais ao meio ambiente e promove economia em energia e preservação dos tanques reacionais, uma vez que estes biocatalisadores não necessitam de altas temperaturas e pressões (SAID; PIETRO, 2014).

Uma das enzimas mais importantes em biotecnologia é a lipase, classificadas como triacilglicerol acilhidrolases (E.C.3.1.1.3), são muito utilizadas em processos oleoquímicos, formulação de detergentes, síntese orgânica e indústria alimentícia. Por esse fato, são constantes objetos de estudo e pesquisa (SAID; PIETRO, 2014).

Considerando-se as aplicações industriais, torna-se vantajoso utilizar enzimas na forma imobilizada, uma vez que são mais estáveis e podem ser facilmente recuperadas do meio reacional, possibilitando economia no custo global do processo. Os métodos de imobilização variam desde a adsorção física sobre o suporte até a encapsulação em matrizes sol-gel (BON; FERRARA; CORVO, 2008).

A aplicação de enzimas imobilizadas hoje tem sido prejudicada pela utilização de suportes caros, limitando o processo. Portanto, encontrar um suporte barato e prontamente disponível para a imobilização da enzima é essencial para o desenvolvimento de novos biocatalisadores imobilizados (BORNSCHEUER, 2012).

Um método bastante utilizado é o de ligação covalente, que consiste na ligação química entre regiões ativas do suporte e de fragmentos dos aminoácidos que constituem a proteína. Dessa forma, é produzida uma enzima mais estável que atua sob condições reacionais bastante amplas (PAULA, 2011).

No entanto, o bom desempenho de um biocatalisador imobilizado relaciona-se também à escolha adequada do suporte de imobilização. Destaque especial é dado ao pó de sabugo de milho. Este material é propício para utilização como suporte, pois é composto basicamente por lignina e celulose que apresentam regiões propensas a interagir com os aminoácidos de proteínas (BASSAN et al., 2016). Além disso, vale ressaltar que o Brasil é um dos maiores produtores de milho do mundo. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), na safra 2014/2015 a produção desse vegetal rendeu 84,7 milhões de toneladas (MIRANDA, 2016). Portanto, a geração de resíduos agrícolas também é volumosa, o que faz com que o uso do pó de sabugo de milho como suporte de imobilização de enzimas agregue valor à este resíduo.

Neste contexto, este trabalho teve por objetivo imobilizar lipase de *Aspergillus niger* em pó de sabugo de milho, por ligação covalente multipontual, e caracterizar o derivado imobilizado resultante com relação aos valores ótimos de pH, temperatura e estabilidade.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Materiais

A lipase de *Aspergillus niger* foi obtida da Novozymes e os reagentes para a imobilização foram da Sigma Chemicals (St Louis, MO, USA). Os demais reagentes químicos foram de grau analítico.

### 2.2 Métodos

**Imobilização:** Para a imobilização da lipase no suporte pó de sabugo de milho-Glioxil (PSM-Glioxil) o Pó de sabugo de milho foi funcionalizado, de acordo com Bassan et al., (2016). A imobilização foi realizada na proporção de 1 g do suporte, previamente preparado, para 10 mL de solução enzimática (5mg/ mL de tampão bicarbonato 100 mmol/L pH 10,0). A suspensão foi suavemente agitada em rolo agitador a temperatura ambiente (25°C), durante 24 h. Depois disso, o derivado foi reduzido com boro-hidreto de sódio (1mg/mL) por 30 min e depois lavado com água destilada e tampão de atividade. Para avaliar a porcentagem de imobilização, amostras do sobrenadante foram periodicamente retiradas e a proteína residual foi medida.

**Rendimento de imobilização:** O rendimento é um parâmetro para determinar a eficiência do processo de imobilização, sendo mais eficiente na medida que se consiga imobilizar a maior quantidade de enzima possível. Após a imobilização da lipase, realizou-se a determinação do rendimento de imobilização pela seguinte equação:

$$RI = \frac{PI - PF}{PF} \times 100$$

Onde: RI = Rendimento (%); PI = Proteína inicial (mg/mL) livre; PF = Proteína final do sobrenadante (mg/mL).

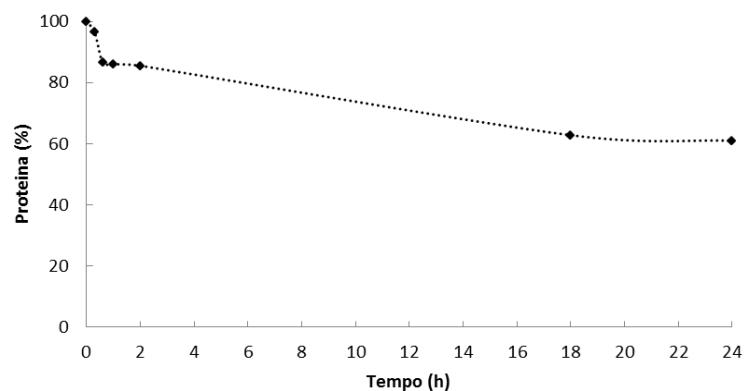
**Atividade Hidrolítica:** Foi determinada pelo método titulométrico, utilizando como substrato óleo de oliva (5% p/v) emulsionado em goma arábica (5% p/v) e tampão fosfato (25mM, pH 7,0). Uma unidade de atividade lipolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de ácido graxo por min de reação nas condições do ensaio (PAULA , 2012).

**Caraterização:** O pH de máxima atividade foi determinado a 40°C em diferentes faixas de pH (3– 8,0) em tampão McIlvaine. Temperatura de máxima atividade foi avaliada a temperaturas na faixa de 25-70°C. A estabilidade ao pH foi estudada incubando a enzima a 40°C por 1 hora variando o pH de 3,0-8,0. A determinação da termoestabilidade das enzimas livre e imobilizada foi avaliada determinando-se atividade residual após incubação das enzimas na ausência de substrato a temperaturas variando de 25-70°C por 1 hora. Dosagem de proteína foi medido pelo método de Bradford, M., 1976 com absorvância = 2,7086 (mg.mL)<sup>-1</sup> da curva analítica.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Imobilização

De acordo com a figura 1, pode-se observar que a enzima em estudo apresentou nas primeiras 2 horas de imobilização uma diminuição no teor de proteína para 85%, obtendo assim 15% de imobilização neste período de tempo. Ao final das 24 horas, a proteína presente no sobrenadante caiu para 61%, caracterizando um rendimento final de imobilização de 39%, permitindo assim, sua imobilização covalente multipontual.

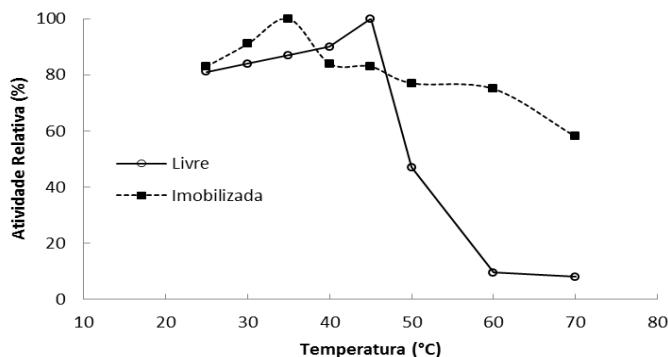


**Figura 1. Perfil de imobilização da lipase de *Aspergillus niger***

### 3.2 Temperatura de máxima atividade.

A figura 2 mostra que quando immobilizada, a enzima apresenta temperatura ótima em 35°C, enquanto a livre 45°C. Esta diferença pode ser explicada devido a maior estabilidade que as enzimas immobilizadas apresentam, exigindo menos temperatura para atingirem seu máximo poder catalítico.

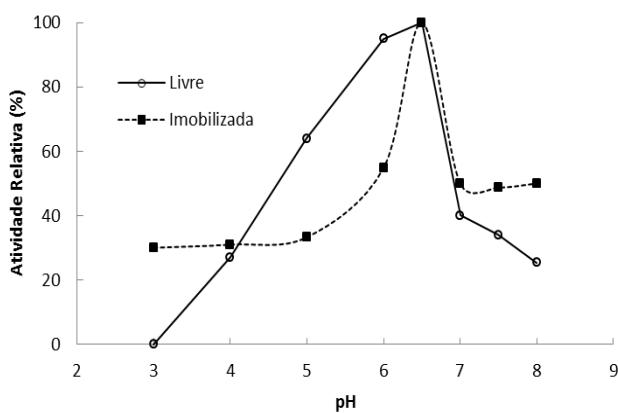
Figura 2 – Atividade relativa em função da temperatura da enzima livre e immobilizada



### 3.3 pH ótimo

A Figura 3 mostra o efeito do pH na atividade das enzimas livre e immobilizada. Houve redução da sensibilidade da enzima ao pH após a immobilização. Em pH 6,5 ambas enzimas apresentaram atividade ótima. Entretanto, a enzima livre apresentou somente 20% de atividade no pH 8, enquanto a atividade da enzima immobilizada foi de 50%.

Figura 3 – Atividade relativa em função do pH da enzima livre e immobilizada

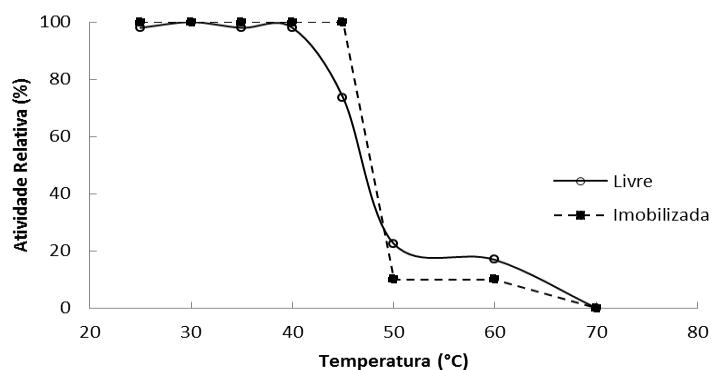


### 3.4 Estabilidade

A Figura 4 apresenta os valores de atividade residual das enzimas livre e immobilizada após 1 hora de exposição a diferentes temperaturas na ausência do substrato. É bastante clara a maior termoestabilidade da enzima immobilizada. Após 1 hora a 45 °C, a enzima livre reteve 70% da atividade inicial, enquanto a enzima immobilizada reteve 100% da atividade inicial. O

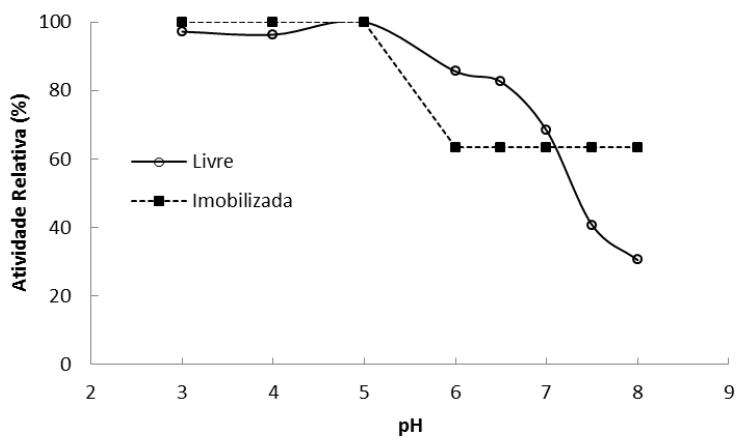
aumento da estabilidade pode se dar em função da estabilização da estrutura da proteína ou simplesmente porque enzimas imobilizadas estão menos acessíveis a agentes desnaturantes (Marconi, 1989). Essa estabilidade é regida pelo número e a natureza das ligações formadas entre a enzima e o suporte; pelo grau de confinamento da enzima ao suporte; pelo microambiente formado entre a enzima e o suporte e as condições de imobilização (Cao, 2005).

Figura 4 – Termoestabilidade da lipase de *Aspergillus niger* livre e imobilizada em pó de sabugo de milho



A Figura 5 apresenta os valores de atividade residual das enzimas livre e imobilizada após 1 hora de exposição a diferentes pH's na ausência do substrato. É notável a maior estabilidade frente ao pH da enzima imobilizada. Após 1 hora a pH 7,5 a enzima livre reteve 40% da atividade inicial, enquanto a enzima imobilizada reteve 63% da atividade inicial. O aumento da estabilidade pode se dar em função da estabilização da estrutura da proteína. Essa estabilidade é regida pelo número e a natureza das ligações formadas entre a enzima e o suporte (Cao, 2005).

Figura 5 – Estabilidade em pH da lipase de *Aspergillus niger* livre e imobilizada em pó de sabugo de milho



#### 4. CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que o sabugo de milho-glixoxil é um suporte promissor para imobilização da lipase de *A. niger*. Através do desenvolvimento deste trabalho foi possível a determinação dos valores ótimos de pH (6,5) e temperatura (35 °C) do derivado imobilizado, que apresentou ótima estabilidade quando comparado com a enzima livre.

#### 5. REFERÊNCIAS

- BASSAN, J. C. *et al.* Immobilization of Trypsin in Lignocellulosic Waste Material to Produce Peptides with Bioactive Potential from Whey Protein. **Materials**, v. 9, n. 357, mai. 2016.
- BORNSCHEUER, UT; HUISMAN, GW; KAZLAUSKAS, RJ; LUTZ, S; MOORE, JC and ROBINS, K. 2012. Nature, 485: 185-194.
- BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia:** Produção, Aplicações e Mercado. 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. 506 p.
- CAO, L. 2005. Immobilised enzymes: science or art? *Curr Opin Chem Biol* 9(2): 217-226.
- MARCONI, W. 1989. Immobilized enzymes: their catalytic behaviour and their industrial and analytical applications. *Reactive Polymers* , 11, 1-19.
- MIRANDA, R. A. Um Ano de Extremos para a Produção de Milho. **Embrapa**, nov. 2016. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/17979608/artigo---2016-um-ano-de-extremos-para-a-producao-de-milho.>>. Acesso em: 7 fev. 2017.
- PAULA, A. V. Reestruturação da gordura do leite por interesterificação enzimática empregando lipase imobilizada: otimização das condições reacionais e operacionais. 2011. 184 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.
- SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. Enzimas como agentes biotecnológicos. 2. ed. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2014. 383 p.