

IMOBILIZAÇÃO DA FITASE EM ZEÓLITA MODIFICADA COM NÍQUEL: UMA FERRAMENTA PARA MELHORIA DA ATIVIDADE CATALÍTICAM. M. Lopes^{1,2,*}, T. C. Coutinho^{1,2}, C. S. Farinas^{1,2}¹ Embrapa Instrumentação, Rua XV de Novembro, 1452, 13560970, São Carlos, SP² Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luiz, 13565-905, São Carlos, SP

* Autor correspondente, e-mail: maah_momesso@hotmail.com

Resumo: A fitase é uma enzima capaz de liberar ao menos um grupo fosfato na reação de hidrólise do fitato. Sua principal aplicação é como aditivo em ração animal, podendo atuar também na solução de problemas ambientais e nas indústrias de alimentos, de biocombustíveis e fármacos. A imobilização desta enzima se faz interessante no sentido de melhorar suas propriedades, tornando ainda mais vantajosa a sua utilização nestes segmentos. Neste trabalho, a fitase foi imobilizada em suporte zeolítico modificado com níquel e o estudo do processo de imobilização mostrou a interação eletrostática como principal interação entre enzima e suporte. Após a imobilização, a atividade catalítica foi favorecida, como observado no elevado valor de atividade recuperada obtido (150,33%). Durante a hidrólise do fitato em reação a 37°C por 5 h e carga de 30 UI/g suporte, observou-se uma melhoria da atividade catalítica, com liberação até 20% maior de fósforo pela enzima imobilizada em comparação à enzima livre. Os resultados mostram as vantagens da utilização da enzima imobilizada quando comparada à enzima livre, baseado na melhora da atividade catalítica ocasionada pelo processo de imobilização, indicando o potencial da aplicação da fitase na forma imobilizada nos diversos setores de sua atuação.

Palavras-chave: fitase, imobilização enzimática, zeólita, níquel.

PHYTASE IMMOBILIZATION ON ZEOLITE MODIFIED WITH NICKEL: A TOOL OF IMPROVEMENT ON CATALYTIC ACTIVITY

Abstract: Phytase is an enzyme that releases at least one phosphate group during the hydrolysis of phytate. Its main application is as an additive in animal feed and also act in solutions to environmental problems and in the food, biofuels and pharmaceutical industry. The immobilization of phytase is interesting to improve its properties, becoming even more advantageous the use of the enzyme in these fields. In this work, phytase was immobilized on a zeolitic support modified with nickel, which immobilization process showed that electrostatic interaction was the main interaction between enzyme and support. After immobilization, catalytic activity was favored, as observed in its high value of recovered activity obtained (150.33%). The phytate hydrolysis during 5 h of reaction at 37°C using 30 IU/g support demonstrates an improvement of catalytic activity, with the release of phosphorous 20% higher by the immobilized enzyme than by the free enzyme. The results presented the advantages of the immobilized enzyme compared to the free enzyme, based on the catalytic activity improvements caused by the immobilization process, indicating the potential of the application of phytase in immobilized form in the various sectors which it can act.

Keywords: phytase, enzymatic immobilization, zeolite, nickel.

1. Introdução

As fitases são enzimas que atuam na hidrólise do fitato, liberando ao menos um fosfato e vêm sendo cada vez mais estudadas pela sua capacidade de atuar em diversos segmentos, como aditivo em ração animal (sua principal aplicação), na indústria de alimentos, de biocombustíveis, de fármacos e nas soluções para problemas ambientais, tais como eutrofização e degradação de

pesticidas, biofertilizantes e biosensores (GESSLER et al., 2018; GONTIA-MISHRA; TIWARI, 2013; MRUDULA VASUDEVAN et al., 2019; RAO et al., 2009).

As propriedades catalíticas da fitase podem ser melhoradas através da imobilização enzimática, tornando seu uso ainda mais atrativo. A imobilização de enzimas pode ser alcançada por diferentes tipos de interação entre enzima e suporte, e para uma imobilização eficiente, devem ser analisadas características do suporte e da enzima, além da aplicação desejada para a enzima imobilizada (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2017; SHELDON; VAN PELT, 2013).

As zeólitas apresentam características como alta capacidade de adsorção, área superficial elevada, estabilidade térmica e mecânica e alta capacidade de troca de íons (DAVIS, 1991). As zeólitas são aplicadas em diversos segmentos, entre eles, como aditivo em detergentes, na remoção de isótopos radioativos e contaminantes de águas, aditivo em rações e na indústria de refinaria de óleos (BACAKOVA et al., 2018; RHODES, 2010; WECKHUYSSEN; YU, 2015). Devido às suas excelentes propriedades, além destas aplicações, as zeólitas são atrativas para atuarem como suportes em imobilização de enzimas.

Considerando o interesse em melhorar as propriedades das fitases e as características das zeólitas que as tornam atrativas como suportes para imobilização enzimática, o presente trabalho tem como objetivo a imobilização da fitase em zeólitas modificadas com níquel, buscando avaliar a influência do processo de imobilização nas propriedades da enzima imobilizada, principalmente a atividade catalítica.

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

A enzima utilizada foi a enzima comercial da Natuphos® E 10000 (BASF), a zeólita comercial 4A Diatom® e o substrato ácido fítico da Sigma-Aldrich (St. Louis, US). Todos os outros reagentes apresentavam grau analítico.

2.2. Modificação do suporte

O suporte foi modificado adicionando o sal NiSO_4 , na concentração de 50 mM à suspensão de zeólita ($0,5\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Esta suspensão foi agitada a 360°C , 30 rpm por 1h, centrifugada por 15 minutos, 8000 rpm, lavada com água destilada e seca em estufa a 50°C por 30 minutos.

2.3. Processo de imobilização

Este processo consiste na preparação da solução de imobilização com suporte na concentração de $0,05\text{g}/\text{mL}$, carga enzimática de 1 mg de proteína/g suporte e o tampão de imobilização no pH e força iônica adequados para cada ensaio. As suspensões de imobilização foram submetidas à agitação 360°C , 30 rpm por 2 h em temperatura ambiente. Os derivados obtidos foram centrifugados por 2 min a 8000 rpm e lavados 3 vezes com o tampão de imobilização. A concentração de proteína dos sobrenadantes das lavagens foi quantificada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) a fim de calcular os valores de rendimento de imobilização (RI). Os valores de atividade recuperada (AR) foram obtidos de acordo com método descrito por Harland e Harland (1980) com modificações.

2.4. Efeito do pH e da força iônica no processo de imobilização

Foram realizados os processos de imobilização com tampões na força iônica de 20 mM, variando os pHs em 3, 5, 7 e 9, para determinar o melhor pH de imobilização com base nos valores de RI e AR. Com o tampão no pH selecionado, foram realizados os processos de imobilização variando as forças iônicas em 20 mM, 50 mM, 100 mM e 200 mM, assim definindo a melhor condição de imobilização para o processo. Os ensaios foram realizados em duplicata.

2.5. Avaliação da influência do Ni na atividade enzimática

Foi preparada uma solução estoque de NiSO_4 , a qual foi adicionada a 2,5 mL de substrato na

concentração de 1,66 mg de fitato em 1 mL de tampão acetato pH 5 100 mM, para reagir com 50 μ L de enzima livre. A solução de NiSO₄ foi adicionada ao substrato de forma a atingir concentrações de 10 mM, 5 mM e 1 mM na reação, a qual ocorreu por 15 minutos a 37°C. O controle baseou-se na reação enzimática sem a presença do NiSO₄ e as medidas foram realizadas em duplicata.

2.6. Cinética de hidrólise do fitato

A hidrólise do fitato foi realizada com a fitase livre e imobilizada. O substrato foi preparado em tampão acetato de sódio pH 5, 100 mM, utilizando 20% de carga de sólidos (m/v) e 30 UI/g de substrato. As soluções reacionais permaneceram em agitação 360°C, 30 rpm, 37°C por 5h. Aliquotas foram retiradas em diferentes tempos para quantificar concentração de fósforo liberada nas mesmas em μ mol/mL.

3. Resultados e Discussão

O estudo do efeito do pH e da força iônica no processo de imobilização possibilitou a definição dos parâmetros que mais favoreceram a interação entre enzima e suporte com base nos valores de RI e AR. Também foi possível inferir qual o tipo de interação predominantemente contribuiu para a adsorção.

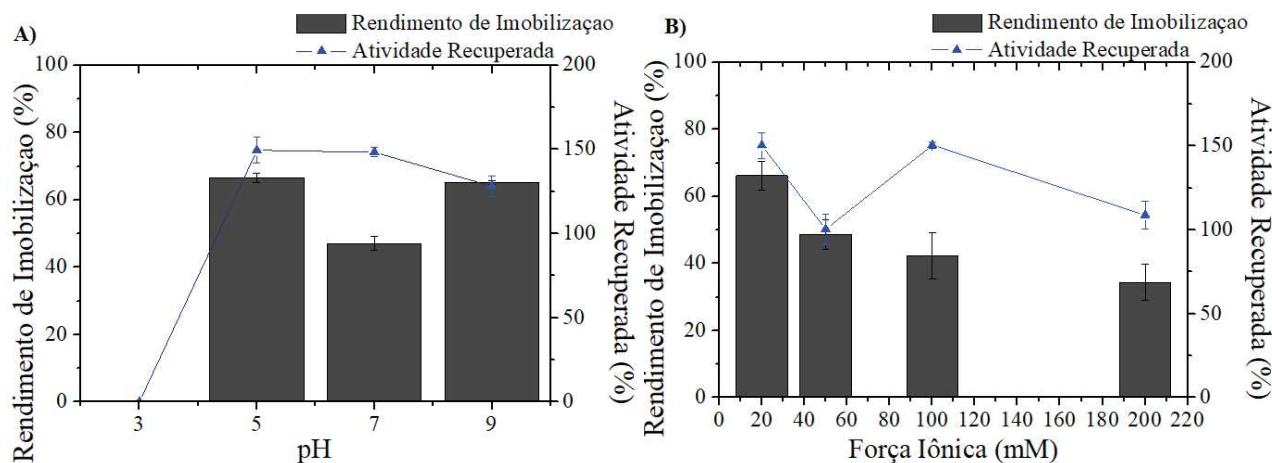


Figura 1. Estudo do efeito de A) diferentes pHs e B) diferentes forças iônicas no processo de imobilização. Carga enzimática de 1 mg proteína/ g suporte, tempo de adsorção de 2h. Os ensaios foram feitos em duplicata.

O pH 5 foi considerado o melhor pH para a imobilização (Fig. 1A), no qual a enzima está negativa de acordo com seu ponto isoelétrico, que está em torno de 4,7, (ULLAH; SETHUMADHAVAN, 2003; WYSS et al., 1999). Por este motivo, a enzima pode ter interagido com as cargas positivas do íon níquel presentes no suporte, indicando uma interação eletrostática. Conforme aumentou-se a força iônica do tampão de imobilização, houve uma queda nos valores de RI (Fig. 1B), o que corrobora com a hipótese da interação eletrostática, já que ocorre a supressão de interações desta natureza em virtude do aumento da força iônica, prejudicando o processo de imobilização (ARNOLD, 1991; JOHNSON; ARNOLD, 2004).

Com os parâmetros de imobilização avaliados otimizados, os resultados de RI chegaram a 66,26% e de AR a 150,33%. Apesar de os valores de RI não terem sido muito elevados, é interessante notar o ganho na atividade catalítica, observado pelo valor maior que 100%. Algumas enzimas são conhecidas por terem suas atividades potencializadas na presença de metais, portanto foi realizado um experimento de avaliação da presença de níquel na atividade da fitase, visto que o suporte utilizado neste trabalho possui este íon. Porém, tal relação não foi encontrada, sendo descartada esta hipótese para explicar os altos valores de atividade recuperada. Uma outra explicação para a melhora na atividade enzimática pode ser uma alteração na conformação da enzima após a sua ancoragem no suporte, favorecendo a entrada do substrato no seu sítio ativo.

O experimento de cinética da hidrólise do fitato mostrou um aumento na liberação de fósforo pela enzima imobilizada em reação à enzima livre. A enzima imobilizada conseguiu liberar quantidades até 20% maiores de fósforo que a enzima livre. (Fig. 2).

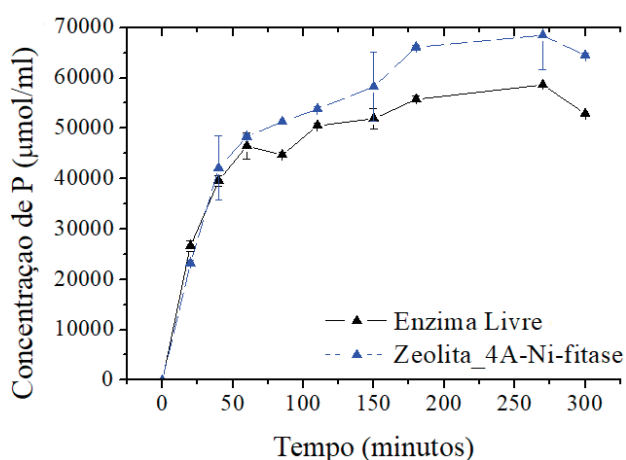


Figura 2. Cinética de liberação de fósforo a partir da hidrólise do fitato pela enzima livre e imobilizada. Carga de sólidos de 20 % e carga de enzimática 30UI/g suporte.

O processo de imobilização enzimática pode ocasionar uma perda, manutenção ou ganho na atividade catalítica. Neste trabalho, houve um aumento desta atividade, que também pode ser explicada pela afinidade entre suporte e substrato (ZHANG, GE; LIU, 2015). O fitato, substrato da fitase, é conhecido por sua capacidade de quelatar metais (SELLE; RAVINDRAN, 2007), e este estando presente no suporte, pode ter promovido a maior captura de substratos, o que leva à maior concentração destes ao redor da enzima e conseqüentemente a uma melhora em sua atividade, como visto neste trabalho.

4. Conclusões

O processo de imobilização enzimática da fitase em suporte modificado com níquel ocorreu majoritariamente por interações eletrostáticas. Os altos valores de atividade recuperada não podem ser relacionados com a presença de níquel durante a reação, portanto infere-se que foi ocasionado pelo processo de imobilização, possivelmente devido à maior acessibilidade do substrato ao sítio ativo da enzima após a imobilização ou pela afinidade entre suporte e substrato. A hidrólise do fitato pela enzima imobilizada liberou mais fósforo em comparação à enzima livre, mostrando a vantagem do uso da primeira, com potencial de aplicação nas diversas áreas em que possa atuar.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à Embrapa, ao CNPq, à CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro.

Referências

- ARNOLD, F. H. Metal-Affinity Separations- A New Dimension in Protein Processing. **Nature Biotechnology**, v. 9, p. 151–156, 1991.
- BACAKOVA, L.; VANDROVCOVA, M.; KOPOVA, I.; JIRKA, I. Applications of zeolites in biotechnology and medicine-a review. **Biomaterials Science**, v. 6, n. 5, p. 974–989, 2018.
- BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. ISSN 0003-2697.
- DAVIS, M. E. Zeolites and Molecular Sieves: Not Just Ordinary Catalysts. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 30, n. 8, p. 1675–1683, 1991.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Special issue: Enzyme immobilization 2016. **Molecules**, v. 22, n.

- 4, p. 1–5, 2017.
- GESSLER, N. N.; SERDYUK, E.G.; ISAKOVA, E.P.; DERYABINA, Y.I. et al. Phytases and the Prospects for Their Application (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 352–360, 2018.
- GONTIA-MISHRA, I.; TIWARI, S. Molecular characterization and comparative phylogenetic analysis of phytases from fungi with their prospective applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 51, n. 3, p. 313–326, 2013.
- HARLAND, B. F.; HARLAND, J. Fermentative reduction of phytate in rye, white, and whole wheat breads. **Cereal Chemistry**, v. 57, n. 3, p. 226–229, 1980. ISSN 0009-0352.
- JOHNSON, R. D.; ARNOLD, F. H. Review: Multipoint binding and heterogeneity in immobilized metal affinity chromatography. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 48, n. 5, p. 437–443, 2004.
- MRUDULA VASUDEVAN, U.; JAISWAL, A.K.; KRISHNA, S.; PANDEY, A. Thermostable phytase in feed and fuel industries. **Bioresource Technology**, v. 278, n. November 2018, p. 400–407, 2019.
- RAO, D. E. C. S.; RAO, K.V.; REDDY, T.P.; REDDY, V.D. Molecular characterization, physicochemical properties, known and potential applications of phytases: An overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 182–198, 2009.
- RHODES, C. J. Properties and applications of zeolites. **Science Progress**, v. 93, n. 3, p. 223–284, 2010.
- SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 135, n. 1–2, p. 1–41, 2007.
- SHELDON, R. A.; PELT, S. VAN. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 2013.
- ULLAH, A. H. J.; SETHUMADHAVAN, K. PhyA gene product of *Aspergillus ficuum* and *Peniophora lycii* produces dissimilar phytases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 303, n. 2, p. 463–468, 2003.
- ULLAH, A. H. J.; SETHUMADHAVAN, K.; MULLANEY, E. J. Monitoring of unfolding and refolding in fungal phytase (phyA) by dynamic light scattering. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 327, n. 4, p. 993–998, 2005.
- WECKHUYSSEN, B. M.; YU, J. Recent advances in zeolite chemistry and catalysis. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 20, p. 7022–7024, 2015.
- WYSS, M.; PASAMONTES, L.; FRIEDLEIN, A.; RÉMY, R.; TESSIER, M.; KRONENBERGUER, A.; MIDDENDORF, A.; LEHMANN, M.; SCHNOEBELEN, L.; ROTHILISBERGUER, U.; KUSZNIR, E.; WAHI, G.; MULLER, F.; LAHN, H.; VOGEL, K.; ADOLPHUS, P.G.M.; LOON, V. Biophysical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): Molecular size, glycosylation pattern, and engineering of proteolytic resistance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 359–366, 1999.
- ZHANG, Y.; GE, J.; LIU, Z. Enhanced Activity of Immobilized or Chemically Modified Enzymes. **ACS Catalysis**, v. 5, n. 8, p. 4503–4513, 2015.