



IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES POR ADSORÇÃO EM AGAROSE MODIFICADA

A.I.S. Brígida¹; C.M. Silva¹; M.P. Stephan¹; C.A. Araujo²; K.N. Silva²; L.M.F. Gottschalk¹

1- Embrapa Agroindústria de Alimentos. CEP 23020-470 – Rio de Janeiro – RJ – Brasil, Telefone: 55 (21) 3622-9600 – Fax: 55 (21) 3622-9713 – e-mail: (ana.iraiddy@embrapa.br; leda.fortes@embrapa.br; caroline.mellinger@embrapa.br; marilia.stephan@embrapa.br)

2- Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro. CEP 20260-100 – Rio de Janeiro – RJ – Brasil, Telefone: 55 (21) 3293-6000 – e-mail: (carolinaalvesrj21@gmail.com; karolinenovais.s@gmail.com)

RESUMO – Buscando contribuir para o desenvolvimento de processos contínuos e o reuso de enzimas, bem como promovendo uma maior estabilidade e atividade catalítica de enzimas, muitos estudos vem sendo realizados para obtenção de lipases imobilizadas. Neste trabalho o processo de imobilização de lipases de *Aspergillus niger* C e de *Thermomyces lanuginosus* por adsorção em agarose modificada foi avaliado. A imobilização ocorreu a pH 7 em três tipos de suportes a base de agarose: octil sepharose, DEAE sepharose e CM sepharose. O uso de octil sepharose mostrou-se mais eficiente na obtenção de derivados mais ativos frente à DEAE e CM sepharose, independente do tipo de extrato de lipase usado. Maior atividade no derivado foi obtida na imobilização de lipase de *T. lanuginosus* (304 U/g de octil sepharose) com 1,1 mg de proteína adsorvida em 1 grama de suporte.

ABSTRACT – In order to contribute to the development of continuous processes and reuse of enzymes as well as promoting greater stability and catalytic activity of enzymes, many studies have been conducted to obtain immobilized lipases. In this work, immobilization process of lipase from *Aspergillus niger* C and *Thermomyces lanuginosus* by adsorption on modified agarose was evaluated. Immobilization occurred at pH 7 on three types agarose-based supports: octyl sepharose, DEAE sepharose and CM sepharose. The use of octyl sepharose was more efficient to produce most active derivatives in front of DEAE and CM sepharose, independent of the type of lipase extract used. Higher activity of immobilized enzyme was obtained to lipase from *T. lanuginosus* (304 U/g of octyl sepharose) with 1.1 mg of protein adsorbed in 1 gram of support.

PALAVRAS-CHAVE: adsorção; troca iônica; interações hidrofóbicas; *Aspergillus niger*; *Thermomyces lanuginosus*.

KEYWORDS: adsorption; ion exchange; hydrophobic interaction; *Aspergillus niger*; *Thermomyces lanuginosus*.

1. INTRODUÇÃO

Lipases (glicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3) são enzimas responsáveis pela catalise, não só da hidrólise, como também da síntese de ésteres formados de glicerol e longas cadeias de ácidos graxos. Sob condições especiais, elas também podem catalisar reações de interesterificação, aminólise e tiotransesterificação. Um aumento no número de aplicações de lipases em sínteses e biotransformações impulsionaram o estudo para obtenção de biocatalisadores imobilizados, possibilitando o reuso da enzima, bem como promovendo uma maior estabilidade e atividade catalítica (Villeneuve et al., 2000).



Existem várias espécies com grande potencial como fontes de lipases com propriedades importantes para aplicações industriais. A lipase de *Aspergillus*, por exemplo, tem sido utilizada na síntese orgânica, na indústria de alimentos, na produção de compostos aromáticos, na obtenção de lipídios funcionais, na indústria de detergentes e outras aplicações (Contesini et al., 2010). Outra lipase bastante aplicada é a lipase de *Thermomyces lanuginosus*. Esta pode ser encontrada na forma livre, a exemplo do produto Lipolase® (preparação solúvel comercial da Novozymes) e, também, na forma imobilizada por adsorção iônica num suporte de silicato, Lipozyme TL IM®. A lipase de *T. lanuginosus* é uma enzima importante para diversas aplicações industriais, como produção de produtos químicos finos, produção de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (PUFA), modificação, hidrólise, alcoólise ou transesterificação de óleos e gorduras, produção de biodiesel, resolução de misturas racêmicas e aplicações ambientais (Fernandez-Lafuente, 2010).

Desta forma, visando contribuir para o desenvolvimento de biocatalisadores estáveis e aplicáveis a indústria de alimentos, o objetivo deste trabalho foi avaliar o processo de imobilização de lipases de *A. niger* C e de *T. lanuginosus* por adsorção em agarose modificada.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Extrato rico em lipase de *Aspergillus niger* C foi obtido por fermentação em estado sólido conforme metodologia descrita por Gomes (1995). Extrato comercial de lipase de *Thermomyces lanuginosus* foi doado pela Novozymes. Os suportes octil sepharose (CL 4B), DEAE sepharose e CM sepharose, obtidos a partir de agarose modificada, foram gentilmente cedidos pela General Electric - GE. Reagentes como p-nitro fenil laurato, albumina de soro bovino e o dimetilsulfóxido foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Co. Outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2 Imobilização de lipase

Para os estudos de imobilização de lipase, solução estoque comercial de lipase de *T. lanuginosus* ou extrato bruto rico em lipase de *A. niger* C foram diluídas em tampão fosfato de sódio 50 mM pH7. A proporção suporte:enzima foi de 0,03 g de suporte para 1 ml de solução de enzima. A imobilização por adsorção ocorreu a 25°C, sob agitação branda (~10 rpm), utilizando a técnica de banho finito. Após uma hora de contato, o sobrenadante foi separado do derivado por filtração e atividade de ambos foi determinada. Durante os estudos de imobilização, além de acompanhar a atividade hidrolítica do derivado obtido e do sobrenadante, o cálculo de dois outros parâmetros (atividade recuperada e rendimento de imobilização) foi fundamental para avaliar o desempenho do processo de imobilização. O rendimento de imobilização (R) pode ser definido como a quantidade de enzima teoricamente imobilizada (Equação 1). E a atividade recuperada ($At_{recuperada}$) é a relação de quanto, das enzimas teoricamente imobilizadas, que se encontram ativas (Equação 2). A avaliação desses parâmetros indicaram as melhores condições de imobilização obtidas por meio deste estudo.

$$R(\%) = \left(1 - \frac{At_s}{At_b}\right) * 100 \quad (1)$$

$$At_{recuperada} = \frac{At_d}{\frac{At_0}{Ms} * R} * 100 \quad (2)$$

sendo,

At_s : atividade hidrolítica medida no sobrenadante após um dado período de imobilização (U);

At_b : atividade hidrolítica medida numa solução “branco” de mesma concentração inicial que a solução

destinada a imobilização após o mesmo período destinado a At_s (U);



A_t : atividade hidrolítica medida no derivado (U/g);

A_0 : atividade hidrolítica na solução inicial de enzima (U);

M_s : massa do derivado (g).

O teor de proteína adsorvida (mg de proteína/g de suporte) também foi um parâmetro avaliado. Este foi calculado como sendo a diferença entre a quantidade de proteína inicial e quantidade após um dado tempo de contato entre enzima e suporte no sobrenadante dividida pela massa do suporte. Para avaliar o teor de proteína no sobrenadante, utilizou-se a metodologia descrita por Bradford (1976).

2.3 Medida de atividade enzimática

A determinação da medida de atividade das enzimas livres e imobilizadas foi realizada acompanhando a hidrólise de p-nitro fenil laurato (560 μ M) via espectrofotômetro a 410 nm (Brígida et al., 2013). A reação ocorreu em temperatura ambiente (25 °C), em sistema agitado e tamponado utilizando tampão fosfato de sódio a 50 mM, pH 7. Para esta metodologia, uma unidade (U) de atividade enzimática hidrolítica foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de p-nitrofenol por minuto nas condições propostas.

2.4 SDS-PAGE

Amostras contendo quantidades conhecidas de proteína foram adicionadas a igual volume de tampão de amostra (Tris-HCl 2 mol.l⁻¹ pH 6,8, EDTA 0,2 mol/l, glicerol 10% e azul de bromofenol 0,5%), fervidas por dois minutos, centrifugadas rapidamente e aplicadas em géis de 12 % de SDS-poliacrilamida. Após a corrida, os géis foram corados com Coomassie de acordo com protocolos descrito na literatura (Laemmli, 1970). Marcadores de baixo peso molecular foram utilizados como padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Imobilização de lipase de *T. lanuginosus*

A imobilização de lipase de *T. lanuginosus* foi avaliada a pH 7 em três tipos de suportes a base de agarose (Tabela 1). Maior atividade no derivado foi observada para o octil sepharose (304 U/g) com 1,1 mg de proteína adsorvida em 1 grama de suporte, totalizando adsorção de 41% da proteína oferecida ao sistema. Também foi encontrada maior atividade específica no derivado para este suporte. Tais resultados indicam maior afinidade da lipase de *T. lanuginosus* para o octil frente ao DEAE e CM sepharose. Este resultado reforça os dados observados em literatura que indicam que as lipases tendem a ter alta afinidade por suportes de interação hidrofóbica, como o octil (Villeneuve et al., 2000). Comparando DEAE e CM sepharose, não houve diferença entre eles na atividade do derivado e teor de proteína adsorvida. Os suportes DEAE e CM sepharose adsorvem proteínas especialmente pela troca iônica entre as moléculas. No caso de DEAE sepharose há uma troca de ânions, logo é um suporte carregado positivamente numa ampla faixa de pH. Já no CM sepharose há uma troca de cátions, logo é um suporte carregado negativamente. Maior proteína adsorvida de lipase de *T. lanuginosus* era esperada no DEAE em comparação ao CM sepharose em pH 7, haja visto que o ponto isoelétrico desta enzima é 4,4 (Fernandez-Lafuente, 2010). É possível que aditivos utilizados na solução comercial tenham interferido nessa interação de troca iônica. O perfil proteico presente na solução oferecida, sobrenadantes após 1 hora de contato e derivados também foram avaliados (Figura 1). A presença ainda de forma forte da banda de lipase nos sobrenadantes refletem os baixos valores de rendimento de imobilização encontrados. Em octil, além da banda característica de lipase de *T. lanuginosus* próxima a 33 kDa (Fernandez-Lafuente, 2010), bandas de impurezas de peso molecular superior a 50 kDa também foram observadas indicando a presença de outras proteínas no extrato



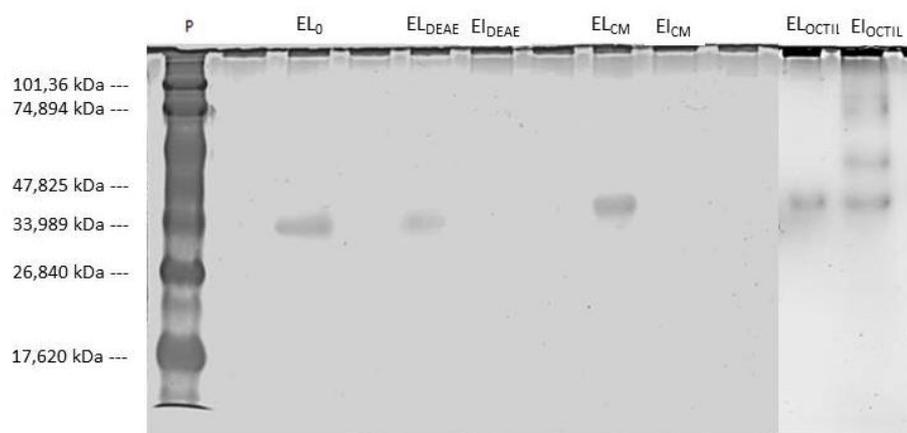
comercial. E, devido ao baixo teor de proteína adsorvida, não foi possível detectar bandas de lipase de *T. lanuginosus* nos suportes de troca iônica.

Tabela 1 – Parâmetros de processo de imobilização de lipase de *T. lanuginosus* em suportes a base de agarose por adsorção a temperatura ambiente, tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7, utilizando concentração inicial de proteína de 80 mg/l e tempo de contato de 1 hora.

Suporte	Atividade do Imobilizado (U/g)	Rendimento (%)	Atividade Recuperada (%)	Proteína Adsorvida (mg de prot/g de suporte)	Atividade Específica do Imobilizado (U/mg de prot)
Octil sepharose	304	*	*	1,10	276
DEAE sepharose	122	11	5,6	0,85	144
CM sepharose	129	*	*	0,9	142

* Não foi possível determinar o valor.

Figura 1 – Eletroforese do estudo de imobilização de lipase de *T. lanuginosus* em suportes a base de agarose por adsorção.



EL₀: enzima livre no tempo 0 hora; EL_{DEAE}: sobrenadante após 1 hora de imobilização em DEAE sepharose; EL_{DEAE}: imobilizado em DEAE sepharose; EL_{CM}: sobrenadante após 1 hora de imobilização em CM sepharose; EL_{CM}: imobilizado em CM sepharose; EL_{OCTIL}: sobrenadante após 1 hora de imobilização em octil sepharose; EL_{OCTIL}: imobilizado em octil sepharose.

3.2 Imobilização de lipase de *A. niger* C

A imobilização de lipase de *A. niger* C também foi avaliada em três tipos de suportes a base de agarose (Tabela 2). Maior atividade no derivado foi observada para o octil sepharose (13 U/g) com 0,26 mg de proteína adsorvida em 1 grama de suporte, totalizando adsorção de 20% da proteína oferecida ao sistema. Também foi encontrada maior atividade específica no derivado para este suporte. Tais resultados indicam maior seletividade na imobilização de lipase de *A. niger* C para o octil frente ao DEAE e CM sepharose. Considerando que neste estudo a fonte de lipase de *A. niger* é um extrato bruto, a imobilização, além de estabilizar, poderá funcionar como uma etapa de purificação na medida em que se empregam condições mais seletivas de imobilização.

Comparando DEAE e CM sepharose, além de apresentarem uma atividade muito baixa, não houve muita diferença entre eles com relação à atividade do derivado. Contudo, observou-se maior teor de proteína adsorvida em DEAE sepharose apresentando, conseqüentemente, um baixo valor de



atividade específica. Em termos de percentual de proteína oferecida que foi adsorvida, os valores são de 69 e 8 % para DEAE e CM sepharose, respectivamente. Como reportado no item 3.1, os suportes DEAE e CM sepharose adsorvem proteínas especialmente pela troca iônica entre as moléculas. Em geral, o ponto isoelétrico (pI) para lipases de *A. niger* varia entre 3,5 a 4,4, contudo, Mhetras et al. (2009) reportou ter purificado uma lipase de *A. niger* com pI de 8,5. Considerando a maior probabilidade de um pI ácido, maior proteína adsorvida de lipase de *A. niger* era esperada no DEAE frente ao CM sepharose em pH 7. Isso foi observado tanto em termos de maior rendimento de imobilização para DEAE quanto de teor total de proteína adsorvida. Contudo, a orientação ou presença de outras proteínas no extrato bruto influenciou para um derivado pouco ativo refletindo uma atividade recuperada menor que 1%.

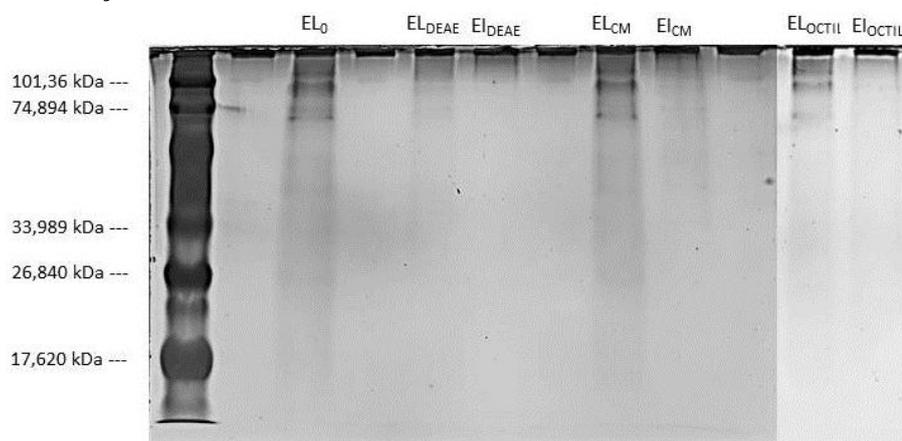
O perfil proteico presente na solução oferecida, sobrenadantes após 1 hora de contato e derivados no processo de imobilização de lipases de *A. niger* C presente em extrato bruto também foram avaliados (Figura 2). A quantidade de lipase frente a outras proteínas presentes no extrato é bem inferior, tanto que não é possível visualizar de forma nítida bandas próximo a 32 kDa, característico de lipases de *A. niger* (Mhetras et al., 2009). Devido ao baixo teor de proteína total adsorvida e a uma grande diversidade de pesos moleculares entre elas, não foi possível detectar bandas proteicas nos suportes.

Tabela 2 – Parâmetros de processo de imobilização de lipase de *A. niger* C em suportes a base de agarose por adsorção a temperatura ambiente, tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7, utilizando concentração inicial de proteína de 40 mg/l e tempo de contato de 1 hora.

Suporte	Atividade do Imobilizado (U/g)	Rendimento (%)	Atividade Recuperada (%)	Proteína Adsorvida (mg de prot/g de suporte)	Atividade Específica do Imobilizado (U/mg de prot)
Octil sepharose	13	*	*	0,26	50
DEAE sepharose	0,17	93,4	<1	0,9	0,19
CM sepharose	0,38	67,9	<1	0,1	4

* Não foi possível determinar o valor.

Figura 2 – Eletroforese do estudo de imobilização de lipase de *A. niger* C em suportes a base de agarose por adsorção.



EL₀: enzima livre no tempo 0 hora; EL_{DEAE}: sobrenadante após 1 hora de imobilização em DEAE sepharose; EL_{DEAE}: imobilizado em DEAE sepharose; EL_{CM}: sobrenadante após 1 hora de imobilização em CM sepharose;



XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Alimentação: a árvore que sustenta a vida

X CIGR Section IV International Technical Symposium

Food: the tree that sustains life

24 a 27 de outubro de 2016 • FAURGS • GRAMADO/RS

EL_{CM}: imobilizado em CM sepharose; EL_{OCTIL}: sobrenadante após 1 hora de imobilização em octil sepharose; EL_{OCTIL}: imobilizado em octil sepharose.

4. CONCLUSÕES

O uso de octil sepharose mostrou-se mais eficiente na obtenção de derivados mais ativos frente à DEAE e CM sepharose, independente do tipo de extrato de lipase usado. Fazendo um paralelo da imobilização de lipase de *A. niger* C com os dados encontrados para imobilização de lipase de *T. lanuginosus* em condições similares e suportes, têm-se valores de atividade nos derivados bem inferiores para lipase de *A. niger* C, reflexo da grande quantidade de impureza presente no extrato bruto utilizado. O excesso de impureza no extrato de *A. niger* C nos indica que, para obtenção de um derivado mais ativo, algumas etapas de purificação serão necessárias. Por adsorver apenas 8% da proteína total oferecida ao sistema com um rendimento de imobilização de 68%, supõe-se que a imobilização de lipase de *A. niger* C em CM sepharose seja uma etapa de pré-purificação promissora caso seja possível realizar recuperação das proteínas adsorvidas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Brígida, A. I. S.; Amaral, P. F.; Gonçalves, L. R. B.; Coelho, M. A. Z. (2013). *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682: Lipase production in a multiphase bioreactor. *Current Biochemical Engineering*, 1, 65-74.
- Contesini, F. J., Lopes, D. B., Macedo, G. A., Nascimento, M. G., Carvalho, P. O. (2010). *Aspergillus* sp. lipase: Potential biocatalyst for industrial use. *Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic*, 67 (3-4), 163-171.
- Fernandez-Lafuente, R. (2010) Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62 (3-4), 197-212.
- GOMES, C. A. O. (1995). *Produção de enzimas despolimerizantes por fermentação em meio semi sólido por Aspergillus niger 3T5B8* (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680 – 685.
- Mhetras, N. C.; Bastawde, K. B.; Gokhale, D. V. (2009). Purification and characterization of acidic lipase from *Aspergillus niger* NCIM 1207. *Bioresource Technology*, 100 (3), 1486-1490.
- Villeneuve, P. (2000) Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 9, 113-148.