

IMOBILIZAÇÃO E ESTABILIZAÇÃO DE LIPASE PARA APLICAÇÃO EM MEIO AQUOSO E ORGÂNICO

Sérgio R. Machado¹ (IC), José R. Guimarães (PQ)¹

¹ Universidade federal de Itajubá - UNIFEI

Palavras-chave: Biocatalisador. Reações de biotransformação. Suporte heterofuncional. Taxa de conversão. TLL.

Introdução

As lipases são enzimas amplamente utilizadas em reações de hidrólise (OKADA; MORRISSEY, 2007), esterificação (KRISHNA et al., 2000) e transesterificação (JAEGER; EGGERT, 2002). Entre as lipases, a lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) destaca-se por suas aplicações industriais, como na síntese de ésteres de açúcar (DANTAS et al., 2019; YANG et al., 2012). A TLL apresenta uma cadeia polipeptídica, chamada "tampa" ou "lid", que cobre seu sítio ativo. Essa tampa se abre e permite o acesso do substrato ao centro ativo ao interagir com substratos ou superfícies hidrofóbicas (RODRIGUES et al., 2019).

A baixa estabilidade das enzimas livres representa um desafio, o que pode ser minimizado pela imobilização enzimática (FERNANDES; LIMA; LOPES, 2010). Entre as estratégias que vêm sendo utilizadas, a imobilização em suportes heterofuncionais vêm ganhando destaque. Neste caso, a imobilização ocorre em duas etapas: adsorção hidrofóbica seguida de ligação covalente (BERNAL; ILLANES; WILSON, 2010). A vinil sulfona, utilizada na etapa de ligação covalente (DE ALBUQUERQUE et al., 2016) fornece um braço espaçador longo e de alta reatividade com grupos nucleofílicos na superfície da enzima (ANDRADES et al., 2019), mostrando-se eficaz nesse processo.

Apesar de muitos estudos focarem na imobilização de lipases em suporte heterofuncional, as reações catalisadas por esses biocatalisadores ainda são pouco exploradas. Este trabalho tem como objetivo estabilizar a lipase TLL por meio da imobilização em suporte heterofuncional para aplicação em meio aquoso e orgânico. Para isso, foi necessário preparar o suporte com grupos octadecil e vinil sulfona, fixar a TLL por interação interfacial e ligação covalente, determinar o fator de efetividade da enzima no suporte heterofuncional e, por fim, aplicar o biocatalisador em termos de biotransformação em diferentes meios de reação.

Metodologia

Inicialmente, para realizar o molhamento das esferas Purolite® C18 foi necessário suspendê-las em metanol (1:5 m/v) e agitadas levemente por 1 hora para eliminar o

ar interno (TACIAS-PASCACIO et al., 2017). Em seguida, água destilada foi adicionada, ajustando a suspensão para 50% (v/v) de metanol, e agitou-se suavemente por mais 15 minutos. Após filtração a vácuo, as esferas foram lavadas dez vezes com água destilada, usando 10 vezes o volume de suspensão em cada lavagem.

A preparação das esferas Purolite® octadecil-EDA-vinil sulfona seguiu o procedimento experimental descrito por Guimarães et al. (GUIMARÃES et al., 2023). A imobilização da TLL em esferas Purolite® C18 (carga enzimática de 20 mg/g de suporte) foi realizada suspendendo as esferas em solução de fosfato de sódio (5 mM, pH 7,0, proporção de 1:10 (m/v)) mantidas em agitação suave à temperatura ambiente por 2 horas. Após a imobilização, as esferas foram filtradas e lavadas dez vezes com o volume de água destilada equivalente à suspensão inicial. A atividade enzimática foi medida pelo ensaio *p*-NPB (BOUDRANT; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2020).

A imobilização da TLL em esferas Purolite® octadecil-EDA-VS foi realizada em duas etapas: a etapa de imobilização por adsorção interfacial ocorreu nas condições descritas anteriormente. Após a filtração e lavagem, as esferas imobilizadas foram suspensas em solução de carbonato de sódio 100 mM (pH 10,0), na proporção de 1:10 (m/v), e incubadas por 24 horas à temperatura ambiente sob agitação suave. O biocatalisador resultante foi filtrado a vácuo e depois tratado com diferentes soluções de 2 M de agentes bloqueadores (ácido aspártico (Asp), glicina (Gly), etilenodiamina (EDA) ou cisteína (Cys)) a pH 10,0 em uma proporção de 1:10 (m/v). A modificação dos grupos vinil sulfona ocorreu por 48 horas a 25 °C sob agitação suave, e as esferas foram lavadas e filtradas novamente conforme descrito na etapa anterior.

Nos ensaios de hidrólise, os biocatalisadores foram testados com óleos de linhaça, mamona e coco, utilizando uma carga de 2,5 wt.%, relação mássica água/óleo de 1, a 40 °C e 250 rpm por 45 minutos em agitador. Após a reação, uma amostra foi coletada e titulada para determinar a conversão dos óleos em ácidos graxos livres (AGLs). A conversão foi calculada com base no consumo

de KOH necessário para neutralizar os AGLs liberados, e o valor foi comparado com o valor de saponificação do óleo, conforme a Eq. 1. Os testes foram realizados em triplicata. Após a reação de hidrólise, a fase leve (AGLs) foi lavada duas vezes com água destilada e posteriormente seca em um forno a 75 °C por 24 horas. Essa fração purificada foi utilizada na reação de esterificação.

$$\text{Conversão} = \frac{\text{Valor de acidez}}{\text{Valor de saponificação}} \quad (1)$$

A reação de esterificação foi realizada usando AGLs purificados como doadores acila e diferentes álcoois (amílico, isoamílico, octílico) como receptores acila sob condições otimizadas descritas por Guimarães et al. (GUIMARÃES et al., 2021). A razão molar de álcoois para AGLs purificados foi de 2,5, e os biocatalisadores imobilizados em Purolite® C18 e a enzima comercial foram usados em uma proporção de 2,5 wt.%. As reações foram conduzidas em um agitador a 40 °C e 250 rpm. A conversão de AGLs em ésteres com propriedades de biolubrificantes foi avaliada com base no consumo de KOH necessário para neutralizar os AGLs remanescentes.

As reações de metanólise foram realizadas com diferentes óleos (linhaça, coco e mamona) em uma proporção molar de 3:1, usando 2 g do óleo, carga enzimática de 5 wt.%, sob agitação a 250 rpm durante 3 h a 40 °C. A quantificação dos ésteres alquílicos de ácidos graxos foi realizado por cromatografia gasosa.

Resultados e discussão

A TLL foi imobilizada em Purolite C18-TLL e Purolite C18-EDA-VS-TLL-agente bloqueante. A imobilização foi muito rápida em ambos os casos, atingindo 48% de adsorção enzimática em apenas 1 h.

O fator de efetividade para os biocatalisadores bloqueados com Gly (95,99 ± 4,97) e Asp (97,43 ± 3,23) foi semelhante à do suporte hidrofóbico. Isso demonstra que o suporte heterofuncional permite uma transferência de massa comparável à do suporte hidrofóbico. No entanto, o valor para o biocatalisador bloqueado com Cys foi 40% menor (59,99 ± 2,89), o que pode ser atribuído ao efeito de partição provocado pelos grupos funcionais desse aminoácido (-SH, -COOH e -NH₂) (BAYNES; DOMINICZAK, 2019).

A Tabela 2 mostra a hidrólise de diferentes óleos catalisado por diferentes biocatalisadores. O

biocatalisador imobilizado por adsorção interfacial e a enzima imobilizada comercialmente apresentaram melhor desempenho para os diferentes óleos. Os biocatalisadores imobilizados em suporte heterofuncional apresentaram desempenho semelhante, independente do agente bloqueante utilizado. Com exceção, para o biocatalisador bloqueado com Gly que apresentou melhor desempenho na hidrólise do óleo de linhaça.

A Tabela 3 mostra o desempenho de diferentes biocatalisadores na reação de metanólise do óleo de coco, linhaça e mamona. O desempenho do biocatalisador imobilizado por adsorção interfacial foi melhor para todos os óleos utilizados como doadores acila, enquanto a enzima imobilizada comercialmente apresentou menor conversão em relação as demais enzimas imobilizadas. As enzimas bloqueadas com Gly, Asp e Cys apresentaram desempenho semelhantes para metanólise do óleo de coco e mamona, no entanto, o bloqueio com Gly proporcionou menor desempenho na reação ao utilizar óleo de linhaça como doador acila.

A Tabela 4 mostra o desempenho de diferentes biocatalisadores na reação de esterificação de AGLs com diferentes óleos. A enzima imobilizada comercialmente apresentou melhor desempenho em relação aos demais biocatalisadores. O rendimento de ésteres amílicos foi semelhante para os biocatalisadores imobilizados por adsorção interfacial e em suporte heterofuncional. No entanto, o biocatalisador bloqueado com Asp apresentou desempenho superior durante a esterificação dos AGLs com álcool isoamílico. O rendimento de ésteres octílicos foi maior ao utilizar a enzima imobilizada interfacialmente e aquela bloqueada com Cys.

Os resultados deste experimento evidenciam a influência dos diferentes tipos de suportes e agentes bloqueadores na atividade dos biocatalisadores, tanto em reações de hidrólise, esterificação e transesterificação, destacando o impacto significativo do protocolo de imobilização no desempenho das lipases. Esses achados sugerem que a seleção do biocatalisador adequado é crucial para otimizar processos específicos.

Tabela 1. Hidrólise de diferentes óleos catalisada por biocatalisadores imobilizados de TLL. Condições do ensaio: carga de biocatalisador de 2,5 wt.% (considerando o óleo), razão de massa água/óleo de 1, temperatura de 40 °C, agitação de 250 rpm por 0,75 h.

Biocatalizadores	Conversão (%)		
	Óleo de coco	Óleo de linhaça	Óleo de mamona
Purolite C18-TLL	27,15 ± 0,43	21,23 ± 0,26	8,78 ± 0,40
Purolite C18-EDA-VS-TLL-Gly	3,69 ± 0,24	12,21 ± 0,17	4,52 ± 0,45
Purolite C18-EDA-VS-TLL-Asp	4,31 ± 0,17	4,12 ± 0,11	4,82 ± 0,34
Purolite C18-EDA-VS-TLL-Cys	3,72 ± 0,19	4,26 ± 0,23	4,57 ± 0,22
TLL-IM	21,60 ± 0,07	18,83 ± 0,94	5,16 ± 0,27

Tabela 2. Metanólise de diferentes óleos para produzir ésteres metílicos de ácidos graxos (EEAG). Condições: Razão molar metanol/óleo de 3, carga de enzima de 5% em peso, temperatura de 40 °C e agitação a 250 rpm por 3 h.

Biocatalizadores	Rendimento de FAME, wt. %		
	Óleo de coco	Óleo de linhaça	Óleo de mamona
Purolite C18-TLL	43,9 ± 3,3	62,3 ± 8,0	31,3 ± 1,8
Purolite C18-EDA-VS-TLL-Gly	38,9 ± 1,1	9,7 ± 1,0	29,9 ± 1,4
Purolite C18-EDA-VS-TLL-Asp	37,9 ± 0,8	53,0 ± 0,6	30,3 ± 0,7
Purolite C18-EDA-VS-TLL-Cys	37,9 ± 0,8	53,3 ± 0,6	28,9 ± 0,4
TLL-IM	6,9 ± 0,5	13,8 ± 0,2	8,3 ± 0,3

Tabela 3. Avaliação do biocatalisador para esterificação de ácido oleico com diferentes álcoois. Condições do ensaio: carga do biocatalisador de 2,5 wt.% (considerando os AGLs), razão molar AGLs/álcool de 2,5, temperatura de 40 °C, agitação de 250 rpm por 0,5 h.

Biocatalizadores	Conversão, %		
	Amílico	Isoamílico	Octanol
Purolite C18-TLL	65,74 ± 1,76	48,70 ± 1,30	73,04 ± 1,96
Purolite C18-EDA-VS-TLL-Gly	69,15 ± 1,85	67,20 ± 1,80	58,44 ± 1,56
Purolite C18-EDA-VS-TLL-Asp	66,23 ± 1,77	74,02 ± 1,98	64,28 ± 1,72
Purolite C18-EDA-VS-TLL-Cys	64,77 ± 1,73	65,25 ± 1,75	74,02 ± 1,98
TLL-IM	89,11 ± 2,39	91,55 ± 2,45	78,89 ± 2,11

Conclusões

Este estudo permitiu observar os impactos de diversos biocatalisadores imobilizados em distintos suportes aplicados a reações de hidrólise, esterificação e transesterificação. Os resultados demonstram que o desempenho enzimático nessas reações pode ser modificado pelo uso de agentes bloqueadores, utilizados como etapa final no processo de imobilização. O efeito observado nas mudanças na natureza do substrato e no valor da atividade enzimática está relacionado

diretamente aos protocolos de imobilização aplicados, sendo que o desempenho final do biocatalisador é influenciado pelo tipo de substrato utilizado.

Agradecimentos

Agradecemos a Universidade Federal de Itajubá pelo financiamento da bolsa de iniciação científica vigente de 2023/2024.

Referências

- ANDRADES, D. et al. Preparation of immobilized/stabilized biocatalysts of β -glucosidases from different sources: Importance of the support active groups and the immobilization protocol. *Biotechnology Progress*, v. 35, n. 6, 2019.
- BAYNES, J. W.; DOMINICZAK, M. H. *Bioquímica médica*. Elsevier, 2019.
- BERNAL, C.; ILLANES, A.; WILSON, L. Heterofunctional hydrophilic-hydrophobic porous silica as support for multipoint covalent immobilization of lipases: application to lactulose palmitate synthesis. *Langmuir*, v. 30, n. 12, p. 3557-3566, 2014.
- BOUDRANT, J.; WOODLEY, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation. *Process Biochemistry*, v. 90, p. 66-80, 2020.
- DANTAS, A. et al. Potential application of *Thermomyces lanuginosus* lipase (TLL) immobilized on nonporous polystyrene particles. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, v. 38, n. 2, p. 608-613, 2019.
- DE ALBUQUERQUE, T. L. et al. Easy stabilization of interfacially activated lipases using heterofunctional divinyl sulfone activated-octyl agarose beads. Modulation of the immobilized enzymes by altering their nanoenvironment. *Process Biochemistry*, v. 51, n. 7, p. 865-874, 2016.
- FERNANDES, K. F.; LIMA, C. S.; LOPES, F. M. Técnicas de imobilização de enzimas. *Revista Processos Químicos*, v. 4, n. 7, p. 53-58, 2010.
- GUIMARÃES, J. R. et al. Heterofunctional methacrylate beads bearing octadecyl and vinyl sulfone groups: tricks to obtain an interfacially activated lipase from *Thermomyces lanuginosus* and covalently attached to the support. *Catalysts*, v. 13, n. 1, p. 108, 2023.
- GUIMARÃES, J. R. et al. Immobilization of Eversa® transform via CLEA technology converts it in a suitable biocatalyst for biolubricant production using waste cooking oil. *Molecules*, v. 26, n. 1, p. 193, 2021.
- JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, n. 4, p. 390-397, 2002.
- KRISHNA, S. H. et al. Optimization of isoamyl acetate production by using immobilized lipase from *Mucor miehei* by response surface methodology. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, n. 2-4, p. 131-136, 2000.
- OKADA, T.; MORRISSEY, M. T. Production of n-3 polyunsaturated fatty acid concentrate from sardine oil by lipase-catalyzed hydrolysis. *Food Chemistry*, v. 103, n. 4, p. 1411-1419, 2007.
- RODRIGUES, R. C. et al. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. *Biotechnology Advances*, v. 37, n. 5, p. 746-770, 2019.
- TACIAS-PASCACIO, V. G. et al. Evaluation of different lipase biocatalysts in the production of biodiesel from used cooking oil: Critical role of the immobilization support. *Fuel*, v. 200, p. 1-10, 2017.
- YANG, X. et al. Highly efficient biosynthesis of sucrose-6-acetate with cross-linked aggregates of Lipozyme TL 100 L. *Journal of Biotechnology*, v. 161, n. 1, p. 27-33, 2012.