

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Avaliação da estabilidade da lipase de *Aspergillus niger* em soluções aquosas de Líquidos Iônicos da família das colinas.

Paloma Andrade Martins Nascimento¹, Jeine Francis Titato¹, Jorge Fernando Brandão Pereira¹ e Valéria de Carvalho Santos Ebinuma¹

¹Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Rodovia Araraquara Jaú, Km 01 – s/n - 14800-903 - Araraquara – SP - E-mail: pa81anna@gmail.com
Depto. de Bioprocessos e Biotecnologia.

RESUMO

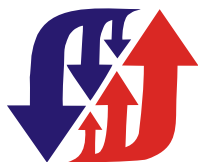
Os Líquidos Iônicos (LIs) são sais orgânicos com baixo ponto de fusão que podem aumentar a estabilidade de biomoléculas. As lipases são enzimas que apresentam grande relevância industrial. Nesse sentido, avaliar sua atividade e estabilidade em diferentes condições experimentais é fundamental antes de sua aplicação. O objetivo deste trabalho foi estudar a estabilidade de lipases microbianas em relação ao pH, temperatura e em soluções aquosas de LIs (concentrações de 0,05, 0,1 e 0,5 mM) da família das colinas, nomeadamente acetato e cloreto de colina. O pH e temperatura ótima da enzima foi 5,5 e 50°C, respectivamente, apresentando-se estável entre pH 5,5-6,5 e as temperaturas de 40-50°C. Na presença dos LIs a enzima apresentou-se ativa e estável, porém, a atividade na presença do acetato de colina foi 80% superior da obtida com cloreto de colina. Assim, o emprego de soluções aquosas de acetato colina pode melhorar a atividade enzimática da lipase.

Palavras-chave: Acetato de colina, Cloreto de colina, Lipase, *Aspergillus niger*.

INTRODUÇÃO

Os LIs são sais orgânicos comumente definidos como sais com ponto de fusão inferior a 100°C). Diferentemente dos eletrólitos comuns, estes apresentam uma série de propriedades físico-químicas muito interessantes, como, elevada estabilidade térmica e química e elevada força de solvatação (FREIRE et al, 2014). Devido a estas propriedades, estes compostos têm sido amplamente utilizados na área acadêmica e industrial como agentes adequados de separação e purificação em Sistemas Aquosos Bifásicos (SABs) (VICENTE et al., 2014). Com a utilização de LIs como solventes é possível alterar não só a polaridade, mas também a solubilidade de substratos, podendo melhorar a seletividade, estabilidade e atividade enzimática (VENTURA et al., 2012).

As lipases (E.C. 3.1.1.3) são biocatalizadores pertencentes à família estrutural da α/β -hidrolases, classificadas como glicerol éster hidrolases (DOBREV et al., 2015). São estáveis e ativas em solventes orgânicos, não necessitam de co-factores, além de possuírem um elevado grau de enantio-regioseletividade (DEIVE et al., 2011). Têm como função natural a hidrólise de triglicérides em meio aquoso, e como característica comum, as superfícies das conformações abertas e ativa em torno do sítio catalítico, o que confere caráter hidrofóbico para este biocatalizador (FREIRE et al, 2008). Desse modo, devido às suas características, as lipases são empregadas em diversas áreas, como farmacêutica, alimentícia, química fina, degradação biológica e remoção de carga lipolítica de efluentes industriais (NUNES et al., 2011). Considerando a diversidade de aplicações da lipase e suas distintas funções, e combinando com as interessantes propriedades dos LIs, se faz necessário o estudo de estabilidade frente a diferentes condições como pH e temperatura e concentração de soluções



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

aquosas de Cloreto de Colina ([Ch]Cl) e Acetato de Colina ([Ch][Ac]). A definição de uma série de LIs visa uma futura aplicação dos mesmos na recuperação de lipases obtidas de meios fermentados, como sistemas de separação e purificação mais biocompatíveis e biodegradáveis.

MATERIAL E MÉTODOS

Determinação da temperatura e pH ótimo, estabilidade térmica, ao pH e a diferentes soluções aquosas de LIs

A lipase microbiana comercial de *Aspergillus niger*, *p*-nitrofenil palmitato (*pNPP*), Cloreto de Colina e Acetato de Colina foram adquiridos da Sigma-Aldrich™. Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

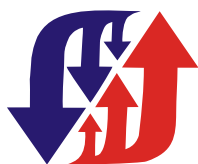
O pH ótimo da enzima foi determinado medindo sua atividade em diversos níveis de pH (2,5– 8,5) em tampão McIlvaine a 40°C. A estabilidade ao pH foi estudada incubando a enzima a 40°C variando o pH de 3,5-8,5. Os estudos de temperatura ótima e estabilidade da enzima a temperatura foram realizados em tampão McIlvaine, pH 5,5, para a temperatura ótima variando a temperatura entre 20 e 70°C. A estabilidade térmica foi realizada na faixa de temperatura de 20 a 50°C. O estudo de estabilidade da lipase em diferentes soluções aquosas de [Ch][Ac] e ([Ch]Cl) foi determinado medindo a atividade enzimática a 40°C variando as concentrações de ambos os LIs em 0,05, 0,1 e 0,5 mM. Todos os ensaios de estabilidade foram realizados durante 24 horas e alíquotas foram retiradas nos tempos: 0, 1, 3, 6, 9 e 24 horas. A atividade enzimática da lipase foi determinada utilizando *pNPP* como substrato de acordo com a metodologia descrita por Mayordomo et al. (2000).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Estabilidade da Lipase ao pH e temperatura

A lipase de *A. niger* apresentou pH ótimo de 5,5 (Figura 1A). Em relação a sua estabilidade ao longo do tempo, sua atividade foi afetada para pHs levemente alcalinos, nomeadamente, 7,5 e 8,5, nos quais se observou uma queda de, aproximadamente 80% de atividade quando comparado à atividade em pH 5,5. Por outro lado, em faixa de pH moderadamente ácido, entre 3,5 e 6,5, a enzima manteve-se estável durante as 24 horas, sendo as maiores atividades obtidas a pHs de 5,5 e 6,5. (Figura 1B). De acordo com a literatura (SAXENA et al., 2003), grande parte das lipases produzidas por cepas de *Aspergillus* apresentam pH ótimo entre 5 e 6. Desta maneira, nossos resultados corroboram com os que tem vindo a ser reportados na literatura.

Em relação à temperatura, a temperatura ótima da enzima foi a 50°C (Figura 2A). Importa destacar que, nas primeiras três horas a enzima apresentou uma maior estabilidade térmica em temperaturas mais baixas, entre 20-30°C, apresentando uma atividade residual superior a 60% quando comparada ao tempo 0 horas (Figura 2B). A Lipase apresentou um comportamento semelhante durante as seis primeiras horas nas temperaturas entre 40-50°C, contudo, após 9 horas, a atividade enzimática foi maior a 40°C, tendo sido obtida uma atividade residual de 70% comparativamente ao tempo inicial de 0 horas, mantendo-se esta, estável durante as 3 horas restantes.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

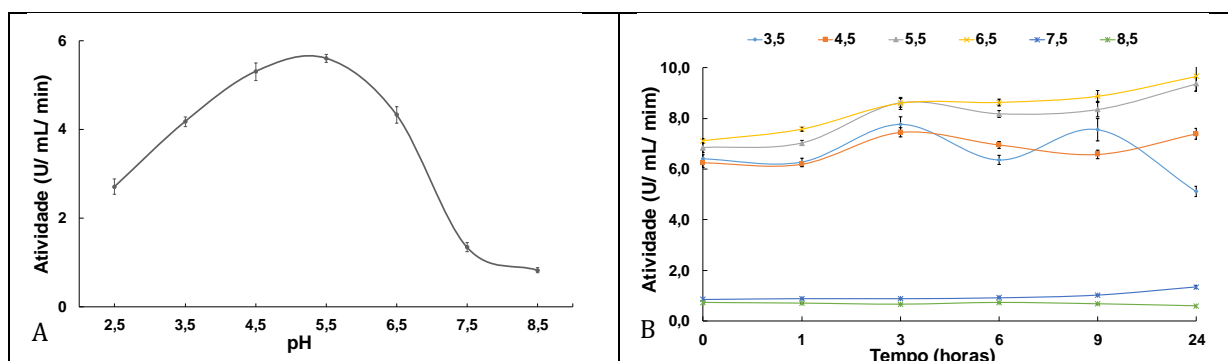


Figura 1. pH ótimo (A) e estabilidade da lipase de *A. niger* em diferentes pHs em relação ao tempo (B).

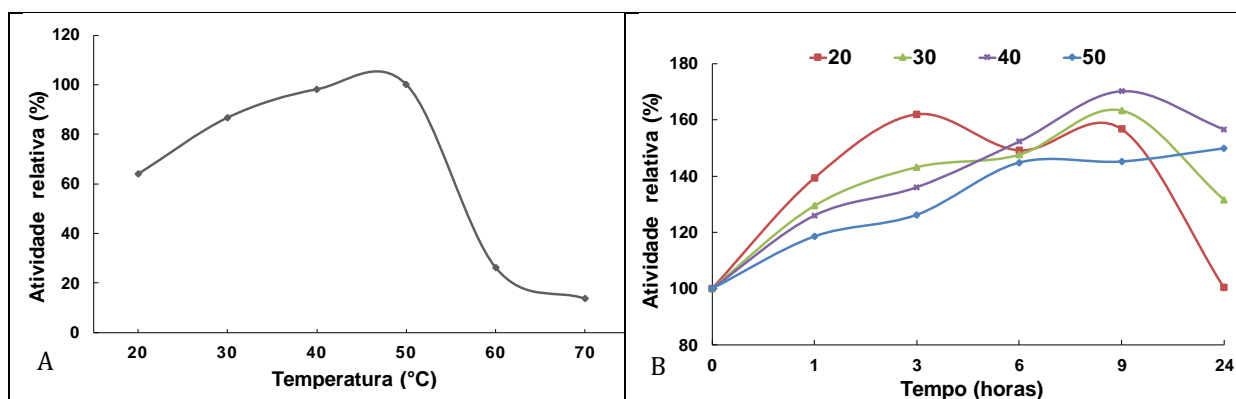
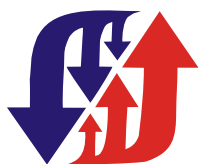


Figura 2. Temperatura ótima (A) e estabilidade térmica da lipase de *A. niger* em relação ao tempo (B).

Estabilidade da lipase A. niger em diferentes soluções aquosas de Líquidos Iônicos

A estabilidade de uma proteína está associada aos íons que estão ao seu redor, e sua capacidade de promover a ordem ou desordem das moléculas de água em redor da camada superficial da proteína, a qual resulta principalmente da influência de diferentes íons sobre as interações hidrofóbicas, seguindo o comportamento da série de Hofmeister. De modo geral, um líquido iônico consiste de um ânion cosmotrópico e um cátion caotrópico. De acordo com a série de Hofmeister, o cátion de amônio quaternário $[\text{Ch}]^+$ (caotrópico) quando combinado com um ânion cosmotrópico como o $[\text{Ac}]^-$, deve permitir a estabilização da lipase (XUE et al., 2013). O $[\text{Ch}][\text{Ac}]$ pode também estimular positivamente a atividade catalítica da lipase (LAI et al., 2011). Os resultados apresentados na Figura 3, demonstraram que a lipase se manteve estável na presença do $[\text{Ch}][\text{Ac}]$, estando de acordo com os dados previamente reportados na literatura (Figura 3). Ademais, foi verificado que não houve diferenças significativas na atividade relativa da enzima nas diferentes concentrações de LIs estudados.

Contrariamente à $[\text{Ch}][\text{Ac}]$, o $[\text{Ch}]\text{Cl}$ não contribuiu para um aumento da atividade catalítica da enzima (independente da concentração aplicada) (Figura 3). Nesse caso, a adição de $[\text{Ch}]\text{Cl}$ causou uma diminuição da atividade relativa em até 80% dos valores obtidos em soluções aquosas com as mesmas concentrações de $[\text{Ch}][\text{Ac}]$. Embora as concentrações do $[\text{Ch}]\text{Cl}$ aplicadas neste trabalho sejam menores do que as previamente estudadas por Deive et al. (2015), os nossos resultados estão de acordo com os reportados.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

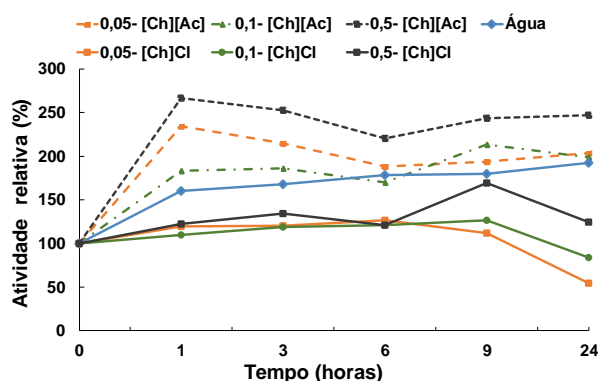


Figura 3. Atividade relativa da lipase de *A. niger* incubada em diferentes concentrações (mM) de [Ch][Ac] e [Ch]Cl durante 24 horas.

CONCLUSÕES

A lipase de *A. niger* apresentou maior atividade em condições ácidas e em temperaturas de 40-50°C. Na presença de [Ch][Ac], a enzima se manteve ativa e estável, porém este comportamento não foi observado na presença de [Ch]Cl. Os resultados mostram que [Ch][Ac] pode ser empregado como agente formador de SABs e ser aplicado como adjuvante para incrementar a atividade catalítica da lipase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Journal

- Deive, F.J.; Rodríguez, A.; Pereiro, A.B.; Araújo, J.M.M.; Longo, M.A.; Coelho, M.A.Z.; Canongia Lopes, J.N.; Esperança, J.M.S.S.; Rebelo, L.P.N.; Marrucho, I.M. 2011. Ionic liquid-based aqueous biphasic system for lipase extraction. *Green Chem* 13: 390-396.
- Deive, J.F.; Ruivo, D.; Rodrigues, J.V.; Gomes, C.M.; Sanromán, M.A.; Rebelo, L.P.N.; Esperança, J.M.S.S.; Rodríguez, A. 2015. On the hunt for truly biocompatible ionic liquids for lipase-catalyzed reactions. *RSC Adv* 5: 3386-3389.
- Dobrev, G.; Zhekova, B.; Dobрева, V.; Strinska, H.; Doykina, P.; Krastanov, A. 2015. Lipase biosynthesis by *Aspergillus carbonarius* in a nutrient medium containing products and byproducts from the oleochemical industry. *Biocatal Agri Biotech* 4: 77-82.
- Freire, M.G.; Cláudio, A.F.M.; Araújo, J.M.M.; Coutinho, J.A.P.; Marrucho, I.M.; Lopes, J.N.C.; Rebelo, L.P.N. 2012. Aqueous biphasic systems: a boost brought about using ionic liquids. *Chem. Soc. Rev.* 41: 4966-4995.
- Lai, J.Q.; Li, Z.; Lü, Y-H; Yang, Z. 2011. Specific ion effects of ionic liquids on enzyme activity and stability. *Green Chem* 13:1860-1868.
- Mayordomo, I.; Randez-Gil, F.; Prieto, J.A. 2000. Isolation, purification, and characterization of a cold-active Lipase from *Aspergillus nidulans*. *J Agric Food Chem* 48:105-109.
- Nunes, P.A.; Pires-Cabral, P.; Ferreira-Dias, S. 2011. Production of olive oil enriched with medium chain fatty acids catalysed by commercial immobilised lipases. *Food Chem* 127: 993-998.
- Saxena, R.K.; Davidson, W.S.; Sheoran, A.; Giri, B. 2003. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*. *Process Biochem* 39:239-247.
- Ventura, S. P. M.; Santos, L. D. F.; Saraiva, J. A.; Coutinho, J. A. P. 2012. Ionic liquids microemulsions: the key to *Candida antarctica* lipase B superactivity. *Green Chem* 14: 1620-1625.
- Vicente, F.A.; Malpiedi, L.P.; Silva, F.A.; Pessoa Jr., A.; Coutinho, J.A.P.; Ventura, S.P.M. 2014. Design of novel aqueous micellar two-phase systems using ionic liquids as co-surfactants for the selective extraction of (bio)molecules. *Sep Purif Technol* 135: 259-267.
- Xue, L.; Zhao, Y.; Yu, L.; Sun, Y.; Yan, K.; Li, Y.; Huang, X.; Qu, K. 2013. Choline acetate enhanced the catalytic performance of *Candida rugosa* lipase in AOT reverse micelles. *Colloid Surf. B* 105:81-86.

Book

- Freire, D. M. G.; Castilho, L. R. Lipases em Biocatálise in a Book: Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro. 2008. Interciência pp.369.