

PARTIÇÃO DE LIPASE PRODUZIDA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS

Carlos Henrique Carvalho Almeida¹, Vanessa Santos Sampaio²

RESUMO

Objetivou-se nesse trabalho a partição de lipase utilizando sistemas aquosos bifásicos formados por PEG 8000+sulfato de magnésio + água no pH 5,0 à 25°C. Os resultados indicaram que a composição global L1 alcançou a maior recuperação teórica (98,9%), enquanto o ponto global L2 demonstrou uma alta seletividade na partição das moléculas-alvo. O L3 também se destacou na purificação, reduzindo a concentração de contaminantes no extrato enzimático bruto.

Concluiu-se que o sistema aquoso bifásico com PEG 8000 (16%), sulfato de magnésio (7,5%) e água (76,5%) foi a configuração mais eficiente para purificar a lipase produzida por *Aspergillus niger* sob as condições de estudo.

PALAVRAS-CHAVE: sistema aquosos bifásicos, lipase, PEG, enzima.

Title: LIPASE PARTITION PRODUCED BY SOLID STATE FERMENTATION USING TWO-PHASE AQUATIC SYSTEMS

ABSTRACT

The aim of this work was to partition lipase using two-phase aqueous systems formed by PEG 8000+magnesium sulfate + water at pH 5.0 at 25°C. The results indicated that the L1 global composition achieved the highest theoretical recovery (98.9%), while the L2 global point demonstrated a high selectivity in partitioning the target molecules. L3 also stood out in purification, reducing the concentration of contaminants in the crude enzyme extract.

It was concluded that the two-phase aqueous system with PEG 8000 (16%), magnesium sulfate (7.5%) and water (76.5%) was the most efficient configuration to purify lipase produced by *Aspergillus niger* under conditions of study.

KEYWORDS:. biphasic aqueous system, lipase, PEG, enzyme.

INTRODUÇÃO

As lipases são hidrolases que atuam em ligações éster do grupo carboxílico, tais como reações de esterificação, interesterificação e transesterificação em meios não aquosos, acilação de mentóis e glicóis e síntese de peptídeos (Sharma; Chisti; Banerjee, 2001; Carvalho et al., 2003). Por isso, são aplicáveis em uma diversidade de setores industriais, como na indústria química, produção de surfactantes, na formulação de detergentes, resolução de misturas racêmicas, no tratamento de resíduos ricos em óleos e gorduras e na área da saúde, cosméticos ou antibióticos. Na indústria de alimentos apresentam aplicações na transformação de lipídios, a fim de se produzir lipídios estruturados com elevados teores de ácidos graxos polinsaturados, na produção de margarinas; no desenvolvimento de aromas na maturação de queijos e embutidos cárneos, entre outros.

A fermentação em estado sólido é uma tecnologia adequada à produção de enzimas, uma vez que este processo pode ser realizado *in situ* e rejeitos industriais podem ser empregados como fonte de nutrientes para o processo fermentativo.² Além disso, pesquisas com fermentação em estado sólido têm apresentado maiores produções de lipases, quando comparada com a fermentação submersa, devido alta taxa de crescimento da biomassa e à baixa atividade proteolítica.

Sistemas aquosos bifásicos (SAB), formados por fases imiscíveis, constituem uma excelente alternativa para separação, concentração e purificação de moléculas bioativas, pois são uma variante da extração líquido-líquido convencional, que favorecem a estabilidade de moléculas com origem em sistemas biológicos. A utilização dos SAB permite isolar e concentrar moléculas com atividade biológica de misturas complexas, como as proteínas, pois as fases constituídas majoritariamente por água, oferecem um ambiente adequado e com condições favoráveis à distribuição das mesmas nesses sistemas, tendo um baixo custo para implementação e fácil manuseio.

Sendo assim objetivou-se nesse trabalho a partição de lipase utilizando sistemas aquosos bifásicos formados por PEG 8000+sulfato de magnésio + água no pH 5,0 à 25°C.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Engenharia de Processos (LEP) do Campus de Itapetinga da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. O extrato enzimático utilizado neste trabalho foi obtido pesquisas feitas anteriormente em fermentação em estado sólido (Araujo SC; Ramos MRMF, do Espírito Santo EL; de Menezes LHS; de Carvalho MS; Tavares IMC; Franco M e de Oliveira JR et al, 2021). Todos os reagentes utilizados nesta pesquisa foram de grau analítico.

Para o experimento de partição foram utilizadas três linhas de amarração do sistema formado por PEG 8000 g/mol, sulfato de magnésio e água em pH 5,0 na temperatura de 25°C. Para obtenção dos sistemas forma adicionadas quantidades suficientes de

PEG (50%), sulfato de magnésio (40%) e extrato bruto (100 mM) para uma massa final de 10g para alcançar as concentrações L1 (7,5% sulfato de magnésio e 13% PEG 8000), L2 (7,5% sulfato de magnésio e 16% PEG 8000), L3 (7,5% sulfato de magnésio e 19% PEG 8000). A mistura foi agitada no vórtex e então centrifugada a 3500 rpm por 15 minutos para acelerar a formação de fases. Posteriormente o sistema foi mantido em repouso na temperatura de estudo por 12h em estufa BOD. Após esse tempo as fases foram coletadas para posterior determinação da atividade enzimática e determinação do teor de proteína.

O coeficiente de partição da proteína (K_p) é calculado pela equação 1:

$$(1) K_p = \frac{[C]_{sup}}{[C]_{inf}}$$

O coeficiente de partição da atividade enzimática (K_e) em (U/ml) a equação 2:

$$(2) K_e = \frac{[A]_{sup}}{[A]_{inf}}$$

O valor da seletividade (S) da enzima no sistema, através da equação 3:

$$(3) S = \frac{K_e}{K_p}$$

O valor do rendimento (Y_s) é uma maneira de avaliar a eficiência de partição da enzima, onde R corresponde à razão entre os volumes da fase superior e inferior, calculado na equação 4

$$(4) Y(\%) = \frac{100}{1 + (1/RK_e)}$$

Para o cálculo do fator de purificação (FP) é utilizado a equação 5:

$$(5) PF = \frac{AE}{AE_i}$$

Para quantificar o teor de proteínas no extrato bruto, foi utilizada a metodologia proposta por Bradford(1976). Como padrão utilizou-se a albumina soro bovina (BSA)

Para o ensaio de atividade utilizou-se a p-nitrofenila palmitato, que se baseia na hidrólise de nitrofenil palmitato. A liberação do p-nitrofenila, de coloração amarela, é detectada em 410nm. Utilizou-se 3 soluções.

Solução A : dissolve-se 162mg de pNPP em 30,0ml de isopropanol

Solução B: Adiciona-se 9,0g de triton X-100 e 0,90g de goma arábica em 450mL de tampão Tris-HCl 0,09M, pH 8,0.

Solução C: Adiciona-se 1,0mL de solução A em 9,0 mL de solução B sob agitação contínua.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 1 - Parâmetros de partição

<i>Composição Global</i>	<i>Ke</i>	<i>Kp</i>	<i>S</i>	<i>FP</i>	<i>Y%</i>
L1	0,004	0,490	0,008	7,221	98,908
L2	2,500	0,020	121,904	526,272	85,324
L3	1,998	0,023	86,809	420,665	82,193

O coeficiente de partição das proteínas apresentou valores menores que 1 para todas as composições globais, bem como o coeficiente de partição de atividade enzimática no ponto global L1. Tal comportamento indica migração preferencial das moléculas para a fase inferior rica em sal e pode ser explicado pelo efeito salting in promovido pela solução salina, onde os íons tendem a reforçar a camada de solvatação das biomoléculas estabelecendo aumento de sua solubilidade. Além disso, a partição para a fase rica em PEG é desfavorecida pelo efeito do volume de exclusão do polímero devido a sua extensa massa molar (RAMAKRISHNAN et al., 2016).

Em contrapartida, o coeficiente de partição de atividade enzimática alcançou valores superiores a 1 nos pontos globais L2 e L3, o que demonstra que a enzima teve maior afinidade pela fase superior rica em PEG. Tal resultado está associado à mudança na composição global dos sistemas L2 e L3, onde houve aumento da concentração do polímero. Nesse caso, a fase polimérica torna-se mais hidrofóbica e tende a excluir as moléculas de água, resultando no aumento de espaços intersticiais disponíveis (ASENJO e ANDREWS, 2011). Uma vez que o impedimento estérico nesse meio é reduzido, a afinidade da lipase aumenta devido ao seu caráter anfifílico (TACIAS-PASCACIO et al., 2016).

Em relação à recuperação teórica, é possível apontar que o sistema com composição global L1 obteve maior rendimento (98,9%). Já para o fator seletividade, observa-se maior resposta para o ponto global L2, o que indica a capacidade desse sistema em particionar a molécula alvo e demais proteínas em fases diferentes. De maneira semelhante, o SAB 2 apresentou maior valor para o fator de purificação, sugerindo que o sistema foi capaz de reduzir a concentração de contaminantes presentes no extrato bruto enzimático.

CONCLUSÃO

Nesse sentido, conclui-se que o sistema aquoso bifásico composto por PEG 8000 (16%), sulfato de magnésio (7,5%) e água (76,5%) é o protocolo mais eficiente na purificação da lipase produzida a partir de *Aspergillus niger* dentro das condições de estudo.

CONSIDERAÇÕES

Agradeço ao órgão Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (Fapesb) pelo apoio financeiro e a Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) pelo suporte para a condução do estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, Annie Nolasco. EXTRAÇÃO DE PROTEASES DE ORA-PRO-NÓBIS (*Pereskia aculeata* Miller) E PURIFICAÇÃO PARCIAL EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS FORMADOS POR PEG+ FOSFATO DE SÓDIO+ÁGUA. **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS**, Brasil, v. 1, n. 1, p. 1-65, mar./2020. Disponível em: <http://www2.uesb.br>. Acesso em: 30 ago. 2023.

COLLA, Luciane Maria; REINEHR, Christian Oliveira; COSTA, J. A. V. APLICAÇÕES E PRODUÇÃO DE LIPASES MICROBIANAS . **Revista CIATEC-UPF**, Brasil, v. 4, n. 2, p. 1-14, fev./2012. Disponível em: <https://repositorio.furg.br>. Acesso em: 28 ago. 2023.

SAMPAIO, Vanessa Santos. DADOS DE EQUILÍBRIO E MODELAGEM DE SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS FORMADOS POR PEG E SAIS DE SULFATO EM pH 2 E SUA APLICAÇÃO PARA PARTIÇÃO DE PROTEASES. **PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS**, Brasil, v. 1, n. 1, p. 1-88, jul./2019. Disponível em: <https://mail.google.com>. Acesso em: 29 ago. 2023.

SCIELO BRASIL. **Co-produção de lipase e biossurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos**. Disponível em: <https://www.scielo.br>. Acesso em: 30 ago. 2023.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **Otimização da produção de lipase por *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 por meio de fermentação em estado sólido**

utilizando resíduo agroindustrial com base em análise univariada. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 1 ago. 2023.