

PURIFICAÇÃO DE LIPASE PRODUZIDA A PARTIR *YARROWIA LIPOLYTICA* POR MEIO SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO E ULTRAFILTRAÇÃO

T.C. SANTOS¹, R. C. F. BONOMO², M. FRANCO³, P. V. FINOTELLI⁴ e P. F. F. AMARAL⁵

¹Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Engenharia Bioquímica

²Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Departamento de Estudos Básicos e Instrumentais

³Universidade Estadual de Santa Cruz, Departamento de Ciências Exatas e Tecnológicas.

⁴Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Produtos Naturais e Alimentos

E-mail para contato: tcsantos@ufrj.br

O uso de enzimas em diferentes segmentos industriais é crescente. A obtenção de enzimas compreende o processo fermentativo, as etapas de separação e concentração de produto, seguidos ou não da sua purificação e secagem. Com vistas ao uso do setor biotecnológico, a lipase foi produzida a partir da *Yarrowia lipolytica*, o extrato bruto obteve a atividade enzimática de 75 U/mL. Com esse extrato foram utilizadas duas formas de purificação parcial, por sistema aquoso bifásico (SAB) com o uso de polietilenoglicol (1500 Da) e fosfato de sódio (20% m/m) com variação de pH (6 e 8) em 4°C e 25°C, e o sistema de ultrafiltração tangencial (UF), em membranas de 10 kD. Os resultados demonstram que a purificação realizada pelo SAB, o fator de purificação (FP) quantificado foi de 34,74, já para a ultrafiltração o FP foi 6,55. Todos os tratamentos apresentaram tolerância a uma ampla faixa de temperatura (20 a 50°C) e pH (4 a 8,5) a 150 min de exposição, como atividade relativa superior a 50%.

1. INTRODUÇÃO

As lipases (glicerol éster hidrolases, E.C.3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas em seu ambiente natural. Estas possuem a função de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis aos correspondentes ácidos graxos e glicerol (ZAREVUCKA *et al.*, 1995). Elas representam um grupo de biocatalisadores acessíveis e de baixo preço, que em geral, são flexíveis quanto à sua especificidade. São as enzimas mais empregadas tanto em nível industrial (indústria alimentícia, de cosméticos e perfumes, biomédica, pesticidas, detergentes, entre outras) como acadêmico (BREUER *et al.*, 2004). As lípases são capazes de catalisar não apenas reações de hidrólise, mas também de síntese em meio aquo-restritos, como reação de esterificação, interesterificação, transesterificação, alcoólise e aminólise. Além disso, as lipases usualmente atuam sobre substratos não naturais (JAEGER e EGGERT, 2002).

A maioria dos custos de produção para um produto biológico simples reside na estratégia de purificação. Existe uma grande necessidade de se estabelecer técnicas de biosseparação eficientes, efetivas e econômicas em larga escala, que permitam atingir elevado grau pureza e rendimento de recuperação, mantendo a atividade biológica da molécula. A utilização dos SABs, compatível com os

processos de biosseparações, permite isolar moléculas com atividade biológica de misturas complexas, e oferece vantagens como curto tempo de processamento, baixo custo e facilidade de aplicação tanto em escala piloto como em escala industrial (COIMBRA e TEIXEIRA, 2009).

A maioria das lipases microbianas são extracelulares e o processo de cultivo é usualmente seguido pela remoção das células do meio de cultivo. O meio livre de células pode ser concentrado por ultrafiltração, ou com o uso dos Sistemas Aquosos Bifásicos (SABs), compatível com os processos de biosseparações, permite isolar moléculas com atividade biológica de misturas complexas, e oferece vantagens como curto tempo de processamento, baixo custo e facilidade de aplicação tanto em escala piloto como em escala industrial (COIMBRA e TEIXEIRA, 2009).

O objetivo deste trabalho foi a purificação da lipase produzida com a levedura *Yarrowia lipolytica* através da ultrafiltração tangencial e com o uso do sistema aquoso bifásico.

2. MATERIAIS E METODOS

2.1. Microrganismo

A levedura empregada no presente trabalho foi uma cepa selvagem de *Yarrowia lipolytica* 583 (IMUFRJ 50682) selecionada de um estuário da Baía de Guanabara no Rio de Janeiro, Brasil (HAGLER e MENDONÇA-HAGLER, 1981) e identificada pelo Instituto de Microbiologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro (AMARAL, 2007).

As células foram conservadas a 4°C após 24 horas de crescimento em tubos de ensaio com meio YPD (“Yeast Extract, Peptone, Dextrose”) contendo (em p/v): extrato de lêvedo 1%, peptona 2%, glicose 2% e Agar-agar 2% (AMARAL, 2007).

2.2. Cultivos

A partir dos tubos contendo as células preservadas em meio sólido YPD (descrito no item 2.1) inoculava-se, de forma estéril com uma alça de platina, 200 mL de meio de cultivo YPD em erlenmeyers de 500 mL. Após cerca de 70 horas em um incubador rotatório a 29°C, 160 rpm, a absorbância (570 nm) de uma amostra deste cultivo foi determinada e, em seguida as células foram centrifugadas de forma estéril a 3.000 g por 10 minutos e ressuspensas em 10 mL de meio de cultivo servindo de inóculo dos experimentos que foram descritos nos itens posteriores. O volume centrifugado desse pré-inóculo era suficiente para se obter uma concentração inicial de células de, aproximadamente, $1,0 \pm 0,1$ mg p.s. cel/mL nos meios de cultivo % (AMARAL, 2007).

2.3. Obtenção do extrato enzimático

Após o período ótimo de fermentação, o meio foi coletado e centrifugado a temperatura ambiente durante 10 min a 2016g. O sobrenadante foi utilizado como extrato enzimático, uma vez que a *Yarrowia lipolytica* produz lipase extracelular (KORDEL et al., 1991).

2.4. Determinação da atividade lipolítica

A atividade lipolítica foi determinada segundo a metodologia descrita por Macedo e colaboradores (1997). Para isso foi utilizado uma emulsão contendo 5mL de azeite de oliva e goma arábica a 7%, 2mL de tampão fosfato de sódio pH 7 (10mM) e 1mL de extrato enzimático. A mistura foi incubada por 30 minutos e 150 rpm em agitador orbital. A reação foi interrompida pela adição de 15mL de solução acetona/etanol (1:1 em volume). Os ácidos graxos liberados durante a reação foram titulados com NaOH 0,05N usando fenolftaleína como indicador. Um branco contendo o mesmo meio reacional que os ensaios com a enzima inativa foi utilizado. O cálculo da atividade enzimática foi efetuado segundo a Equação 1.

$$A \left(\mu \frac{\text{mol}}{\text{g}} \cdot \text{min} \right) = \frac{(V_a - V_b) \cdot M \cdot D \cdot 10^6}{t \cdot v} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde:

A é a atividade lipolítica, V_a é o volume de NaOH gasto na titulação da amostra (mL);

V_b é o volume do NaOH gasto na titulação do branco;

D é a diluição da amostra; M é a concentração da solução de NaOH;

v é o volume de extrato bruto (mL) e

t é o tempo de reação (min).

Uma unidade de atividade de lipase foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto.

2.5. Determinação do teor de proteínas totais

A concentração de proteínas no extrato enzimático foi determinada segundo a metodologia descrita por Bradford (1976), tendo como padrão a albumina de soro bovino.

2.6. Sistema aquoso bifásico (SAB)

Foi utilizado o sistema proposto por Padilha *et al.* (2010). Foram preparadas soluções de PEG 1500 a 50% p/p e soluções tampão fosfato de pHs 6 e 8, durante 12 horas em incubadora BOD. Após esse processo a solução que apresou maior atividade específica enzimática foi submetida a um sistema com membranas de dialise (850 SIGMA) para recuperação final do produto.

As Equações 2 e 3 serão utilizadas para cálculo dos parâmetros K_{prot} , K_{ativ} , onde FL é a fase leve (PEG) e FP a fase pesada (sal fosfato).

$$K_{\text{prot}} = \frac{\text{proteína (FP)}}{\text{proteína (FL)}} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$K_{ativ} = \frac{\text{atividade (FP)}}{\text{atividade (FL)}} \quad (\text{Eq. 3})$$

2.7. Ultrafiltração tangencial

O extrato bruto clarificado livre de partículas foi submetido a uma ultrafiltração tangencial, utilizando-se uma membrana de polipropileno em com diâmetro de corte de 10 kDa em temperatura ambiente, 150 psi de pressão e com 200 rpm.

2.8. Cálculo do fator de purificação

Para o cálculo do fator de purificação (FP), utilizou-se da Equação 5.

$$FP = \frac{AE}{AE(Bruta)} \quad (\text{Eq. 4})$$

E para a atividade específica usou-se da Equação 6.

$$AE = \frac{\text{Atividade de lipase}}{\text{concentração de proteína}} \quad (\text{Eq. 5})$$

Sendo:

AE: atividade específica das fases leve e pesada.

AE(Bruta): atividade específica da enzima bruta.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o processo fermentativo a atividade da lipase (extrato bruto livre de células) atingiu 58,3 U/mL e a proteína solúvel 0,315 mg/mL, conforme demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1 – Sistema Aquoso Bifásico com PEG 1500

Sistema a 4°C					
Fase	pH	Atividade Enzimática (U/mL)	Proteína solúvel (mg/mL)	Atividade Especifica (U/mg)	Fator de Purificação
Superior ¹	6	2,99 (± 0,03)	0,183 (± 0,09)	16,33 (± 0,02)	0,08 (± 0,05)
Inferior ²	6	53,83 (± 0,05)	0,0084 (± 0,01)	6408,33 (± 0,05)	34,74 (± 0,03)
Superior ¹	8	40,91 (± 0,01)	0,114 (± 0,02)	358,85 (± 0,02)	1,94 (± 0,02)
Inferior ²	8	10,02 (± 0,02)	0,11 (± 0,02)	92,77	0,50 (± 0,02)
Sistema a 25°C					
Fase	pH	Atividade Enzimática (U/mL)	Proteína solúvel (mg/mL)	Atividade Especifica (U/mg)	Fator de Purificação

Superior ¹	6	1,36 ($\pm 0,05$)	0,15 ($\pm 0,03$)	8,94 ($\pm 0,02$)	0,05 ($\pm 0,03$)
Inferior ²	6	12,83 ($\pm 0,1$)	0,051 ($\pm 0,06$)	251,56 ($\pm 0,02$)	1,36 ($\pm 0,05$)
Superior ¹	8	10,02 ($\pm 0,02$)	0,11 ($\pm 0,04$)	92,77 ($\pm 0,02$)	0,50 ($\pm 0,03$)
Inferior ²	8	1,05 ($\pm 0,01$)	0,25 ($\pm 0,01$)	4,21 ($\pm 0,02$)	0,023 ($\pm 0,04$)

1 Fase constituída de aproximadamente 95% de PEG 1500

2 Fase constituída de aproximadamente 95% de tampão estoque fosfato de potássio

Os resultados demonstrados na Tabela 1, as maiores atividades da lipase foram obtidas a 4°C, apresentado um maior índice de purificação com o sistema tamponado ao pH 6 na fase inferior, constituída basicamente por solução tampão fosfato, o que garante maior facilidade de recuperação da biomolécula após submissão no sistema aquoso.

Com a ultrafiltração a atividade final da enzima lipase do extrato concentrado foi de 128,15 U/mL, com 0,106 mg/ml de proteína solúvel, com atividade específica 1208,96. Assim o fator de purificação (F.P.) foi estimado em 6, 55. No sistema de ultrafiltração o volume inicial foi 1 litro com recuperação final de 200 mL.

Outras técnicas empregadas na purificação de lipases são citadas por Saxena e colaboradores (2003), como, por exemplo: dois processos usados para obtê-las de *C. viscosum* por meio do uso de micelas reversas de AOT/iso-octano tendo uma recuperação da atividade em 91% e fator de purificação de 4,3; e outro com o emprego de cromatografia usando Amberlite CG e Shofadex com recuperação da atividade de 2,8% e fator de purificação de 23; ou ainda de *B. Streamthermophilus* por cromatografia com CM-Sefarose e DEAE-Sefarose, obtendo uma recuperação da atividade enzimática de 62,2% e fator de purificação de 11,6. Padilha e colaboradores (2009) purificaram a lipase de *Pseudomonas cepacia* usando cromatografia de troca iônica por adsorção em leito expandido. Para o grau de expansão 1,5 vezes a altura do leito fixo, os autores recuperaram a atividade enzimática em 102,45%, com fator de purificação próximo a 80.

Os ensaios de estabilidade a temperatura e pH são apresentados nas Figuras 1 e 2, em a lipase do processo de ultrafiltração foi mais estável que a lipase purificada com o SAB, mas mesmo com ambos tratamentos, a lipase apresentou tolerância a uma ampla faixa de temperatura (20 a 50°C) e pH (4 a 8,5) a 150 min de exposição, como atividade relativa superior a 50%.

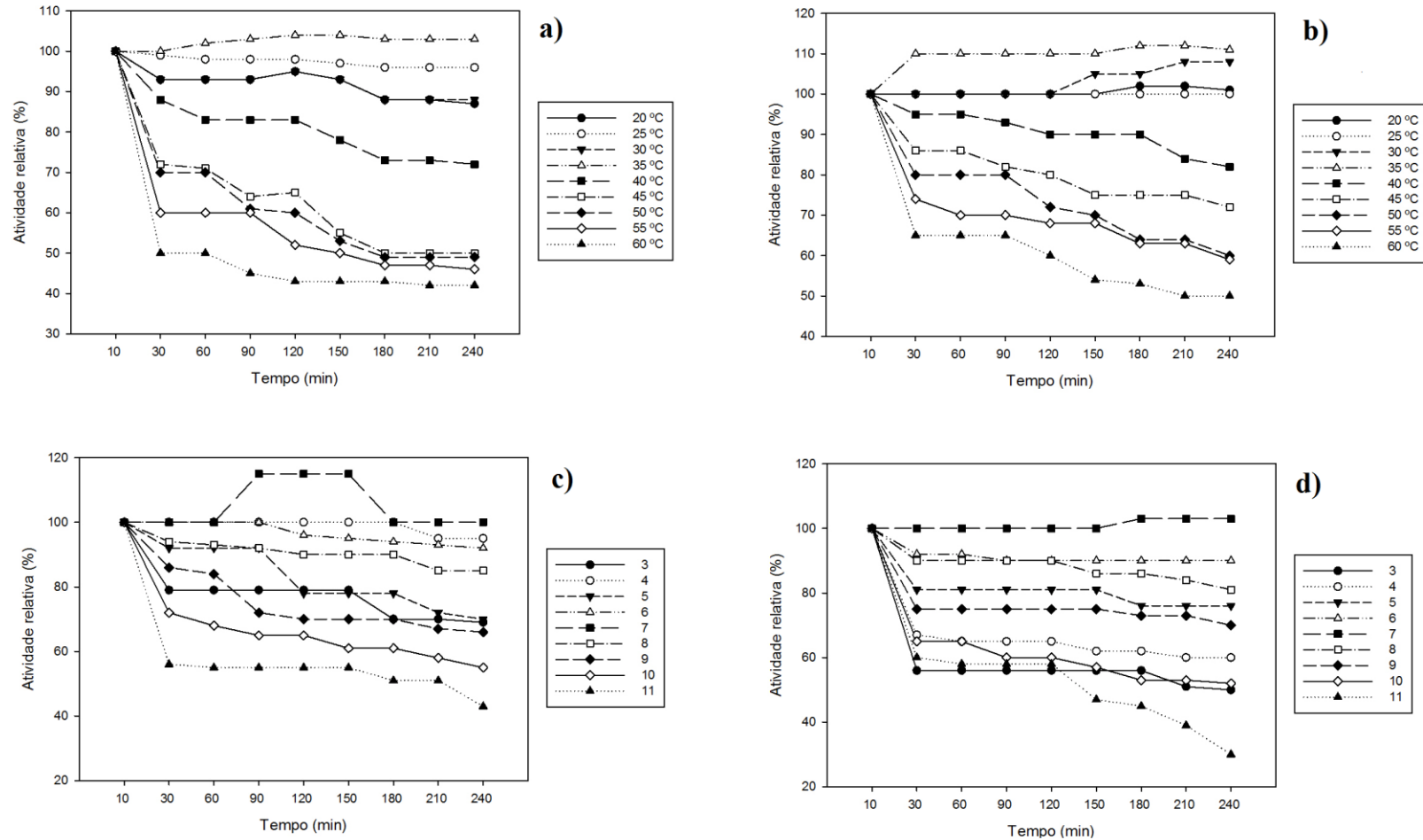


Figura 1. Estabilidade a temperatura (a) e pH (c) para a lipase com o tratamento com SAB, estabilidade a temperatura (b) e ao pH (d) para a lipase purificada com a ultrafiltração

4. CONCLUSÃO

Com o uso dos sistemas de purificação é possível estabelecer que o uso do SAB é mais satisfatório, porém o sistema de ultrafiltração gera um menor custo no processo total, já que não é necessário o uso de reagentes e nenhum processo adicional para recuperação final da biomolécula. A enzima é estável a uma ampla faixa de temperatura e pH, mesmo após os tratamentos de purificação, o que demonstra aplicabilidade industrial futura.

5. REFERÊNCIAS

AMARAL, P. F. F. **Produção de lipase de *Yarrowia lipolytica* em Biorreator Multifásico**. 2007. 220 p. 29,7 cm. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – EQ, 2007.

BRADFORD, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v.72, n.1-2, 248-254. 1976,

BREUER, M., DITRICH, K., HABICHER, T., HAUER, B., KESSELER, M., STURMER, R., ZELINSKI, T., BROCKMAN, H. L., BORGSTROM, B., Industrial methods for the production of optically active intermediates. **Angewandte Chemie International**., n.43, v.7, p.788-824. 2004

COIMBRA, J.S. R.; TEIXEIRA, J. **Engineering Aspects of Milk and Dairy Products**. Boca-Raton, CRC Press, 2009.

JAEGER, K. E., EGGERT, T., Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, n.4, p.390-397, 2002.

KORDEL, M., HOFMANN, B., SCHOMBURG, D., SCHMID, R. Extracellular lipase of *Burkholderia sp* Strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization and preliminary X-ray diffraction data. **Journal of Bacteriology**, v. 177, p. 4836-4841, 1991.

MACEDO, G.A., PARK, Y.K., PASTORE, G.M. Partial purification and characterization of an extracellular lipase from a newly isolated strain of *Geotrichum sp*. **Journal of the Brazilian Society for Microbiology**, v. 28, p. 90-95, 1997.

PADILHA, G. S.; CURVELO-SANTANA, J. C.; ALEGRE, M. R.; TAMBOURGI, E. B. Expanded bed adsorption of an alkaline lipase from *Pseudomonas cepacia*. **Journal of Chromatography B**, v. 877, p. 521- 526, 2009.

PADILHA, G.S., CASTIGIONI, G.L., MONTE ALEGRE, R., TAMBOURGI, E.B. Avaliação de diferentes íons na atividade da lipase de *Pseudomonas cepacia*. **Exacta**, v.7, n. 2, p. 181-186, 2010.

SAXENA, R. K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W. S. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, p. 1-18, 2003.

ZAREVUCKA, M., ZALSKA, Z., REJZEK, M., STREINZ, L., WIMMER, Z., MACKOVA, M., DEMNEROVA, K., Lipase-mediated hydrolysis and esterification. **Enzyme Microbiology Technology**, v.17, n.10, p.866-869, 1995.