

Partição da lipase de *Burkholderia cepacia* em sistema bifásico aquoso PEG 4000/fosfato

Lipase partitioning from Burkholderia cepacia by aqueous two phase system PEG4000/phosphate

Giovana da Silva Padilha

Doutora em Engenharia Química
Departamento de Engenharia de Sistemas Químicos e
Informática – Unicamp

Campinas – SP [Brasil]

giovana_padilha@yahoo.com.br

Ranulfo Monte Alegre

Doutor em Engenharia de Alimentos
Departamento de Engenharia de Alimentos – Unicamp
Campinas – SP [Brasil]
ranulfo@fea.unicamp.br

Elias Basile Tambourgi

Doutor em Engenharia Química
Departamento de Engenharia de Sistemas Químicos e
Informática – Unicamp
Campinas – SP [Brasil]
eliasm@feq.unicamp.br

Este trabalho teve como objetivo mostrar como purificar a lipase de *Burkholderia cepacia* com o uso do sistema bifásico aquoso (SBA) PEG4000/fosfato. Esse sistema é baseado no equilíbrio do polietileno glicol e sal fosfato. Um planejamento fatorial 2^2 foi usado para avaliar o efeito do pH (6, 7 e 8) e linhas de amarração (concentração de equilíbrio entre o PEG e sal fosfato) no coeficiente de partição. O volume total do sistema foi de 7 mL. A lipase foi obtida a partir de meio com óleo de soja por fermentação usando a cepa de *Burkholderia cepacia*. A combinação dos melhores dados otimizados de coeficiente de partição apresentou o SBA PEG 4000/fosfato a pH 8 como o melhor sistema a ser utilizado na purificação da lipase.

Palavras-chave: *Burkholderia cepacia*. Lipase. Sistema bifásico aquoso.

This work aimed to show how to purify the lipase from *Burkholderia cepacia* by PEG 4000/phosphate aqueous two phase system (ATPS). This system is based on the equilibrium of the polyethylene glycol (PEG) and phosphate salts. A factorial design 2^2 was used to evaluate the effect of pH (6, 7 and 8) and tie lines (PEG and phosphate salt equilibrium concentrations) on the partition coefficient. Total volume systems were of about 7 mL. Lipase was obtained from medium containing soy oil by fermentation using *Burkholderia cepacia* yeast. The combination of the best data optimized partition presented pH 8 of ATPS PEG 4000/phosphate as the best system for being utilized in the purification of lipase.

Key words: Aqueous two phase system. *Burkholderia cepacia*. Lipase.

1 Introdução

Técnicas de isolamento e purificação de biomoléculas têm apresentado acentuado crescimento nos últimos anos. Métodos convencionais muitas vezes não são adequados para separar produtos de origem biológica, por isso novos sistemas de separação estão sendo estudados e desenvolvidos. Uma das técnicas que possuem bom rendimento na separação da biomolécula, sem interferir em sua atividade e com boa viabilidade econômica, é a partição em sistemas bifásicos aquosos (SBA) de proteínas, enzimas e ácidos nucleicos (PESSOA e KILIKIAN, 2005; DIAMOND e HSU, 1992). Os SBAs podem ser formados por soluções aquosas de dois polímeros hidrofílicos ou por soluções aquosas de um polímero e um sal. Entre os sistemas bifásicos aquosos mais estudados em partição aquosa, destaca-se o formado por PEG/dextrana, que apresenta, no entanto, o grande inconveniente do elevado custo da dextrana. Para combater a falta de competitividade econômica dos SBAs constituídos por PEG e dextrana tem-se recorrido aos SBAs PEG/sal. Sistemas formados por PEG e sal são empregados por apresentarem rápida separação de fases, baixo custo e elevada seletividade na separação de moléculas com base na solubilidade (PESSOA e KILIKIAN, 2005; ALBERTSSON, 1971). Embora existam diversos sais que formem duas fases com o PEG, o sal fosfato de potássio é utilizado por apresentar alto coeficiente de partição de biomoléculas em relação a outros sais, tais como o NaCl e o Na₂SO₄, além de ser uma boa alternativa de baixo custo aos processos convencionais (PEG/dextrana) (ALBERTSSON, 1971).

Os SBAs polímero/polímero ou polímero/sal oferecem ambientes físico-químicos apropriados para as biomoléculas, apresentando baixas diferenças de potencial, tensão superficial em torno de 10⁻⁷ N/m, contendo 80 a 90% em massa de água em suas fases (DIAMOND e HSU, 1992). Entre as

diversas biomoléculas a serem particionadas por SBA, encontram-se as lipases.

As lipases (triglicerol acil-hidrolases E.C. 3.1.1.3) são enzimas que hidrolisam ligações ésteres de triacilgliceróis. Em razão do desenvolvimento de tecnologias baseadas no uso destas enzimas para a síntese de novos compostos, a tecnologia das lipases está em constante expansão. A aplicação das lipases tem sido cada vez mais promissora no processamento de formulações de detergentes, modificações de óleos e gorduras, nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos e laticínios. Também podem ser usadas na catálise de algumas reações de interesterificação, como alcoólise e acidólise, e como catalisadoras nas reações de esterificação e transesterificação (PENCREAC'H e BARRATI, 1996; SHARMA et al., 2002; SINGH e BANERJEE, 2007).

As lipases são encontradas em diversos organismos, incluindo animais, plantas, fungos e bactérias. Dentre os microrganismos produtores de lipase, destacam-se fungos dos gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus* e *Mucor*, bactérias do gênero *Pseudomonas* (*Burkholderia*) e leveduras do gênero *Candida* (KORDEL et al., 1991). O rápido crescimento celular, em relação aos fungos, é uma das vantagens das fontes bacterianas como produtoras destas enzimas, além de serem consideradas de alto potencial biotecnológico em razão da estabilidade em elevadas temperaturas e em solventes orgânicos. Dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molecular variando entre 20 a 75 kDa, atividade ótima em pH na faixa entre 6 a 8 e em temperaturas entre 30 e 40°C (BEISSON et al., 2000; BORGSTRÖM e BROCKMAN, 1984; KORDEL et al., 1991; PASTORE et al., 2003).

Pastore e colaboradores (2003) obtiveram lipases de *Rizopus sp* após fermentação em meio contendo azeite de oliva. Depois, estas enzimas foram purificadas usando fracionamento com sulfato de amônio e cromatografia em resina

SEPHADEX, o fator de purificação ficou próximo de 5 e a recuperação da atividade ficou abaixo dos 3%. Sharma e colaboradores (2002) purificaram uma lipase de *Bacillus sp.* A purificação se deu em cinco etapas: centrifugação, precipitação com sulfato de amônio, diálise, cromatografia de troca iônica e filtração em gel. Após a última etapa alcançou-se um fator de purificação acima de 200, embora a recuperação da atividade enzimática tenha sido inferior aos 20%. 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 Shefadex com recuperação da atividade de 2,8% e fator de purificação de 23; ou ainda de *B. Streamthermofilus* 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.

Neste trabalho foi feito estudo de otimização de purificação da lipase, a partir de planejamento fatorial, utilizando o pH e o comprimento da linha de amarração como fatores que influenciam no coeficiente de partição no sistema bifásico aquoso (SBA) PEG 4000/fosfato. Embora diversas técnicas sejam empregadas na purificação dessas enzimas, dados acerca de etapas de recuperação da lipase de *Burkholderia cepacia* usando sistemas bifásicos aquosos PEG/fosfato de potássio ainda não foram encontrados na literatura.

2 Materiais e métodos

2.1 Materiais

Microrganismo: Foi utilizada a cepa de *Burkholderia cepacia*, obtida da Fundação André Tosello, mantida em tubos de ensaio a 4°C, no ágar nutriente.

Reagentes: todos os reagentes utilizados foram de grau de pureza analítico. Acetona, álcool etílico, fosfato monobásico de sódio, fosfato dibásico de sódio, fosfato monobásico de potássio, fosfato dibásico de potássio, hidróxido de sódio, sulfato de magnésio e o polietileno glicol com massa molecular de 1500 foram adquiridos pela Synth (Diadema, SP). A goma arábica, ágar-ágar, extrato de levedura e peptona bacteriológica foram obtidos da Oxoid (Londres, UK). Foram obtidos no comércio local os óleos de soja (Liza) e azeite de oliva (Gallo) com acidez máxima declarada pelos fabricantes de 0,3% e 0,5%, respectivamente. A albumina de soro bovino (BSA) com 98% de grau de pureza foi adquirida da Sigma (EUA).

2.2 Métodos

Preparo do inóculo e sistema fermentativo: O inóculo foi transferido dos tubos de ensaio para Erlenmeyers de 125 mL contendo extrato de levedura (3g/L), peptona (3g/L), K_2PO_4 (4g/L) e $MgSO_4$ (0,2g/L) e 3% (v/v) de óleo de soja. A adaptação do microrganismo foi realizada durante 48h a 30°C e 150 rpm. Após adaptação do microrganismo, o inóculo foi transferido para biorreator tipo Bioflo III (com volume útil de 5000mL contendo 3000mL de meio). O ar foi fornecido por compressor, esterilizado por filtro de lã de vidro e a vazão foi controlada por meio de rotâmetros. O meio de cultivo estudado por Castiglioni e Monte Alegre (2007) apresentou as mesmas concentrações preparadas para o inóculo, porém com 6% (v/v) de óleo de soja para induzir a produção da lipase. A fermentação foi conduzida a 30°C,

pH 7, aeração de 1,5vvm e agitação de 150rpm durante 96h.

Obtenção do extrato enzimático: Após as 96h de fermentação, o meio foi coletado e centrifugado em temperatura ambiente durante 10min a 2683g. Os sobrenadantes foram utilizados como extrato enzimático, uma vez que a *Burkholderia cepacia* produz lipase extracelular (Kordel et al., 1991).

Determinação do teor de proteínas: Para determinação da concentração de proteínas no extrato enzimático foi usada a metodologia descrita por Bradford (1976), tendo como padrão a albumina de soro bovino.

Obtenção do coeficiente de partição da lipase: Visando a redução da quantidade de experimentos a serem realizados e uma melhor avaliação dos resultados obtidos, foi utilizado um planejamento fatorial 2^2 com pontos centrais, no qual foram investigados a influência do pH (6, 7 e 8) e do comprimento da linha de amarração (concentrações do equilíbrio PEG/fosfato) sobre o coeficiente de partição da lipase. Cada fator foi variado em três níveis para o planejamento pelo método do ponto central (+1, 0, -1), com triplicata nos pontos centrais, totalizando 7 ensaios. Para cada ensaio, os pontos das linhas de amarração (Padilha et al., 2007) foram reproduzidos em tubos graduados com volume total do sistema de 7 mL. A estes tubos foi adicionado o extrato fermentado que continha a lipase. Assim que o equilíbrio difusivo foi atingido (entre 12 e 24 horas), coletou-se 1 mL de amostra de cada fase. A determinação da atividade e da concentração de proteínas totais nas fases inferior e superior foi determinada segundo a metodologia descrita por Macedo e colaboradores (1997) e por meio do método de Bradford (1976), respectivamente. A distribuição da biomolécula entre as fases do SBA foi caracterizada pelo coeficiente de partição (K), conforme a Equação 1.

$$K = \frac{C_s}{C_i} \quad (1)$$

Onde: C_s e C_i são as concentrações de equilíbrio nas fases superior e inferior, respectivamente.

Pela metodologia de análise de variância ANOVA, segundo Barros Neto e colaboradores (1995), foram analisadas a significância do modelo, o ajuste de dados, o cálculo das médias quadráticas, os erros puros de cada estimativa de parâmetro, a correlação múltipla e as porcentagens de variáveis explicáveis para a partição da lipase. Modelos com os valores de K na forma logarítmica também foram testados.

3 Resultados e discussões

A Tabela 1 apresenta o resultado do planejamento fatorial 2^2 com os valores do coeficiente de partição (K) da atividade enzimática e proteína da lipase de *Burkholderia cepacia*.

Tabela 1: Resultados de partição (K) da lipase de *Burkholderia cepacia* por SBA PEG4000/fosfato

Ensaio	x_1	x_2	pH	LA	$K_{atividade}$	$K_{proteína}$
1	-1	-1	6	1	0,050	0,020
2	1	-1	8	1	0,375	0,151
3	-1	1	6	3	0,541	0,007
4	1	1	8	3	0,441	0,191
5	0	0	7	2	0,194	0,025
6	0	0	7	2	0,180	0,031
7	0	0	7	2	0,176	0,034

Fonte: Os autores.

Para analisar as variáveis independentes, utilizou-se do diagrama de Pareto, que representa os efeitos estimados, em ordem decrescente de magnitude, das variáveis pH e comprimento da linha de amarração (LA) e suas interações das respostas linearizadas de atividade enzimática (Figura 1) e proteína (Figura 2) da lipase de *Burkholderia*

cepacia. Foram considerados significativos os termos cujos valores de *t* calculado (representado pelas barras horizontais no gráfico de Pareto) apresentam-se superiores ao valor de *t* tabelado = 4,30 (representado pela linha tracejada vertical do gráfico), para distribuição de Student, a 95% de confiança. Analisando a Figura 1, os fatores pH e comprimento da linha de amarração, bem como a interação entre eles são estatisticamente significativos, onde observa-se que o pH e LA apresentaram efeitos positivos, ou seja, usando os maiores níveis é possível aumentar o coeficiente de partição. Entretanto, na Figura 2 o comprimento da linha de amarração não foi fator significativo para a partição da proteína da lipase de *Burkholderia cepacia*, mas o pH apresentou efeito positivo no coeficiente de partição.

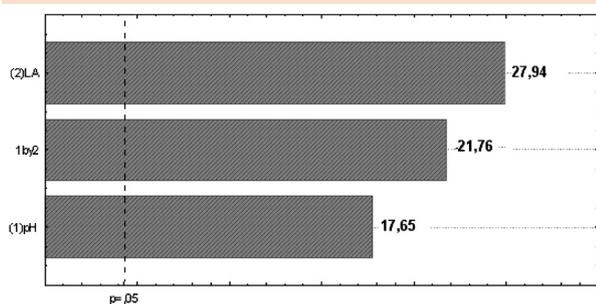


Figura 1: Estimativa dos efeitos por meio do gráfico de Pareto - variável resposta do coeficiente de partição (*K*) da atividade enzimática da lipase de *Burkholderia cepacia*

Fonte: Os autores.

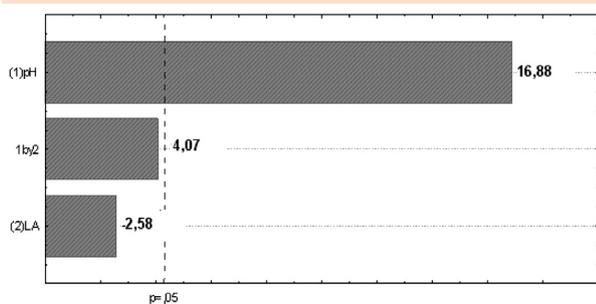


Figura 2: Estimativa dos efeitos por meio do gráfico de Pareto - variável resposta do coeficiente de partição (*K*) da proteína da lipase de *Burkholderia cepacia*

Fonte: Os autores.

As influências do pH e comprimento da linha de amarração sobre o coeficiente de partição da atividade enzimática e proteína da lipase de *Burkholderia cepacia* foram verificadas por meio da análise de variância (ANOVA) (Tabela 2). Com esses dados pode-se obter a significância da regressão e da falta de ajuste com 95% de confiança ($p \leq 0,05$), utilizando o teste *F* para o planejamento estudado. A análise de variância (ANOVA) mostrou que o modelo ajustado para a proteína foi significativo, satisfazendo o critério sugerido por Barros Neto e colaboradores (1995), visto que a razão MQ_R/MQ_r (*F* calculado) foi maior que o valor tabelado de $F_{0,95;3,3}$ (9,28) e a razão MQ_{faj}/MQ_{ep} foi menor do que o valor de $F_{0,95;1,2}$ (18,51). No entanto, ao analisar o modelo para a atividade enzimática, notou-se que a razão MQ_{faj}/MQ_{ep} não foi significativa (*F* calculado superior ao *F* tabelado), embora o valor da razão MQ_R/MQ_r foi de 17,43. Comparado com $F_{0,95;3,3} = 9,28$, este valor indica uma regressão significativa e também útil para fins preditivos. Em ambos os casos, o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,9460 e 0,9578, indicando que o modelo explicou aproximadamente 96% da variação dos dados observados da atividade da enzima e proteína, respectivamente. Nesse caso, o modelo pode ser utilizado para descrever o comportamento do coeficiente de partição (*K*) sobre a influência do pH e da linha de amarração na recuperação da lipase de *Burkholderia cepacia* em SBA PEG 4000/fosfato.

Os modelos codificados propostos para representar a linearização da partição da atividade enzimática e proteína da lipase foram ajustados por meio de regressão em função dos fatores pH e comprimento da linha de amarração (LA), conforme as Equações 2 e 3. Os modelos mostraram uma dependência linear dos coeficientes de partição para o pH e o comprimento da linha de amarração do SBA PEG 4000/fosfato, conforme descrito pelo modelo de Albertsson (1971).

Tabela 2: Resultados da ANOVA para a variável partição da enzima e proteína da lipase de *Burkholderia cepacia*

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F _{calculado}	F _{tabelado}	R2
Partição da atividade da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>						
Regressão	3,66	3	1,22	17,43	9,28	94,60
Resíduo	0,21	3	0,07	-	-	
Falta de ajuste	0,20	1	0,20	20,00	18,51	
Erro Puro	0,01	2	0,01	-	-	
Total	3,87	6	-	-	-	
Partição da proteína da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i>						
Regressão	7,67	3	2,57	23,36	9,28	95,78
Resíduo	0,34	3	0,11	-	-	
Falta de ajuste	0,29	1	0,29	9,67	18,51	
Erro Puro	0,05	2	0,03	-	-	
Total	8,01	6	-	-	-	

Fonte: os autores

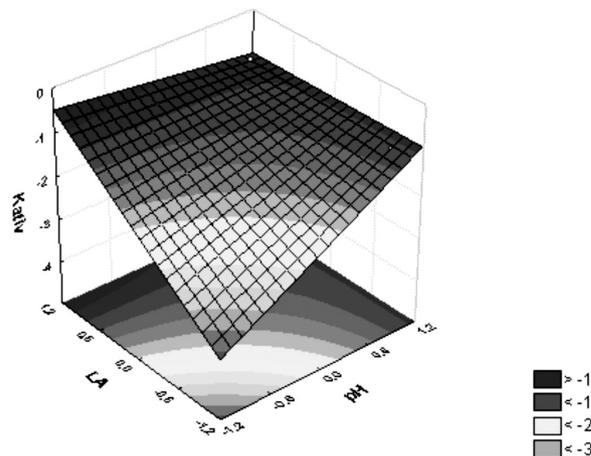
$$\ln K_{ativ} = 1,50 + 0,45 \cdot pH + 0,63 \cdot LA - 0,55 \cdot pH \cdot LA$$

(2)

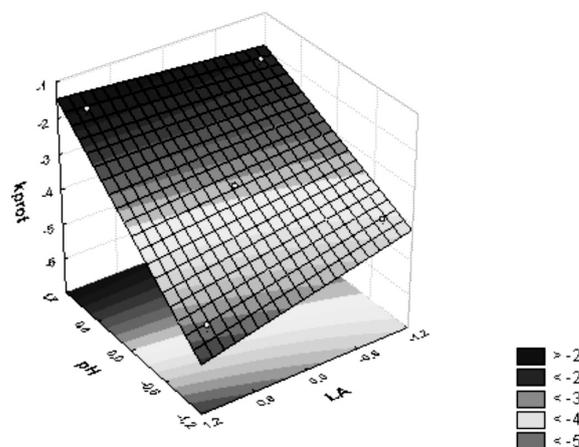
$$\ln K_{ativ} = -3,28 + 1,33 \cdot pH - 0,20 \cdot LA - 0,32 \cdot pH \cdot LA$$

(3)

Por meio do software STATISTICA versão 8.0 foi possível gerar as superfícies-resposta da partição da atividade enzimática (Figura 3) e proteína (Figura 4) da lipase de *Burkholderia cepacia* por SBA PEG 4000/fosfato. Na Figura 1 observa-se que maiores valores de K foram obtidos quando os valores de pH e o comprimento da linha de amarração foram aumentados, ou seja, a melhor condição de partição dessas enzimas é no pH 8 e na última linha de amarração. Na Figura 2, os maiores valores de K foram obtidos quando também se aumentaram os valores de pH, mas não houve uma dependência do comprimento da linha de amarração, pois se mantiver o pH em sua região de máximo não será observada uma maior variação da partição ao deslocarmos da região de maiores valores para a de menores valores da linha de amarração.

**Figura 3: Superfície-resposta na avaliação do pH e comprimento da linha de amarração (LA) no coeficiente de partição da atividade enzimática (K_{ativ}) da lipase de *Burkholderia cepacia***

Fonte: Os autores.

**Figura 4: Superfície-resposta na avaliação do pH e comprimento da linha de amarração (LA) no coeficiente de partição da proteína (K_{prot}) da lipase de *Burkholderia cepacia***

Fonte: Os autores.

Conclusões

Por meio da otimização das respostas do coeficiente de partição da lipase de *Burkholderia cepacia* em SBA PEG 4000/fosfato foi possível verificar a influência do pH e da linha de amar-

ração. A otimização RSM apresentou um modelo com as respostas linearizadas da atividade enzimática e proteína que indicou a região de maiores pHs como sendo aquela onde se obtém os valores máximos do coeficiente de partição (K). Os resultados indicaram que o melhor sistema a ser utilizado na recuperação da lipase é a última linha de amarração do SBA PEG 4000/fosfato a pH 8.

Referências

- ALBERTSSON, P. A. *Partition of cell particles and macromolecules*, New York: Ed. John Wiley & Sons, 1971.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. *Planejamento e otimização de experimentos*, Campinas: Editora da Unicamp, 1995.
- BEISSON, F.; TISS, A.; RIVIÈRE, C.; VERGER, R. Methods for lipase detection and assay: a critical review. *European Journal Lipid Science Technology*, p. 133-153, 2000.
- BORGSTRÖM, B.; BROCKMAN, H. *Lipases*, New York: Ed. Elsevier, 1984.
- 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, p. 248-254, 1976.
- CASTIGLIONI, G. L.; MONTE-ALEGRE, R. Produção simultânea de lipase e bioemulsificante por *Pseudomonas cepacia*. In: *6º Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos*, Campinas – SP, 2007.
- DIAMOND, A. D.; HSU, J. T. Aqueous two phase systems for biomolecule separation. *Advances in Biochemistry Engineering*, v. 47, p. 89-135, 1992.
- KORDEL, M.; HOFMANN, B.; SCHOMBURG, D.; SCHMID, R. Extracellular lipase of *Pseudomonas 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 Brazilian Society for Microbiology*, v. 28, p. 90-95, 1997.
- PADILHA, G. S.; FERREIRA, J. F.; ALEGRE, R. M.; TAMBOURGI, E. B. Diagrama de fases para utilização em sistema bifásico aquoso com diferentes massas molares de PEG e pHs. *Anais do 9º Congresso Brasileiro de Polímeros*, Campina Grande – PB, 2007.
- 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.
- PASTORE, G. M.; COSTA, V. S. R.; KOBLITZ, M. G. B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus sp.* *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 23, p. 135-140, 2003.
- PENCREAC'H, G.; BARRATI, J. C. Hydrolysis of p-nitrophenyl palmitate in n-heptane by the *Pseudomonas cepacia* lipase: a simple test for the determination of lipase activity in organic media. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 18, p. 417-422, 1996.
- PESSOA JR., A.; KILIKIAN, B. V. *Purificação de produtos biotecnológicos*, Barueri: Ed. Manole, 2005.
- 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.
- SHARMA, R.; SONI, S. K.; VOHRA, R. M.; GUPTA, L. K.; GUPTAS, J.K. Purification and characterisation of a thermostable alkaline lipase from a thermophilic *Bacillus sp.* RSJ-1. *Process Biochemistry*, v. 37, p. 1075-1084, 2002.
- SINGH, S.; BANERJEE, U.C. Purification and characterization of trans-3-(4-methoxyphenyl) glycidic acid methyl ester hydrolyzing lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Process Biochemistry*, v. 42, p. 1063-1068, 2007.

Recebido em 7 jan. 2010 / aprovado em 20 ago. 2010

Para referenciar este texto

PADILHA, G. da S.; ALEGRE, R. M.; TAMBOURG, E. B. Partição da lipase de *Burkholderia cepacia* em sistema bifásico aquoso PEG 4000/fosfato. *Exacta*, São Paulo, v. 8, n. 2, p. 193-199, 2010.

