

ESTUDO DA PARTIÇÃO DE LIPASES EM SISTEMAS AQUOSOS BIFÁSICOS FORMADOS POR PEG 8000, SULFATO DE MAGNÉSIO E ÁGUA

Izabella de Carvalho Batista MUNIZ¹, Lucas Silva de Sousa², Annie Nolasco Alves¹, Priscilla Amaral Nascimento³, Vanessa Santos Sampaio⁴, Renata Cristina Ferreira BONOMO⁴

¹Doutoranda, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos (PPGECAL), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB); ²Doutorando, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa (UFV), ³Pós-doutoranda, Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos (PPGECAL), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), ⁴Docente, Programa de Departamento de Tecnologia Rural e Animal (DTRA), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB).

*E-mail para contato: izabelacarvalhobatista@hotmail.com

RESUMO – Os sistemas aquosos bifásicos (SABs) consistem em uma ferramenta valiosa e eficiente para a concentração e purificação de enzimas, uma vez que fornecem um ambiente ameno que promovem a recuperação da molécula de interesse contribuindo para a preservação da atividade biológica e estabilidade. Este trabalho teve como objetivo o estudo da partição de lipases produzidas por *Aspergillus niger* utilizando SABs compostos por PEG 8000 g.mol⁻¹, sulfato de magnésio e água à 25 °C. Foi avaliado o efeito da concentração de PEG no comportamento de partição. A determinação da atividade enzimática e do teor de proteínas, permitiram calcular os coeficientes de partição (K_p e K_e , para proteínas totais e atividade enzimática, respectivamente), recuperação teórica ($Y\%$), seletividade (S) e fator de purificação (FP). O SAB composto por 16 % PEG 8000, 7,5 % sulfato de magnésio e 76,5% água apresentou melhor desempenho na separação das lipases presentes no extrato enzimático bruto. Nessa condições os parâmetros de partição apresentaram valores de $K_p = 0,02$; $K_e = 2,5$; $Y\% = 85,32$; $S = 121,90$ e $FP = 526,27$. Tais resultados evidenciam o uso dos SABs, como uma forma promissora para partição de lipases produzidas por fermentação.

Palavras-chave: Lipases fúngicas; extração líquido-líquido; downstream process; purificação;

STUDY OF THE PARTITION OF LIPASES IN AQUEOUS BIPHASIC SYSTEMS FORMED BY PEG 8000, MAGNESIUM SULFATE, AND WATER

ABSTRACT – Aqueous two-phase systems (ATPS) are a valuable and efficient tool for concentrating and purifying enzymes. They provide a mild environment that promotes an efficient recovery of the target molecule, contributing to the preservation of biological activity

*and stability. This work studied the partition of lipases produced by *Aspergillus niger* using SABs composed of PEG 8000 g.mol^{-1} , magnesium sulfate and water at 25 °C. The effect of PEG concentration on partition behavior was evaluated. The determination of enzymatic activity and protein content in the phases allowed the calculation of partition coefficients (K_p and K_e , for total proteins and enzymatic activity, respectively), theoretical recovery ($Y\%$), selectivity (S) and purification factor (PF). The SAB composed of 16% PEG 8000, 7.5% magnesium sulfate and 76.5% water showed better performance in the separation of lipases present in the crude enzymatic extract. Under these conditions, the partition parameters presented values of $K_p = 0.02$; $K_e = 2.5$; $Y\% = 85.32$; $S = 121.90$, and $FP = 526.27$. These results underscore the potential of ATPS as a promising method for partitioning lipases produced by fermentation.*

Keywords: Fungal lipases; liquid-liquid extraction; downstream process; purification.

1. INTRODUÇÃO

Enzimas são catalisadores biológicos que atuam controlando a velocidade de conversão de produtos em reações químicas nos organismos vivos. Nas últimas duas décadas, à crescente demanda por processos sustentáveis, expandiu significativamente a aplicação de enzimas como catalisadores em diversos segmentos industriais (Maghraby et al., 2023). As lipases (triacilglicerol acilhidrolases E.C.3.1.1.3) são hidrolases que catalisam uma ampla gama de reações de bioconversão, tais como transesterificação, interesterificação, esterificação, aminólise, alcoólise e hidrólise, representando um dos grupos de enzimas mais aplicados industrialmente devido às suas propriedades versáteis, como alta estabilidade a diferentes condições operacionais, capacidade de reconhecer uma grande variedade de substratos e alta especificidade (Maghraby et al., 2023; Muniz et al., 2023). Por esse motivo, enzimas lipolíticas são amplamente empregados no processamento de alimentos, produção de emulsificantes, detergentes, termoplásticos, agroquímicos, cosméticos, tratamento de efluentes, produção de biodiesel, síntese de ésteres aromáticos, dentre outras aplicações (Javed et al., 2018).

As lipases industriais são, em sua maioria, de origem microbiana sendo obtidas por processos fermentativos. Entretanto, a produção de enzimas por meio de processos fermentativos apresentam a desvantagem de o extrato enzimático bruto obtido ser rico em compostos bioativos e outras proteínas contaminantes, o que contribui para a redução da atividade específica da biomolécula de interesse (Muniz et al., 2024). Para satisfazer as demandas e exigências do mercado, diversas técnicas de purificação podem ser estabelecidas visando a obtenção de biomoléculas com elevado grau de pureza, baixo custo e retenção da atividade biológica. Nesse contexto, a extração líquido-líquido por sistemas aquosos bifásicos (SABs) tornou-se objeto de estudo nas últimas décadas por ser uma técnica que proporciona protocolos rápidos, eficientes e econômicos (de Barros et al., 2016; Sousa et al., 2018).

Sistemas aquosos bifásicos (SABs) são formados por duas fases imiscíveis majoritariamente aquosas que promovem a partição de um composto de interesse de acordo com sua afinidade por uma das fases (Espitia-Saloma et al., 2014; Tan et al., 2015). A técnica de partição por SABs tem se destacado entre as técnicas de purificação como uma alternativa viável aos métodos convencionais de separação e recuperação de biocomposto devido principalmente, a grande quantidade de água presente nas fases que promove a separação do composto de interesse em condições amenas, mantendo a estabilidade e retenção de sua atividade biológica (Muniz et al., 2023). Além disso, essa técnica apresenta diversas vantagens,

como elevada biocompatibilidade, baixa tensão interfacial, separação rápida e seletiva, viabilidade de reprodução em larga escala e baixo consumo de energia (Lemos et al., 2011; Sousa et al., 2018; Penido et al., 2019). Caracterizando-se como ferramenta eficiente em etapas de separação, concentração e/ou purificação de proteínas e enzimas com apelo biotecnológico

Sendo assim, presente trabalho tem por objetivo realizar um estudo da partição de lipase produzida pelo fungo *Aspergillus niger* INCQS 40018 por fermentação em estado sólido, utilizando sistemas aquosos bifásicos compostos por PEG 8000 g·mol⁻¹, sulfato de magnésio e água a 25 °C.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Extrato enzimático

As lipases oriundas de *Aspergillus niger* INCQS 40018 (ATCC 1004) foram produzidas por fermentação em estado sólido utilizando casca de amendoim como substrato e óleo residual de fritura como meio indutor.

O ensaio fermentativo foi realizado em erlenmeyers de 125 mL contendo 5 g de resíduo da casca do amendoim previamente esterelizado (121 psi/20 min), solução de Tween 80 (0,01 % m/m), para ajuste da umidade, e óleo de residual de fritura (1,0 % m/m). Os reatores foram inoculados com volume de solução de esporos necessários para se atingir a concentração de 10⁷ de esporos por grama de resíduo e posteriormente, encaminhados à estufa bacteriológica onde foram mantidos à 30 °C por 120 horas.

Após o período de fermentação, foi adicionado 25 mL de solução de sulfato de magnésio MgSO₄·2 a 25 % (m/m) em pH 7,0. A suspensão foi mantida sob agitação em mesa agitadora por 30 minutos à 200 rpm e em seguida, centrifugada por 30 minutos à 6000 rpm e 20 °C. O extrato enzimático bruto foi obtido através da filtração do sobrenadante em bomba a vácuo, com auxílio de papel filtro.

2.2. Ensaios de partição

A partição das lipases presentes no extrato bruto foi estudada em três linhas de amarração (LA) de SABs compostos por PEG 8000, sulfato de magnésio e água à 25 °C. As composições globais de cada sistema estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Composição global dos SABs formados por PEG 8000 (w_1), sulfato de magnésio (w_2) e água (w_3).

| Composição Global | w_1 | w_2 | w_3 |
|-------------------|-------|-------|-------|
| L1 | 13,0 | 7,5 | 79,5 |
| L2 | 16,0 | 7,5 | 76,5 |
| L3 | 19,0 | 7,5 | 73,5 |

Os sistemas foram formados a partir da adição de quantidades adequadas de solução estoque de PEG 8000, sulfato de magnésio e água para uma massa total de 10 g em tubos de centrífuga cônico. Uma vez que o sulfato de magnésio foi utilizado como componente do extrato, sua composição global foi fixada para todos os sistemas considerando a concentração salina presente no extrato enzimático.

Os tubos foram agitados em vórtex e centrifugados a 5000 rpm por 10 minutos a fim de acelerar a separação de fases. Em seguida, os sistemas foram mantidos em repouso por 12 horas em estufa B.O.D na condição de temperatura determinada. Após os sistemas atingirem o equilíbrio, as fases foram coletadas com seringas, para posterior determinação do teor de proteína total e da atividade enzimática. A partir desses dados, foram calculados os coeficientes de partição de atividade enzimática (K_e) e de proteínas (K_p), a recuperação teórica ($Y\%$), seletividade (S) e fator de purificação (FP) conforme Equações 1 a 6 descritas abaixo.

$$K_e = \frac{A_{e\sup}}{A_{e\inf}} \quad (1)$$

$$K_p = \frac{[prot]_{\sup}}{[prot]_{\inf}} \quad (2)$$

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

$$FP = \frac{A_{\text{específica purificada}}}{A_{\text{específica do extrato}}} \quad (4)$$

$$Y_{s(\%)} = \frac{100}{1 + \frac{1}{R_V * K_e}} \quad (5)$$

$$Y_{I(\%)} = \frac{100}{1 + (R_V * K_e)} \quad (6)$$

Em que: A_e é a atividade específica da lipase (U/mg) e $[prot]$ é o teor de proteínas totais (mg/mL) nas fases superior (*sup*) e inferior (*inf*) e R_V é a razão entre os volumes das fases.

2.3. Determinação do teor de proteínas totais

A quantificação de proteínas totais nas fases foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976) utilizando espectrofotômetro no comprimento de onda $\lambda = 595$ nm. A curva analítica foi construída utilizando-se como padrão a proteína Albumina do Soro Bovino (BSA).

2.4. Determinação da atividade lipolítica

A atividade enzimática foi determinada pelo método titulométrico, com hidrólise da emulsão de azeite de oliva, conforme metodologia adaptada de Soares et al. (1999).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizados experimentos de partição da lipase produzida por *Aspergillus niger* em sistemas aquosos bifásicos compostos por PEG 8000 g·mol⁻¹ + sulfato de magnésio + água na temperatura de 25 °C e pH 5,0. Os resultados dos coeficientes de partição de atividade enzimática (K_e) e de proteínas (K_p), seletividade (S), fator de purificação (FP) e recuperação teórica ($Y\%$) são apresentados na Tabela 2.

Tabela 1 - Parâmetros de partição das lipases nos SAB formados por PEG 8000 + MgSO_4^{2-} + água na temperatura de 25°C e pH 5,0.

| LA | K_e | K_p | S | FP | Y% |
|----|-------|-------|---------|---------|--------|
| 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 | 86,609 | 420,665 | 82,193 |

Nos sistemas avaliados, o coeficiente de partição das proteínas (K_p) apresentou valores menores que 1, indicando migração preferencial das proteínas totais presentes no extrato enzimático para a fase inferior rica em sal. Tal comportamento 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. Somando a isso, sabe-se que em SABs formados por PEG de alto peso molecular, a partição para a fase polimérica é geralmente desfavorecida devido ao efeito do volume de exclusão do polímero (Ramakrishnan et al., 2016). O aumento das interações polímero-polímero resulta na redução de espaços vazios, isto é, sítios disponíveis para que as moléculas de proteínas possam se alojar, tornando a fase mais seletiva. Sendo assim, moléculas com menor afinidade, isto é, menos hidrofóbicas, tendem a ser expulsas para a fase oposta (Muniz et al., 2021).

Em contrapartida, o coeficiente de partição de atividade enzimática (K_e) alcançou valores superiores a 1 nos pontos globais L2 (7,5% sulfato de magnésio e 16% PEG 8000) e L3 (7,5% sulfato de magnésio e 19% PEG 8000), 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).

De um modo geral, os SABs apresentaram desempenho satisfatório na capacidade de recuperação da atividade lipolítica ($Y\% > 80\%$), sendo o maior rendimento observado em L1 (98,9%). Em relação ao parâmetro seletividade (S), o qual indica a capacidade SAB em particionar a molécula alvo para a fase oposta das demais proteínas, o elevado valor de S em L2 sugere que esse sistema foi capaz de reduzir a concentração de contaminantes presentes no extrato bruto enzimático. O elevado valor de K_p e baixo valor de K_e confirmam tal resultado e indicam que de fato, dentre as composições avaliadas, L2 foi o SAB mais eficiente para recuperação das lipases produzida a partir de *Aspergillus niger*.

4. CONCLUSÃO

Os ensaios de partição da lipase produzida a partir de *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido indicaram que o sistema aquoso bifásico formado por PEG 8000 (16%), sulfato de magnésio (7,5%) e água (76,5%) apresentou as melhores respostas para o coeficiente de partição de proteínas e de atividade enzimática, recuperação teórica, seletividade e fator de purificação, destacando-se dentre os demais como SAB mais apropriado para a etapa de concentração ou purificação parcial do extrato enzimático. Os bons resultados apresentados no

presente estudo reforçam a eficiência da extração líquido-líquido utilizando SABs em etapa de downstream process de processos fermentativos.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

6. REFERÊNCIAS

- ASENJO, J. A., & ANDREWS, B. A., Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective. **Journal of Chromatography A**, v. 1218(49), p. 8826-8835, 2011.
- BRADFORD 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.
- DE BARROS, D. P. C., CAMPOS, S. R. R., AZEVEDO, A. M., BAPTISTA, A. M., & AIRES-BARROS, M. R., Predicting protein partition coefficients in aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography A**, v. 1470, p. 50-58, 2016.
- ESPITIA-SALOMA, E., VÁZQUEZ-VILLEGAS, P., AGUILAR, O., & RITO-PALOMARES, M., Continuous aqueous two-phase systems devices for the recovery of biological products. **Food and Bioproducts Processing**, v. 92(2), p. 101-112, 2014.
- JAVED, S., AZEEM, F., HUSSAIN, S., RASUL, I., SIDDIQUE, M. H., RIAZ, M., AFZAL, M., KOUSER, A., & NADEEM, H., Bacterial lipases: A review on purification and characterization. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 132, p. 23-34, 2018.
- LEMOES, L. R. DE, PATRÍCIO, P. DA R., RODRIGUES, G. D., CARVALHO, R. M. M. DE, SILVA, M. C. H. da, & Silva, L. H. M. da., Liquid-liquid equilibrium of aqueous two-phase systems composed of poly (ethylene oxide) 1500 and different electrolytes ((NH₄)₂SO₄, ZnSO₄ and K₂HPO₄): Experimental and correlation. **Fluid Phase Equilibria**, v. 305(1), p. 19-24. 2011.
- MAGHRABY, Y. R., EL-SHABASY, R. M., IBRAHIM, A. H., & AZZAZY, H. M. E.-S., Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications. **ACS Omega**, v. 8(6), p. 5184-5196, 2023.
- MUNIZ, I. DE C. B., CASTRO, S. DE S., GANDOLFI, O. R. R., DOS SANTOS, K. A., SANTOS, B. S., SOUZA JUNIOR, E. C., FONTAN, R. DA C. I., VELOSO, C. M., & BONOMO, R. C. F., Liquid-liquid equilibrium data for systems formed by PEG (4000 or 6000) or alcohol (1-propanol or 2-propanol) + potassium phosphate + water: Experimental measurements, correlations and thermodynamic modeling. **Journal of Molecular Liquids**, 343, 117671, 2021.
- MUNIZ, I. DE C. B., DE OLIVEIRA, R. M., ALVES, A. N., DA SILVA, E. C., SANTOS, B. S., DE SOUZA JUNIOR, E. C., SAMPAIO, V. S., DA COSTA, A. R., & BONOMO, R. C. F., Partition of porcine pancreatic lipase in ATPS composed of PEG/salt and alcohol/salt: a thermodynamic study. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 40(3), p. 873-883, 2023.
- MUNIZ, I. DE C. B., SANTOS, J. B., DE OLIVEIRA, R. M., SANTOS, F. G., SOUZA JUNIOR, E. C. DE, OYAMA, L., FONTAN, R. DA C. I., & BONOMO, R. C. F., Current



"Tecnologia e Inovação: o papel da ciência nos novos desafios da indústria de alimentos"

- advances in obtaining novel cyclodextrin glycosyltransferases for optimizing the synthesis of cyclodextrins. **Process Biochemistry**, v. 145, p. 195-209, 2024.
- PENIDO, J. A., MAGESTE, A. B., MARTINS, P. L., & FERREIRA, G. M. D., Surfactant as selective modulator in the partitioning of dyes in aqueous two-phase systems: A strategy for separation. **Journal of Molecular Liquids**, v. 293, p. 111501, 2019.
- RAMAKRISHNAN, V., GOVEAS, L. C., SURALIKERIMATH, N., JAMPANI, C., HALAMI, P. M., & NARAYAN, B., Extraction and purification of lipase from *Enterococcus faecium* MTCC5695 by PEG/phosphate aqueous-two phase system (ATPS) and its biochemical characterization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 6, p. 19-27, 2016.
- SOUSA, R. DE C. S., PEREIRA, M. M., FREIRE, M. G., & COUTINHO, J. A. P., Evaluation of the effect of ionic liquids as adjuvants in polymer-based aqueous biphasic systems using biomolecules as molecular probes. **Separation and Purification Technology**, v. 196, p. 244-253, 2018.
- TACIAS-PASCACIO, V. G., PEIRCE, S., TORRESTIANA-SANCHEZ, B., YATES, M., ROSALES-QUINTERO, A., VIRGEN-ORTÍZ, J. J., & FERNANDEZ-LAFUENTE, R., Evaluation of different commercial hydrophobic supports for the immobilization of lipases: tuning their stability, activity and specificity. **RSC Advances**, v. 6(102), p. 100281-100294, 2016.
- TAN, C. H., SHOW, P. L., OOI, C. W., NG, E. P., LAN, J. C. W., & LING, T. C., Novel lipase purification methods - a review of the latest developments. **Biotechnology Journal**, v. 10(1), p. 31-44, 2015.