

UNIVERSIDADE TIRADENTES – UNIT
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS - PEP

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE DE
***Bacillus* sp. ITP-001**

Autor: José Murillo de Pinho Barbosa

Orientadores: Prof. Dr. Álvaro Silva Lima

Prof^ª. Dr^ª. Cleide Mara Faria Soares

ARACAJU, SE - BRASIL

FEVEREIRO DE 2011

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE DE *Bacillus* sp. ITP-001

José Murillo de Pinho Barbosa

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA DE PROCESSOS DA UNIVERSIDADE TIRADENTES COMO PARTE
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
ENGENHARIA DE PROCESSOS

Aprovada por:

Prof. Dr. Álvaro Silva Lima

Prof^a. Dr^a. Cleide Mara Faria Soares

Prof. Dr. Antonio José de Almeida Meirelles

Prof^a. Dr^a. Alini Tinoco Fricks

Prof. Dr. Daniel Pereira Silva

ARACAJU, SE - BRASIL

FEVEREIRO DE 2011

FICHA CATALOGRÁFICA

B238p José Murillo de Pinho Barbosa

Purificação e caracterização da lipase de: *Bacillus* sp. Itp-001 / José Murillo de Pinho Barbosa; Orientadores: Álvaro Silva Lima; Cleide Mara Faria Soares. – Aracaju, 2011.

120 p; il.

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processo). –Universidade Tiradentes, 2010.

1. Lipase. 2. Purificação. 3. Sistema aquoso bifásico. 4. Estabilidade. 5. Sensibilidade química. 6. Engenharia de processos. I. Lima, Álvaro Silva (orient.). II. Soares, Cleide Mara Faria (orient.). III. Universidade Tiradentes. IV. Título.

CDU: 66.067

*O conhecimento torna a alma
jovem e diminui a amargura da
velhice. Colhe, pois, a sabedoria.
Armazena suavidade para o
amanhã.*

(Leonardo da Vinci)

Agradecimentos

Antes de começar a ler este agradecimento gostaria de ressaltar que a sua ordem não interfere na importância de cada um na minha vida, se fosse assim todos estariam em uma única linha e completamente sobrepostos para que não houvesse distinção. Deste modo, agradeço...

À Deus, por ter me proporcionado mais uma oportunidade em minha vida e por ter me ajudado a dar mais um passo na minha carreira profissional;

Aos meus pais, Edemilton Silva Barbosa e Maria Genilza de Pinho Barbosa, que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões e sempre me serviram de fortaleza para encarar todos os momentos, sejam ruins ou bons. Também agradeço pelos ensinamentos de como é a vida, de como tratar o próximo e de saber diferenciar o certo do errado;

Ao meu irmão, Fabrício de Pinho Barbosa, que mesmo sem perceber me ajudou muito a esquecer dos problemas, fazendo suas graças que muitas vezes até extrapolavam... Além disso, sempre foi um grande irmão protetor, e tenho certeza que está muito orgulhoso de mim assim como estou dele;

À minha amada Silviane, que apareceu na minha vida como um anjo e me fez enxergar que com amor, carinho e dedicação tudo é possível. Almejo de coração tornar seus dias melhores, retribuir com muito amor tudo o que tem feito por mim, e no futuro próximo realizar o nosso grande sonho de formar uma linda família. Te amo eternamente!!! Que Deus abençoe o nosso amor...

Aos meus familiares, primeiramente aos meus dois avós que não se encontram mais entre nós, mas sei que sempre estiveram comigo e nesse exato momento estão comemorando juntos por esse grande momento que estou passando. Não posso esquecer também de agradecer a todos os meus primos, tios e minhas avós, que sempre me apoiaram nessa longa jornada acadêmica que escolhi de coração;

À meus orientadores e amigos, Álvaro Silva Lima e Cleide Mara Faria Soares, que sempre foram uma grande fonte de conhecimento inacabável e que puseram a minha disposição todos os ensinamentos. Simplesmente é difícil falar destes dois, pois tudo que tenho e que sou é devido à credibilidade e confiança que me ofereceram. Gostaria que soubessem que minha gratidão é eterna e que com certeza não tem como retribuir, mas espero poder fazer futuramente o mesmo que fizeram por mim a outras pessoas;

Aos professores e funcionários da Universidade Tiradentes e do Instituto de Tecnologia e Pesquisa, que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho;

À meus amigos (Acendino, Acenini, Ana Lúcia, Diana, Eduarda, Fabiano, Flávia, Gustavo, Igor, Juliana, Mateus, Meiryelle, Monalisa, Murillo, Nayara, Paty, Ranyere, Roneval, Samuel, Tarciso), por ter enfrentado junto comigo todas as alegrias, tristezas, facilidades e dificuldades que esse grande desafio, chamado mestrado, nos faz passar. Alguns desses nem imaginavam que seriam citados aqui, mas se estão é por que de alguma forma foram bastante importantes nessa jornada. Outros estão tão ligados a mim que chegam a sentir todas as minhas emoções sem que ao menos seja dita uma única palavra;

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo;

Para finalizar gostaria de deixar um grande abraço carinhoso e um muito obrigado para todos citados nesse agradecimento, e dizer também que essa vitória não é apenas minha, mas de todos nós! Verdadeiros amigos podem ter certeza que seria bem mais complicado se não tivesse vocês junto a mim.

José Murillo de Pinho Barbosa

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos da Universidade Tiradentes como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Processos.

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE DE *Bacillus* sp. ITP-001

José Murillo de Pinho Barbosa

O uso de enzimas em diferentes segmentos industriais é cada vez maior. A obtenção de enzimas compreende um conjunto de operações que incluem o processo fermentativo, as etapas de separação e concentração de produto, seguidos ou não da sua purificação e secagem. Portanto o objetivo deste trabalho foi aperfeiçoar o processo de purificação em sistema aquoso bifásico e caracterizar bioquimicamente as enzimas lipolíticas obtidas a partir do *Bacillus* sp. ITP-001 em fermentação submersa. A purificação da enzima envolveu as etapas de precipitação com sulfato de amônio com 80% de saturação e sistema aquoso bifásico constituído por polietilenoglicol e sal fosfato de potássio. Após as referidas etapas, a enzima apresentou um fator de purificação de 251,03 vezes, na qual a enzima teve maior predileção pela fase salina do sistema. A lipase purificada na reação de hidrólise apresentou atividade ótima em pH 7,0 e 55°C e a maior estabilidade foi verificada à 37°C e pH 5,0. A atividade enzimática foi estimulada pelos íons Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{3+} , e reduzida pelo Cu^{+} . O solvente etanol afetou fortemente a atividade enzimática, ao passo que o isopropanol, metanol, acetona e acetonitrila afetaram ligeiramente a atividade, enquanto que apenas a piridina teve um efeito positivo. Os valores de K_m e $V_{\max}$ foram respectivamente 0,0675 mol e 0,0110 mol/min pelo método de Wolf-Augustinsson-Hofstce na reação de hidrólise. Foi verificado também o potencial de produção de ésteres, sendo observado que uma lipase com maior afinidade por cadeias carbônicas curtas.

Palavras-Chave: *Bacillus* sp. ITP-001, lipase, sistema aquoso bifásico, caracterização bioquímica.

Abstract of Dissertation presented to the Process Engineering Graduate Program of University Tiradentes as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF LIPASE FROM *Bacillus* sp. ITP-001

José Murillo de Pinho Barbosa

The use of enzymes in different industries segments is ever greater. The acquisition of enzymes comprises a set of operations that include the fermentation process, the steps of separation and concentration of product, followed or not by their purification and drying. Therefore, the purpose of this study was to improve the purification process in aqueous two-phase system and characterizing biochemically the lipolytic enzymes derived from *Bacillus* sp. ITP-001 in submerged fermentation. The purification of the enzyme involved the steps of precipitation with 80% saturated ammonium sulfate and aqueous two-phase system consisting of polyethylene glycol and potassium phosphate salt. After these steps, the enzyme showed a purification factor of 251.03 times, in which the enzyme had a greater preference for the saline phase of the system. The purified lipase in hydrolysis reaction showed optimal activity at pH 7.0 and 55 ° C and the highest stability was observed at 37 ° C and pH 5.0. The enzyme activity was stimulated by Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} and Fe^{3+} , and reduced by Cu^{+} . The ethanol solvent strongly affected the enzyme activity, while the isopropanol, methanol, acetone and acetonitrile slightly affected the activity, while only pyridine had a positive effect. The values of K_m and $V_{\max}$ were respectively, 0.0675 mol and 0.0110 $\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ by the method of Wolf-Augustinsson-Hofstee in hydrolysis reaction. It was also verified the production potential of esters, and it was observed that the lipase showed higher affinity for short carbon chains.

Keywords: *Bacillus* sp. ITP-001, lipase, aqueous two-phase system, characterization biochemical.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1.1 ENZIMAS	3
1.2 ENZIMAS LIPOLÍTICAS.....	5
1.2.1 Microrganismos Produtores.....	6
1.2.2 Processos Fermentativos	7
1.2.3 Aplicações	9
1.3 PURIFICAÇÃO ENZIMÁTICA.....	11
1.3.1 Sistema Aquoso Bifásico (SAB).....	14
1.4 RECUPERAÇÃO FINAL	23
1.5 PROPRIEDADES CATALÍTICAS DAS LIPASES BACTERIANAS.....	24
1.5.1 Efeitos do pH e Temperatura.....	24
1.5.2 Estabilidade em Solventes Orgânicos	25
1.5.3 Efeito de Íons.....	26
1.5.4 Determinação de V_{max} e K_m	27
1.5.5 Influência do Tamanho da Cadeia Carbônica.....	28
2. OBJETIVOS	29
3. ARTIGO I - Partitioning of Porcine Pancreatic Lipase in a Two-Phase Systems of Polyethylene Glycol/Potassium Phosphate Aqueous	31
4. ARTIGO II – Purification of a Lipase Produced by <i>Bacillus</i> sp. ITP-001 in Submerged Fermentation Using Aqueous Two-Phase System.....	52
5. ARTIGO III – Biochemical Characterization of Lipase from New Strain <i>Bacillus</i> sp. ITP-001.....	71
6. CONCLUSÃO.....	93
7. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS	95
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1: REAÇÕES CATALISADAS POR LIPASES.....	5
FIGURA 1.2: ESQUEMA REPRESENTATIVO DE UM DIAGRAMA DE EQUILÍBRIO	17
FIGURA 1.3: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PARTIÇÃO DOS BIOCOMPOSTOS NO SAB.....	19

CAPÍTULO III

FIGURE 1: INFLUENCE OF PEG CONCENTRATION ON THE VOLUME RATIO BETWEEN THE PHASES (A) AND PARTITION OF PORCINE PANCREATIC LIPASE (B) IN THE SYSTEM CONTAINING 18% OF POTASSIUM PHOSPHATE, WITHOUT NaCl, AT pH 7.0 AND 4°C.....	37
FIGURE 2: INFLUENCE OF POTASSIUM PHOSPHATE ON THE VOLUME RATIO BETWEEN THE PHASES (A) AND PARTITION OF PORCINE PANCREATIC LIPASE (B) IN THE SYSTEM CONTAINING 20% OF PEG, WITHOUT NaCl, AT pH 7.0 AND 4°C.....	39
FIGURE 3: INFLUENCE OF TIE LINE LENGTH IN THE VOLUME RATIO BETWEEN THE PHASES (A), PARTITION COEFFICIENT (B), EFFICIENCY (C), AND PURIFICATION FACTOR (E) IN THE AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM APPLIED TO PORCINE PANCREATIC LIPASE WITHOUT NaCl AT pH 7.0 AND 4°C.....	43
FIGURE 4: INFLUENCE OF NaCl CONCENTRATION ON THE VOLUME RATIO BETWEEN THE PHASES (A), AND PARTITION OF PORCINE PANCREATIC LIPASE (B), IN THE SYSTEM CONTAINING 20% OF PEG AND 18% OF POTASSIUM PHOSPHATE AT pH 7.0 AND 4°C	45
FIGURE 5: INFLUENCE OF TEMPERATURE ON THE VOLUME RATIO BETWEEN THE PHASES (A), AND PARTITION OF PORCINE PANCREATIC LIPASE (B), IN THE SYSTEM CONTAINING 20% OF PEG AND 18% OF POTASSIUM PHOSPHATE AND WITHOUT NaCl AT pH 7.0	46

CAPÍTULO IV

FIGURE 1: PRODUCTION OF LIPASE BY <i>Bacillus</i> sp. ITP-001 AT pH 7.0 AND 37 °C.....	59
FIGURE 2: EFFECT OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF PEG 8,000 g/mol PLUS 18% PHOSPHATE AT pH 6.0 AND 4 °C ON LIPASE PARTITIONING	61
FIGURE 3: EFFECT OF CONCENTRATION OF POTASSIUM PHOSPHATE BUFFER SOLUTION CONTAINING 20% OF PEG 8,000 g/mol ON LIPASE PARTITIONING, AT pH 6.0 AND 4 °C	62
FIGURE 4: EFFECT OF NaCl ADDITION ON LIPASE PARTITIONING IN A SYSTEM CONTAINING 20% (w/v) PEG 8,000 g/mol AND 18% (w/v) POTASSIUM PHOSPHATE AT pH 6.0 AND 4 °C.....	63
FIGURE 5: EFFECT OF pH ON LIPASE PARTITIONING IN A SYSTEM CONTAINING 20% (w/v) PEG 8,000 g/mol, 18% (w/v) POTASSIUM PHOSPHATE AND 6% (w/v) NaCl AT 4 °C.....	64
FIGURE 6: EFFECT OF TEMPERATURE ON LIPASE PARTITIONING IN A SYSTEM CONTAINING 20% (w/v) PEG 8,000 g/mol, 18% (w/v) POTASSIUM PHOSPHATE AND 6% (w/v) NaCl AT pH 6.0	65

CAPÍTULO V

FIGURE 1. EFFECT OF DIFFERENT pH VALUES AT 37°C (A) AND TEMPERATURES AT pH 7.0 (B) ON THE ACTIVITY OF LIPASE FROM <i>Bacillus</i> sp. ITP-001	80
--	----

FIGURE 2. EFFECT OF pH AT 37°C (A) AND TEMPERATURE AT pH 7.0 (B) ON THE STABILITY OF LIPASE FROM <i>Bacillus</i> sp. ITP-001.....	81
FIGURE 3. EFFECT OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF Ca ²⁺ ON THE LIPASE OF <i>Bacillus</i> sp. ITP-001.....	83
FIGURE 4. HANES-WOLF PLOT OF PURIFIED LIPASE FROM <i>Bacillus</i> sp. ITP-001 USING OLIVE OIL AS A SUBSTRATE. SOLID LINE: ADJUSTED; DOTTED LINE: WOLF-AUGUSTINISSE-HOFSTCE; DIAMOND: EXPERIMENTAL RESULTS.....	87
FIGURE 5. INFLUENCE OF ALKYL CHAINS OF FATTY ACIDS (A) ON THE DEGREE OF ESTERIFICATION OF ETHANOL (0.30 M), AND OF ALKYL CHAINS OF ALCOHOLS (B) ON THE DEGREE OF ESTERIFICATION OF ACETIC ACID (0.45 M)	88

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1: CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL DE ENZIMAS.....	4
TABELA 1.2: PRINCIPAIS MICRORGANISMOS PRODUTORES DE LIPASE	6
TABELA 1.3: SEGMENTOS DE APLICAÇÕES DAS LIPASES (MILHÕES DE DÓLARES).....	10
TABELA 1.4: EXEMPLOS DE COMPONENTES E TIPOS DE SISTEMA AQUOSO BIFÁSICO	15

CAPÍTULO III

TABLE 1 EFFECTS OF PEG CONCENTRATION ON THE PARTITION OF PORCINE PANCREATIC LIPASE IN SYSTEM CONTAINING 18% OF POTASSIUM PHOSPHATE, WITHOUT NaCl AT pH 7.0 AND 4°C.....	38
TABLE 2 EFFECTS OF POTASSIUM PHOSPHATE CONCENTRATION ON THE PARTITION OF PORCINE PANCREATIC LIPASE IN SYSTEM CONTAINING 20% OF PEG, WITHOUT NaCl AT pH 7.0 AND 4°C.....	41
TABLE 3 EFFECTS OF NaCl CONCENTRATION ON THE PARTITION OF PORCINE PANCREATIC LIPASE IN SYSTEM CONTAINING 20% OF PEG AND 18% OF POTASSIUM PHOSPHATE AT pH 7.0 AND 4°C.....	47
TABLE 4 EFFECTS OF TEMPERATURE ON THE PARTITION OF PORCINE PANCREATIC LIPASE IN SYSTEM CONTAINING 20% OF PEG, 18% OF POTASSIUM PHOSPHATE AND WITHOUT NaCl AT pH 7.0.....	48

CAPÍTULO IV

TABLE 1: PRE-PURIFICATION OF LIPASE PRODUCED BY <i>Bacillus</i> sp. ITP-001 IN THE FERMENTED BROTH USING DIFFERENT STEPS.....	59
TABLE 2: EFFECT OF PEG MOLECULAR WEIGHT ON THE PARTITIONING OF LIPASE PRODUCED BY <i>Bacillus</i> sp. ITP-001 USING 20% (w/v) PEG AND 18% (w/v) POTASSIUM PHOSPHATE AT pH 6.0 AND 4 °C.....	60
TABLE 3: THERMODYNAMIC PARAMETERS OF LIPASE BY <i>Bacillus</i> sp. ITP-001 AND TOTAL PROTEIN PARTITIONING USING 20% (w/v) PEG 8,000 g/mol, 18% (w/v) POTASSIUM PHOSPHATE AND 6% (w/v) NaCl AT pH 6.0.....	66

CAPÍTULO V

TABLE 1. PURIFICATION OF LIPASE PRODUCED FROM <i>Bacillus</i> sp ITP-001 USING SEVERAL PROCESSES.....	79
TABLE 2. OPTIMAL TEMPERATURE AND pH OF SOME LIPASES FROM DIFFERENT MICROORGANISMS.....	82
TABLE 3. EFFECTS OF COMPOUNDS ON THE ACTIVITY OF THE PURIFIED ENZYME	85
TABLE 4. EFFECTS OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF SOLVENTS ON LIPASE ACTIVITY	85
TABLE 5. METALLIC ION AND EDTA SENSITIVITY OF MICROBIAL LIPASES	86

TABLE 6. THE VALUES OF MEAN RELATIVE ERROR (P), ESTIMATED (SE) AND KINETICS PARAMETERS (K_m AND V_{max}) USING OLIVE OIL AS A SUBSTRATE	87
--	----

LISTA DE SIGLAS

C_{T ou B}: Concentração protéica na fase de topo e fundo

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

K_m: Constante de Michaelis Mentem

K_P: Coeficiente de partição da proteína

K_E: Coeficiente de partição da enzima

PEG: Polietilenoglicol

PF_{T ou B}: Fator de purificação

PI: Ponto Isoelétrico

PPG: Polipropilenoglicol

R_{T ou B}: Recuperação na fase de topo ou fundo

R_V: Razão volumétrica

SA: Atividade específica

SAB ou ATPS: Sistema aquoso bifásico

TLL: Comprimento da linha de amarração

v_{max}: Velocidade máxima da reação

INTRODUÇÃO

O uso da tecnologia enzimática concilia o desenvolvimento tecnológico com uso de matérias-primas renováveis e preservação ambiental, questão importante para o país, visto que o meio ambiente brasileiro é um ativo de valor incalculável e que contribui decisivamente para a representatividade brasileira no cenário internacional. Neste sentido, as lipases são enzimas que vêm se destacando cada vez mais no cenário da biotecnologia nacional e internacional, devido à sua versatilidade em catalisar reações de hidrólise e de síntese, muitas vezes de forma quimio, régio ou enantiosseletiva. A aplicação industrial está dividida nos mais diversos setores, como, por exemplo, alimentício, farmacêutico, biodiesel e detergentes, dentre outras. Apesar de preparações enzimáticas parcialmente purificadas serem suficientes para diversas aplicações industriais, o uso medicinal e analítico ou aplicação em pesquisa necessitam de lipases extremamente puras, chegando, em alguns casos, em nível de homogeneidade protéica. Embora nos últimos 20 anos, a utilização de lipases industriais esteja aumentando rapidamente, ainda existe um grande campo para a sua expansão. Deste modo, a obtenção de lipases de novas fontes tem criado oportunidades sendo constatado que em alguns setores da indústria a utilização destas enzimas está apenas começando.

De forma geral, as lipases podem ser extraídas de diferentes fontes, microrganismos, animais e vegetais. As fontes microbianas são as mais utilizadas, e os microrganismos mais citados para a produção de lipases são fungos dos gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus*, e *mucor*, leveduras do gênero *Candida*, e *Yarrowia*, e bactérias como *Bacillus* (GUPTA *et al.*, 2004). Microrganismos de uma mesma linhagem possuem o potencial de produzir enzimas com características completamente ou parcialmente diferenciadas, e por este motivo a busca por novas fontes microbianas continua sendo foco de vários pesquisadores. Dentre as espécies, o gênero *Bacillus* possui atrativo industrial por diversas características vantajosas, tais como: alta taxa de crescimento, levando a um curto tempo para a fermentação, e a capacidade de secretar proteínas para o meio extracelular. O gênero *Bacillus* atualmente também é considerado um dos maiores produtores de enzimas industriais, incluindo espécies encontradas na natureza (solo, água e ar), e algumas como participante da biota intestinal (CHANTAWANNAKUL *et al.*, 2002).

Entretanto, durante o processo fermentativo para obtenção da enzima são gerados, além do composto desejado, co-produtos que impedem, muitas vezes, a utilização do caldo bruto da fermentação nos procedimentos industriais. Por esta razão, várias técnicas de purificação foram desenvolvidas e aplicadas na separação de biocompostos. Cerca de 50 a 90% do custo

de produção dos produtos biológicos deve-se a estas estratégias de purificação, desta forma o uso de uma técnica que permite um alto grau de purificação e recuperação associada a um baixo custo de operação é de grande interesse. Uma análise econômica sugere que o sistema aquoso bifásico (SAB), utilizado primeiramente na década de 1950 na Suécia para a separação de macromoléculas, células e organelas, pode ser considerado um dos processos de purificação que cumpre com estes critérios (MALPIEDI *et al.*, 2009).

Sua constituição é dada pela mistura de soluções aquosas de dois polímeros, usualmente polietilenoglicol (PEG) e dextrana, ou de um polímero e um sal, como PEG e fosfato de potássio. A formação das duas fases dependerá das interações intermoleculares, que são responsáveis pela distribuição dos componentes, pela relação do volume entre as fases e do coeficiente de partição, dentre outros (SILVA e LOH, 2006). Devido ao alto conteúdo de água em ambas as fases e a baixa tensão interfacial, os SABs fornecem um ambiente ameno para as biomoléculas, evitando mudanças em suas estruturas e perda das atividades biológicas (MALPIEDI *et al.*, 2009).

Após o processo de purificação, a aplicação das enzimas depende da caracterização quanto as condições ótimas de pH e temperatura, estabilidade a íons e solventes, determinação da massa molecular, do ponto isoelétrico, do seu potencial em realizar a sínteses de ésteres, bem como determinação dos parâmetros cinéticos, dentre outras. Dentre as aplicações, o emprego das lipases na produção de biodiesel ganhou muita relevância nos últimos anos. Nouredini *et al.* (2005) compararam o desempenho de 9 diferentes lipases na transesterificação de óleo de soja com metanol e etanol e verificaram que as maiores rendimentos foram obtidos com a lipase de *Pseudomonas cepacia*. Neste caso, o uso de lipases no processo de esterificação representará um avanço tecnológico significativo, que possibilitará o aumento da qualidade do processo.

Este contexto favorece a implementação de processos baseados na biotransformação, motivando assim, a busca contínua por novas lipases com elevada estabilidade e rendimento em reduzidos tempos de reação, o que ainda desperta o interesse dos pesquisadores. Por este motivo o objetivo do presente estudo foi purificar a lipase de uma nova linhagem obtida de um solo com histórico de contato com petróleo, nomeada como *Bacillus* sp. ITP-001, em sistema aquoso bifásico, constituído por polietilenoglicol (PEG) e tampão fosfato de potássio, caracterizá-la bioquimicamente e avaliar o seu potencial reacional.

Capítulo I

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Enzimas

Em meados do século XIX, admitia-se que fenômenos como a fermentação e a decomposição de matéria orgânica eram incapazes de acontecer sem a presença de células vivas. Essa teoria vitalista foi sendo modificada gradativamente. Payen e Persoz (1833) mostraram que estas reações poderiam ser realizadas também por substâncias chamadas de “diástases”, as quais foram nomeadas em 1835 por Berzelius, como enzimas (CABRAL *et al.*, 2003). Todavia, esta teoria foi somente desacreditada em 1897 com os experimentos dos irmãos Buchner, que obtiveram um extrato de levedura livre de células capaz de realizar a transformação do substrato (BUCHNER, 1907).

Em 1926, Sumner conseguiu purificar enzimas e definiu sua natureza química como protéica e constatou sua especificidade, já em 1945 a ação enzimática foi associada à um modelo “chave” e “fechadura” por Emil Fischer. Outro importante desenvolvimento desta idéia foi proposto por Linus Pauling, em 1948, que definiu um mecanismo de reação enzimática, no qual há a um estado de transição formado pela complexação da enzima (CABRAL *et al.*, 2003). A complementaridade perfeita entre o sítio ativo da enzima e o substrato foi considerada menos rígida por Koshland (1958) que propôs seu modelo do mecanismo induzido, no qual mesmo que a conformação do centro ativo não exiba previamente uma perfeita complementaridade ao substrato, este, ao interagir com a enzima, pode induzir modificações conformacionais que orientam adequadamente os grupos de ligação e catalíticos, com relação ao substrato (BON *et al.* 2008)

Técnicas de cristalografia têm revelado duas diferentes conformações das lipases: uma na qual o sítio ativo da enzima está fechado através de um oligopeptídeo hidrofóbico (Enzima inativa), a segunda conformação ocorre quando há ligação do substrato na superfície da enzima, o oligopeptídeo desloca-se e deixa o sítio ativo acessível ao substrato (Enzima Ativa). Este mecanismo é conhecido como ativação interfacial (BUCHHOLZ *et al.*, 2005). Atualmente, as enzimas são caracterizadas de forma geral como catalisadores biológicos ou biocatalisadores, em sistemas *in vivo* e *in vitro*, de natureza protéica, altamente específicas e com grande poder catalítico (WISEMAN, 1995). Podem ser de origem microbiana, vegetal ou animal, obtidas por meio de processos fermentativos e trituração de tecidos vegetais e animais (FUCIÑOS *et al.*, 2005; JOSÉ *et al.*, 2004; BACHA *et al.*, 2005).

As enzimas microbianas podem ser extracelulares, dispersas no meio de cultivo, ou intracelulares, localizadas no interior celular, e, portanto obtidas por meio da ruptura da célula (FELLOWS, 1994).

As enzimas são classificadas por meio das suas propriedades catalíticas, podendo ser: oxidorreduases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases, como mostra a Tabela 1.1 (NELSON *et al.*, 2006). Essas classes são posteriormente divididas em subclasses, para especificar o tipo de reação e a natureza química dos reagentes. Com essas características pe definido um número código (EC), o qual foi normatizado pela *Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry* (ROSEVEAR *et al.*,1987).

Tabela 1.1: Classificação internacional de enzimas.

Nº	Classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxidorreduases	Transferência de elétrons (íons hidretos ou átomos de H)
2	Transferases	Reações de transferência de grupos
3	Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais da água)
4	Liasas	Adição de grupos a ligações duplas, ou formação de duplas ligações pela remoção de grupos
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro de moléculas para produzir formas isoméricas
6	Ligases	Formação de ligações C–C, C–S, C–O e C–N pelas reações de consideração acopladas à clivagem do ATP

Fonte: NELSON *et al.*, 2006.

A função da enzima durante uma reação é diminuir a energia de ativação, propiciando assim a ocorrência da reação com menor tempo. A parte significativa da energia usada para aumentar a velocidade enzimática é derivada das interações (pontes de hidrogênio, interações iônicas e hidrofóbicas) entre o substrato e a enzima (NELSON *et al.*, 2006). Além desta propriedade, as enzimas também se caracterizam por não serem destruídas durante a reação e não alterarem o equilíbrio químico das reações (CABRAL *et al.*, 2003).

A estrutura funcional das enzimas está constituída por centros ativos (centros catalíticos e de ligação dos substratos) e podem possuir, além destes, centros reguladores (centros alostéricos), aos quais se ligam pequenas moléculas que podem ativar ou inibir a ação

enzimática (CABRAL *et al.*, 2003). O seu comportamento é avaliado ao longo da reação por meio da atividade enzimática, a qual quantifica o aparecimento do produto ou desaparecimento do substrato (GODFREY e WEST, 1996).

De forma geral, as características enzimáticas associadas a sua ampla variedade (acilases, oxidases, proteases, amilases, celulasas, lipases, dentre outras) vem despertando um crescente interesse nas áreas de engenharia de proteínas e enzimologia. Dentre estas, as lipases destacam-se cada vez mais no cenário da biotecnologia, devido à sua eficiência catalítica, estabilidade e propriedades químio, régio ou enantiosseletivas (VILLENEUVE, 2007; CASTRO *et al.*, 2004).

1.2. Enzimas Lipolíticas

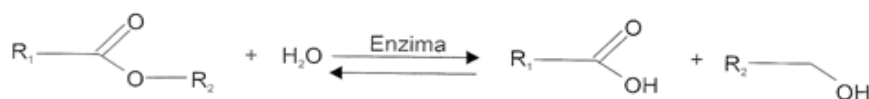
As enzimas lipolíticas ou lipases (EC 3.1.1.3), são biocatalisadores que atuam na interface orgânico-aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster-carboxílicas e liberando ácidos e alcoóis orgânicos (BON *et al.*, 2008). Contudo, ao contrário de muitas outras enzimas, as lipases apresentam níveis consideráveis de atividade e estabilidade em ambientes não-aquosos, facilitando a catálise de muitas reações, tais como esterificação, transesterificação, acidólise, alcoólise e aminólise (SUN *et al.*, 2009; MARTINS *et al.*, 2008). A Figura 1.1 apresenta os diferentes tipos de reações catalisadas por lipases.

Baseado na sua especificidade, as lipases podem ser divididas em três classes: regioespecífica, específica por acilglicerois e específica por ácidos graxos (BOORNSCHEUER, 2000). O seu mecanismo de ação está baseado nos sítios ativos presentes, formados pela tríade de aminoácidos serina-histidina-aspartato/glutamato. Dessa forma, para que a catálise tenha início é necessário que ocorra a “ativação interfacial” (BON *et al.*, 2008). Essa ativação pode ser explicada por meio da estrutura tridimensional da lipase. O sítio ativo das lipases é coberto por uma superfície entrelaçada, denominada de tampa (ou borda). Quando há ligação do substrato na superfície da enzima, esta tampa move-se, alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, com o centro ativo agora acessível ao substrato e, ao mesmo tempo, expondo uma larga superfície hidrofóbica que facilita a ligação da lipase ao substrato (CASTRO *et al.*, 2004).

Estas enzimas podem ser encontradas em células de tecidos animais e vegetais e ainda podem ser produzidas por microrganismos (SAXENA *et al.*, 2003). Segundo Vulfson (1994), as enzimas lipolíticas são mais extensamente encontradas nas plantas, porém o seu conhecimento é bastante limitado se comparado com as lipases de microrganismos e animais.

Do ponto de vista industrial as lipases microbianas são consideradas de maior importância, porque além de apresentarem procedimentos mais simples de obtenção, a partir do caldo fermentativo, são geralmente mais estáveis e com propriedades mais diversificadas (GANDRA *et al.*, 2008; PASTORE *et al.*, 2003).

Hidrólise e esterificação

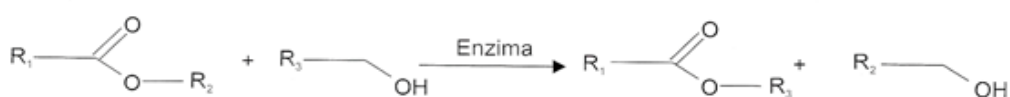


Transesterificações

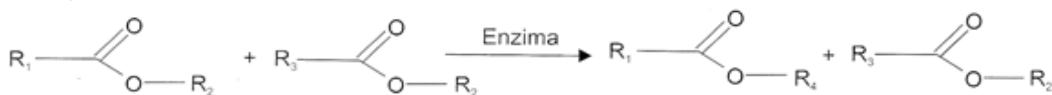
a) Acidólise



b) Alcoólise



c) Troca de éster



d) Aminólise

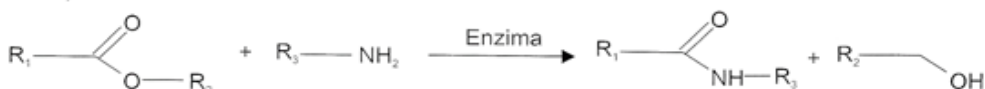


Figura 1.1: Reações catalisadas por lipases (BON *et al.*, 2008)

1.2.1 Microrganismos Produtores

Várias espécies de microrganismos possuem a habilidade de produzir enzimas lipolíticas como, por exemplo, *Aspergillus* sp., *Bacillus* sp., *Rhizopus* sp., *Staphylococcus* sp., dentre outras como mostra a Tabela 1.2.

É crescente o número de publicações que relatam novas espécies produtoras de enzimas lipolíticas, formas de obtenção e sua caracterização (HASAN *et al.*, 2006). Estudos realizados por Sharma *et al.* (2001), listou 109 espécies produtoras de lipase, das quais 47 foram obtidas de bactérias, com prevalência do gênero *Bacillus* sp., 42 obtidas de fungos e 20 de leveduras.

Tabela 1.2: Exemplos de microrganismos produtores de lipase

<i>Microrganismos</i>	<i>Referência</i>
<i>Pseudomonas</i> sp.	YU <i>et al.</i> (2009); CHAKRABORTY <i>et al.</i> (2009); GAUR <i>et al.</i> (2008).
<i>Burkholderia</i> sp.	WANG <i>et al.</i> (2009); OOI <i>et al.</i> (2009);
<i>Staphylococcus</i> sp.	HORCHANI <i>et al.</i> (2009); MOSBAH <i>et al.</i> (2005).
<i>Rhizopus</i> sp.	SUN <i>et al.</i> (2009); PASTORE <i>et al.</i> (2003); YANG <i>et al.</i> (2005).
<i>Penicillium</i> sp.	WOLSKI <i>et al.</i> (2008);
<i>Candida</i> sp.	BASSANI <i>et al.</i> (2010);
<i>Bacillus</i> sp.	BRADDOO <i>et al.</i> (1999); CHEN <i>et al.</i> (2004)

O gênero *Bacillus* sp. possui o maior acervo de microrganismos existentes, e a maioria destes microrganismos normalmente são termofílicos, encontrados em fontes quentes crescendo em temperaturas acima de 45°C. Por possuírem muitas características vantajosas, como sua alta taxa de crescimento, menor tempo da fermentação, e principalmente capacidade de secretar enzimas para o meio extracelular, esse gênero vem se tornando bastante importante e atrativo para o setor industrial. Sendo assim, estes microrganismos constituem-se uma fonte importante de enzimas extracelulares, dentre elas proteases, amilase e lipases (MARGULIS, 2001; SCHALLMEY, 2004)

1.2.2 Processos Fermentativos

A obtenção das enzimas acontece geralmente por dois métodos de fermentação: sólida (FES) e submersa (FS). O ambiente fornecido nesses dois métodos é bem diferente em relação ao teor líquido, e isso caracteriza a produção de diferentes tipos de enzimas (SATO E SUDO, 1999). Segundo Aguilar (2008) a fermentação em estado sólido possui desvantagens, como somente o uso de microrganismos capazes de crescerem sob níveis reduzidos de umidade, a dificuldade em determinar parâmetros (pH, umidade, taxa de oxigênio livre e dióxido de carbono) e sua baixa utilização em largas escalas.

Neste contexto, Feitosa *et al.* (2010) utilizaram microrganismos isolados de solos contaminados por petróleo para a produção de lipase e obteve uma atividade máxima de 4369 U/mL em cultivo submerso. Singh *et al.* (2010) utilizaram o microrganismo *Bacillus subtilis* OCR-4 em fermentação sólida, sob variadas condições do pH, substratos e tempo de incubação, para a produção de enzimas lipolíticas. A máxima atividade lipolítica observada foi 4,5 U/g utilizando óleo de amendoim após 48 horas de fermentação e pH 8. Falony *et al.* (2006) avaliaram a produção de lipase em fermentação sólida e obtiveram lipases com atividade máxima de 4,8 U/mL.

Wolski *et al.* (2009) fizeram um estudo comparativo entre as características da lipase de *Penicillium* sp. produzida em fermentação sólido e submersa. Seus resultados propuseram que enzimas produzidas a partir da fermentação submersa possuem melhores características quanto a estabilidade em pH e temperatura. No trabalho em questão o extrato enzimático obtido da fermentação submersa e sólida apresentou a melhor estabilidade na faixa de pH 4,9-8,5, temperatura de 25-35°C e pH 7,0 e 25°C, respectivamente. A lipase obtida da fermentação submersa também apresentou maior tempo de meia vida à 25°C (76,2 h).

A partir de uma análise econômica sobre a fermentação submersa e sólida, para a produção na escala de 100 m³ de lipase concentrada por ano, o investimento necessário para o processo submerso é 78% superior ao necessário para a fermentação sólida segundo Castilho *et al.*, (2000). Porém a fermentação submersa apresenta muitas vantagens, principalmente referente à facilidade de controle do processo. Por este motivo, a fermentação submersa ainda supera a fermentação sólida. Estudos relevantes realizados por Pinheiro *et al.* (2008), referentes à produção de lipases por fermentação submersa, mostraram a importância do uso de resíduos agroindustriais com a finalidade de diminuir o custo de produção do biocatalisador. Neste estudo foi investigado a produção de lipases por *Penicillium verrucosum* em fermentação submersa utilizando meio convencional (peptona, extrato de levedura, NaCl e óleo de oliva) e industrial (água de maceração de milho, Prodex Lac - hidrolisado de levedura, NaCl e óleo de oliva). A cinética de produção de lipases foi avaliada e as atividades enzimáticas mais elevadas para meio convencional e meio industrial foram de 3,15 e 2,22 U/mL, respectivamente. O extrato enzimático mostrou atividade ótima no intervalo de 30 a 40°C e em pH 7,0.

Além de uma boa escolha sobre qual tipo de fermentação utilizar, faz-se necessário uma avaliação sobre o meio de cultura utilizado para o crescimento microbiano. Os meios de cultivo são formulados por meio da utilização de compostos quimicamente conhecidos ou de matérias-primas naturais. Os constituintes principais desses meios são fontes de carbono (e

energia), fontes de nitrogênio, substâncias minerais, fatores de crescimento, e se tratando da produção de enzimas é essencial a presença de um indutor (LIMA *et al.*, 2007).

Carvalho *et al.* (2008) avaliaram a influência de três tipos de óleos (coco, mamona e oliva) como indutor e fonte de carbono na produção de lipase por uma bactéria isolada de um solo contaminado por petróleo. No estudo observaram que dentre os óleos testados, o óleo de coco produziu lipases com maior atividade (1.675 U/mL).

Kumari *et al.* (2009) realizaram a otimização estatística das condições de cultura para a produção de lipase utilizando o microrganismo *Enterobacter aerogenes*. Os parâmetros avaliados no estudo foram temperatura, concentração do óleo, volume do inóculo, pH e o tempo de incubação. Seus resultados mostraram que a melhor condição para a produção de lipase foi temperatura de 34°C, 3% de óleo, 7% de volume de inóculo, pH 7,0 e 60 horas de incubação, na qual foi obtida uma atividade lipolítica máxima de 27,25 U/mL.

Desta forma, a produção de enzimas em escala industrial se faz majoritariamente por fermentação submersa, embora nos países orientais haja uma tradição estabelecida de utilização da fermentação semi-sólido (LIMA *et al.*, 2007).

1.2.3 Aplicações

As lipases têm sido utilizado em aplicações promissoras de variados segmentos biotecnológicos, como indústrias de alimentos (BUSTAMANTE *et al.*, 2003), de detergentes (LIU *et al.*, 2009), oleoquímica (MATSUOKA *et al.*, 2009), farmacêutica e química fina (VIEIRA *et al.*, 2009), tratamento biológico de resíduos (ROSA *et al.*, 2006), citados com mais detalhes a seguir. A alta capacidade catalítica das lipases permite que estas enzimas sejam utilizadas na síntese regioseletiva ou na resolução estereosseletiva de alcoóis, ácidos carboxílicos e aminas, dando origem a produtos opticamente ativos e ampliando a aplicação comercial (BON *et al.*, 2008). O mercado industrial das lipases está dividido em três segmentos de aplicação: enzimas técnicas, enzimas para indústria de alimentos e enzimas para ração animal. Na Tabela 1.3 pode-se observar que o mercado mundial das lipases passou de 1,8, em 2002, para 2,3 bilhões de dólares americanos, em 2009 (HASAN *et al.*, 2006).

Na indústria alimentícia, as lipases são utilizadas nos seguintes sub-grupos: melhoramento da textura de pães, otimização do tempo de maturação de salsichas fermentadas, na hidrólise de gorduras do leite e até para alterar o sabor do leite (BON *et al.*, 2008; GANDRA *et al.*, 2008).

Tabela 1.3: Segmentos de aplicações das lipases (Milhões de dólares)

<i>Segmentos de aplicação</i>	<i>2002</i>	<i>2003</i>	<i>2004</i>	<i>2009</i>
Enzimas técnicas	978	1.009	1.040	1.222
Enzimas para indústria de alimentos	701	720	740	863
Enzimas para ração animal	210	215	220	267
Total	1.890	1.945	2.000	2.352

Fonte: HASAN *et al.*, 2006.

A utilização de lipases na indústria de detergentes ocorre desde 1994 e hoje este segmento é considerado indiscutivelmente o maior consumidor destas enzimas, correspondendo a aproximadamente 32% das vendas totais das lipases. Isso se deve principalmente à característica da enzima suportar ao pH e a temperatura branda submetido durante o processo de lavagem (BON *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2009).

Dentre as aplicações na indústria oleoquímica merece destaque a interesterificação de óleos, que permite a valorização de um óleo mais barato por meio da composição em ácidos graxos (CABRAL *et al.*, 2003). Segundo ISO (2001), o emprego das lipases na produção de biodiesel também é bastante estudado. Nesta reação são produzidos ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, que podem ser empregados como combustível, sem a desvantagem de gerar óxidos de enxofre e de particulados. Comparado ao método químico, o método enzimático simplifica o procedimento para recuperação de ésteres etílicos e metílicos (biodiesel) e dos subprodutos gerados (glicerol), eliminando a geração de resíduos (YANG *et al.*, 2007).

Na indústria farmacêutica e química fina, o potencial das lipases é conferido pela sua característica de regio, enantio e quimiosseletividade, que permite a sua utilização na resolução de misturas racêmicas e na remoção seletiva de certos compostos (CABRAL *et al.*, 2003)

As lipases são utilizadas no tratamento de resíduos domésticos, na limpeza de tubulações de esgotos, fossas sépticas e sumidouros e também para acelerar a biodegradação de polímeros e lamas de perfuração de poços de petróleo contendo ésteres sintéticos emulsionados em água (JAEGER e REETZ, 1998; BON *et al.*, 2008).

Por outro lado, as lipases também podem ser empregadas como biossensores para a detecção de triacilgliceróis na indústria oleoquímica, na tecnologia de alimentos e em análises clínicas (BON *et al.*, 2008).

A versatilidade das lipases, aliada ao desenvolvimento dos conhecimentos e técnicas associadas à biologia molecular dos microrganismos, mostram que sua utilização será ampliada consideravelmente nos próximos anos (SHARMA *et al.*, 2001). Para que essas aplicações sejam possíveis faz-se necessário a purificação da enzima e novos estudos na área de engenharia de proteínas.

1.3. Purificação Enzimática

As enzimas comerciais apresentam-se desde preparações enzimáticas brutas até enzimas altamente purificadas (BON *et al.*, 2008). A aplicação das enzimas depende do seu grau de pureza, portanto a purificação é uma etapa essencial para o estudo das propriedades biológicas e moleculares desses biocatalisadores. A ausência ou o reduzido grau de impurezas contribui para um espectro mais amplo de aplicações da enzima e um alto nível de atividade enzimática, que permite a utilização de pequenas quantidades da enzima. Um problema significativo da purificação é decorrente da complexidade estrutural destas enzimas e a necessidade de manter as suas propriedades biológicas após a aplicação da técnica de purificação (BASSANI *et al.*, 2010).

De forma geral, as enzimas podem ser purificadas por etapa única (por exemplo, cromatografia de afinidade) ou por uma combinação de várias etapas (por exemplo, precipitação, tecnologia de membranas, troca iônica, filtração em gel, etc.). A precipitação é descrita como uma tecnologia bastante simples, que pode ser utilizada para remover impurezas ou isolar uma proteína alvo numa mistura. Dentre as técnicas de precipitação a utilização de sulfato de amônio é a mais utilizada devido à precipitação da maioria das proteínas ocorrer em uma molaridade alta, não promover o aquecimento da solução (em comparação com a utilização de solventes como etanol), apresentar uma densidade que não interfere na sedimentação da maioria das proteínas e promover o efeito de concentração das proteínas (KANWAR *et al.*, 2006).

Abbas *et al.* (2002), com a finalidade de estudar o isolamento e a caracterização de uma lipase extracelular de uma cepa isolada de *Mucor* sp., de palma de frutas, utilizaram para a precipitação da proteína 75% (m/v) de sulfato de amônio a 0°C, obtendo uma atividade lipolítica específica de 129 U/g e um rendimento total de 99%. Resultados semelhantes foram verificados no estudo de Castilho *et al.* (2000) para a purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp., neste

processo utilizaram o sulfato de amônio a 70% para a precipitação e obtiveram uma atividade específica de 103 U/g.

Todavia, esta técnica de precipitação é considerada de baixa resolução de separação devido à baixa especificidade. Saxena *et al.* (2003) realizaram um estudo sobre os métodos de purificação e observaram que cerca de 80% dos sistemas de purificação utilizam a etapa de precipitação, dos quais, 60% usam sulfato de amônio e 35% usam etanol, acetona ou um ácido, seguido pela combinação de algum método cromatográfico. Estes autores também verificaram que entre os métodos cromatográficos, a cromatografia de troca iônica é a mais utilizada (67%), e o trocador iônico mais empregado são os grupos dietilaminoetil (DEAE) para troca aniônica (58%) e carboximetil (CM) para troca catiônica (20%). O segundo método mais utilizado é a gel filtração (60%), seguida pela cromatografia de afinidade (27%). Outro método cromatográfico, porém menos utilizado para purificação de lipases é a cromatografia de interação hidrofóbica (18%), para o qual os adsorventes mais utilizados são dos grupos fenil e octil.

A configuração física geral de um processo cromatográfico é uma fase estacionária (matriz) empacotada em uma coluna, através da qual a fase móvel é eluída. A fase estacionária pode ser constituída por um polímero, que se apresenta em partículas esféricas de aproximadamente 100 µm, dispersas em solventes, o qual constitui a maior parte desta fase (SCHMIDELL *et al.*, 2005).

Gaur e colaboradores (2008) purificaram a lipase produzida por *Pseudomonas aeruginosa* PseA por meio da ultrafiltração em membrana (33 kDa) seguida da aplicação das enzimas, já liofilizadas, em uma coluna Sephadex G-100. Uma purificação de 8,6 vezes foi alcançada com 51,6% de rendimento. Esta lipase apresentou pH ótimo de 8,0 e temperatura ótima de 40°C.

Chen *et al.* (2007) purificaram a lipase produzida por *Bacillus cereus* C71 com a seguintes sequência de etapas: precipitação com sulfato de amônio até 60%, cromatografia de interação hidrofóbica (fenil-Sepharose), coluna de troca aniônica (DEAE-Sepharose) e coluna CIM QA (material monolítico polimérico com alta eficiência). O resultado foi uma purificação de 1.092 vezes associado a 18% de rendimento, com valores ótimos de pH e temperatura 9,0 e 33°C.

Kumar *et al.* (2005) propuseram a purificação da lipase produzida por *Bacillus coagulans* BTS-3 promovendo a precipitação das proteínas com sulfato de amônio, seguida da ressuspensão e diálise com tampão tris-HCl 0,1 M, e coluna de troca aniônica (DEAE-Sepharose). Utilizando este processo conseguiram purificar a lipase 40 vezes e o peso

molecular determinado foi de 31 kDa. Os valores ótimos de pH e temperatura foram 8,5 e 55°C, respectivamente.

Kambourouva *et al.* (2003) purificaram uma lipase termoestável produzida por *Bacillus stearothermophilus* MC 7 num método que consistiu na ultrafiltração, cromatografia em gel sephadex G-200 e cromatografia de troca iônica (DEAE-Sepharose). Uma purificação de 19,25 vezes e rendimento de 10,2% foram alcançados. Os valores ótimos de pH e temperatura foram 7,0 e 80°C, respectivamente.

Koblitz e Pastore (2004) realizaram a purificação parcial da lipase, produzida por *Rhizopus* sp., por meio de dois métodos cromatográficos: DEAE Sepharose (Troca aniônica) e fenil Sepharose (Interação hidrofóbica). Seus resultados indicam que a DEAE Sepharose, embora mais seletiva para a enzima em questão, parece provocar redução de sua atividade. Enquanto que o fenil Sepharose sobre presença de maiores concentrações de Na⁺ contribui para um aumento da atividade da lipase.

Por outro lado, a tecnologia de membranas tem emergido como uma alternativa atrativa para a coluna cromatográfica, entretanto possui algumas limitações como fluxo irregular, tamanho dos poros variados, espessura irregular da membrana e menor capacidade de ligação (ROSA *et al.*, 2010). Apesar da cromatografia ser considerada um método de purificação bastante eficaz e muito utilizado à nível industrial, diversos pesquisadores continuam à procura de novas alternativas de purificação.

Como pôde ser observado, o processo de purificação é fundamental na obtenção e aplicação industrial de uma enzima. A escolha do processo de purificação enzimática deve ser feita levando em consideração a necessidade de uma boa recuperação da atividade enzimática aliada a um alto grau de pureza. Além disso, o processo deve ser simples e barato, evitando sucessivas etapas. Em geral, a fase de purificação é a etapa que mais contribui para o custo total de obtenção de uma enzima. Em comparação as técnicas citadas anteriormente, a partição em sistema aquoso bifásico é uma alternativa bastante eficiente para a separação e purificação de bioprodutos como proteínas. São muitas as vantagens oferecidas por este tipo de sistema, como: ambiente biocompatível, baixa tensão interfacial, baixa energia, fácil aplicação em grande escala, operação contínua e alta sensibilidade no reconhecimento das interações das proteínas ligantes (SELVAKUMAR *et al.*, 2010).

A aplicação do sistema aquoso bifásico na separação de enzimas tem sido estudada por diversos pesquisadores, porém a quantidade de reagentes químicos consumidos, como sais e polímeros, determina a competitividade entre a extração com SAB e as outras técnicas de bioseparação. Por este fato, a possibilidade de reutilização dos constituintes das fases deve ser

considerada ao se efetuar o escalonamento, pois os custos dos componentes das fases aumentam linearmente com a escala de produção. Por este motivo a reciclagem de reagentes tem sido estudada basicamente para SAB compostos de polietilenoglicol (PEG) e sais, para os quais a reciclagem do PEG pode ser facilmente integrado ao processo, chegando a níveis de recuperação de 90 à 95%, enquanto que os sais podem ser recuperados por meio de eletrodíálise (COIMBRA *et al.*, 2003).

1.3.1 Sistema Aquoso Bifásico

Os sistemas aquosos bifásicos são conhecidos desde o final do século XIX, quando Beijerinck percebeu a separação espontânea em duas fases líquidas límpidas ao misturar soluções aquosas de gelatina com ágar ou amido solúvel. Posteriormente, Ostwald, Hertel, Dobry e Boyer-Kawenoki estudaram esses sistemas, porém, foi apenas com os trabalhos de Albertsson, em meados da década de 50, que ficou evidente para a comunidade científica a grande potencialidade de aplicação desta técnica para a partição/purificação de biocompostos (ZAFARANI-MOATTAR e NASIRI, 2010).

De forma geral, a formação dos SAB ocorre quando dois compostos hidrofílicos como polímeros (polietilenoglicol, dextrano, dentre outros) e sais (fosfatos, sulfatos, citratos, etc.) são misturados acima de certa concentração crítica resultando em duas fases imiscíveis, onde o maior constituinte é água (GARZA-MADRID *et al.*, 2010). A Tabela 1.4 classifica as composições do SAB em quatro grupos, que deverão ser aplicados de acordo com a biomolécula a ser purificada.

Os SAB formados por PEG e dextrana ou PEG e sais são amplamente utilizados, pela disponibilidade em grandes quantidades no mercado, por não serem tóxicos, possuírem alta seletividade, possibilidade de reciclagem dos reagentes e por manterem a integridade das enzimas (FERREIRA *et al.*, 2009). Todavia, o elevado custo da dextrana torna inviável a sua aplicação em escala industrial. Assim, o sistema PEG e sais têm sido empregados para a extração de enzimas em larga escala, pelo reduzido custo, baixa viscosidade e elevada seletividade (MALPIEDI *et al.*, 2009).

O polietilenoglicol (PEG), $\text{HO}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n-\text{H}$, é um polímero sintético, hidrofílico, não iônico, de cadeia linear ou ramificada, produzido mundialmente em grandes quantidades e com massas molares variando de poucas centenas a milhares de Daltons, sendo obtido a partir da ligação de polímeros de oxietileno de massa molar menor que 40.000 g/mol com metóxido de sódio ou hidróxido alcalino (CARVALHO, 2004). O PEG e seus derivados têm

sido amplamente utilizados em alimentos, cosméticos, sabões e medicamentos, isso devido à suas propriedades de atoxicidade e por não ser considerado antigênico nem imunogênico (COIMBRA, 1995).

Tabela 1.4: Exemplos de componentes e tipos de sistema aquoso bifásico

<i>Grupos do SAB</i>	<i>Exemplos</i>
Dois polímeros não iônicos	Polietilenoglicol (PEG)/Ficoll PEG/Dextrana PEG/Polivinil álcool Polipropilenoglicol (PPG)/dextrana Metil celulose/hidroxipropildextrana Ficoll/dextrana.
Polieletrólito e polímero não-iônico	Sulfato dextrana de sódio/PPG Carboximetilcelulose de sódio/metil celulose
Dois polieletrólitos	Sulfato dextrana de sódio/carboximetildextrana de sódio Carboximetildextrana de sódio/ carboximetilcelulose de sódio
Polímero não-iônico e composto de baixa massa molecular (SAL)	PPG/fosfato de potássio PEG/fosfato de potássio Metoxipolietilenoglicol/fosfato de potássio PPG/glicose PEG/glicose PEG/sulfato de magnésio PEG/citrato de sódio

Fonte: PESSOA JUNIOR *et al.*, 2005.

No caso de lipases não complexadas, o estado conformacional da estrutura cristalina depende da composição e das propriedades microscópicas da solução. Em polietilenoglicol, por exemplo, obtém-se geralmente a conformação fechada, enquanto que, na presença de

álcoois, obtém-se geralmente a forma aberta. Logo, as estruturas das lipases até hoje determinadas são geralmente divididas em duas categorias: as que têm o sítio ativo acessível ao solvente (estrutura aberta) e as que têm o sítio ativo inacessível ao solvente (estrutura fechada) (BON *et al.*, 2008).

Pesquisadores tem utilizado este tipo de sistema para a purificação de diversas biomoléculas, como albumina (YAN-MIN *et al.*, 2010), esterase (YANG *et al.*, 2010), protease (RAWDKUEN *et al.*, 2010) e lipase (BASSANI *et al.*, 2010). Segundo Rawdkuen *et al.* (2010), a efetividade do sal é determinada principalmente pela natureza do componente e segue a seguinte ordem de eficácia: para ânions $\text{SO}_4^{2-} > \text{HPO}_4^{2-} > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^-$ e para cátions $\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{Mg}^{2+} > \text{Ca}^{2+}$.

Madhusudhan *et al.* (2008) estudaram a influência de diferentes sais na purificação da álcool desidrogenase (ADH). Utilizando os sais fosfato de sódio, sulfato de sódio, sulfato de magnésio, fosfato de potássio e sulfato de amônio, observaram que a melhor recuperação da atividade (89%) foi obtida utilizando o sal fosfato de potássio. Mohamadi *et al.* (2007) também verificaram a influência de diferentes sais na partição, recuperação e fator de purificação da fenilalanina desidrogenase, e observaram que dentre os sais testados (sulfato de magnésio, sulfato de amônio, fosfato de potássio e fosfato de sódio) o sulfato de amônio apresentou os melhores resultados para a partição enzimática (68,77), recuperação (91,13%) e fator de purificação (300,2 vezes).

Li *et al.* (2010) investigaram a influência de diferentes sais (KCl, KBr, KI, K_2SO_4 , K_2HPO_4 , NaCl, Na_2SO_4 , NH_4Cl e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e concentrações (10 a 80 mM) na partição da lipase pura em sistema aquoso bifásico. Seus resultados mostraram que os efeitos do sal de fosfato na partição da lipase são muito melhores em comparação ao sódio e amônio, isso devido à diferença de potencial elétrico entre as duas fases. Em escala industrial, o principal sal utilizado é o fosfato devido ao seu baixo custo e ao alto coeficiente de partição de biomoléculas, porém altas concentrações deste sal podem acarretar problemas de desnaturação das biomoléculas, bem como ao ambiente (YAN-MIN *et al.*, 2010).

Uma inovação nos SAB é a utilização de líquidos iônicos como componente do sistema. Os líquidos iônicos são uma nova classe de sais com ponto de fusão abaixo de 100°C, cujas características principais incluem alta capacidade de solvatação, não inflamável e alta estabilidade térmica e química (MONIRUZZAMAN *et al.*, 2010). Pereira *et al.* (2010) estudaram a influência de vários líquidos iônicos no SAB constituído por polietilenoglicol e Na_2SO_4 , e perceberam que a separação do L-triptofano na presença dos líquidos iônicos foi

bastante eficiente no sistema, induzindo diretamente a mudança do coeficiente de partição da biomolécula.

Devido ao alto teor de água, a representação gráfica dos dados termodinâmicos do SAB é geralmente realizada por meio de diagramas retangulares (Figura 1.2). Utilizando estes diagramas pode-se obter as composições globais do sistema, com delimitação das regiões monofásica e bifásica por meio da curva binodal. Também são representadas as linhas de amarração ou *tie-lines*, que são retas que ligam pontos no diagrama que representam a composição das duas fases em equilíbrio. Qualquer ponto sobre essa mesma linha fornecerá fases de topo e fundo com a mesma composição final, porém com diferentes relações de volumes entre as fases (SILVA e LOH, 2006). Outra particularidade dos diagramas de fases é o ponto crítico (P_c), onde as propriedades físico-químicas das duas fases são teoricamente iguais (ALBERTSSON, 1986).

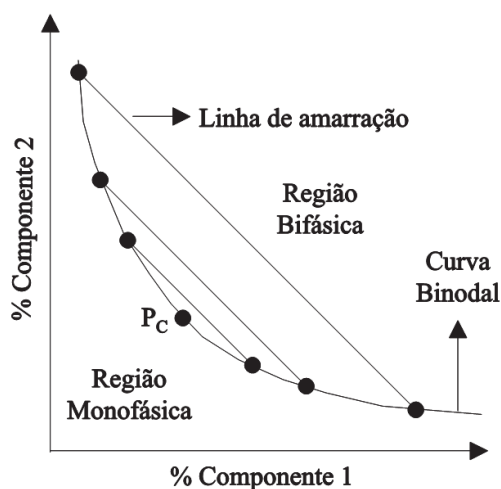


Figura 1.2: Esquema representativo de um diagrama de equilíbrio. (SILVA e LOH, 2006)

O comprimento da linha de amarração (usualmente referido como TLL) é um importante parâmetro termodinâmico, geralmente utilizado como variável determinante dos processos de partição. De acordo com Malpiedi *et al.* (2009), o aumento da TLL ocasiona uma diminuição do volume livre na fase de fundo do sistema, promovendo a partição da proteína para a fase de topo. Segundo Silva e Loh (2006), o comprimento da linha de amarração pode ser calculado por meio da equação 1.1.

$$TLL = [(\Delta C_1)^2 + (\Delta C_2)^2]^{0,5} \quad (1.1)$$

onde, ΔC_1 e ΔC_2 são as diferenças de concentração do componente 1 e 2 entre as fases, respectivamente.

A distribuição desigual da biomolécula entre as duas fases é resultante de um intrincado e delicado balanço de interações entre a proteína e as outras espécies (polímeros, água e/ou sais inorgânicos) presentes nas duas fases que coexistem em equilíbrio (LUECHAU *et al.*, 2010). De acordo com Mageste *et al.* (2009), a distribuição de proteínas entre as fases aquosas dos SAB é caracterizada por um parâmetro denominado coeficiente de partição, K , definido como:

$$K = \frac{C_T}{C_F} \quad (1.2)$$

onde, C_T e C_F são, respectivamente, as concentrações da proteína nas diferentes fases (T = topo ou F = fundo).

Inúmeras propriedades físico-químicas do sistema e do biopolímero determinam o valor de K . Os fatores associados à proteína são o tamanho, a conformação (estrutura secundária, terciária e quaternária) e a composição (estrutura primária), presença de carga elétrica e hidrofobicidade. Além disto, propriedades importantes das fases também contribuem nesta distribuição, como a natureza química dos componentes formadores do SAB, a massa molar e concentração dos polímeros, a presença de ligantes ao longo da cadeia polimérica que possam interagir especificamente com sítios da proteína, pH, temperatura e a adição de sais inorgânicos (CHAIWUT *et al.*, 2010).

Entretanto, os mecanismos que governam a partição de materiais biológicos ainda não são entendidos por completo. Para numerosos investigadores a partição de biomoléculas em sistemas aquosos bifásicos pode ser descrita com base na repulsão entrópica ($\log K_S$), interações eletrostáticas ($\log K_{el}$) e hidrofóbicas ($\log K_{hy}$), e a força motriz eletroquímica proveniente do sal do sistema, onde o total da partição (K_{tot}), segundo Johansson *et al.* (2008) é dada por:

$$\log K_{tot} = \log K_S + \log K_{el} + \log K_{hy} + \log K_{salt} \quad (1.3)$$

A Figura 1.3 apresenta os principais efeitos que podem ocorrer no SAB: o volume de exclusão e *salting out*. O efeito de volume de exclusão é ocasionado pelo aumento da massa molar ou concentração do polímero, que ocupa os espaços intersticiais da fase de topo ocasionando a diminuição da solubilidade e aumento da viscosidade das proteínas na fase

polimérica, respectivamente (RAWDKUEN *et al.*, 2010). O efeito *salting out* é devido ao aumento da concentração do sal, resultando na diminuição da solubilidade das biomoléculas na fase de fundo e consequentemente o aumento da sua partição para a fase de topo (BABU *et al.*, 2008).

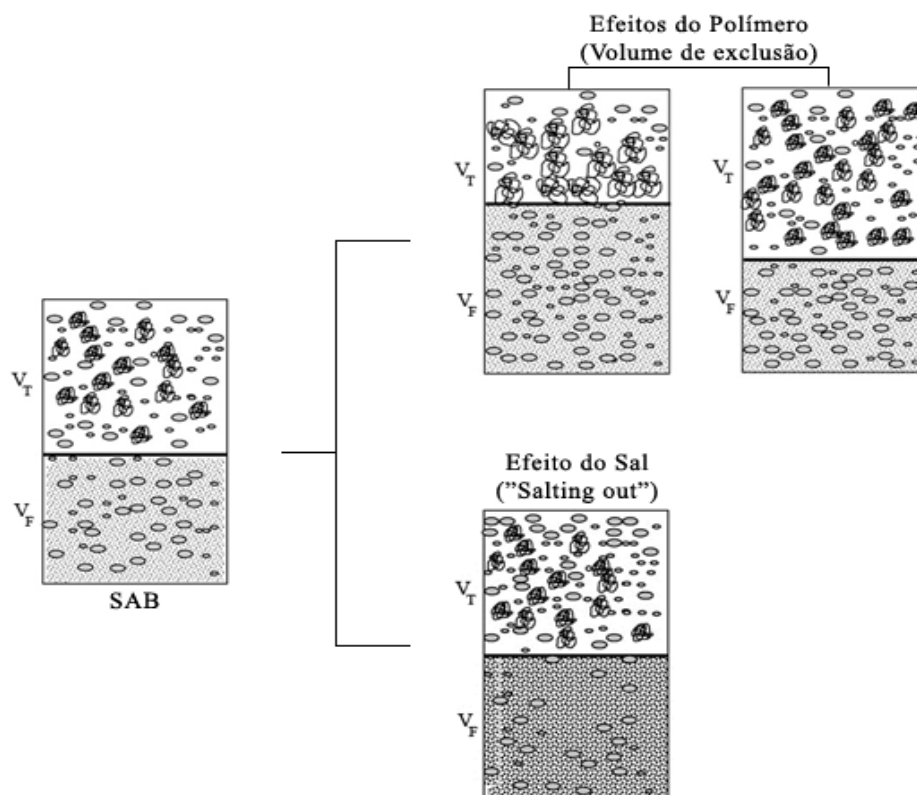


Figura 1.3: Representação esquemática da partição dos biocompostos no SAB: (●) Polímero; (○) Enzimas/proteínas; (■) Sal; V_T : volume da fase de topo; V_F : volume da fase de fundo. (BABU *et al.*, 2008)

Antov *et al.* (2004), utilizou diferentes concentrações de PEG na purificação de pectinases com dois tipos de SAB. Nos seus resultados pode-se perceber a influência da concentração do PEG, pois nos dois sistemas utilizados o K diminuiu de 0,30 para 0,0 e 0,59 para 0,14 mudando a concentração de PEG de 13 à 19% e 5 à 17,5%, respectivamente. Resultados contrários foram obtidos por Oliveira *et al.* (2001), que utilizaram o sistema PEG/citrato para purificar a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). No estudo foi avaliado a influência de diferentes massas moleculares (400 à 1500), concentrações (20 à 24%) de PEG e do sal citrato, e o resultado preliminar mostrou que a enzima foi melhor particionada na fase de topo, com o K igual a 184, mesmo utilizando elevada concentração do

polímero. Acredita-se que este resultado deva-se principalmente a baixa massa molecular do PEG e a alta concentração do sal, que impediu o efeito de exclusão e favoreceu ao efeito *salting out*, respectivamente. Para Johansson *et al.* (2008), a diminuição do K com o aumento do polímero pode ser devido ao aumento da repulsão entrópica da fase.

Ribeiro *et al.* (2007) notaram a diminuição do coeficiente de partição utilizando diferentes massas molares de PEG (300 à 1500) na purificação de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). O aumento da massa molecular do PEG proporcionou o aumento da G6PD na fase de fundo do sistema, sugerindo uma maior hidrofobicidade desta enzima. Oliveira *et al.* (2001) realizaram a partição da G6PD em sistema aquoso bifásico formado por PEG e o sal citrato, variando a massa molecular e concentração do polímero bem como a concentração do sal. Os resultados obtidos mostraram que o maior coeficiente de partição, K (184), foi obtido com extrações conduzidas com 22% de PEG 400 e 20% de citrato. Sendo assim, de todas as variáveis testadas a baixa massa molar do PEG associada à elevada concentração do sal citrato favoreceram a transferência da enzima para a fase superior do SAB. O fato de a enzima possuir uma elevada massa molar (~100.000 Dáltons) indica que pode ter havido o efeito de exclusão pelo volume provocado por PEG de massas molares mais elevadas.

Zuñiga *et al.* (2001) utilizaram 4 massas molares de PEG, 1500, 4000, 6000 e 8000 Dáltons na partição de duas proteínas, α -lactoalbumina e β -lactoglobulina. Os coeficientes de partição obtidos para as diferentes massas molares foram: PEG 1500 ($K_{\alpha}=20,55$; $K_{\beta}=0,036$), PEG 4000 ($K_{\alpha}=16$; $K_{\beta}=0,123$), PEG 6000 ($K_{\alpha}=8,95$; $K_{\beta}=0,128$) e PEG 8000 ($K_{\alpha}=7,84$; $K_{\beta}=0,089$). Observaram que o aumento da massa molar do polímero aumenta a partição da α -lactoalbumina para a fase inferior, enquanto que o efeito contrário ocorreu para a β -lactoglobulina. Dentre os sistemas testados o mais eficiente para a partição das proteínas foi composto por 18% de PEG 1500 e 18% de fosfato de potássio.

Bassani *et al.* (2010) observaram o efeito do volume de exclusão ao purificar lipase liofilizada de *Candida rugosa* num sistema aquoso bifásico constituído por PEG e fosfato de potássio, onde a massa molecular variou de 2000 à 4000. Porto *et al.* (2008), obtiveram resultados semelhantes extraindo proteases de caldo fermentado utilizando SAB formado por PEG/citrato, com baixos valores de K associados a alto fator de purificação com o uso de 22 % de PEG 10.000.

Além destes fatores citados anteriormente, a adição de novos sais e a variação do pH e temperatura têm sido alternativas que podem corroborar com a partição das biomoléculas. A adição de sais, como NaCl, pode aumentar a diferença de hidrofobicidade entre as fases

devido à diminuição da quantidade de água à superfície. Isso pode resultar na exposição das partes hidrofóbicas na superfície da proteína, que irá promover interações hidrofóbicas com o polímero, portanto, aumentar o coeficiente de partição (ROSA *et al.*, 2010).

Porém, a característica hidrofóbica da enzima também deve ser considerada, isso porque enzimas com superfícies hidrofóbicas têm maior tendência em ser particionada para a fase de topo (CHAIWUT *et al.*, 2010). Lima *et al.* (2002) afirmaram que o NaCl pode contribuir para o aumento da recuperação enzimática à depender do biocomposto que se deseja purificar.

Bassani *et al.* (2010) avaliaram a influência de diferentes concentrações de NaCl (0 à 6%) na partição da lipase de *Candida rugosa* e observaram que o aumento da concentração NaCl induziu a transferência da lipase para a fase rica em sal (fundo), todavia concentrações maiores que 3% favoreceram a partição para a fase de topo. Segundo Ooi *et al.* (2009), quando a lipase possui carga negativa a adição do NaCl cria um potencial eletrostático que interfere na partição. Estudos realizados por Yang *et al.* (2010) mostraram que o aumento da concentração do NaCl em sistema aquoso bifásico, composto por 27% de PEG 1000 e 13% de NaH_2PO_4 , não foram significantes na partição de esterase. Resultados similares foram encontrados por Naganagouda e Mulimani (2008) utilizando SAB, constituído de PEG e fosfato para purificar α -galactosidase.

Muitos pesquisadores investigam a correlação do pH em sistemas aquosos bifásicos. A concentração hidrogeniônica afeta a transferência das proteínas, porque estes biopolímero contêm uma grande variedade de grupos ácidos e básicos com diferentes pK_a , resultando em cargas elétricas que são funções dos valores de pH. Esta densidade de carga elétrica na superfície da proteína pode modificar sua conformação, bem como processos de associação ou dissociação entre as macromoléculas presentes no sistema. Todos estes processos que ocorrem com a proteína modificam sua interação com os componentes do sistema bifásico, alterando seu comportamento de partição. O pH também pode modificar a composição das fases dos SAB, seja a posição da linha binodal ou o comprimento das TLL (SILVA e LOH, 2006).

Resultados encontrados por Zhang *et al.* (2010), ao purificar lipase de *Trichosporon laibacchii* em sistema aquoso bifásico PEG/fosfato, mostraram que o aumento do pH de 3,0 para 7,0 ocasionou o aumento do coeficiente de partição (7,61) e o fator de purificação (aproximadamente 3 vezes). Estudo feitos por Bassani *et al.* (2007), usando lipase pancreática suína, revelaram que a influência do pH relaciona-se com a massa molecular do PEG. Utilizando massa molecular inferior a 4.000 o aumento do pH ocasionou a diminuição do coeficiente de partição e valores superiores a 4.000 o aumento do pH influenciou

significativamente no aumento do coeficiente de partição. Também tem sido observado por outros autores o aumento do coeficiente de partição com o aumento do pH para algumas biomoléculas, como por exemplo: lipase (LI *et al.*, 2010), protease (CHAIWUT *et al.*, 2010) e xilanase (YANG *et al.*, 2008).

Para Saravanan *et al.* (2008) o pH pode afetar o coeficiente de partição, seja alterando a carga do soluto ou outras espécies presentes no sistema. Também relatam que existe uma grande relação entre o pH e o ponto isoelétrico (pI) da proteína, isso porque quando o pH do sistema é mais elevado que seu pI , a proteína é carregada negativamente, e portanto, o coeficiente de partição da proteína aumenta com o aumento do pH.

O efeito da temperatura no SAB varia de acordo com o tipo dos componentes. Sistemas PEG e dextrana quando submetidos a temperaturas elevadas necessitam de uma maior concentração dos polímeros para que haja a separação das fases, por este motivo neste tipo de sistema normalmente é submetido a temperaturas inferiores a ambiente. Já para sistema PEG e sal o aumento da temperatura favorece o aumento da concentração do PEG na fase de topo e consequentemente ocorre a redução da concentração do polímero na fase de fundo (PESSOA JÚNIOR, 2005). De acordo com Coimbra *et al.* (2003), sistemas cuja composição se aproxima do ponto crítico são mais afetados por mudanças de temperatura, devido à instabilidade inerente à região do ponto crítico.

A influência da temperatura nos sistemas aquosos bifásicos tem relação direta com o tipo de biomolécula que será empregada. Segundo Lima (2002), enzimas quando submetidas à temperatura elevadas nos sistemas aquosos bifásicos podem sofrer deterioração das suas estruturas secundárias e terciárias, levando a desnaturação. Neste caso as ligações covalentes são quebradas e eventualmente toda a estrutura é destruída, seguindo-se da agregação das mesmas. Para Saravanan *et al.* (2008) o efeito da temperatura é um fator muito importante na partição da proteína, todavia a sua influência também está relacionada com o tipo de polímero utilizado.

Mokhtarani *et al.* (2008) avaliaram por meio de um planejamento fatorial completo 2^3 a influência da temperatura, concentração do sal e concentração e massa molar do polímero na partição de ciprofloxacina em sistema composto por PEG e sulfato de sódio. Os resultados do modelo indicaram que a partição do antibiótico foi altamente dependente da concentração do sal, enquanto que tanto a temperatura e a concentração do PEG tiveram um efeito parcial, e a massa molecular do polímero não teve efeito significativo.

Apesar da importância do estudo do sistema de purificação da enzima é preciso considerar que por mais adequado que seja o processo, este sempre vai causar alterações na

enzima. Redução da atividade enzimática, alterações de temperatura e pH ótimo de atuação e de estabilidade são algumas das características que podem ser afetadas com o processo de purificação. Dessa forma, a caracterização bioquímica das enzimas ganha destaque por fornecer dados para compreender a atuação e as alterações sofridas pela enzima.

1.4 Recuperação Final

A maioria das preparações enzimáticas é comercializada na forma líquida ou granulada (BON *et al.*, 2008). As etapas envolvidas para a recuperação final das enzimas a purificação do extrato bruto obtido no processo fermentativo, são a secagem (forma granulada) e a estabilização do produto final (forma granulada ou líquida).

No caso específico da secagem para a obtenção da enzima no estado sólido é importante ressaltar que após o processo, o biocatalisador deve manter a sua conformação nativa, e por extensão, sua atividade deve estar preservada (CHEN *et al.*, 2007).

O método mais utilizado para a secagem de enzimas é o método conhecido como “freeze drying”, no qual a secagem é feita por liofilização. O processo de liofilização possui as seguintes vantagens em comparação aos processos convencionais: a estrutura do material permanece intacta, e a umidade é removida a baixa temperatura, a estabilidade do produto durante o armazenamento é mantido; e a rápida transição do produto de um estado físico para outro minimiza a degradação da enzima (BOSS, 2004).

Para estabilização do produto final, na forma granulada ou líquida, faz-se necessário o emprego de etapas finais de acabamento para a manutenção da atividade enzimática durante o armazenamento e comercialização.

A maioria das preparações enzimáticas industriais contém, além da enzima ativa, outras proteínas, estabilizantes, preservativos, sais e diluentes que permitem a padronização entre as produções obtidas de diversas bateladas com diferentes atividades específicas. Para a manutenção da atividade enzimática é fundamental a preservação da conformação nativa, sendo utilizados, para esta finalidade, aditivos, modificação química controlada ou imobilização de enzimas. A metodologia empregada na estabilização do biocatalisadores somente são revelados aos clientes pela empresas que produzem enzimas comerciais, com compromisso firmado de confidencialidade (BON *et al.*, 2008).

1.5 Propriedades Catalíticas das Lipases Bacterianas

Existe uma diversidade muito grande de lipases que podem ser obtidas a partir de microrganismos e estas podem apresentar propriedades muito distintas entre si, mesmo sendo produzidas por linhagens próximas. Essas características enzimáticas podem ser afetadas por uma série de fatores, como forma de obtenção da enzima, tipo de reação em que a enzima é aplicada, tempo, temperatura e pH de estocagem, processos de purificação, etc. Sendo assim, o conhecimento das propriedades catalíticas das enzimas é extremamente importante, pois estas informações facilitam a compreensão da atuação enzimática e as supostas alterações que possam vir a ocorrer durante a reação enzimática. A temperatura e pH ótimos, estabilidade à temperatura e pH, massa molecular, sensibilidade a íons e solventes e outras propriedades são decisivas para o uso industrial.

1.5.1 Efeito do pH e da Temperatura

Devido à natureza protéica, as enzimas são altamente sensíveis a variações de pH e temperatura. O efeito do pH sobre a enzima deve-se às variações no estado de ionização dos componentes do sistema à medida que o pH varia. (KENNEDY *et al.*, 1987). No caso específico das lipases de origem microbiana o pH ótimo de atuação, nas diferentes reações, são os valores próximos a neutralidade ou alcalinidade (GUPTA *et al.*, 2004). Entretanto, existem algumas exceções como, por exemplo, a lipase de *Pseudomonas fluorescens* SIK W1 cujo pH ótimo é ácido, em torno de 4,8 (LEE *et al.*, 1993). De forma geral, a faixa de pH ótimo está entre o pH 4 e 11 (PASTORE *et al.*, 2003; SAXENA *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2008; YU *et al.*, 2009; HORCHANI *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2009). Com relação à estabilidade ao pH, a maioria das lipases conferem atividade em faixa de pH entre 3 e 12 (GUPTA *et al.*, 2004).

Quando o pH do meio propicia a ausência de cargas na estrutura da enzima, diz-se que este valor de pH é o ponto isoelétrico (pI) da enzima, neste ponto as forças eletrostáticas repulsivas entre as moléculas das enzimas tornam-se mínimas. O ponto isoelétrico (pI) comumente determinado para lipases bacterianas têm sido valores bastante diversos, variando entre 4 e 10. Entretanto, lipases fúngicas e de leveduras está entre 4 e 6, com algumas exceções com valores entre 7 e 9 (LIMA *et al.*, 2004). As maiores taxas de reação química para catalisadores de uma forma geral dependem também da temperatura, isto é o aumento na temperatura imprime maior energia cinética às moléculas dos reagentes, ocasionando um maior número de colisões produtivas por unidade de tempo, conforme descrito pela equação

empírica de Arrhenius (CABRAL *et al.*, 1993). As reações catalisadas por enzimas apresentam um comportamento semelhante às reações catalisadas quimicamente. Porém, as enzimas são moléculas proteicas complexas e sua atividade catalítica provém da necessidade da sua estrutura terciária ser mantida, principalmente por um grande número de ligações não covalentes, como pontes de hidrogênio, ligações dissulfeto e interações hidrofóbicas. Assim, se a molécula absorve excesso de energia, a estrutura terciária se rompe e a enzima entra em um processo de desnaturação, perdendo sua atividade catalítica. À medida que a temperatura se eleva o aumento esperado na velocidade, resultante do aumento das colisões entre enzima e substrato, é contraposto pelo aumento da velocidade de desnaturação. Consequentemente, a curva de atividade-temperatura é o resultado líquido dos efeitos opostos resultantes da elevação da temperatura (aceleração da reação) e do aumento da inativação (desnaturação) (BON *et al.*, 2008).

A dependência da temperatura na atividade enzimática para as lipases foi investigada por diversos pesquisadores, a temperatura ótima das lipases geralmente está entre 30 e 60°C (HORCHANI *et al.*, 2009; GAUR *et al.*, 2008; SAXENA *et al.*, 2003). Porém existem algumas enzimas que mantêm sua atividade em temperaturas superiores a 70°C, tais como a lipase das espécies *Bacillus* sp. e *Burkholderia* sp. (DHARMSTHITI *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 1999; RATHI *et al.*, 2000 e 2001; BRADDOO *et al.*, 2002). Para que uma enzima tenha potencial para aplicação industrial um requisito importante é a estabilidade térmica, já que muitos processos utilizam temperatura em torno de 50°C. A termoestabilidade da enzima lipolítica depende do microrganismo produtor, mas estudos recentes vêm mostrando que grande parte das lipases termoestáveis são provenientes de *Bacillus* sp. e *Pseudomonas* sp. (SALLEH *et al.*, 2006). Segundo Tyndall *et al.* (2002) para que uma enzima possua estabilidade térmica é necessário apresentar alguns fatores estruturais como: aumento das cargas superficiais, aumento das ligações de hidrogênio, aumento do número de cadeias β , dentre outras.

1.5.2 Estabilidade em Solventes Orgânicos

Os efeitos dos solventes sobre a velocidade da reação da catálise enzimática é um fator importante, devido à interferência direta do solvente na atividade, estabilidade e especificidade da enzima. Os solventes menos nocivos às enzimas são os mais hidrofóbicos, por não interagirem significativamente com a camada de hidratação da enzima tão forte, que em alguns casos, solventes hidrofílicos não conseguem retirar a água. As enzimas, quando em suspensão em solventes hidrofóbicos, requerem substancialmente uma menor quantidade de

água para manutenção de sua atividade em comparação às enzimas suspensas em solventes hidrofílicos (WILLIAMS *et al.*, 1987; YADAV *et al.*, 2004, GAUR *et al.*, 2008).

A estabilidade em solventes orgânicos é desejável em reações de síntese, e as lipases geralmente são estáveis e somente uma minoria é estimulada ou inibida. De acordo com a literatura, a lipase de *Pseudomonas aeruginosa* PseA apresentaram estabilidade perante aos seguintes solventes orgânicos: dimetilsulfoxido, metanol, isopropanol, etanol, benzeno, dentre outros (GAUR *et al.*, 2008). Resultados contrários foram obtidos por Saxena (2003) utilizando a lipase de *Aspergillus carneus*, a qual perdeu de 45 à 100% da atividade após 30 minutos de reação com os solventes etanol (90 e 40%) e propanol (60%).

1.5.3 Efeito de Íons

Os íons também podem exercer um papel inibidor ou estimulador por meio da sua associação com as enzimas (GUPTA *et al.*, 2004). Algumas enzimas aceitam vários íons metálicos bivalentes como ativadores, como Ca^{2+} , Mg^{2+} ou Mn^{2+} , enquanto outras exigem um íon específico para a catálise (BORZANI *et al.*, 2008). Brune e Gotz (1992), e Rashid (2001) testaram a influência de alguns íons na lipase de *Pseudomonas* sp. e notaram que a atividade foi inibida pelo Zn^{2+} , Fe^{2+} e Fe^{3+} , e ativada pelo Ca^{2+} , Mn^{2+} e Sr^{2+} , respectivamente.

Wang *et al.* (2009) avaliaram o comportamento de uma lipase termoestável de *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 perante a diferentes soluções iônicas e reagentes. A enzima neste estudo foi fortemente ativada pelo Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , e aparentemente inibida pelos reagentes ácido etilenodiamino tetra acético, fenilmetilsulfonil e ditiotreitól.

No caso do estudo do efeito dos íons, muitas vezes torna-se necessário o uso de várias técnicas que apresentam sensibilidades distintas, dentre as quais a mais comum é a eletroforese em gel de poliacrilamida para validar a pureza final da proteína e a massa molecular. A outra técnica de grande confiabilidade é a cromatografia em coluna realizado em sistemas de HPLC, que dispõem de detectores altamente sensíveis, que determinam a absorvidade do eluído da coluna em todo espectro de luz visível e ultravioleta (MARTINS *et al.*, 2006). Nos diversos estudos relatados na literatura com as mais diversas técnicas mostram que as lipases possuem predominância de 19 à 60 kDa (GAUR *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2008; LESUISSE *et al.*, 1993).

Park *et al.* (2007) purificaram em cromatografia de troca iônica e caracterizaram lipase hepática de *Tarodes pacifus*. Os resultados obtidos mostraram que a massa molecular da enzima foi 27 kDa, determinado pela técnica SDS-page. E também foi verificada que a

atividade enzimática foi completamente inibida quando foi utilizado íons Hg^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} ou Cd^{2+} na concentração de 1 mM; segundo o autor os íons metálicos podem apresentaram efeitos variáveis na interface óleo-água através da interação com os ácidos graxos livres.

Liu *et al.* (2008) produziram, purificaram e caracterizaram uma lipase extracelular de *Aureobasidium pullulans* HN2.3 utilizando a técnica do SDS-Page, por meio da qual foi determinada a massa molecular da lipase de 63,5 kDa. Neste caso, a enzima foi fortemente inibida pelo íons Hg^{2+} , Fe^{2+} e Zn^{2+} e pelos solventes fluoreto fenilmetanosulfonil e ácido iodoacético.

1.5.4 Determinação de $V_{\max}$ e K_m

Nos estudos da cinética enzimática, determinam-se os valores de velocidades iniciais correspondentes a diferenças de concentrações iniciais de substrato, de acordo com uma representação de hipérbole correspondente a equação de Michelis-Menten obtendo $V_{\max}$ e K_m , a partir de métodos de linearização da equação de Michelis-Menten.

As três representações lineares mais utilizadas foram descritas por Woolf (apud BON *et al.*, 2008), mas são conhecidas pelos nomes dos bioquímicos que as utilizaram para tratar os seus resultados: Lineweaver e Burk (1934); Eadie (1942) e Hofstee (1952); Hanes (1932).

Na literatura, o método a representação de Lineweaver-Burk, sem dúvida é a mais popular entre os bioquímicos, como por exemplo estudos realizados por Liu *et al.* (2008) que após a produção, purificação e caracterização da lipase extracelular de *Aureobasidium pullulans* HN2.3 determinaram o valor de K_m e $V_{\max}$ da lipase (0,608 mM e 0,039 mM/min), respectivamente, indicando uma alta afinidade pelo substrato p-nitrofenil-laurato. Kambourova *et al.* (2003) determinaram as constantes cinéticas da lipase termoestável de um *Bacillus stearothermophilus* MC 7 utilizando o pNP palmitato como substrato, e encontraram os valores de 0,33 mM e 188 $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ para K_m e $V_{\max}$, respectivamente.

1.5.5 Influência do Tamanho da Cadeia Carbônica

Outra característica bastante importante da lipase é o seu potencial de esterificação. Chen *et al.* (2004) isolaram 7 linhagens do gênero *Bacillus* (três linhagens de *B. stearothermophilus* e *B. licheniformis*, e um *B. subtilis*) e avaliaram o potencial de reação em diferentes comprimentos de cadeias carbônicas. Os substratos utilizados foram Butirato (C_4) Caproato (C_6), Caprilato (C_8), Caprato (C_{10}), Laurato (C_{12}), Miristato (C_{14}), Palmitato (C_{16}) e Stearato (C_{18}). Com exceção de uma linhagem do *B. licheniformis*, que apresentou maior

atividade em cadeias carbônicas médias (C_{10}), a atividade lipolítica das lipases foi maior em curtas cadeias de ésteres. Esta maior afinidade por cadeias curtas extrapola para uma preferência de aplicação em acilglicerois de cadeia curta da gordura do leite por lipases do gênero *Bacillus*, que pode vir a ter um impacto significativo no sabor, devido ao sabor do leite está preferencialmente relacionado com os ácidos graxos de cadeia curta. Resultados contrários foram obtidos por Borkar *et al.* (2009), que purificaram e caracterizaram uma lipase extracelular de uma nova cepa de *Pseudomonas aeruginosa* SRT 9 e observaram que a enzima possui maior afinidade por ésteres de cadeias longas (C_{14} - C_{16}).

Capítulo II

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Aperfeiçoar o processo de purificação utilizando sistema aquoso bifásico, constituído por polietilenoglicol e tampão fosfato de potássio em preparação enzimática comercial e a obtida a partir do *Bacillus* sp. ITP-001 em fermentação submersa, e caracterizar bioquimicamente as enzimas lipolíticas obtida a partir do *Bacillus* sp. ITP-001.

Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da massa molecular do polietilenoglicol, e concentração do fosfato de potássio e polietilenoglicol na partição da lipase pancreática de porco e do *Bacillus* sp. ITP-001 no sistema aquoso bifásico;
- Selecionar a melhor condição de pH, temperatura e a influência de variadas concentrações de NaCl na partição enzimática;
- Determinar pH e temperatura ótimos da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 purificada;
- Caracterizar a lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 quanto a estabilidade, em variadas temperaturas e pHs, e aos parâmetros cinéticos;
- Analisar a influência de íons metálicos e solventes na atividade lipolítica;
- Estudar o potencial de esterificação da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001.

INTRODUÇÃO AOS CAPÍTULOS III, IV, V

Os capítulos III, IV e V, são apresentados em forma de artigos científicos, e estão organizados conforme as normas propostas pelo periódico de publicação. Estes capítulos trazem uma pequena introdução, os materiais e métodos utilizados no desenvolvimento de cada artigo, os resultados obtidos e sua discussão, além das conclusões de cada etapa.

No primeiro artigo (Capítulo III – “Partitioning of Porcine Pancreatic Lipase in a Two-Phase Systems of Polyethylene Glycol/Potassium Phosphate Aqueous”), foram determinadas as melhores condições de partição em sistema aquoso bifásico para uma lipase comercial. Este artigo está publicado no periódico *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 161, p. 1-8, 2010. Doi: 10.1007/s12010-010-8907-2.

O segundo artigo (Capítulo IV – “Purification of Lipase Produced by *Bacillus* sp. ITP-001 in Submerged Fermentation Using Aqueous Two-Phase System”) avalia as melhores condições de partição em sistema aquoso bifásico para a lipase produzida pelo microrganismo *Bacillus* sp. ITP-001, isolado pelo nosso grupo de pesquisa. Este artigo foi submetido ao periódico *Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic*.

O terceiro artigo desta dissertação (Capítulo V – “Biochemical Characterization of Lipase from a Novel Bacteria Strain – *Bacillus* sp. ITP-001”) aborda as características da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001 quanto a seu pH e temperatura ótimos, estabilidade, sensibilidade à íons e solventes orgânicos, bem como a determinação da massa molecular, ponto isoelétrico e parâmetros cinéticos. Este artigo foi submetido ao periódico *Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic*.

Capítulo III

Partitioning of porcine pancreatic lipase in a two-phase systems of polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous

Ranyere Lucena de Souza¹, José Murilo de Pinho Barbosa¹, Gisella Maria Zanin², Marcos Wandir Nery Lobão¹, Cleide Mara Faria Soares^{1,3}, Álvaro Silva Lima^{1,3,*}

¹Universidade Tiradentes, ²Universidade Estadual de Maringá, ³Instituto de Tecnologia e Pesquisa. Av. Murilo Dantas, 300, Prédio do ITP, Farolândia, Araaju-Sergipe, Brazil.

*E-mail: alvaro_lima@itp.org.br

Abstract

The hydrolysis of triglycerides at the oil-water interface, synthesis of esters and transesterification in microaqueous conditions are catalyzed by lipase. For its application, a proper purification method was necessary. This study examined the application of an aqueous two-phase system (ATPS) to partition porcine pancreatic lipase. The influence of molecular weight and concentration of polyethylene glycol (PEG), tie line length (TLL), potassium phosphate concentration, sodium chloride (NaCl) addition and temperature in the partition was studied. The enzyme was more efficiently purified in PEG 8,000 at 14.5 °C (PF= 3.89 fold), presenting more recoveries at the top phase with shorter TLL and lower concentrations of PEG and potassium phosphate. Moreover, the increase of these variables repressed the purification and the further addition of NaCl did not promote the purification of the enzyme. These results demonstrated the efficiency of the aqueous two-phase system on lipase purification.

Keywords: aqueous two-phase system, lipase, enzymes, purification, PEG

Introduction

Lipases (EC 3.1.1.3) are a class of hydrolases that catalyse a wide range of reactions including hydrolysis, inter-esterification, alcholysis, acidolysis, esterification and aminolysis. They catalyse the hydrolysis of fatty acid esters bound in the triacylglycerol (TAG) and release free fatty acids (ffa). The reaction is reversible and the direction of the reaction depends on the water content available in the reaction. In low water media, lipase catalyses esterification, transesterification and interesterification (1,2).

Since the mid 1980s there has been a growing interest in lipases, especially in those of microbial origin, due to the different reactions they are able to catalyse and their region- and enantio-selectivity (3). Lipases present uses in numerous applications, for example in detergents, foods, pharmaceuticals, fine chemicals, leather, pulp and paper industries. Promising fields for application of lipases include the biodegradation of plastics, such as polyhydroxyalkanoates (PHA) and polycaprolactone (PCL) and the resolution of racemic mixtures to produce optically active compounds (4,5,6). The critical factor for the use of lipase in the biotransformation process is the water activity present in the system, because it effects the reaction's speed, production yield, enzyme activity and reaction selectivity (7,8,9). More widespread industrial applications of these enzymes would depend on the development of low-cost processes for the production and purification of lipases.

As well as the desired components, the fermentation process generates by-products that frequently hinder the use of the fermented broth in industrial procedures. For the success of commercial production of enzymes and proteins, efficient downstream processing techniques are needed. When these processes are applied to biological materials, purification steps that are delicate enough to preserve the biological activity are required. However, these protocols increase the cost of the process and decrease the yield of the reaction (10). The conventional procedure includes ammonium sulphate precipitation, chromatography, dialysis and filtration (11,12,13).

An effective and economically viable method for the separation and purification of lipase is the partitioning in an aqueous two-phase system (ATPS). The ATPS can be formed by combining either two incompatible polymers or a polymer and salt in water, above a certain critical concentration. These systems are attractive due to low costs, rapid phase disengagement and the availability of commercial separators, which allow faster continuous protein separation (14).

The goal of this work is to determine the application of an aqueous two-phase system (PEG/potassium phosphate) as a step to purify lipase, studying the influence of PEG and potassium phosphate concentrations, tie line length, NaCl addition and temperature in the partition of porcine pancreatic lipase.

Experimental procedures

Materials and enzyme

The reagents utilized include analytical grade polyethylene glycol (PEG) with nominal molecular weights of 1,500 and 8,000 g/mol, and porcine pancreatic lipase (PPL) were purchased from Sigma (USA). Potassium phosphate and sodium chloride were also of analytical grade and were purchased from Synth (Brazil). The polymer and salt were used without further purification. Water previously distilled and de-ionized by a Milli-Q device (Millipore, USA) was used throughout the experiments.

Phase diagram

The phase diagram was obtained from the available literature (15,16). The mixture points were chosen by the phase diagram that promotes different lengths of tie line, which were defined by Equation 1 (17):

$$TLL = \sqrt{(\Delta W_T - \Delta W_B)_{PEG}^2 + (\Delta W_T - \Delta W_B)_{Phosphate}^2} \quad (1)$$

where TLL is the tie line length, ΔW is the weight percentages of phase-forming components in the top (T) and bottom (B), respectively.

Aqueous two-phase systems

The systems were prepared from stock solutions of PEG (50%, w/v), by a phosphate buffer (at pH 7.0) which was formed as a mixture of potassium phosphate monobasic and bibasic (50%, w/v) in a ratio of 1.087 (w/w), and by sodium chloride (30%, w/v), all stored at 4 °C. The amount of the commercial enzyme preparation added to the systems was always 10% of the system's total volume (10 ml), and was the last component added to the system. All systems were prepared in graduated tubes. After 2 min of gently stirring, the systems were centrifuged at 4 °C and 3000 g for 10 min. The tubes were brought to equilibrium in a thermostatic bath at 4 °C and local atmospheric pressure (1 atm) overnight (at least 12 h). After this treatment, the two phases became clear and transparent and the interface was well defined. The phases were carefully withdrawn using a pipette for the top phase and a syringe with a long needle for the bottom phase. The volumes were determined in graduated test tubes (10).

The partition coefficient is defined as the protein concentration (K_p) or enzyme activity (K_e) in the top phase, divided by the corresponding value in the bottom phase. In order to evaluate the purification process, the enzyme specific activity ($SA_{T \text{ or } B}$, expressed in U/mg protein), the volume ratio (R_v), the enzyme recovered in the top phase (R_T - %) and bottom phase (R_B - %), and purification factor (PF) were calculated according Lima *et al.* (10).

The extraction efficiency of the enzyme was calculated by using the following Equation 2:

$$E = \frac{EA_T V_T}{EA_T V_T + SA_B V_B} = \frac{K_E R_V}{1 + K_E R_V} \quad (2)$$

The partition experiments were carried out in triplicate and the average results are the values reported in the present work.

Enzyme assay

Lipolytic activities were assayed using the oil emulsion method according to a modification used by Soares *et al.* (18). The substrate was prepared by mixing 50 ml of olive oil with 50 ml of Arabic gum solution (7 % w/v). The reaction mixture containing 5 ml of the oil emulsion, 2 ml of 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) and enzyme extract (1 ml) was incubated in a thermostated batch reactor for 60 min at 37 °C. Samples were taken at 5, 10, 15, 30, and 60 min. A blank titration was done on a sample where the enzyme was replaced with distilled water. The reaction was stopped by the addition of 10 ml of acetone-ethanol solution (1:1). The liberated fatty acids were titrated with 25 mM potassium hydroxide solution in the presence of phenolphthalein as an indicator. One unit (U) of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that liberated 1 μmol of free fatty acid per min ($\mu\text{mol}/\text{min}$) under the assay conditions (37 °C, pH 7.0, 150 rpm).

Protein assay

Total protein concentration was determined by Bradford's method (19) using bovine serum albumin (BSA) as standard.

Results and discussion

Influence of PEG concentration on the lipase partition

The effects of PEG 1,500 and 8,000 g/mol on the partitioning of pancreatic porcine lipase are shown in Figure 1 and Table 1. The volume ratio was found to be above 4.0, which demonstrated that the top phase was formed in a bigger volume with PEG 1,500 g/mol and

the trend of the curves was similar for PEG 8,000 and 1,500 g/mol. The R_v values were practically constant until 25% concentration of PEG 1,500 and 8,000.

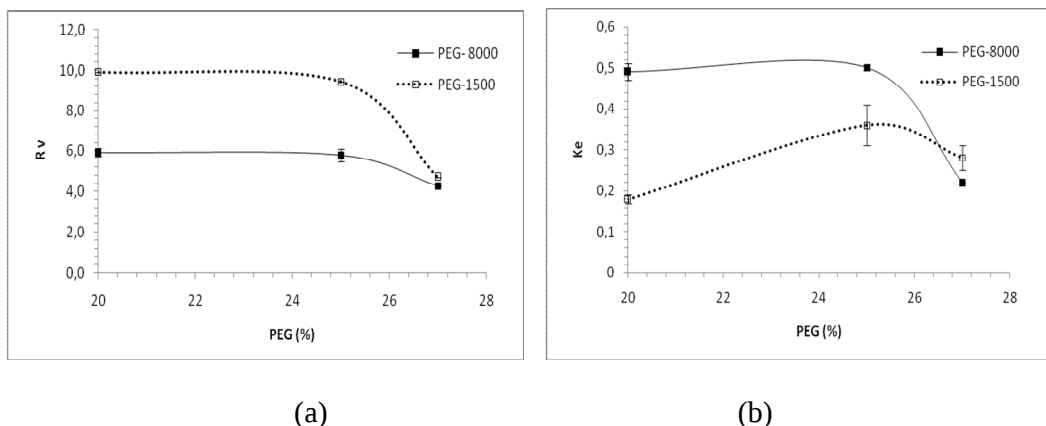


Fig. 1 Influence of PEG concentration on the volume ratio between the phases (a) and partition of porcine pancreatic lipase (b) in the system containing 18% of potassium phosphate, without NaCl at pH 7.0 and 4°C.

Moreover, the partition coefficients were found to be below 1.0, indicating that the lipase accumulated in the bottom phase. These results suggest the high hydrophilicity of the enzyme. Similarly, Ribeiro *et al.* (20) observed the partition of glucose-6-phosphate dehydrogenase at the bottom phase in aqueous two-phase PEG and phosphate systems. The partition coefficients decrease with PEG concentration above 25%, in which the highest values were found (0.36 ± 0.05 and 0.50 ± 0.11 for PEG 1,500 g/mol and PEG 8,000 g/mol, respectively). According to Babu *et al.* (21) this decrease in partition coefficient of lipase is due to the influence of volume exclusion. In fact, the volume occupied by the PEG increases with an increase in polymer concentration, which resulted in a reduced space for biomolecules in the top phase, then the compound tend to partition to the bottom phase.

Table 1 Effects of PEG concentration on the partition of porcine pancreatic lipase in system containing 18% of potassium phosphate, without NaCl at pH 7.0 and 4°C.

PEG-1500											
PEG (%)	V _b (ml)	V _t (ml)	AS _b (mg/l)	AS _t (mg/l)	AS _i (U/ml)	Cp _b (mg/ml)	Cp _t (mg/ml)	Cp _i (mg/ml)	R _t (%)	E (%)	PF _t
20	10.9±0.1	1.1±0.0	53.50±5.45	82.62±4.36	56.54±5.34	0.68±0.00	0.08±0.00	0.76±0.00	53.67±0.00	64.08	1.46±0.06
25	10.6±1.9	1.2±0.2	77.91±1.39	116.39±19.04	85.45±4.85	0.22±0.00	0.05±0.00	0.29±0.00	69.41±4.35	77.26	0.91±0.04
27	9.4±0.0	2.0±0.0	161.15±8.44	187.27±10.25	166.27±4.78	0.22±0.00	0.05±0.00	0.29±0.00	53.41±0.00	56.82	0.97±0.02
PEG-8000											
PEG (%)	V _b (ml)	V _t (ml)	AS _b (mg/l)	AS _t (mg/l)	AS _i (U/ml)	Cp _b (mg/ml)	Cp _t (mg/ml)	Cp _i (mg/ml)	R _t (%)	E (%)	PF _t
20	9.8±0.1	1.6±0.1	156.83±10.98	42.25±1.01	55.73±2.18	0.24±0.00	0.03±0.00	0.27±0.00	74.49±1.56	74.33	2.81±0.09
25	10.1±0.1	1.8±0.1	87.19±7.30	29.98±3.80	38.25±2.25	0.41±0.00	0.07±0.00	0.46±0.00	73.91±3.05	73.29	2.29±0.33
27	9.4±0.0	2.2±0.0	175.97±10.01	195.54±11.35	191.63±11.08	0.21±0.00	0.05±0.00	0.26±0.00	49.01±0.03	48.44	0.92±0.00

AS_i = specific activity in the entry system, Cp_i – protein concentration in the entry system.

It was verified that the decrease in concentration of PEG enabled the increment of recoveries, efficiency and purification factors in the top phase. The values of the recovery and extraction efficiency were highest at 25% in PEG-1,500 g/mol ($R_t = 53.67$ and $E = 64.08\%$) and 20% in PEG-8000 g/mol ($R_t =$ and 74.49% and $E = 74.33\%$), however the values of these parameters at 20 and 25% of PEG concentration do not differ much. Associated to this fact, the biggest purification factors occurred at 20% for both molecular weights of PEG (1.46- and 2.81-fold at PEG 1,500 g/mol and PEG 8,000 g/mol, respectively). For this reason the concentration of PEG chosen for the following experiments was 20%.

Influence of potassium phosphate concentrations

To observe the effect of differing potassium phosphate concentrations, a series of solutions containing 20% PEG (1,500 and 8,000 g/mol) and 18-28% of potassium phosphate were assessed. Figure 2 and Table 2 show the effect of varying concentrations of potassium phosphate on the partitioning of porcine pancreatic lipase.

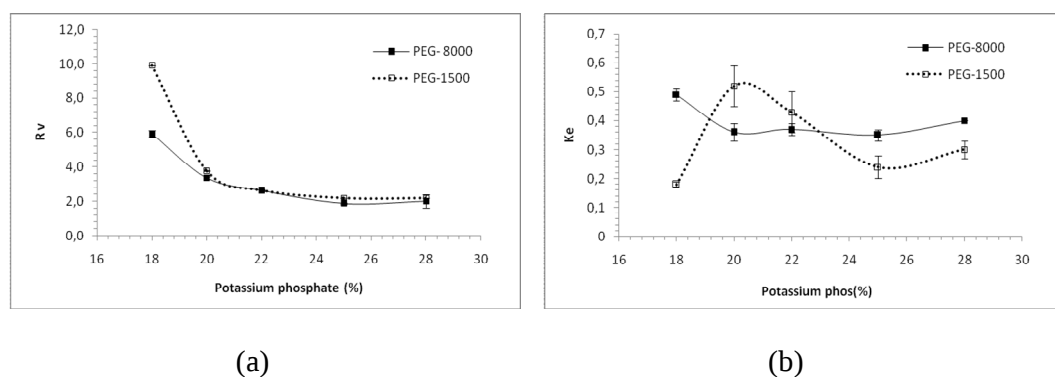


Fig. 2 Influence of potassium phosphate concentration on the volume ratio between the phases (a) and partition of porcine pancreatic lipase (b) in system containing 20% of PEG, without NaCl at pH 7.0 and 4°C.

The concentration of potassium phosphate significantly influenced the purification of porcine pancreatic lipase. The increase in phosphate concentration allowed the chaotropic capacity of the system to increase. Chaotropic salts have smaller negative or even positive values for Gibbs free energy of hydration and thus formed the better system. Thus, the volume ratio decreased from 9.91 to 2.19 and from 5.91 to 1.87 for PEG 1,500 and PEG 8,000 g/mol, respectively, with increasing phosphate concentrations. For the partition coefficients presented for PEG 1,500 g/mol, it was noted that the highest value was found at a concentration of 20% phosphate (0.52 ± 0.07), whereas for PEG 8,000 g/mol the lowest concentrations offered the highest partition coefficient (0.49 ± 0.02 for the phosphate concentration of 18%). Overall, it appears that the increase in phosphate concentration made the bottom phase more hydrophilic and this enabled the enzyme to go through the hydrophilic phase and consequently the K_e to decrease.

The efficiency of lipase partition was negatively affected by the increase in phosphate concentration. The highest values were 66.22% and 74.33% for the 20% (PEG 1,500 g/mol) and 18% (PEG 8,000 g/mol) concentrations respectively. The results of recoveries indicated two distinct regions, one with a higher recovery at the top and the other one at the bottom. The change occurred at a concentration of approximately 22% for both molecular weights of PEG. In the top phase the highest recoveries were observed (66.19 ± 3.07 at 20% of phosphate and PEG 1,500 g/mol and 74.49 ± 1.55 at 18% of phosphate and PEG 8,000 g/mol).

The purification factors were highest in the top phase when the lowest potassium phosphate concentration was used. The best result of lipase purification was obtained with 20% of phosphate for PEG 1,500 g/mol (1.46 ± 0.06 -fold) and 18% of phosphate for PEG 8,000 g/mol (2.81 ± 0.09 -fold).

Table 2 Effects of potassium phosphate concentration on the partition of porcine pancreatic lipase in system containing 20% of PEG, without NaCl at pH 7.0 and 4°C.

PEG-1500											
Phos. (%)	V _b (ml)	V _t (ml)	AS _b (mg/l)	AS _t (mg/l)	AS _i (U/ml)	Cp _b (mg/ml)	Cp _t (mg/ml)	Cp _i (mg/ml)	R _t (%)	E (%)	PF _t
18	10.9±0.0	1.1±0.0	53.50±5.46	82.62±4.36	56.54±5.34	0.68±0.00	0.80±0.00	0.76±0.00	64.63±3.80	64.08	1.46±0.06
20	9.1±0.0	2.4±0.0	51.18±2.23	85.60±7.37	59.35±0.05	0.19±0.00	0.06±0.00	0.24±0.00	66.19±3.07	66.22	1.44±0.12
22	8.2±0.1	3.1±0.1	27.98±0.81	37.75±4.77	30.34±0.54	0.76±0.00	0.24±0.00	1.01±0.00	53.00±3.39	53.07	1.24±0.14
25	7.8±0.1	4.1±0.1	127.72±3.98	94.64±12.79	119.64±0.12	0.18±0.00	0.06±0.00	0.24±0.00	34.35±3.65	34.45	0.79±0.11
28	7.9±0.0	3.6±0.0	33.65±1.41	30.20±3.90	32.78±2.04	0.74±0.00	0.25±0.00	0.99±0.00	39.87±2.21	39.65	0.92±0.06
PEG-8000											
Phos. (%)	V _b (ml)	V _t (ml)	AS _b (mg/l)	AS _t (mg/l)	AS _i (U/ml)	Cp _b (mg/ml)	Cp _t (mg/ml)	Cp _i (mg/ml)	R _t (%)	E (%)	PF _t
18	9.8±0.1	1.6±0.1	42.25±1.01	156.83±10.98	55.73±2.19	0.24±0.00	0.03±0.00	0.27±0.00	74.49±1.56	74.33	2.81±0.09
20	9.1±0.1	2.7±0.0	75.04±7.53	144.21±4.21	86.00±7.01	0.18±0.00	0.03±0.00	0.21±0.00	54.97±2.15	54.82	1.68±0.09
22	8.4±0.1	3.2±0.0	30.58±3.26	37.22±1.46	36.75±2.78	0.75±0.00	0.27±0.00	1.02±0.00	48.91±1.46	49.13	1.01±0.04
25	7.6±0.2	4.1±0.0	92.31±4.96	123.19±13.07	98.78±6.66	0.17±0.00	0.05±0.00	0.22±0.00	39.73±0.59	39.56	1.25±0.05
28	7.9±0.0	4.0±0.8	34.37±0.69	38.81±0.80	35.53±0.72	0.73±0.00	0.26±0.00	0.99±0.00	44.47±4.89	44.27	1.09±0.00

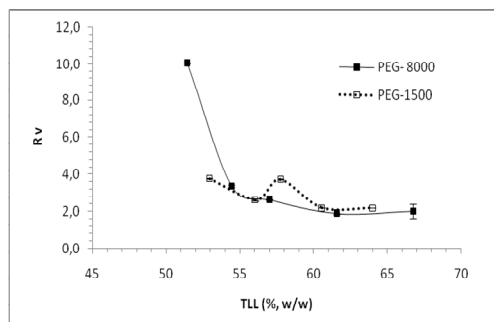
Phos. = phosphate, AS_i = specific activity in the entry system, Cp_i – protein concentration in the entry system.

Due to these results, in further purification protocols of lipase, 18% of potassium phosphate concentration in the partition system was used because the highest PF_t was found in PEG 8,000 g/mol.

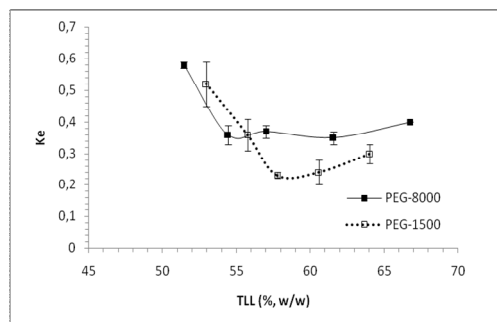
Influence of tie line length (TLL)

The effect of tie line length is shown in Figure 3. The value of TLL was determined using Equation 1. Increase in the tie line length is related to the increase in the hydrophobicity of the top phase in an ATPS, and also to the interface potential between the two phases (15). This increase of the hydrophobicity favoured partitioning of porcine pancreatic lipase to the bottom phase. The same verification was obtained by Antov *et al.* (17) working on pectinase partitioning in an aqueous two-phase system using PEG and ammonium sulphate.

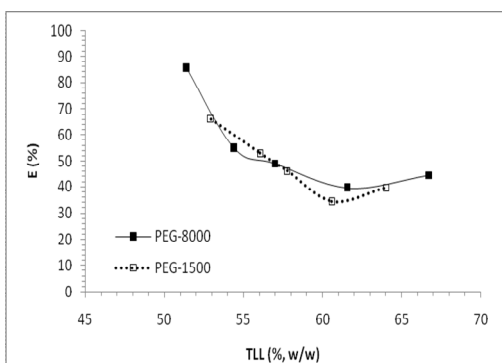
The TLL increase induced a decrease in the volume ratio, due to the decrease of the free volume of the bottom phase, and furthermore promoted the protein partition to the top phase. The partition coefficients of bulk protein increased from 0.12 (TLL= 50.17%) to 0.34 (TLL= 66.74%) and from 0.13 (TLL= 50.17%) to 0.36 (TLL= 66.74%) for PEG 1,500 and PEG 8,000 g/mol, respectively (data not shown). Rito-Palomares and Hernández (22) showed similar observations in partitioning of cheese whey proteins. The enzyme was more partitioned to the bottom phase and the K_e decreased differently from TLL value. Malpiedi *et al.* (23) also showed that trypsinogen from bovine pancreas partitioned to the bottom phase with the increase of TLL.



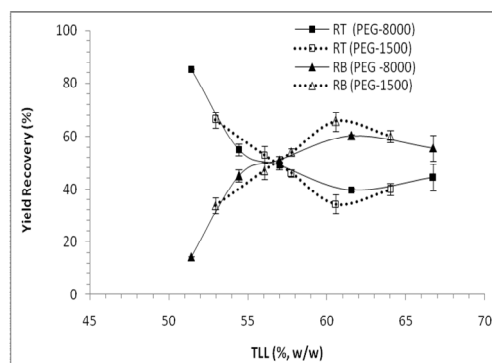
(a)



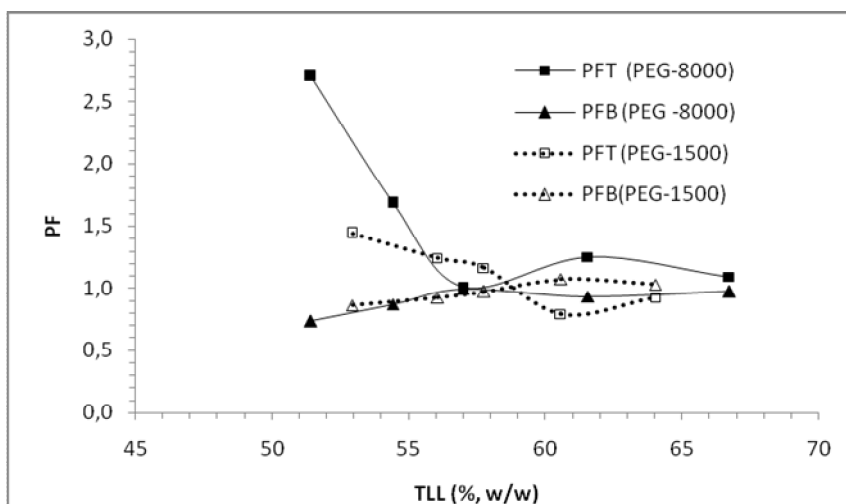
(b)



(c)



(d)



(e)

Fig. 3 Influence of tie line length in the volume ratio between the phases (a), partition coefficient (b), efficiency (c), recovery (d), and purification factor (e) in the aqueous two-phase system applied to porcine pancreatic lipase without NaCl at pH 7.0 and 4°C.

The efficiency of partitioning (E) followed the behaviour of R_t and the best values found were approximately 52% of TLL ($E = 66.22$ and $R_t = 66.19\%$ for PEG 1,500 and $E = 85.32\%$ and $R_t = 85.35\%$ PEG 8,000 g/mol, respectively). These results showed that the recovery of lipase was greater in the top phase for shorter TLL, and in the bottom phase for longer TLL, with an inflection point observed at 57% of TLL.

As the TLL increased, the volume of the bottom phase increased (R_v decrease), moreover, the phase became more hydrophilic and part of the enzyme went to the bottom phase, ($K_e < 0$). Associated with this is the fact that K_p increased (protein went to the top phase), but this migration is not sufficiently to the PF_t increase with the increase of TLL. The highest values of PF_t were found in the shortest TLL.

Influence of the addition of NaCl

Figure 4 and Table 3 show the effect of addition of NaCl on the purification process of porcine pancreatic lipase. The K_e decreased with the addition of NaCl. Lima *et al.* (10) also applied an aqueous two-phase system to purify pectinase and verified the reduction of the partition coefficient of the enzyme. In the system containing NaCl severe repression of the recovery, efficiency and purification factor were observed and the enzyme went to the bottom phase. Bradoo *et al.* (24) noted that the addition of NaCl to the system promoted the partitioning of lipase from *Bacillus stearothermophilus* to the top phase, whereas Bassani *et al.* (25) verified that addition of NaCl was implied in the reduction of the partition coefficient to PEG molecular weights over 4000 g/mol. This corroborates the results of this study, however, the NaCl addition of 3% promoted a purification of 8.0-fold.

Due to these results, systems without the addition of NaCl were used in subsequent experiments.

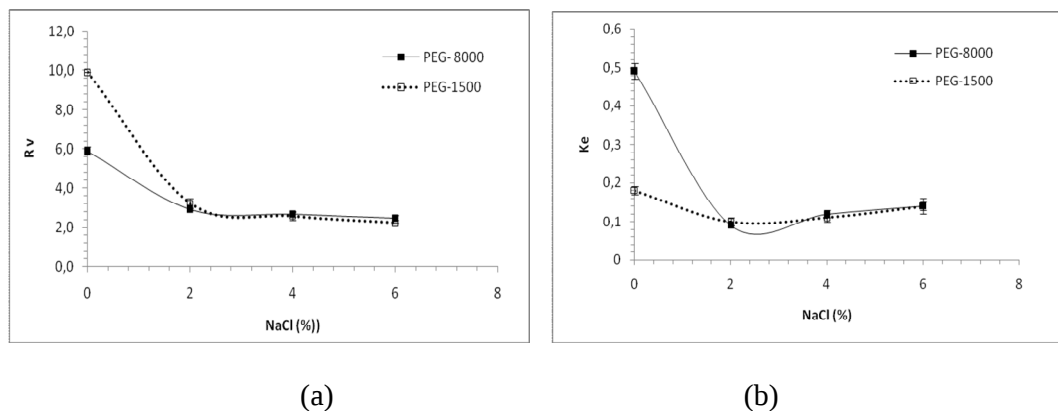


Fig.4 Influence of NaCl concentration on the volume ratio between the phases (a) and partition of porcine pancreatic lipase (b) in the system containing 20% of PEG and 18% of potassium phosphate at pH 7.0 and 4°C.

Influence of system temperature

The effect of temperature in the purification process of porcine pancreatic lipase using an aqueous two-phase system is shown in Figure 5 and Table 4.

Lipase purification using PEG 1,500 and PEG 8,000 g/mol was carried out more efficiently at 14.5 °C. At this temperature the best values for efficiency were verified (79.45% and 83.40% for PEG 1,500 and PEG 8,000 g/mol, respectively), recovery in the top phase (79.45±4.29% and 83.11±1.90% for PEG 1,500 and PEG 8,000 g/mol, respectively) and purification factor (1.50±0.01 and 3.89±0.42 for PEG 1,500 and PEG 8,000 g/mol, respectively). The increase in temperature did not promote the purification of lipase, probably due to deactivation of the enzyme.

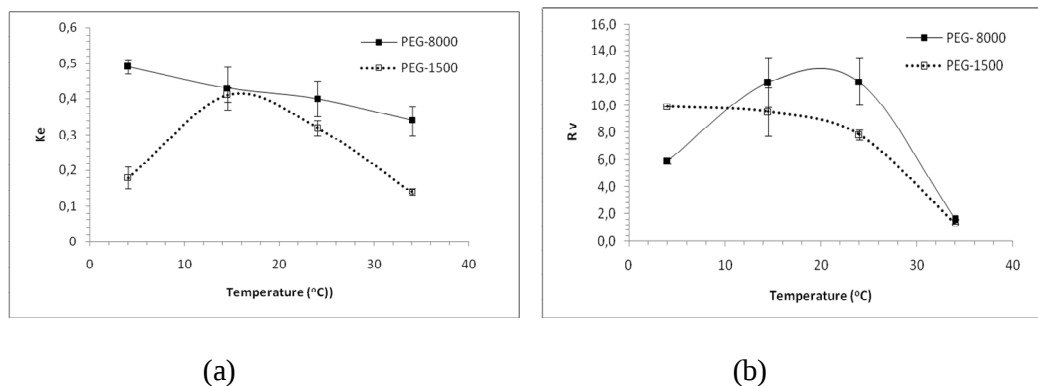


Fig 5 Influence of temperature on the volume ratio between the phases (a) and partition of porcine pancreatic lipase (b) in system containing 20% of PEG, 18% of potassium phosphate and without NaCl at pH 7.0.

Liu *et al.* (11) obtained a purification factor of 3.4-fold for lipase purification and recovery of 4.8% after using precipitation with ammonium sulphate, dialysis, and application of a Sephadex G-75 column and DEAE Sepharose fast-flow anion-change column. The best purification factor found in the present work (3.89-fold) leads us to conclude that the aqueous two-phase system is a good process to use for lipase purification because a single step promoted a purification factor similar to that found in the pre-purification steps, and the best enzyme recovery (83.40%).

Comparatively, the results obtained with the PEG 1,500 and 8,000 g/mol observed that the different degrees of PEG polymerization influenced the lipase purification efficiency. The increase of PEG molecular weight from 1,500 to 8,000 g/mol allowed us to find the best values of purification factor, recoveries and efficiency. Yang *et al.* (26) also observed the same effect when the aqueous two-phase system was applied to purify xylanase from *Paecilomyces thermophila*.

Table 3 Effects of NaCl concentration on the partition of porcine pancreatic lipase in system containing 20% of PEG and 18% of potassium phosphate at pH 7.0 and 4°C.

PEG-1500											
NaCl (%)	V _b (ml)	V _t (ml)	AS _b (mg/l)	AS _t (mg/l)	AS _i (U/ml)	Cp _b (mg/ml)	Cp _t (mg/ml)	Cp _i (mg/ml)	R _t (%)	E (%)	PF _t
0	10.9±0.0	1.1±0.0	53.50±5.46	82.62±4.36	56.54±5.34	0.68±0.00	0.08±0.00	0.76±0.00	64.18±1.14	64.08	1.46±0.06
2	8.6±0.2	2.7±0.1	137.45±10.23	74.54±0.52	127.12±7.06	0.24±0.00	0.05±0.00	0.29±0.00	25.03±0.81	24.03	0.59±0.03
4	8.1±0.0	3.1±0.0	194.83±32.53	101.15±5.16	177.69±23.98	0.18±0.02	0.04±0.00	0.22±0.01	22.62±0.83	22.04	0.58±0.11
6	7.7±0.0	3.4±0.0	335.23±29.58	65.65±12.29	223.27±30.25	0.10±0.00	0.07±0.01	0.17±0.00	23.89±0.37	24.04	0.29±0.02
PEG-8000											
NaCl (%)	V _b (ml)	V _t (ml)	AS _b (mg/l)	AS _t (mg/l)	AS _i (U/ml)	Cp _b (mg/ml)	Cp _t (mg/ml)	Cp _i (mg/ml)	R _t (%)	E (%)	PF _t
0	9.8±0.1	1.6±0.1	42.25±1.01	156.83±10.98	55.73±2.19	0.24±0.00	0.03±0.00	0.27±0.00	74.49±1.56	74.33	2.81±0.09
2	8.6±0.1	3.0±0.1	166.79±8.75	92.84±16.27	156.82±10.88	0.23±0.00	0.03±0.00	0.26±0.00	19.82±0.34	20.70	0.59±0.06
4	8.2±0.1	3.1±0.1	199.22±87.87	67.62±0.98	163.22±57.63	0.13±0.04	0.04±0.00	0.17±0.02	24.15±2.93	24.20	0.44±0.15
6	8.0±0.1	3.2±0.2	263.74±8.93	33.36±5.66	143.30±6.88	0.09±0.00	0.10±0.00	0.19±0.00	25.40±3.59	25.69	0.23±0.03

AS_i = specific activity in the entry system, Cp_i – protein concentration in the entry system.

Table 4 Effects of temperature on the partition of porcine pancreatic lipase in system containing 20% of PEG, 18% of potassium phosphate and without NaCl at pH 7.0.

PEG-1500											
T (°C)	V _b (ml)	V _t (ml)	AS _b (mg/l)	AS _t (mg/l)	AS _i (U/ml)	Cp _b (mg/ml)	Cp _t (mg/ml)	Cp _i (mg/ml)	R _t (%)	E (%)	PF _t
4	1.1±0.0	10.9±0.0	53.50±5.46	82.622±4.36	56.54±5.34	0.68±0.00	0.80±0.00	0.76±0.00	61.38±1.14	64.08	61.38±1.14
14.5	1.1±0.1	10.8±0.1	139.67±11.64	238.53±23.83	159.01±14.68	0.11±0.01	0.03±0.00	0.14±0.01	79.45±4.09	79.61	79.45±4.09
24	1.4±0.1	10.6±0.1	133.32±15.10	135.67±21.32	133.15±6.39	0.10±0.00	0.03±0.01	0.13±0.00	71.53±1.97	71.45	71.53±1.97
34	4.8±0.1	6.3±0.1	367.21±41.06	190.33±30.59	327.52±18.93	0.05±0.01	0.02±0.01	0.07±0.00	15.58±0.59	15.40	15.58±0.59
PEG-8000											
T (°C)	V _b (ml)	V _t (ml)	AS _b (mg/l)	AS _t (mg/l)	AS _i (U/ml)	Cp _b (mg/ml)	Cp _t (mg/ml)	Cp _i (mg/ml)	R _t (%)	E (%)	PF _t
4	1.6±0.1	9.8±0.1	42.25±1.01	156.83±10.98	55.73±2.19	0.24±0.00	0.03±0.00	0.27±0.00	74.49±1.56	74.33	2.81±0.09
14.5	0.9±0.1	10.8±0.2	35.71±0.79	183.36±26.61	47.09±2.81	0.32±0.00	0.03±0.00	0.35±0.00	83.11±1.90	83.40	3.89±0.42
24	0.9±0.1	10.8±0.2	151.90±9.19	178.67±11.22	158.39±5.77	0.13±0.00	0.04±0.00	0.17±0.00	82.02±2.41	82.46	1.13±0.09
34	4.2±0.0	6.6±0.1	391.37±46.51	167.38±51.03	287.99±14.49	0.03±0.00	0.02±0.00	0.05±0.00	34.47±2.95	34.80	0.58±0.15

AS_i = specific activity in the entry system, Cp_i – protein concentration in the entry system.

Conclusions

The purification process of porcine pancreatic lipase was more efficient when the system was formed with 20% PEG and 18% potassium phosphate ($PF_t = 1.45$ for PEG 1,500 g/mol and $PF_t = 2.81$ for PEG 8,000 g/mol). Longer tie line length and NaCl addition in the aqueous two-phase system had a negative effect on the porcine pancreatic lipase. Temperature over 24 °C decreased the recovery, efficiency and purification factor of this enzyme, in fact, at 14.5 °C the best purification of lipase (1.50 and 3.89 for PEG 1,500 e PEG 8,000 g/mol, respectively) was observed.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (Process 471118/2007) for financial support, and the PIBIC-UNIT for the scholarship for R.L. Souza.

References

1. Carvalho, N.B., Souza, R.L., Castro, H.F., Zanin, G.M., Lima, A.S. and Soares, C.M.F. (2008) Appl. Biochem. Biotechnol. 150, 25-32.
2. Vakhlu, J. and Kour, A. (2006) Electronic J. Biotechnol. 9(1), 69-85.
3. Cavalcanti, E.A.C., Gutarra, M.L.E., Freire, D.M.G., Castilho, L.R. and Sant'Anna Júnior, G.L. (2005) Braz. Arch. Biol. Technol. 48, 79-84.
4. Alonso, F.O.M., Oliveira, E.B.L., Dellamora-Ortiz, G.M. and Pereira-Meirelles, F.V. (2005) Braz. J. Chem. Engin. 22(1), 9-18.

5. Jensen, R.G., Galluzzo, D.R. and Bush, V.J. (1990) *Biocat.* 3, 307-316.
6. Jones, J.B. (1996) *Tetrah.* 42, 3351-3403.
7. Arroyo, M., Sanchez-Montero, J.M. and Sinisterra, J.V. (1999) *Enzyme Microb. Technol.* 24, 3-12.
8. Halling, P. (1994) *Enzyme Microb. Technol.* 16, 178-206.
9. Lamare, S. and Legoy, M.D. (1995) *Biotechnol. Bioengin.* 45, 387-397.
10. Lima, A.S., Alegre, R.M. and Meirelles, A.J.A. (2002) *Carbohy. Polym.* 50, 63-68.
11. Liu, Z., Chi, Z., Wang, L. and Li, J. (2008) *Biochem. Engin. J.* 40, 445-451.
12. Koblitz, M.G.B. and Pastore, G.M. (2006) *Ciênc. Agrotec.* 30(3), 494-502.
13. Saxena, R.K., Davidson, W.S., Sheoran, A. and Giri, B. (2003) *Process Biochem.* 39, 239-247.
14. Silva, L.H.M. and Meirelles, A.J.A. (2001) *Carbohy. Polym.* 42, 273-278.
15. Albertsson, P.A. (1986) *Partition of cell particles and macromolecules.* 3rd ed, Wiley Interscience, New York, USA.
16. Zaslavsky, B.Y. (1995) *Aqueous two-phase partitioning, physical chemistry and bioanalytical application.* Marcell Dekker, New York, USA.
17. Antov, M.G., Percin, D.M. and Pejin, S.N. (2004) *J. Serb. Soc.* 69(4), 299-307.
18. Soares, C.M.F., Castro, H.F., Moraes, F.F. and Zanin, G.M. (1999) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 77-79, 745-758.
19. Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
20. Ribeiro, M.Z., Silva, D.P., Vitolo, M., Roberto, I.C. and Pessoa Junior, A. (2007) *Braz. J. Microbiol.* 38, 78-83.
21. Babu, B.R., Rastogi, N.K. and Raghavarao, K.S.M.S. (2008) *Chem. Engin. Proces.* 47, 83-89.
22. Rito-Palomares, M. and Hernández, M. (1998) *J. Chrom. B.* 711, 81-90.

23. Malpied, L.P., Guillermo, D.R., Picó, A. and Nerli, B.B. (2009) *Separ. Purif. Technol.* 65(1), 40-45.
24. Bradoo, S., Saxena, R.K. and Gupta, R. (1999) *Process Biochem.* 35(1-2), 57-62.
25. Bassani, G., Farruggia, B., Nerli, B., Romanini, D. and Pico, G. (2007) *J. Chrom. B.* 859(2), 222-228.
26. Yang, S., Huang, Z., Jiang, Z. and Li, L. (2008) *Process Biochem.* 43, 56-61.

Capítulo IV

Purification of lipase produced by a new source of *Bacillus* in submerged fermentation using an aqueous two-phase system

José Murillo P. Barbosa¹, Ranyere L. Souza¹, Alini T. Fricks^{1,2}, Gisella Maria Zanin³, Cleide
Mara F. Soares^{1,2}, Álvaro S. Lima^{1,2,*}

¹ UNIT, Universidade Tiradentes, Av. Murilo Dantas, 300, Farolândia, 49032-490, Aracaju-
SE, Brazil.

² ITP, Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Av. Murilo Dantas, 300-Prédio do ITP, Farolândia,
49032-490, Aracaju-SE, Brazil.

³ UEM, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790- zona 7, Maringá-PR, Brazil.

*Corresponding author:

Tel/Fax: +55-79-32182190. E-mail: aslima2001@yahoo.com.br

Abstract

This work discusses the application of an aqueous two-phase system for the purification of lipases produced by *Bacillus* sp. ITP-001 using polyethylene glycol (PEG) and potassium phosphate. In the first step, the protein content was precipitated with ammonium sulphate (80% saturation). The enzyme remained in the aqueous solution and was dialyzed against ultra-pure water for 18 h and used to prepare an aqueous two-phase system (PEG/potassium phosphate). The use of different molecular weights of PEG to purify the lipase was investigated; the best purification factor (PF) was obtained using PEG-8,000 g/mol. The influence of PEG and potassium phosphate concentrations on the enzyme purification was then studied: the highest FP was obtained with 20% of PEG and 18% of potassium phosphate. NaCl was added to increase the hydrophobicity between the phases, and also increased the purification factor. The pH value and temperature affected the enzyme partitioning, with the best purifying conditions achieved at pH 6.0 and 4 °C. According to the results the best combination for purifying the enzyme is PEG-8,000 g/mol and potassium phosphate (20/18%) with 6% of NaCl at pH 6.0 and 4 °C (201.53 fold). The partitioning process of lipase is governed by the entropy contribution.

Keywords: lipolytic enzyme, purification, aqueous two-phase system

1 Introduction

A considerable number of lipases (EC 3.1.1.3) are produced by microorganisms such as yeasts, *Yarrowia lipolytica* [1], moulds, *Aspergillus carneus* [2], and bacteria, *Bacillus coagulans* [3]. Traditionally, lipases catalyze the hydrolysis of insoluble triacylglycerols to generate free fatty acids, mono and diacylglycerols and glycerol [4]. Microbial lipase is

obtained using a submerged or solid-state fermentation process. However, besides the desired components, the fermentation process generates by-products that frequently hinder the use of fermented broth in industrial procedures [5].

Efficient downstream processing techniques are required for the successful commercial production of enzymes and proteins. In biological materials, these require purification steps that are delicate enough to preserve biological activity [6]; on the other hand, the protocols involved increase the costs of the final product by about 60–90% and decrease the yield of the reaction [7]. The conventional purification process is usually begun by the removal of cells from the culture broth, either by centrifugation or by filtration. Then, the cell-free fermented broth is concentrated by ultrafiltration and ammonium sulphate precipitation, and isolated by chromatography and dialysis [8,9]. Liquid–liquid extraction using an aqueous two-phase system (ATPS) is an emerging and powerful technique for the purification of enzymes. The mixing of certain aqueous solutions of polymers (polyethylene glycol (PEG) – dextran, polymer and salt: PEG – potassium phosphate) above critical conditions leads to a system that splits into two immiscible phases [10,11].

The aqueous two-phase system presents advantages such as the low interfacial tension between the conjugated phases, the low cost of the materials, which can be recycled, the rapid attainment of the partition equilibrium, and the availability of commercial separators, which can easily be scaled up [12,13]. In this context ATPS has been extensively used to recover and purify various biocompounds such as proteins, enzymes and alkaloids [14,15]. Following purification, lipases may be used in the fat and oil/chemical industry, for the removal of different lubricants in the textile industry, as industrial detergents, for the resolution of racemic mixtures, in food processing, cosmetic, and medical applications, in the pulp and paper industry, and for oil degradation and biodiesel production [16]. For this reason, in the present study, the use of an aqueous two-phase system formed from polyethylene glycol

(PEG) and potassium phosphate for the purification of lipase produced by *Bacillus* sp. ITP-001 was investigated, and in particular the influence of the molecular weight of the PEG, the concentration of PEG and phosphate, NaCl addition, pH and temperature on the purification process.

2 Experimental

2.1 Microorganism

Bacillus sp. ITP-001 was isolated from petroleum-contaminated soil by the Institute of Research and Technology (Aracaju-Sergipe, Brazil). The bacterial strain was maintained on nutrient agar slants at 4 °C.

2.2 Substrates and chemicals

Coconut oil was used as an inducer (lipase production) and carbon source, and was purchased at a local market. Polyethylene glycol (PEG) with a nominal molecular weight of 1,500; 4,000 and 8,000 g/mol and the other reagents were standard analytical grade and were purchased from Sigma Chemical Co. (USA).

2.3 Fermentation conditions

The bacteria were cultivated in 500 ml Erlenmeyer flasks containing 200 ml medium of the following composition (% w/v): KH_2PO_4 (0.1), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.05), NaNO_3 (0.3), yeast extract (0.6), peptone (0.13), and starch (2.0) as the carbon source. The fermentation conditions were: initial pH value 7.0 at 37 °C; and stirred speed (170 rpm). After 72 h cultivation, coconut oil (4%, w/v) was added.

2.4 Purification

The fermented broth was centrifuged at 10,000 *g* for 30 min, to separate the biomass. Protein contaminants in the cell-free fermented broth were precipitated using ammonium sulphate at 80% saturation (w/v) and the broth was subsequently centrifuged at 10,000 *g* for 30 min, separating the aqueous solution and precipitate. The aqueous phase was dialyzed using MD 25 (cut-off: 10,000–12,000 Da) against ultra-pure water. The dialyzed solution containing the enzyme was then used to prepare the ATPS [17].

2.5 Aqueous two-phase systems

The phase diagram was obtained from the available literature [18]. The systems comprised different compositions of PEG, potassium phosphate and sodium chloride dissolved in dialyzed solution containing the enzyme. The mixing point (initial concentration of PEG and potassium phosphate required to form the aqueous two-phase system) was chosen to give a volume ratio of approximately 1.0 (phases with the same volumes). The potassium phosphate buffer was a mixture of potassium phosphate monobasic and dibasic at a ratio of 1.087 (w/w) and pH 6.0. All systems were prepared in graduated tubes. After 2 min of gently stirring, the systems were centrifuged at 3,000 rpm for 20 min. The tubes were brought to equilibrium in a thermostatic bath at 4 °C and local atmospheric pressure (1 atm) overnight (for at least 12 h). After this treatment, the two phases became clear and transparent and the interface was well defined. The phases were carefully withdrawn using a pipette for the top phase and a syringe with a long needle for the bottom phase. The volumes were determined in graduated test tubes.

The partition coefficient was defined as the protein concentration (K_p) or enzyme activity (K_e) in the top phase, divided by the corresponding value in the bottom phase. In order to evaluate the purification process, the enzyme specific activity (SA, U/mg protein), the volume ratio

(R_v), the enzyme recovered in the top phase (R_T - %) and bottom phase (R_B - %), and the purification factor (PF) were calculated according to Lima et al. [5].

2.6 Enzyme assay

Lipolytic activity was assayed using the oil emulsion method according to a modification used by Soares et al. [19]. One unit (U) of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that liberated 1 μmol of free fatty acid per min ($\mu\text{mol}/\text{min}$) under the assay conditions (37 °C, pH 7.0).

2.7 Thermodynamic functions

The Gibbs free energy change (ΔG), enthalpy change (ΔH) and entropy change (ΔS) associated with the lipase partition coefficient were determined by van Hoff equations at different temperatures (4 to 34 °C), according to Eq. 1–2:

$$\ln K_e = -\frac{\Delta H}{R} \times \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{Eq. 2})$$

where T is temperature (Kelvin) and R is the ideal gas constant.

2.8 Assays

The pH value was determined using a digital pH meter. For analysis of the culture broth, the culture supernatant was obtained by centrifugation and membrane filtration. The total protein concentration was determined by Bradford's method [20] using bovine serum albumin (BSA) as the standard. All measurements were made in triplicate (the standard deviations were < 0.2).

3 Results and Discussion

3.1 Lipase production and pre-purification

The production of extracellular lipase by *Bacillus* sp. ITP-001 at pH 7.0, 170 rpm and 37 °C was carried out using starch (2%, w/v) and coconut oil (4%, v/v), which was added as a second carbon source and inductor at 72 h. After the addition of oil, enzyme activity increased (Figure 1). Using the same microorganism, Carvalho et al. [21] noted that the concentration of starch reached a minimum after 144 h, at which point the microorganisms began to use the oil as a carbon source and inducer of lipase production. The highest enzymatic activity was observed at 144 h (6,351.91 U/ml), in this case the concentration of protein (1.20 mg/ml) was relatively low, and therefore a high specific activity was verified (Table 1). Lee et al. [22] reported that the extracellular lipase activity of *B. thermoleovorans* ID-1 decreased with prolonged cultivation due to thermal inactivation and proteolysis, but this observation was not verified in the present study. The results thus suggest that *Bacillus* sp. ITP-001 may be used as a producer of a stable enzyme during the fermentation process.

The fermented broth was centrifuged and the microorganisms were harvested, and ammonium sulphate was then added to the cell-free fermented broth to precipitate the enzyme. However, it was noted that the lipase remained in the fermented broth, while the protein contaminants precipitated. The purification factor found to the precipitated was 7.97 fold, this result was due to the concentration of enzyme in the process, but the majority of enzyme remained in the fermented broth (PF=155.98 fold). After this, the aqueous phase was dialyzed against ultra-pure water using a dialysis bag to remove the salts produced by the fermentation and ammonium sulphate (PF=32.17 fold). The decrease in enzyme activity was probably due to the loss of enzyme during the dialysis and the increased water content in the dialysis bag, thus causing a reduction in the purification factor after this process. Kanwar et al. [23] used

ammonium sulphate to retrieve the fermented broth lipase from *Pseudomonas* sp. and found that the enzyme was precipitated using this salt with a purification factor of about 1.41 fold.

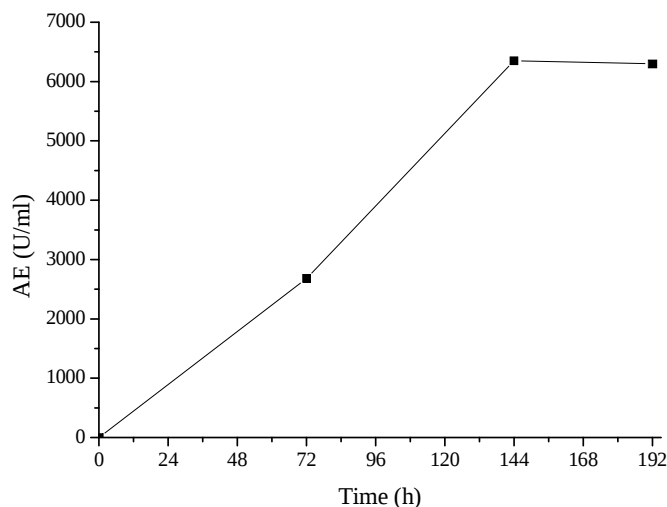


Figure 1: Production of lipase by *Bacillus* sp. ITP-001 at pH 7.0 and 37 °C.

Table 1: Pre-purification of lipase produced by *Bacillus* sp ITP-001 in the fermented broth using different steps

Process	AE (U/ml)	C _p (mg/ml)	AS (U/mg)	FP (fold)
Crude lipase	6,351.91	1.20	5,296.82	1.00
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation				
Precipitated	67,899.93	1.61	42,239.53	7.97
Aqueous solution	101,412.85	0.12	826,180.72	155.98
Dialyzed	9,456.32	0.06	179,401.67	32.17

3.2 Influence of PEG molecular weight

The effect of PEG molecular weight (1,500, 4,000 and 8,000 g/mol) on the partitioning of lipase (K_e) and the total protein (K_p) was studied (Table 2). We used 20% PEG and 18% potassium phosphate, as these were previously found to be the optimum concentrations [6], at 4 °C and pH 6.0. The enzyme was partitioned strongly to the salt-rich phase ($K_e \ll 1.0$),

while the proteins partitioned to the top phase ($K_p > 1.0$). The partitioning coefficient of the enzyme (K_e) decreased with an increase in PEG molecular weight, due to the reduction in space for lipase in the top phase; as a result the enzyme tended to partition to the bottom phase, in a process known as the volume exclusion effect. Bassani et al. [11] observed the same profile following the volume exclusion effect when partitioning lipase produced by *Candida rugosa* using PEG 10,000 g/mol and 40% (w/w) of potassium phosphate at pH 7.0 and 8 °C.

The volume ratio was approximately 1.0, which demonstrated that the phases were formed similarly. The enzyme recovery and the purification factor for the bottom phase showed similar trends, increasing with the molecular weight of PEG. The highest PF was found with PEG 8,000 g/mol (123.89 fold), and for this reason this molecular weight was chosen for subsequent experiments (Table 2).

Table 2: Effect of PEG molecular weight on the partitioning of lipase produced by *Bacillus* sp. ITP-001 using 20% (w/v) PEG and 18% (w/v) potassium phosphate at pH 6.0 and 4 °C.

PEG (g/mol)	MW	R_v	K_e	K_p	R_B (%)	PF_B (fold)
1,500		0.97±0.06	0.17±0.02	1.15±0.09	85.76±2.29	65.08±1.11
4,000		0.92±0.00	0.12±0.00	1.26±0.10	90.15±0.30	107.76±8.12
8,000		0.92±0.02	0.06±0.00	1.26±0.04	94.45±0.26	123.89±4.71

3.3 Influence of PEG concentration

To observe the effect of differing PEG concentrations, a series of solutions containing 18% (w/v) potassium phosphate and 14–25% (w/v) of PEG were assessed at 4 °C and pH 6.0. Figure 2 shows the effect of varying concentrations of PEG on the partitioning of lipase. Previous reports have demonstrated that lipase partitioning in ATPS is driven by two factors: first, the excluded volume effect, in which the PEG concentration induces a reduction in K_e ,

as shown in the present work. With PEG 8,000 g/mol 20% (w/v) an increase in K_e occurs, and according to Bassani et al. [12] this observation may be attributed to the fact that when the concentration of this polymer increases, the PEG forms a compact and hydrophobic structure with a great capacity to interact with the active site of lipase and a high affinity for hydrophobic ligands. The highest purification factor (123.89 fold) was found in the bottom phase using 20% (w/v) PEG 8,000 g/mol and 18% (w/v) potassium phosphate.

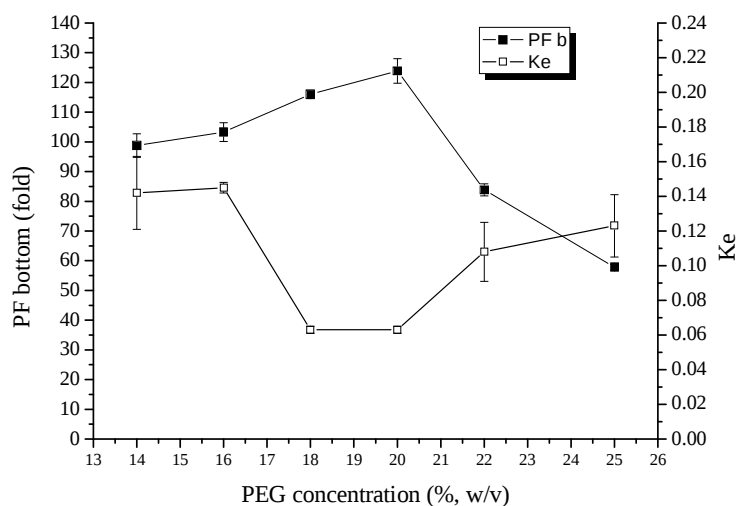


Figure 2: Effect of different concentrations of PEG 8,000 g/mol plus 18% phosphate at pH 6.0 and 4 °C on lipase partitioning.

3.4 Influence of phosphate concentration

The effect of potassium phosphate at concentrations ranging between 12–30% (w/v) was investigated. The concentration of PEG 8,000 g/mol was fixed at 20% (w/w) and the system was operated at 4 °C and pH 6.0. Figure 3 shows the lipase partition coefficient and purification factor in the bottom phase. The enzyme was partitioned to the bottom phase ($K_e \ll 1.0$), and the value of K_e decreased from 0.14 to 0.06. According to Babu et al. [24], the solubility of biomolecules in the salt-rich (bottom) phase decreases with an increase in salt

concentration, which results in increased partitioning of biomolecules to the top phase, in a process known as the salting out effect. However, the effect of volume exclusion at high PEG molecular weights was stronger than the salting out effect, and thus the enzyme remained partitioned more strongly to the bottom phase. Antov et al. [25] also noted that an increase in salt $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ concentration in the ATPS decreased the partition coefficient of xylanase, as found in the present work. Moreover, the trend for PF in the bottom phase was the opposite of that for K_e , the highest value of PF (123.89 fold) being found at 18% (v/v), with good enzyme recovery (94.45%) (data not shown). Yang et al. [14] reported that 12.5% of PEG-4000 g/mol and 25% of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gave the best purification factor for xylanase (4.02 fold). Hence, 18% (w/v) potassium phosphate buffer was used in further experiments.

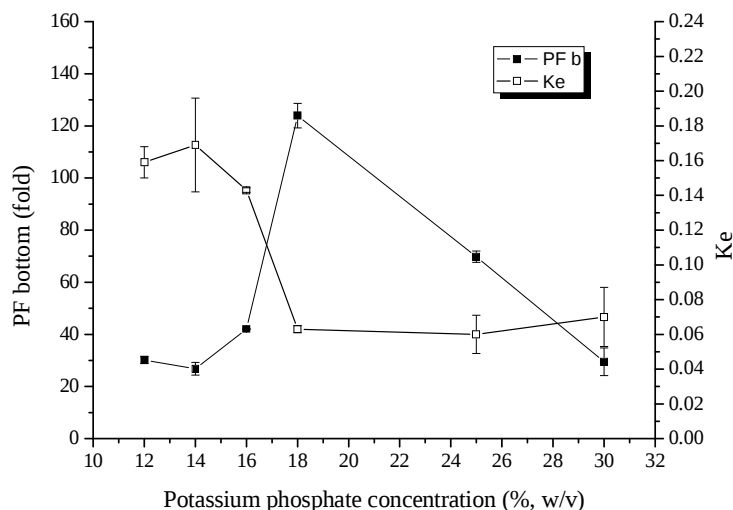


Figure 3: Effect of concentration of potassium phosphate buffer solution containing 20% of PEG 8,000 g/mol on lipase partitioning, at pH 6.0 and 4 °C.

3.5 Influence of NaCl addition

In order to study the influence of NaCl addition (2, 4, 6 and 8%, w/v) on lipase partitioning in the selected phase system (20% PEG 8,000 g/mol and 18% potassium phosphate),

experiments were performed at pH 6.0 and 4 °C, and the results are presented in Figure 4. Bradoo et al. [26] observed that following the addition of between 1 and 4% (w/v) NaCl, the partition coefficient remained almost constant, but that at 5% NaCl it decreased dramatically. In the present work, K_e was almost constant with NaCl addition, although the purification factor increased significantly from 59.93 to 141.65 fold for 6% (w/v) of NaCl. On the other hand, the further addition of NaCl decreased the K_e for lipase, as reported by Gulati et al. [27] when using NaCl and *Aspergillus terreus* to purify lipase.

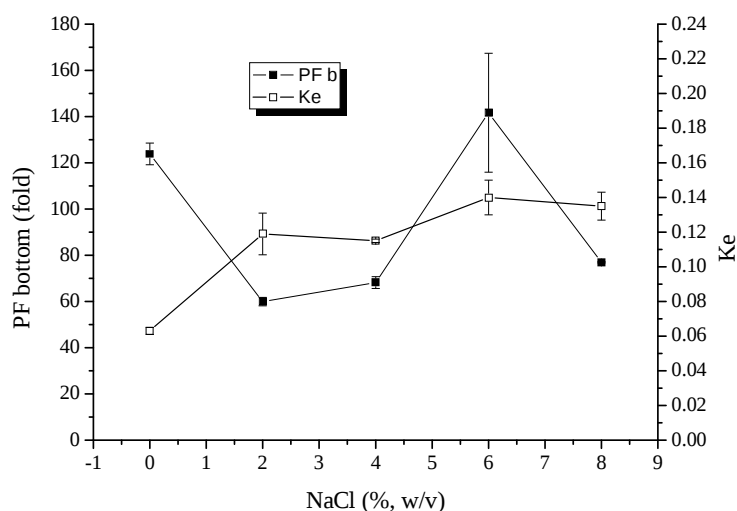


Figure 4: Effect of NaCl addition on lipase partitioning in a system containing 20% (w/v) PEG 8,000 g/mol and 18% (w/v) potassium phosphate at pH 6.0 and 4 °C.

3.6 Influence of pH

Based on the results, a system composed of 20% (w/v) PEG 8,000 g/mol, 18% (w/v) potassium phosphate and 6% (w/v) NaCl at 4 °C was selected for the study of lipase by *Bacillus* sp. ITP-001 using different initial pH values (5, 6, 7, 8 and 9), as shown in Figure 5. The enzyme partitioned to the bottom phase ($K_e \ll 1.0$). For charged proteins, Albertsson [18] developed the classical model for electrochemical partitioning in ATPSs

$(\ln K_e = \ln K_o + (z_p F / RT) / \Delta \phi)$, where K_e is the partition coefficient of lipase, $(z_p F / RT) \Delta \phi$ denotes the electrostatic term as a product of enzyme surface charge z_p and $\Delta \phi$, the electrostatic potential difference between the two phases, and K_o includes all the other factors affecting protein partitioning. With an increase in pH, the negative charges of the studied lipase increased, and its partition coefficient was enhanced, reaching a maximum at pH 9.0 (0.34).

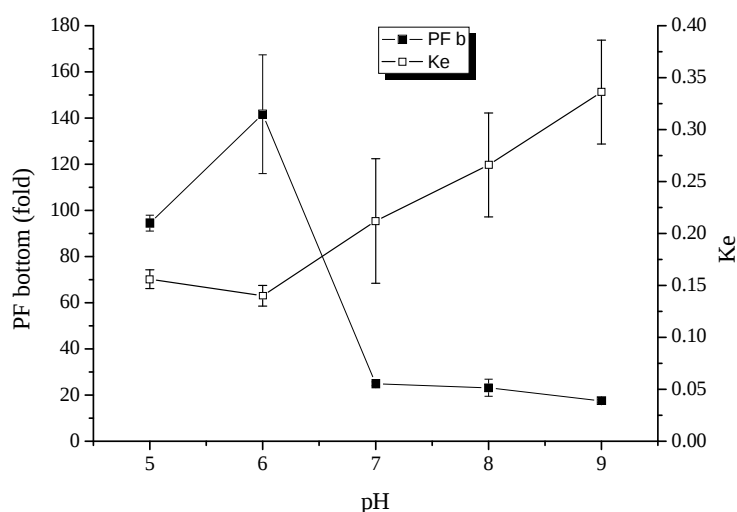


Figure 5: Effect of pH on lipase partitioning in a system containing 20% (w/v) PEG 8,000 g/mol, 18% (w/v) potassium phosphate and 6% (w/v) NaCl at 4 °C.

The enzyme partition coefficient was influenced by pH values in the ATPS. As a general rule, positively charged proteins partition to the bottom phase, while negatively charged proteins are directed to the top phase [28]. Partitioning of the total proteins and the enzyme to these phases is dependent on their isoelectric points (pI). The lipase from *Bacillus* sp. ITP-001 is an acidic enzyme, with a pI that is close to 3.0. As the pH of the system increased above the isoelectric point, the lipase surface charge became negative. As a result, partitioning of the enzyme into the salt-rich bottom phase decreased. The same results were obtained by Xu et al. [29], for the partitioning of glucose-6-phosphate dehydrogenase and hexokinase in PEG/PES

systems. During this pH change, the enzyme recovery from the bottom phase decreased from 91.59 to 85.69 (data not shown); moreover there was also a decrease in PF in the bottom phase, with the highest value (141.65 fold) found at pH 6.0. The reduction in these parameters may be due to the low stability of lipase at higher pH.

3.7 Influence of temperature

In the conditions determined previously, lipase partitioning was carried out over a temperature range of 4–34 °C in order to improve the PF of the enzyme (Figure 6). In the present work the K_e and PF in the bottom phase decreased from 0.13 to 0.10 and from 201.53 to 157.57 fold, when the temperature was increased from 4 to 34 °C, respectively. Some conditions influence the effect of temperature on the partitioning of proteins and enzymes, such as phase composition, electrostatic and hydrophobic interactions, and therefore understanding this effect is quite complex. In addition the enzymes can change their conformational structure and consequently denature.

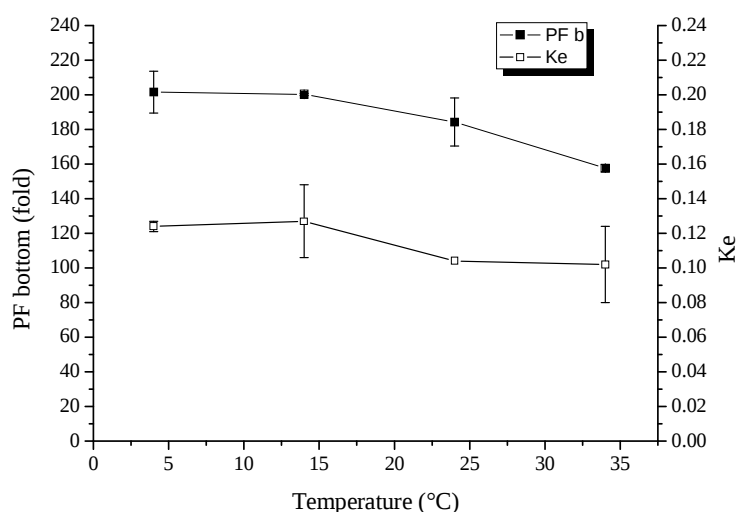


Figure 6: Effect of temperature on lipase partitioning in a system containing 20% (w/v) PEG 8,000 g/mol, 18% (w/v) potassium phosphate and 6% (w/v) NaCl at pH 6.0.

Some authors have reported an increase in the K_e with temperature; Sarubbo et al. [30] observed an increase in K (trypsin) when using an aqueous two-phase system comprising 13% PEG 1,500 and 21% cashew-nut tree gum as temperature increased from 25 to 40 °C. Other reports have demonstrated that the K_e decreases or does not have any temperature dependence; Souza et al. [6] noted a decrease in K_e for porcine pancreatic lipase using 20% PEG 8,000 g/mol and 18% potassium phosphate.

Johansson et al. [31] applied the Flory-Huggins theory to aqueous two-phase systems, which describes the driving force required to make up the ΔG , which in turn governs the partitioning of a solute in an ATPS using two analytical equations, one related to the enthalpy contribution (ΔH) and the other to the entropy contribution (ΔS). The thermodynamic parameters were determined using the partitioning coefficient of the enzyme and total protein at different temperatures. A linear equation was fitted for the experimental data and the van't Hoff equation was applied to determine the ΔH and ΔS ; the regression coefficient was 0.9472 and 0.9678 for the enzyme and total protein partitioning, respectively. Table 3 presents the values of the thermodynamic parameters for lipase partitioning.

Table 3: Thermodynamic parameters of lipase by *Bacillus* sp. ITP-001 and total protein partitioning using 20% (w/v) PEG 8,000 g/mol, 18% (w/v) potassium phosphate and 6% (w/v) NaCl at pH 6.0.

Component	ΔH (KJ/mol)	ΔG (KJ/mol)	ΔS (J/mol.K)
Enzyme	-8.33	5.22	-46.54
Total protein	7.78	-0.44	28.88

The partition coefficient is defined as the equilibrium between the enzymatic activity or total protein concentration in the salt-rich phase (bottom phase) and the PEG-rich phase (top

phase). The ΔG for enzyme partitioning is positive ($\Delta G > 0$), and therefore the process is not spontaneous, favouring partitioning of the lipase to the bottom phase ($K_e < 1$). The system releases energy (exothermic process), meaning that partitioning is governed by intermolecular interactions. However, the entropy contribution dominates and overshadows the enthalpy contribution. For total protein the system has a slightly negative ΔG (-0.44 KJ/mol), indicating that the process is almost in equilibrium, with K_p values ranging from 1.10 to 1.56, when the temperature increases from 4 to 34 °C, respectively. Nevertheless, the total protein partitions to the top phase and promotes the purification of lipase. Sousa et al. [32] also observed the contributions of entropy and enthalpy in the partitioning of conalbumin and lysozyme. Pereira et al. [33] observed that the absolute results of $T \times \Delta S$ are inferior to ΔH , suggesting that the enthalpic changes are the main driving forces ruling the amino acid (tryptophan) partitioning.

4 Conclusion

The lipase produced by *Bacillus* sp. ITP-001 was purified by partitioning in a PEG/potassium phosphate ATPS. The enzyme partitioned to the bottom phase and the best purification factor ($PF_B = 201.53$ fold) was achieved in an ATPS comprising 20% (w/v) PEG 8,000 g/mol, 18% (w/v) potassium phosphate buffer and 6% (w/v) NaCl at pH 6.0 and 4 °C. Therefore, an ATPS could be used to selectively purify lipase from the crude culture filtrates. The enzyme partitioning process is governed by entropy while the protein partitioning is governed by enthalpy.

Acknowledgments

The authors thank the FAPITEC, CAPES and CNPq for financially supporting this project and PROBIC-UNIT for the scholarship for R. S. Lucena.

References

- [1] P.F.F. Amaral, A.P.R Almeida, T. Peixoto, M.H.M Rocha-Leão, J.A.P. Coutinho, M.A.Z. Coelho, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23 (2007) 339–344.
- [2] R. Kaushik, S. Saran, J. Isar, R.K. Saxena, *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic* 40 (2006) 121–126.
- [3] S. Kumar, K. Kikon, A. Upadhyay, S.S. Kanwar, R. Gupta, *Prot. Expres. Purif.* 41 (2005) 38–44.
- [4] T.L.F. Pinheiro, S. Menoncin, N.M. Domingues, D. Oliveira, H. Treichel, M. Luccio, D.M.G. Freire, *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 28(2) (2008) 444–450.
- [5] A.S. Lima, R.M. Alegre, A.J.A. Meirelles, *Carboh. Polym.* 50 (2002) 63–68.
- [6] R.L. Souza, J.M.P. Barbosa, G.M. Zanin, M.W.N. Lobão, C.M.F. Soares, A.S. Lima, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 161 (2010) 1–8.
- [7] C.M.S.S. Neves, S.P.M. Ventura, M.G. Freire, I.M. Marrucho, J.A.P. Coutinho, *J. Phy. Chem. B* 113 (2009) 5194–5199.
- [8] P. Trodler, J. Nieveler, M. Rusnak, R.D. Schmid, J. Pleiss, *J. Chrom. A* 1179 (2008) 161–167.
- [9] L.D. Castro-Ochoa, C. Rodriguez-Gomez, G. Valerio-Alfaro, R.O. Ros, *Enz. Microb. Technol.* 37 (2005) 648–654.
- [10] A. Karakatsanis, M. Liakopoulou-Kyriakides, *J. Food Engin.* 80 (2007) 1213–1217.
- [11] G. Bassani, B. Farruggia, B. Nerli, D. Romanini, G. Picó, *J. Chrom. B* 859 (2007) 222–228.
- [12] G. Bassani, P. Fuciños, G. Picó, B. Farruggia, *Coll. Surf. B: Biointerf.* 75 (2010) 532–537.
- [13] Y. Jiang, H. Xia, J. Yu, C. Guo, H. Liu, *J. Chem. Engin.* 147 (2009) 22–26.

- [14] S. Yang, Z. Huang, Z. Jiang, L. Li, *Process Biochem.* 43 (2008) 56–61.
- [15] S. Li, C. He, F. Gao, D. Li, Z. Chen, H. Liu, K. Li, F. Liu, *Talanta* 71 (2007) 784–789.
- [16] F. Hasan, A.A. Shah, A. Hameed, *Enz. Microb. Technol.* 39 (2006) 235–251.
- [17] I.C. Feitosa, J.M.P. Barbosa, S.C. Orellana, A.S. Lima, C.M.F. Soares, *Acta Scienti. Technol.* 32 (2010) 27–31.
- [18] P.A. Albertsson, *Partition of Cell Particles and Macromolecules*, second ed., Wiley Interscience, New York, 1986.
- [19] C.M.F. Soares, H.F. Castro, F.F. Moraes, G.M. Zanin, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 77–79 (1999) 745–758.
- [20] M.M. Bradford, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [21] N.B. Carvalho, R.L. Souza, H.F. Castro, O.A. Santos, G.M. Zanin, A.S. Lima, C.M.F. Soares, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 150 (2008) 25–32.
- [22] D.W. Lee, H.W. Kim, K.W. Lee, B.C. Kim, E.A. Choe, H.S. Lee, D.S. Kim, Y.R. Pyun, *Enz. Microb. Technol.* 29 (2001) 363–371.
- [23] L. Kanwar, B.K. Gogo, P. Goswami, *Biores. Technol.* 84 (2002) 207–211.
- [24] B.R. Babu, N.K. Rastogi, K.S.M.S. Raghavarao, *Chem. Engin. Proc.* 47 (2008) 83–89.
- [25] M.G. Antov, D.M. Pericin, M.G. Dasic, *Proc. Biochem.* 41 (2006) 232–235.
- [26] S. Bradoo, R.K. Saxena, R. Gupta, *Proc. Biochem.* 35 (1999) 57–62.
- [27] R. Gulati, R.K. Saxena, R. Gupta, *Proc. Biochem.* 36 (2000) 149–155.
- [28] R.P. Bezerra, F.K.S.L. Borba, K.A. Moreira, J.L. Lima-Filho, A.L.F. Porto, A.C. Chaves, *Braz. Arch. Biol. Technol.* 49(4) (2006) 547–555.
- [29] Y. Xu, M. Vitolo, C.N. Albuquerque, A. Pessoa-Junior, *J. Chrom. B* 780 (2002) 53–60.
- [30] L.A. Sarubbo, L.A. Oliveira, A.L.F. Porto, G.M. Campos-Takaki, E.B. Tambourgi, *Braz. Arch. Biol. Technol.* 47(5) (2004) 685–691.

- [31] O.H. Johanssona, G. Karlströmc, F. Tjerneldb, C.A. Haynesa, J. Chrom. B 711 (1998) 3–17.
- [32] R.C.S. Sousa, J.S.R. Coimbra, L.H.M. Silva, M.C.H. Silva, E.E.G. Rojas, A.A.A. Vicente, J. Chrom. B 877 (2009) 2579–2584.
- [33] J.F.B. Pereira, A.S. Lima, M.G. Freire, J.A.P. Coutinho, Green Chem.12 (2010) 1661–1669 .

Capítulo V

Biochemical characterisation of lipase from new strain *Bacillus* sp. ITP-001

José Murillo P. Barbosa¹, Ranyere L. Souza¹, Alini T. Fricks^{1,2}, Cleide Mara F. Soares^{1,2},

Álvaro S. Lima^{1,2,*}

¹ UNIT, Universidade Tiradentes, Av. Murilo Dantas, 300 – Farolândia – 49032-490,

Aracaju-SE, Brazil.

² ITP, Instituto de tecnologia e Pesquisa, Av. Murilo Dantas, 300 – Bloco ITP, Farolândia –

49032-490, Aracaju-SE, Brazil.

* To whom correspondence should be addressed: e-mail: alvaro_lima@unit.br. Phone: +55 32182115. Fax: +55 32182190.

Abstract

Lipases are characterised mainly by catalytic versatility and applications in different industrial segments. The aim of this study was to biochemically characterise a new strain of *Bacillus* sp. ITP-001. The isoelectric point was 3.12 and the best lipase activity was 276 U.g⁻¹ at pH 7.0 and temperature 80°C, showing more stability at pH 5 and temperature 37°C. The enzyme activity was stimulated by Ca²⁺, Mg²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ and Fe³⁺ ions, and inhibited by Cu⁺. The enzymatic activity was stimulated by pyridine and strongly inhibited by ethanol. The values of K_m and v_{max} were, respectively, 0.0675 mol and 0.0110 mol.min⁻¹.g⁻¹ determined by the method of Wolf-Augustinsson-Hofstee. The lipase shows more affinity for alcohol and organic acids with small carbon chains in the esterification reaction.

Key words: Lipase, biochemical characterisation, *Bacillus*

1. Introduction

Lipases (triacylglycerol acylhydrolase, EC 3.1.1.3) are enzymes that not only possess the natural function of hydrolysing triacylglycerol to glycerol and free fatty acids, but also catalyse the synthesis of esters and transesterification in microaqueous conditions (Wang et al., 2009; Demir and Tükel, 2010). Lipases are important biocatalysts because they act under mild conditions; they are highly stable in organic solvents, show broad substrate specificity, and usually present high region and/or stereoselectivity in catalysis (Hasan et al., 2006; Dandanvat et al., 2009). Consequently, lipases have gained importance, and have been applied widely in various fields such as foods, pharmaceuticals, detergents, biosensors, biodiesel, cosmetics and fine chemical agrochemicals (Supakdamrongkul et al., 2010).

In view of the variety in applications, there has been a renewed interest in the development of sources of lipases. They are widely distributed in nature in different organisms such as fungi (Supakdamrongkul et al., 2010), bacteria (Horchani et al., 2009), plants and animals (Gupta et al., 2004), and have been studied extensively based on their properties. Bacterial lipases have received much attention for their substrate specificity and their ability to function in extreme environments (Demir and Tükel, 2010; Horchani et al., 2009). A large number of lipase-producing bacteria have been characterised, including those from *Serratia marcescens* (Abdou, 2003), *Staphylococcus aureus* (Horchani et al., 2009) and *Bacillus stearothermophilus* MC 7 (Kambourova et al., 2003). Taxonomically close strains may produce lipases of different types, and due to their interesting biological properties, bacteria of the genus *Bacillus* are attractive candidates for a number of industrial applications. Several species of this group are non-pathogenic, simple to cultivate and secrete enzymes with distinctive structure-function properties of high thermostability and optimal activity (Rabani et al., 2009).

Bacterial lipase is obtained using fermentation processes, which comprise of three main techniques: submerged fermentation, solid-state fermentation, and immobilised-cell fermentation (Carvalho et al., 2008; Feitosa et al., 2010). However, the fermentation process generates, besides the desired components, by-products that frequently hinder the use of fermented broth in industrial procedures (Lima et al., 2002). After obtaining the crude broth lipase, employing purification strategies is necessary, such as reverse micellar systems, membrane processes, chromatography and aqueous two-phase systems (ATPS) with or without ionic liquids (Souza et al., 2010; Lima et al., 2002; Pereira et al., 2010). ATPS has been shown to be a powerful technique and offers many advantages as it is environmentally biocompatible, requires low interfacial tension, low energy, scales-up easily, and can operate continuously (Chaiwut et al., 2010). The purification processes can change the structural and

functional properties of the enzymes, meaning that enzymatic characterisation an important step to determine the process conditions and potential of applications.

Generally, lipases have alkaline or neutral optimum pH and demonstrate stability over a wide range from pH 4 to 11. The thermal stability of lipases ranges from 30°C to 60°C, and a larger number are stable in organic solvents (Gupta et al., 2004). Considering that lipases from different sources have variation in properties especially related to positional specificity, fatty acid specificity, resolution, thermostability, optimum pH and kinetics in non-aqueous system, the goal of the present study was biochemically characterise the lipase produced from a new strain of *Bacillus* sp. ITP-001.

2. Material and methods

2.1 Microorganism and culture conditions

Bacillus sp. ITP-001, isolated from petroleum-contaminated soil, was used in the present work. The bacterium strain was maintained in YPD medium at 4°C. For enzyme production, *Bacillus* sp. ITP-001 was cultivated in a medium consisting of (% w/v): 0.5% KH_2PO_4 (0.1), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.05), NaNO_3 (0.3), yeast extract (0.6), peptone (0.13), starch (2.0), 1% Triton-X 100 and 4% coconut oil added after 72 h of reaction and sterilised in the autoclave at 121°C for 22 min. The fermentation conditions were initial pH 7.0; incubation temperature 37°C and stir speed 170 rpm. At the end of fermentation, the cells were harvested by centrifugation and the supernatant was used for enzyme purification.

2.2 Purification of lipase

The purification procedure for lipase from *Bacillus* ITP-001 involves a number of steps. First, the cell free supernatant was precipitated using ammonium sulphate at 80% saturation and centrifuged at 10,000 rpm for 30 min. After this, the aqueous phase was dialysed using membrane dialyse 25 (cut-off 10,000–12,000 Da) against ultra-pure water for 24 h at 4°C. Aqueous two-phase systems were prepared in graduated tubes containing 20% polyethylene glycol (PEG) 8,000; 18% phosphate buffer, formed by a mixture of monobasic and bibasic potassium phosphate in a ratio of 1.087 (w/w), 6% (w/w) NaCl and completed with the solution of dialyzed enzyme. After homogenisation, the pH value was readjusted to 6.0 and the systems were centrifuged at 3,000 rpm for 20 min and kept at 4°C overnight. After this treatment, the bottom phase was collected carefully using a pipette, dialysed again, lyophilised (on FreeZone Labconco equipment) and kept at 4°C (Souza et al., 2009).

2.3 Lipolytic activity assay

Enzyme activity was assayed using the oil emulsion method according to Soares et al. (1999). The substrate was prepared by mixing 50 ml of olive oil with 50 ml of Arabic gum solution (7% w/v). The assay mixture consisting of 5 ml of the substrate, 2 ml of 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) and 1 ml of lyophilised enzyme solution (0.1 g/ml) was incubated for 5 min at 37°C with stirring at 80 rpm. The reaction was terminated by the addition of approximately 0.3 g in 3 ml of acetone:ethanol:water (1:1:1), and the amount of liberated fatty acids during incubation was titred with 0.04 N KOH in the presence of

phenolphthalein as an indicator. One unit of enzyme activity was defined as the number of μ moles of free fatty acids released per ml per min under the assay conditions.

2.4 Determination of protein

The protein concentration was assayed by the method of Bradford et al. (1976) using BSA as the standard.

2.5 Isoelectric point

The zeta potential of purified lipase was determined in a KCl solution (10 mM) with pH values adjusted (2 – 6) with 0.1 M HCl and 0.1M KOH. The electrode chamber was filled with the enzyme solution and the charge of each enzyme solution was monitored to determine the zero charge. The experiments were performed at 25°C and the isoelectric point corresponded to the pH at which the charge was zero.

2.6 pH and temperature optimum and stability

The effect of pH on the activity of the purified lipase was determined by incubating the purified enzyme between pH 2.0-10.5. The buffers used were 0.1 M citric acid-sodium citrate (pH 2.0-5.0), 0.1 M potassium phosphate (pH 6.0-8.0) and 0.1 M bicarbonate-carbonate (pH 8.0-10.5). The pH stability was evaluated over the 5 h incubation period (sampling each 1 h) of the purified enzyme in the appropriate buffers at different pH values (5.0–10.5) at 37°C. The optimal temperature for activity of the enzyme was determined at 25-120°C in the same 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0). Thermostability of the

purified enzyme was investigated over 5 h (sampling each 1h) by pre-incubating the enzyme at different temperatures (37, 50, 65 and 80°C) in buffer of pH 5.0. The remaining activities of lipase were measured immediately after this treatment with the standard method as mentioned above.

2.7 Effect of different metal ions and organic solvents on lipase

To examine effects of different metal ions on lipase activity, the purified lipase was pre-incubated at 37°C in a buffer of pH 5.0 for 1 h with various metal ions at a final concentration of 0.1, 1.0 or 10 mM. The ions tested included CoCl₂, CuCl₂, EDTA, FeCl₃, MgCl₂, MnCl₂ and ZnCl₂. To study the influence of CaCl₂, the purified lipase was pre-incubated for 30 h at a concentration of 0.1, 1.0 and 2.0 mM. The effect of some organic solvents on enzyme activity was carried out by the addition of 10, 20 and 30% acetone, acetonitrile, ethanol, isopropanol, methanol and pyridine for 3 h at 37°C in the buffer (pH 5.0). The lipase activity in the presence of metal ions and organic solvents was compared with the control in the absence of metal ions and organic solvents, whose activity was taken as 100%.

2.8 Esterification potential

The syntheses of esters were carried by incubating 0.1 g lipase from *Bacillus* sp. ITP-001 for 24 h in a reaction system composed of acid (acetic, palmitic, oleic or lauric), alcohol (methanol, propanol, butyl, amyl or octal) and heptane with a fixed molar ratio (1:1.5) at a temperature of 37°C and 150 rpm.

2.9 Kinetic constants determination

K_m and V_{max} of the lipase were determined by the measurement of enzyme activity with various concentrations of olive oil substrate (1-70%, w/v) over 60 minutes. Kinetic constants were calculated using the linearisation methods of Lineweaver-Burk, Hanes-Wolf, Eadie-Scatchard and Wolf-Augustinsson-Hofstee, as well fitting a non-linear model. The degree of fit of the models to the experimental data was based on the magnitude of the mean relative error (P) and estimated (SE), calculated by Eqs. 1 and 2, respectively.

$$P = \frac{100}{n} \sum_{i=1}^n \frac{m_{exp} - m_{pre}}{m_{exp}} \quad (\text{Eq. 1})$$

where m_{exp} and m_{pre} are experimental and predicted units, respectively and n is the number of observations.

$$SE = \sqrt{\left[\left(\sum (Y - \hat{Y})^2 \right) / GLR \right]} \quad (\text{Eq. 2})$$

where Y and $\hat{Y}$ are experimentally observed values and values calculated for the model, respectively and GLR is the degrees of freedom model.

3. Results and discussion

3.1 Lipase production and purification

The purification of lipase from *Bacillus* sp. ITP-001 involved ammonium sulphate precipitation followed by an aqueous two-phase system (ATPS), as summarised in Table 1. After the addition of ammonium sulphate (80% saturation), it was verified that proteases were preferentially precipitated, while lipases were remained in the aqueous solution. Possibly, this observation was due to the molecular weight of lipase or its greater affinity for the aqueous phase. Several authors, including Bacha et al. (2005), have reported that enzymes precipitate after the addition of salt.

Table 1. Purification of lipase produced from *Bacillus* sp ITP-001 using several processes

Purification step	Lipolytic activity (U/ml)	Protein (mg/ml)	Specific activity (U/mg)	Purification Factor (fold)
Crude culture	6,352	1.20	5,297	1
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	118,095	0.11	1,121,064	212
ATPS (Bottom phase)	48,274	0.04	1,067,486	201

The purification in the aqueous two-phase systems (ATPS) partitioned lipase to the bottom phase with a purification factor of 201 fold and the highest specific activity (48,274 U/ml). Souza et al. (2010) used this same system to purify porcine pancreatic lipase commercial and verified a 3.89-fold purification factor with specificity activity 47.09 U/ml. The bottom phase was dialysed against ultra-pure water, lyophilised at a temperature of -50°C and pressure of 1.2×10^{-2} mbar for 48 h. The purified lipase showed activity of 175 U/g and *pI* of 3.12. According to Nthangeni et al. (2001), lipases from generous *Bacillus* normally show *pI* between 6.3 and 9.4.

3.2 Effect of pH and temperature on activity and stability

Maximum lipase activity was obtained at pH 7.0 and 80°C, while at strongly alkaline pH and temperatures above 90°C, the enzyme activity decreased (Fig. 1). Kim et al. (2002) studied the influence of pH range (6.0 at 10.0) on lipase activity from *Bacillus pumilus* B26, with results similar to the present work. Moreover, Gupta et al. (2004) reported that this pH range is optimal for lipases from other microorganisms such as *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas* sp., *P. cepacia* and *Staphylococcus aureus*. There are also some reports on the optimal pH (10.0) for lipases from generous *Bacillus* (Ghanem et al., 2000).

According to the effect of temperature on lipase activity, for most cases, the optimal activity has been found between 30°C and 65°C (Bacha et al., 2005; Gaur et al., 2008) and some at higher temperatures 75°C (Kambourova et al. 2003.). Thermal tolerant lipases are

very promising for industrial applications, since processes performed at high temperatures increase the reaction rate, for example in detergent formulations and other biotransformations (Hasan et al. 2006).

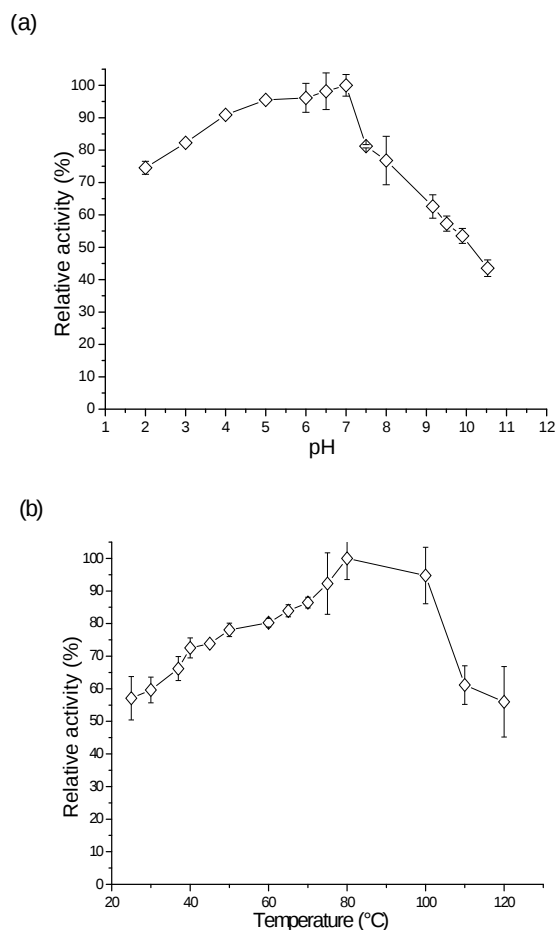


Fig. 1. Effect of different pH values at 37°C (a) and temperatures at pH 7.0 (b) on the activity of lipase from *Bacillus* sp. ITP-001.

The pH and temperature stability were measured after 5 h of pre-incubation of the purified lipase, with sampling at each 1 h, in appropriate buffers at different pH (5.0 to 8.0) and temperature (37°C to 80°C) values. The *Bacillus* sp. ITP-001 was most stable at pH 5.0 and at 37°C, as shown in Fig. 2. This relative activity profile was similar to results obtained by Pastore et al. (2003) using the lipase produced by a new strain of *Rhizopus* sp., in which

greater stability was found at 40°C, opposite to the results reported by Sharma et al. (2002) and Horchani et al. (2009), in which lipase was more stable at alkaline pH (9.5 and 9.0, respectively). Gupta et al. (2004) reported that lipase stability was preferably between neutral and alkaline pH, but some lipases from *Pseudomonas* sp. were able to maintain stability in extreme conditions.

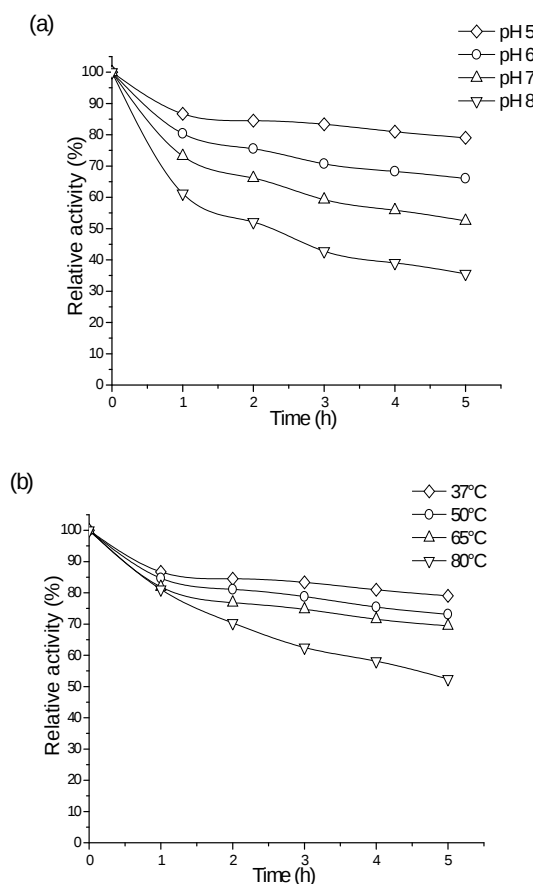


Fig. 2. Effect of pH at 37°C (a) and temperature at pH 7.0 (b) on the stability of lipase from *Bacillus* sp. ITP-001.

According to these results, a rapid loss of activity was not verified; therefore, the half-lives ($t_{1/2}$) of lipases from *Bacillus* sp. ITP-001 were incubated for 24 h at 80°C, 32 days at 65°C and 71 days at 50°C. Interestingly, the lipase retained 69% of its original activity at 37°C for up 100 days. The half-life of lipase from *Bacillus* sp. ITP-001 was longer than that

reported for other lipases, e.g. by Kambourova et al. ($t_{1/2}$ 3 h at 70°C) and by Demir et al. ($t_{1/2}$ 30 days at 25°C).

The Table 2 shows a comparison of optimal temperatures and pH values of several lipases from different microorganisms. Most lipases have the same features, mainly related to the optimum pH for activity and thermal stability.

Table 2. Optimal temperature and pH of some lipases from different microorganisms

Microorganism	Optimum temperature (°C)	Optimum pH	pH stability	Thermo stability (°C)	References
<i>P. aeruginosa</i> LX1	40	7.0	11.0	50	Ji et al. 2010
<i>P. gessardii</i>	30	6.0	5.0	30	Ramani et al. 2010
<i>Nomuraea rileyi</i> MJ	35	8.0	7.0	4	Supakdamrongkul et al. 2010
<i>Spirulina platensis</i>	45	6.5	-	25	Demir et al. 2010
<i>Bacillus coagulans</i> BTS-3	55	8.5	8.5	70	Kumar et al. 2005
<i>Bacillus</i> sp. ITP-001	80	7.0	5.0	37	This article

3.3 Effect of Ca^{2+} on activity and stability

The influence of Ca^{+2} ions on lipase activity was studied, as shown in Fig. 3. At low concentrations of calcium ions, there was a relative activity profile similar to the control (without Ca^{+2} ions). In these cases, the relative activity decreased. However, the relative activity of lipase was enhanced by approximately 10% (4 h) and 23% (12 h), when the concentration of Ca^{+2} ions increased to 1.0 and 2.0 mM of Ca^{+2} ions. After this time, the relative activity was negative influenced by the presence of Ca^{+2} ions. According with Gupta et al. (2004), calcium also stimulated the activity of lipases from different microorganisms (*B.*

subtilis 168, *B. thermoleovorans* ID-1, *P. aeruginosa* EF2, *S. aureus* 226, *Candida viscosum* and *Acinetobacter* sp. RAG-1). The increase in lipase activity due to calcium induction can be attributed to the vital role played by increased Ca^{2+} in building a stable catalytic enzyme structure as a result of calcium ions binding to the internal structure of the enzyme, thereby changing the solubility and the behaviour of the ionised fatty acids at interfaces (Ramani et al., 2010).

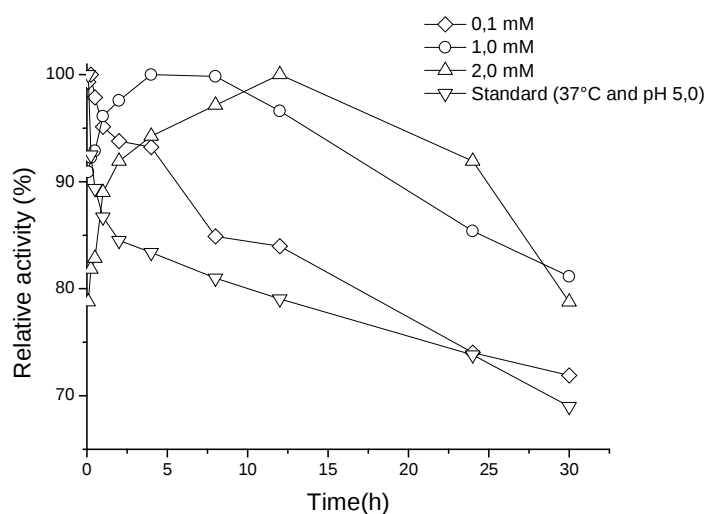


Fig. 3. Effect of different concentrations of Ca^{2+} on the lipase of *Bacillus* sp. ITP-001

The positive influence of calcium has been observed by many researchers, e.g. Ghanem et al. (2000), who verified an increase of 150% in lipase activity in the presence of 50 mM Ca^{2+} , and Yu et al. (2009), who reported a 4-fold increase in lipase activity using $2 \mu\text{mol.L}^{-1} \text{Ca}^{2+}$, but in both cases the enzyme's thermostability was not good. Conversely, Côté and Shareck (2008) did not obtain significant effects with 10 mM of Ca^{2+} with two lipases from *Streptomyces coelicolor* A3 (2). Therefore, the effect of calcium ions depends of the biologic agent.

3.4 Effect of metal ions and solvents on lipase

The effects of other ions and solvents on the purified lipase were evaluated as shown in Tables 3 and 4, respectively, where the values are averages of three assays and have coefficients of variation less than 5%. The lipase was stimulated by Co^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} and Zn^{2+} ions and inhibited by Cu^{2+} . Gaur et al. (2008) used lipase from *P. aeruginosa* that demonstrated decrease activity by 30% and 49% in the presence of 1 mM of Cu^{2+} and Zn^{2+} for 30 minutes, respectively. The chelating agent EDTA did not affect the lipase, indicating that the lipase from *Bacillus* sp. ITP-001 is not a metalloenzyme, like the lipase from *Yarrowia lipolytica*. Kumar et al. 2005 reported that lipase from *Bacillus coagulans* BTS-3 was inactive in the presence 1 mM of Co^{2+} , Mn^{2+} and Zn^{2+} , but was enhanced by K^+ , Fe^{3+} , Hg^{2+} and Mg^{2+} . Two mechanisms of ion action have been described. One is direct action at the catalytic site, as with many other enzymes. Another is specific action resulting in the formation of complexes between the metal ions and ionised fatty acids in a manner that changes their solubility and behaviour at interfaces (Supakdamrongkul et al., 2010).

The effect of solvents on lipase activity is shown in the Table 4, where the values were determined in triplicate with a coefficient of variation less than 5%. Except for pyridine, all solvents acted as inhibitors, mainly ethanol, isopropanol and acetone, which in high concentrations reduced the activity by approximately 30%, 20% and 12%, respectively. Interestingly, none of the solvents inactivated the lipase completely, possibly due to low penetration of the solvent in the enzyme structure, when compared with hydrated solvents. Results reported by Wang et al. (2009) using lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25416 in the presence of 30% (v/v) acetone, chloroform, n-hexane, cyclohexane and n-heptane in the reaction mixture for 2 h at 37°C showed activity increased by 1.7, 1.8, 1.7, 1.7 and 2.0-fold, respectively.

Table 3. Effects of compounds on the activity of the purified enzyme.

Compounds	Relative activity (%) at concentration (mM)		
	0.1	1	10
Co ²⁺	103.4	106.8	120.4
Cu ²⁺	101.8	93.7	82.4
EDTA *	99.8	100.0	104.9
Fe ³⁺	121.5	121.8	129.9
Mg ²⁺	131.3	152.1	187.4
Mn ²⁺	116.7	132.1	139.0
Zn ²⁺	131.3	142.4	153.9

* chelating agent

Table 4. Effects of different concentrations of solvents on lipase activity

Solvents	Relative activity (%) at concentration (% v/v)		
	10	20	30
Isopropanol	98.3	83.4	79.5
Ethanol	96.5	79.0	69.8
Methanol	98.3	97.1	96.9
Acetone	94.9	91.7	88.0
Acetonitrile	94.5	93.5	93.5
Piridine	98.3	103.6	110.5

One feature that should be valued in the lipase from *Bacillus* sp. ITP-001 is its incomplete inactivation in the presence of solvents and increased enzyme activity in the presence of metallic ions, which enhances the industrial employment of this enzyme. The Table 5 shows the effect of ions on the activity of lipases from different sources.

Table 5. Metallic ion and EDTA sensitivity of microbial lipases

Microorganism	Activator	Inhibitor	References
<i>Burkholderia cepacia</i>	Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Co ²⁺	EDTA	Wang et al. 2009
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Co ²⁺	Mn ²⁺	Silva et al. 2009
<i>Spirulina platensis</i>	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Zn ²⁺	Li ⁺ , Fe ²⁺ , Mn ²⁺ , EDTA	Demir et al. 2010
<i>Pseudomonas gessardii</i>	Ca ²⁺ , Mg ²⁺	K ⁺ , Zn ²⁺ , Mn ²⁺ , Fe ²⁺ , Cu ²⁺ , EDTA	Ramani et al. 2010
<i>Bacillus sp. ITP-001</i>	Ca ²⁺ , Co ²⁺ , Fe ³⁺ , Mg ²⁺ , Mn ²⁺ , Zn ²⁺	Cu ²⁺	This article

EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid)

3.5 Kinetic parameters

The Table 6 shows values of K_m and v_{max} for different methods of kinetic parameters determined using olive oil as a substrate. It was verified that there was no significant difference in the v_{max} , but K_m values were strongly influenced. Based on the P and SE values (mean P smaller than 10%), it was observed that the model of Wolf-Augustinsson-Hofstce showed, in general, the best fit for K_m and V_{max} , at 0.0675 mol and 0.0110 mol.min⁻¹, respectively.

In Fig. 4, we show the Hanes-Wolf plot of purified lipase from *Bacillus sp. ITP-001* compared with adjusted data from Silva et al. (2009) on the kinetic parameters of lipase from *Metarhizium anisopliae* for palmitate and laurate substrates, and the obtained K_m and v_{max} values of 0.474 mM and 1.093 mM.min⁻¹.mg⁻¹ and 0.712 mM and 5.969 mM.min⁻¹.mg⁻¹, respectively. Horchani et al. (2009) determined the kinetic parameters of lipase from *Staphylococcus aureus* on different substrates (tributyrin, and triolein trioctanoin) and

obtained K_m and v_{max} : 4.93 mM and 7.774 mol.min⁻¹.mg⁻¹, 7.87 mM and 2.803 mol.min⁻¹.mg⁻¹ and 14.53 mM and 1.485 mol.min⁻¹.mg⁻¹, respectively.

Table 6. The values of mean relative error (P), estimated (SE) and kinetics parameters (K_m and V_{max}) using olive oil as a substrate.

Methods	K_m (mol)	V_{max} (mol.min ⁻¹)	P	SE
Lineweaver-Burk	0.0875	0.0117	8.63	0.00105
Hanes-Wolf	0.0338	0.0103	13.52	0.00103
Eadie-Scatcharel	0.0879	0.0118	8.63	0.00105
Wolf-Augustinis-Hofstce	0.0675	0.0110	7.09	0.00083
Non-linear	0.0557	0.0109	8.87	0.00075

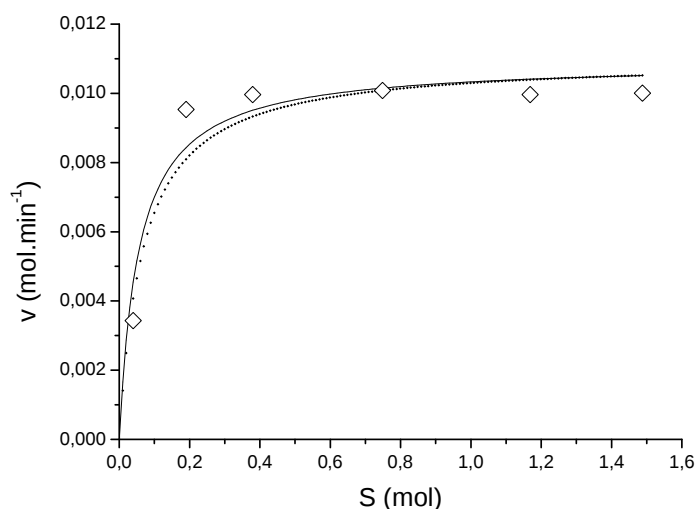


Fig. 4. Hanes-Wolf plot of purified lipase from *Bacillus* sp. ITP-001 using olive oil as a substrate. Solid line: Adjusted; Dotted line: Wolf-Augustinis-Hofstce; Diamond: Experimental results.

3.6 Esterification potential

The ability of lipase from *Bacillus* sp. ITP-001 to catalyse an esterification reaction using some fatty acids and alcohols is shown in Fig. 5. After 24 h of reaction, the best

conversions were obtained using acetic acid and methanol. This indicates that the lipase from *Bacillus* sp. ITP-001 has more affinity for small carbon chains. Chen et al. (2004) isolated seven strains of the genus *Bacillus* (three strains of *B. stearotheomophilus* and *B. licheniformis*, and one *B. subtilis*) and assessed the potential reaction of different carbon chain lengths. The substrates used were butyrate (C₄), caproate (C₆), caprylate (C₈), caprate (C₁₀), laurate (C₁₂), myristate (C₁₄), palmitate (C₁₆) and stearate (C₁₈). With the exception of one strain of *B. licheniformis*, which showed greater activity for medium carbon chains (C₁₀), the lipolytic activity of lipases was higher in short chain esters.

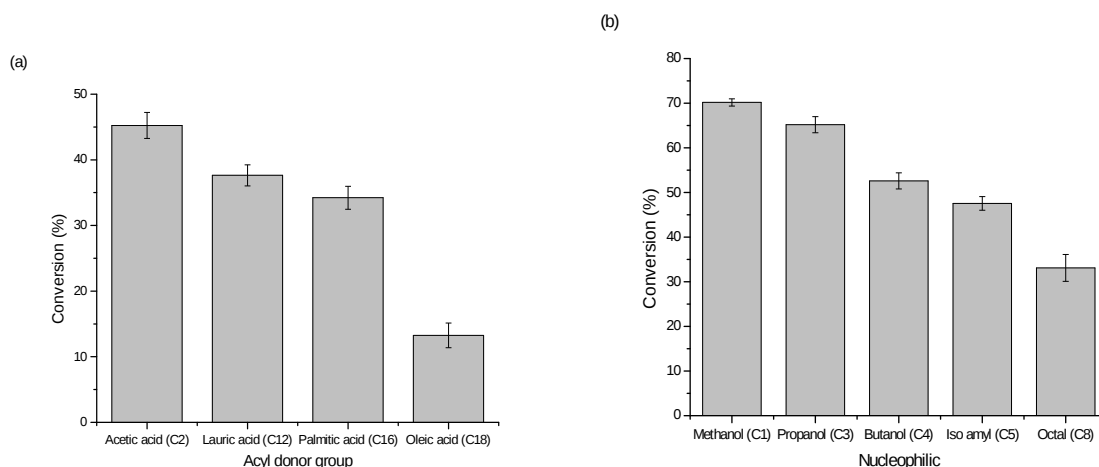


Fig. 5. Influence of alkyl chains of fatty acids (a) on the degree of esterification of ethanol (0.30 M), and of alkyl chains of alcohols (b) on the degree of esterification of acetic acid (0.45 M).

4. Conclusions

In this study, the lipase from *Bacillus* sp. ITP-001 was purified about 201 fold using ATPS and showed an activity of 276 U.g⁻¹ at pH 7 and temperature of 80°C. The pI of the purified lipase was 3.12, which showed high stability and activity at pH 5.0 and temperature of 37°C. The values of K_m and v_{max} were, respectively, 0.0675 mol and 0.0110 mol.min⁻¹.g⁻¹. A positive effect of a majority of the metal ions investigated (Ca²⁺, Mg²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺

and Fe^{3+}) was also observed, and a high tolerance to organic solvents suggests that this lipase has the potential for industrial applications.

Acknowledgements

The authors acknowledge financial assistance from CNPq and CAPES.

References

- Abdou, A. M., 2003. Purification and partial characterisation of psychrotrophic *Serratia marcescens* lipase. *J. Dairy Sci.* 86, 127-132.
- Bacha, A. B., Gargouri, Y., Ali, Y. B., Miled, N., Reinbolt, J., Mejdoub, H., 2005. Purification and biochemical characterisation of ostrich pancreatic lipase. *Enzyme Microb. Technol.* 37, 309-317.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Carvalho, N. B., Souza, R. L., Castro, H. F., Santos, O. A., Zanin, G. M., Lima, A. S., Soares, C. M. F., 2008. Sequential production of amylolytic and lipolytic enzymes by bacterium strain isolated from petroleum contaminated soil. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 150, 25-32.
- Chaiwut, P., Rawdkuen, S., Benjakul, S., 2010. Extraction of protease from *Calotropis procera* latex by polyethylene glycol-salts biphasic system. *Process Biochem.* 45, 1148-1155.
- Côté, A. and Shareck, F., 2008. Cloning, purification and characterisation of two lipases from *Streptomyces coelicolor*. *Enzyme Microb. Technol.* 42, 381-388.
- Dandavate, V., Jinjala, J., Keharia, H., Madamwar, D., 2009. Production, partial purification and characterisation of organic solvent tolerant lipase from *Burkholderia multivorans* V2 and its application for ester synthesis. *Bioresour. Technol.* 100, 3374-3381.
- Demir, B. S., Tükel, S. S., 2010. Purification and characterisation of lipase from *Spirulina platensis*. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 64, 123-128.
- Feitosa, I. C., Barbosa, J. M. P., Orelana, S. C., Lima, A. S., Soares, C. M. F., 2010. Produção de lipase por meio de microrganismos isolados de solos com histórico de contato com petróleo. *Acta Scientiarum Technology.* 32, 27-31.
- Gaur, R., Gupta, A., Khare, S. K., 2008. Purification and characterisation of lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *Process Biochem.* 43, 1040-1046.
- Ghanem, E. H., Al-Sayed, H. A., Saleh, K. M., 2000. An alkalophilic thermostable lipase produced by a new isolate of *Bacillus alcalophilus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 16, 459-464.
- Gupta, R., Gupta, N., Rath, P., 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64, 763-782.

- Hasan, F., Shah, A. A., Hameed, A., 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Technol.* 39, 235-251.
- Horchani, H., Mosbah, H., Salem, N. B., Gargouri, Y., Sayari, A., 2009. Biochemical and molecular characterisation of a thermoactive, alkaline and detergent-stable lipase from a newly isolated *Staphylococcus aureus* strain. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 56, 237-245.
- Ji, Q., Xiao, S., He, B., Liu, X., 2010. Purification and characterisation of an organic solvent-tolerant lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LX1 and its application for biodiesel production. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* doi: 10.1016/j.molcatb.2010.06.001.
- Kambourova, M., Kirilova, N., Mandeva, R., Derekova, A., 2003. Purification and properties of thermostable lipase from thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 22, 307-313.
- Kim, H. K., Choi, H. J., Kim, M. H., Sohn, C. B., Oh, T. K., 2002. Expression and characterisation of Ca^{2+} -Independent lipase from *Bacillus pumilus* B26. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids.* 1583, 205-212.
- Kumar, S., Kikon, K., Upadhyay, A., Kanwar, S. S., Gupta, R., 2005. Production, purification, and characterisation of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. *Protein Expression Purif.* 41, 38-44.
- Lima, A. S., Alegria, R. M., Meirelles, A. J. A., 2002. Partitioning of pectinolytic enzymes in polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous two-phase systems. *Carboh. Polym.* 50, 63-68.
- Nthangeni, M. B., Patterton, H-G., Tonder, A. V., Vergeer, W. P., Litthauer, D., 2001. Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis* lipase: a comparative report on *Bacillus* lipases. *Enzyme Microb. Technol.* 28, 705-712.
- Pastore, G. M., Costa, V. S. R., Koblitiz, M. G. B., 2003. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp. *Ciência e Tecnologia Alimentar.* 23, 135-140.
- Pereira, J. F. B., Lima, A. S., Freire, M. G., Coutinho, J. A. P., 2010. Ionic liquids as adjuvants for the tailored extraction of biomolecules in aqueous biphasic systems. *Green Chem.* doi: 10.1039/c003578e.
- Rabani, M., Sadeghi, H. M., Ani, M., Chegini, K. G., Etemadifar, Z., Moazen, F., 2009. Cloning and nucleotide sequence of a lipase gene from soil isolate. *Research in Pharmaceutical Sciences.* 4, 25-32.

- Sharma, R., Soni, S. K., Vohra, R. M., Gupta, L. K., Gupta, J. K., 2002. Purification and characterisation of a thermostable alkaline lipase from a new thermophilic *Bacillus* sp. RSJ-1. *Process Biochem.* 37, 1075-1084.
- Silva, W. O. B., Santi, L., Berger, M., Pinto, A. F. M., Guimarães, J. A., Schrank, A., Vainstein, M. H., 2009. Characterisation of spore surface lipase from the biocontrol agent *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochem.* 44, 829-834.
- Soares, C. M. F., Castro, H. F., Moraes, F. F., Zanin, G. M., 1999. Characterisation and utilisation of *Candida rugosa* lipase immobilised on controlled pore silica. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 77-79, 745-758.
- Souza, R. L., Barbosa, J. M. P., Zanin, G. M., Lobão, M. W. N., Soares, C. M. F., Lima, A. S., 2010. Partitioning of porcine pancreatic lipase in a two-phase systems of polyethylene glycol/potassium phosphate aqueous. *Appl. Biochem. Biotechnol.* doi: 10.1007/s12010-010-8907-2.
- Supakdamrongkul, P., Bhumiratana, A., Wiwat, C., 2010. Characterisation of an extracellular lipase from the biocontrol fungus, *Nomuraea rileyi* MJ, and its toxicity toward *Spodoptera litura*. *Journal of Invertebrate Pathology.* doi: 10.1016/j.jip.2010.06.011.
- Wang, X., Yu, X., Xu, Y., 2009. Homologous expression, purification and characterisation of a novel high-alkaline and thermal stable lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25416. *Enzyme Microb. Technol.* 45, 94-102.
- Yu, H-W., Han, J., Li, N. Qie, X-S., Jia, Y-M., 2009. Fermentation performance and characterisation of cold-adapted lipase produced with *Pseudomonas* LIP35. *Agricultural Sciences in China.* 8, 956-962.

Capítulo VI

6. CONCLUSÕES

As principais conclusões obtidas neste trabalho são apresentadas a seguir, separadas por assunto desenvolvido:

ARTIGO I - A técnica de purificação foi realizada primeiramente para a avaliação das condições de partição em sistema aquoso bifásico para uma lipase comercial, e foi observado que:

- a. A condição ótima do sistema aquoso bifásico foi constituída por 20% de PEG 8000, 18% de fosfato de potássio, sem adição de NaCl, sob pH 7 e mantido a 14,5°C.
- b. A lipase foi preferencialmente particionada para a fase de topo, rica em polímero, e foi purificada 3,89 vezes.

ARTIGO II - A técnica do sistema aquoso bifásico, constituído por PEG e tampão fosfato de potássio foi aplicada para purificar a lipase produzida pelo *Bacillus* sp. ITP-001 em fermentação submersa, e pode-se concluir que:

- a. A melhor condição do SAB foi constituída por 20% de PEG 8000, 18% de tampão fosfato de potássio, 6% de cloreto de sódio, sob pH 6 e mantido a 4°C.
- b. A lipase foi particionada para fase de fundo, rica em sal, e a melhor condição proporcionou um elevado fator de purificação de 201,53 vezes.

ARTIGO III - Após a purificação da lipase de *Bacillus* sp. ITP-001, neste item foi verificado as propriedades bioquímicas do biocatalisador, e verificou-se:

- a. O pH e temperatura ótimo foram 7,0 e 80°C, respectivamente;
- b. A maior estabilidade da lipase foi verificada em pH 5,0 e temperatura de 37°C;
- c. A lipase é influenciada positivamente pelos íons metálicos (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{3+}) e possui elevada tolerância aos solventes orgânicos testados;
- d. O K_m e $v_{\max}$ foram 0,0675 mol e 0,0110 mol.min⁻¹, respectivamente, e pI de 3,12.

e. Em reações de esterificação pode-se verificar que a lipase tem maior afinidade por cadeias curtas de carbono.

Portanto, neste estudo verificou-se a potencialidade da técnica do sistema aquoso bifásico na partição da lipase, bem como a importância da utilização de uma nova linhagem de bactéria para a produção de lipases.

Capítulo VII

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O presente estudo é integrado a linha de pesquisa desenvolvida pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos e os Programas em Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá (UEM) e a Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP) apresenta novas perspectivas:

1. Utilização da lipase para a produção de biodiesel em meio pressurizado e ultrassom;
2. Aplicação da tecnologia de imobilização de lipase para a produção de emulsificantes e biodiesel de diferentes óleos vegetais;
3. Após estabelecimento das condições reacionais, o uso da enzima livre e imobilizada em diferentes configurações de biorreatores;
4. Avaliar a viabilidade econômica desenvolvida em questão;

Capítulo VIII

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, H.; HIOL A.; DEYRIS, V.; COMEAU, L. Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor* sp strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, p. 968–975, 2002.
- AGUILAR, C. N.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G.; RADO-BARRAGÁN, P. A.; RODRÍGUEZ-HERRERA, R. MARTÍNEZ-HERNANDEZ, J. L.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C. Perspectives of solid state fermentation for production of food enzymes, *American journal of biochemistry and biotechnology*, v. 4, p. 354-366, 2008.
- ALBERTSSON, P. A. Partition of cell particles and macromolecules. Wiley Interscience, New York, USA, 1986.
- ANTOV, M. G.; PERICIN, D. M.; PEJIN, S.M. Pectinases partitioning in aqueous two-phase systems: an integration of the systems poly(ethylene glycol)/crude dextran and poly(ethylene glycol)/ammonium sulphate, *J. Serb. Chem. soc.*, v. 69, p. 299-307, 2004.
- BABU, B. R.; RASTOGI, N. K.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Liquid-liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system, *Chemical Engineering and Processing*, v. 47, p. 83-89, 2008.
- BACHA, A. B.; GARGOURI, Y.; ALI, Y. B.; MILED, N.; REINBOLT, J.; MEJDOUB, H. Purification and biochemical characterization of ostrich pancreatic lipase. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 37, p. 309-317, 2005.
- BASSANI, G.; FARRUGGIA, B.; NERLI, B.; ROMANINI, D.; PICÓ, G. Porcine pancreatic lipase partition in potassium phosphate-polyethylene glycol aqueous two-phase systems, *Journal of Chromatography B*, v. 859(2), p. 222-228, 2007.
- BASSANI, G.; FUCIÑOS, P.; PICÓ, G.; FARRUGGIA, B. *Candida rugosa* lipase Lip1-polyethyleneglycol interaction and the relation with its partition in aqueous two-phase systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 75, p. 532-537, 2010.
- BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado*, Rio de Janeiro, 2008.
- BOORNSCHEUER, U. T.. *Enzymes in Lipid Modification*, Germania, 2000.
- BORKAR, P. S.; BODADE, R. G.; RAO, S. R.; KHOBRAGADE, C. N. Purification and characterization of extracellular lipase from a new strain – *Pseudomonas aeruginosa*

- SRT 9, Brazilian Journal of Microbiology, v. 40, p. 358-366, 2009.
- BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. Biotecnologia industrial: fundamentos, São Paulo, Ed. Blücher, 2008.
- BOSS, E. A. Modelagem e otimização do processo de liofilização: aplicação para leite desnatado e café solúvel. DPQ/UNICAMP, p. 129, 2004.
- BRADDOO, S.; RATHI, P.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. Microwave-assisted rapid characterization of lipase selectivities, J Biochem Biophys Methods, v. 51, p. 115–120, 2002.
- BRADDOO, S.; SAXENA, R.K. GUPTA, R. Partitioning and resolution of mixture of two lipases from *Bacillus stearothermophilus* SB-1 in aqueous two phase system, Process Biochemistry, v. 35, p. 57-62, 1999.
- BRUNE, A.K.; GOTZ, F. Degradation of lipids by bacterial lipases, Microbial degradation of natural products, VCH, Weinheim, p. 243–266, 1992.
- BUCHHOLZ, K.; KACSHE, V.; BORNSCHEUER, U. Biocatalysts and enzyme technology. Weinheim: Wiley-VCH, 2005.
- BUCHNER, E. Cell-free fermentation, Nobel Lecture, p. 103-120, 1907.
- BUSTAMANTE, M.A.; VIRTO, M.; ARAMBURU, M.; BARRON, L. J. R.; PÉREZ-ELORTONDO, F. J.; ALBISU, M.; RENOBABLES, M. Lamb rennet paste in ovine cheese (Idiazabal) manufacture. Proteolysis and relationship between analytical and sensory parameters, International Dairy Journal, v. 13(7), p. 547-557, 2003.
- CABRAL, J.M.S.; AIRES-BARROS, M.R.; GAMA, M.. Engenharia enzimática, 1ª ed., Lisboa: Lidel, 2003.
- CARVALHO, C. Estudo de equilíbrio de fases para sistemas aquosos bifásicos compostos por polietileno glicol, sais e água. Dissertação de mestrado, Departamento de tecnologia de alimentos, UFV, Viçosa, 2004.
- CARVALHO, N. B.; SOUZA, R. L.; CASTRO, H. F.; ZANIN, G. M.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Sequential production of amylolytic and lipolytic enzymes by bacterium strain isolated from petroleum contaminated soil, Appl. Biochem. Biotechnol., v. 150, p. 25-32, 2008.
- CASTILHO, L.R.; POLATO, C.M.S.; BARUQUE, E.A.; SANT'ANNA JR, G.L.; FREIRE, D.M.G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. Biochemical Engineering Journal, v. 4, 239–247, 2000.
- CASTRO, H. F. D.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de Óleos e Gorduras por biotransformação, Química Nova, v. 27, p. 146-156, 2004.

- CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A. Fine chemicals by biotransformation using lipases, *Química Nova*, v. 8, p. 544–554, 1995.
- CHAIWUT, P.; RAWDKUEN, S.; BENJAKUL, S. Extraction of protease from *Calotropis procera* latex by polyethylene glycol-salts biphasic system. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 1148-55, 2010.
- CHANTAWANNAKUL, P.; ONCHAROEN, A.; KLANBUT, K.; CHUKEATIROTE, E.; LUMYONG, S. Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand. *Science Asia*, v. 28, p. 241- 245, 2002.
- CHAKRABORTY, K.; PAULRAJ, R.. Purification and Biochemical Characterization of an Extracellular Lipase from *Pseudomonas fluorescens* MTCC 2421, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, p. 3859-3866, 2009.
- CHEN, L.; COOLBEAR, T.; DANIEL, R. M. Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus* sp. isolated from milk powder production lines, *International Dairy Journal*, v. 14(6), p. 495-504, 2004.
- CHEN, S.; LILI, Q.; BINGZHAO, S. Purification and properties of enantioselective lipase from a newly isolated *Bacillus cereus* C71. *Process Biochemistry*, v. 42 (6), p. 988-994, 2007.
- COIMBRA, J. S. R.; GIRALDO-ZUÑIGA, A. D.; MINIM, L. A.; MEIRELLES, A. J. A. Uso de sistema aquoso bifásico na extração líquido-líquido, Viçosa: UFV, 2003.
- DHARMSTHITI, S.; LUCHAI, S. Production, purification and characterization of thermophilic lipase from *Bacillus* sp. THL027, *FEMS Microbiol Lett*, v. 179, p. 241–246, 1999.
- ELIBOL, M.; ÖZER, D. Lipase production by immobilized *Rhizopus arrhizus*, *Process Biochemistry*, v. 36, p. 219-223, 2000.
- ELLAIHAH, P.; PRABHAKAR, T.; RAMAKRISHNA, B.; TALEB, A. T.; ADINARAYANA, K. Production of lipase by immobilized cells of *Aspergillus niger*, *Process Biochemistry*, v. 39, p. 525-528, 2004.
- FALONY, G.; ARMAS, J. C.; MENDOZA, J. C. D.; HERNÁNDEZ, L. M. Production of extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation, *Food Technol. Biotechnol.*, v. 44 (2), p. 235-240, 2006.
- FEITOSA, I. C.; BARBOSA, J. M. P.; ORELLANA, S. C.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Produção de lipase por meio de microrganismos isolados de solos com histórico de contato com petróleo, *Acta Scientiarum. Technology*, v. 32, p. 27-31, 2010.

- FELLOWS, P.. Tecnología del Procesado de Los Alimentos: Principios e Práticas, Editorial Acribia, p. 172-177, 1994.
- FERREIRA, J. F.; PADILHA, G. D. S.; TAMBOURGI, E. G. Efeitos da massa molar e do pH sobre o equilíbrio termodinâmico do sistema bifásico termodinâmico do sistema bifásico aquoso PEG/fosfatos, *Exacta*, v. 1, p. 49-56, 2009.
- FUCIÑOS, P.; ABADÍN, C. M.; SANROMÁN, A.; LONGO, M. A.; PASTRANA, L.; RÚA, M. L. Identification of extracellular lipases/esterases produced by *Thermus thermophilus* HB27: Partial purification and preliminary biochemical characterization, *Journal of Biotechnology*, v. 117, p. 233-241, 2005.
- GANDRA, K. M.; BIANCHI, M. D.; GODOY, V. P.; QUEIROZ, F. P. C.; STEEL, C. J. Aplicação de lipase e monoglicerídeo em pão de forma enriquecido com fibras, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 2008.
- GARZA-MADRID, M.; RITO-PALOMARES, M.; SERNA-SALDÍVAR, S. O.; BENAVIDES, J. Potential of aqueous two-phase system constructed on flexible devices: human sérum albumin as proof of concept. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 1082-87, 2010.
- GAUR, R.; ANSHU, G. *et al.*. Lipase from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* strain: Production optimization by response surface methodology and application, *Bioresource Technology*, v. 99, p. 4796-4802, 2008.
- GAUR, R.; GUPTA N.; RATHI, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties, *Appl. Microbiol Biotechnol.*, v. 64, p. 763-781, 2004.
- GODFREY & WEST. *Industrial Enzymology*, 2^a ed., New York, 1996.
- GUPTA, R.; GUPTA, N.; RATHI, P. Bacterial lipases an overview of production, purification and biochemical properties, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, v. 64, p. 763-781, 2004.
- HASAN, F.; SHAH, A.A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. *Enz Microb Technol*, v. 39, p. 235–251, 2006.
- HORCHANI, H.; MOSBAH, H.; SALEM, N. B.; GARGOURI, Y.; SAYARI, A. Biochemical and molecular characterisation of a thermoactive, alkaline and detergent-stable lipase from a newly isolated *Staphylococcus aureus* strain, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 56, p. 237-245, 2009.
- ISO, M.; CHEN, B.; EGUCHI, M.; KUDO, T.; SHRESTHA, S. Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 16(1), p. 53-58, 2001.

- JAEGER, K-E. REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. Trends in Biotechnology, v. 16(9), p. 396-403, 1998.
- JOHANSSON, H-O; MAGALDI, F.M.; FEITOSA, E.; PESSOA-JR, A. Protein partitioning in poly(ethylene glycol)/sodium polyacrylate aqueous two-phase systems, Journal of chromatography A, v. 1178, p. 145-153, 2008.
- KANWAR, S. S.; GHAZI, I. A.; CHIMI, S. S.; JOSHI, G. K.; RAO, G. V.; KAUSHAL, R. K.; GUPTA, R.; PUNJ, V. Purification and properties of a novel extra-cellular thermotolerant metalloproteinase of *Bacillus coagulans* MTCC-6375 isolate. Protein Expression and Purification, v. 46, p. 421-428, 2006.
- KAMBOUROVA, M., KIRILOVA, N., MANDEVA, R., DEREKOVA, A. Purification and properties of thermostable lipase from thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7. J. Mol. Catal. B: Enzym., v. 22, p. 307-313, 2003.
- KENNEDY, J.F.; CABRAL, J.M.S., Enzyme Technology. In: Biotechnology – A Comprehensive Treatise in 8 vol. Edited by H.J.REHM and G.REED: v.7 Editor John F. Kennedy, Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, USA, 1987.
- KOBLITZ, M. G. B.; PASTORE, G. M. Purificação parcial, por dois diferentes métodos cromatográficos, da lipase produzida por *Rhizopus* sp., Ciênc. Tecnol. Aliment., v. 24(2), p. 287-292, 2004.
- KUMAR, S.; KIKON, K.; UPADHYAY, A.; KANWAR, S. S.; GUPTA, R. Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS – 3. Protein Expression and Purification, v. 41, p. 38-44, 2005.
- KUMARI, A.; MAHAPATRA, P.; BANERJEE, R. Statical optimization of culture conditions by response surface methodology for synthesis of lipase with *Enterobacter aerogenes*, Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 52 (6), p. 1349-1356, 2009.
- LEE, D. W.; KIM, H. W.; LEE, K. W.; KIM, B. C.; CHOE, E. A.; LEE, H. S.; KIM, D. S.; PYUN, Y. R. Purification and characterization of two distinct thermostable lipases from the gram-positive thermophilic bacterium *Bacillus thermoleovorans* ID-1. Enz Microb Technol., v. 29: 363–371, 2001.
- LEE, Y. P.; CHUNG, G. H.; RHEE, J. S. Purification and characterization of *Pseudomonas fluorescens* SIK W1 lipase expressed in *Escherichia coli*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Lipids and Lipid Metabolism, v. 1169, p. 156-164, 1993.
- LESUISSE, E.; SCHANCK, K.; COLSON, C. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme, Eur J Biochem, v. 216, p. 155–160, 1993.

- LI, S.; WAN, J.; CAO, X. Preliminary application of light-pH sensitive recycling aqueous two-phase systems to purification of lipase. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 598-601, 2010.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotechnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos*. 2. reimpr. São Paulo: E. Blücher, v. 3, 2007.
- LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A.; BARATTI, J. C.; FILLIPPIS, I.; FONTANA, J. D. Kinetic characterization and stability in aqueous media and in organic solvents of a crude lipase preparation obtained from *Penicillium aurantiogriseum*. *Biochem. Eng. J.*, v. 18, p. 65-71, 2004.
- LIU, Z.; CHI, Z.; WANG, L.; LI, J. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils, *Biochemical Engineering Journal*, v. 40, p. 445-451, 2008.
- LUECHAU, F.; LING, T. C.; LYDDIATT, A. Two-step process for initial capture of plasmid DNA and partial removal of RNA using aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry*, v. 45 (8), p. 1432-1436, 2010.
- MADHUSUDHAN, M. C.; RAGHAVARAO, K. S. M. S.; NENE, S. Integrated process for extraction and purification of alcohol dehydrogenase from baker's yeast involving precipitation and aqueous two phase extraction, *Biochemical Engineering Journal*, v. 38, p. 414-420, 2008.
- MAGESTE, A. B.; LEMOS, L. R.; FERREIRA, G. M. D.; SILVA, M. C. H.; SILVA, L. H. M.; BONOMO, R. C. F.; MINIM, L. A. Aqueous two-phase systems: Na eficiente, environmentally safe and economically viable method for purification of natural dye carmine. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 7623-29, 2009.
- MALPIEDI, L.P.; ROMANINI, D.; PICÓ, G.A.; NERLI, B.B. Purification of trypsinogen from bovine pancreas by combining aqueous two-phase partitioning and precipitation with charged flexible chain polymers, *Separation Purification Technology*, v. 65 (1), p. 40-45, 2009.
- MARGULIS, Lynn. *Cinco reinos: um guia ilustrado dos filos da vida da terra*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 497 p., 2001.
- MARTINS, E.S. Purificação de poligalacturonases termoestáveis produzidas pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* através de fermentação submersa e fermentação em estado sólido e caracterização bioquímica das mesmas. Tese apresentada ao Instituto de Biociências de campos de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de doutor em ciências biológicas, p. 132, 2006.

- MARTINS, V. G.; KALIL, S. J.; COSTA, J. A. V. Co-produção de lipase e biosurfactante em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos, *Química Nova*, v. 31, p. 1942-1947, 2008.
- MATSUOKA, H.; MIURA, A.; HORI, K. Symbiotic effects of a lipase-secreting bacterium, *Burkholderia arboris* SL1B1, and a glycerol-assimilating yeast, *Candida cylindracea* SL1B2, on triacylglycerol degradation, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 107(4), p. 401-408, 2009.
- MOHAMADI, H. S.; OMIDINIA, E. Purification of recombinant phenylalanine dehydrogenase by partitioning in aqueous two-phase systems, *Journal of Chromatography B*, v. 854, p. 273-278, 2007.
- MOKHTARANI, B.; KARIMZADEH, R.; AMINI, M. H.; MANESH, S. D. Partitioning of ciprofloxacin in aqueous two-phase system of poly(ethylene glycol) and sodium sulfate, *Biochemical Engineering Journal*, v. 38, p. 241-247, 2008.
- MONIRUZZAMAN, M.; NAKASHIMA, K.; KAMIYA, N.; GOTO, M. Recent advances of enzymatic reactions in ionic liquids, *Biochemical Engineering Journal*, v. 48, p. 295-314, 2010.
- MOSBAH, H.; SAYARI, A.; MEJDOUB, H.; DHOUIB, H.; GARGOURI, Y. Biochemical and molecular characterization of *Staphylococcus xylosus* lipase, *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1723, p. 282-291, 2005.
- NAGANAGOUDA, K.; MULIMANI, V. H. Aqueous two-phase extraction (ATPE): An attractive and economically viable technology for downstream processing of *Aspergillus oryzae* α -galactosidase. *Process Biochemistry*, v. 43, p. 1293-99, 2008.
- NELSON, D. L.; COX, M. M.. *Lehninger princípios de bioquímica*. São Paulo, 2006.
- NOUREDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R.S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. *Bioresource Technology*, v. 96(7): 769-77, 2005.
- OLIVEIRA, G. G. G.; SILVA, D. P.; CONCEIÇÃO, I.; VITOLO, M.; PESSOA-JR, A. Purificação de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) em sistemas de duas fases aquosas utilizando PEG/citrato, *Ver. Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 37(2), 2001.
- OOI, C. W.; TEY, B.T.; HII, S. L.; KAMAL, S. M. M.; LAN, J. C. W.; ARIFF, A.; LING, T. C. Purification of lipase derived from *Burkholderia pseudomallei* with alcohol/salt-based aqueous two-phase systems, *Process Biochemistry*, v. 44, p. 1083-1087, 2009.

- PARK, J.; CHO, S-Y.; CHOI, S-J. Purification and characterization of hepatic lipase from *Todarodes pacificus*, BMB reports, v. 41(3), p. 254-258, 2008.
- PASTORE, G. M.; COSTA, V. D. S. R. D.; KOBLITZ, M. G. B. Purificação parcial e caracterização bioquímica de lipase extracelular produzida por nova linhagem de *Rhizopus* sp., Ciência e Tecnologia Alimentar, v. 23, p. 135-140, 2003.
- PESSOA-JUNIOR, A.; KILIKIAN, B. V. Purificação de produtos biotecnológicos, Barueri - SP, Manole, 2005.
- PINHEIRO, T. L. F.; MENONCIN, S.; DOMINGUES, N. M.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; DI LUCCIO, M.; FREIRE, D. M. G. Production and partial characterization of lipase from *Penicillium verrucosum* obtained by submerged fermentation of conventional and industrial media, Ciência e Tecnologia Alimentar, v. 28(2), p. 444-450, 2008.
- PORTO, T. S.; MEDEIROS E SILVA, G. M.; PORTO. C. S.; CAVALCANTI, M. T. H.; NETO, B. B.; LIMA-FILHO, J. L.; CONVERTI, A.; PORTO, A. L. F.; PESSOA-JR, A. Liquid-liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system, Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, v. 47(4), p. 716-721, 2008.
- RASHID, N.; SHIMADA, Y.; EZAKI, S.; ATOMI, H.; IMANAKA, T. Low temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* sp. strain KB700A, Appl Environ Microbiol, v. 67, p. 4064–4069, 2001.
- RATHI, P.; BRADDOO, S.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. A hyper-thermostable, alkaline lipase from *Pseudomonas* sp. with the property of thermal activation, Biotechnol Lett, v. 22, p. 495–498, 2000.
- RATHI, P.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation, Process Biochem, v. 37, p. 187–192, 2001.
- RAWDKUEN, S.; PINTATHONG, P.; CHAIWUT, P.; BENJAKUL, S. The partitioning of protease from *Calotropis procera* latex by aqueous two-phase systems and its hydrolytic pattern on muscle proteins. Food and Bioproducts Processing, doi: 10.1016/j.fbp.2010.02.001, 2010.
- RIBEIRO, M. Z.; SILVA, D. P.; VITOLO, M.; ROBERTO, I. C.; PESSOA-JUNIOR, A. Partial purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase by aqueous two-phase poly(ethyleneglycol)/phosphate systems, Brazilian Journal of Microbiology, v. 38, p. 78-83, 2007.

- ROSA, D. R.; CAMAROTA, C. M.; FREIRE, D. M. G. Production and utilization of a new solid enzymatic preparation produced by *Penicillium restrictum* in activated sludge systems treating wastewater with high levels of oil and grease, *Environmental Engineering Science*, v. 23(5), p. 814-23, 2006.
- ROSA, P. A. J.; FERREIRA, I. F.; AZEVEDO, A. M.; AIRES-BARROS, M. R. Aqueous two-phase systems: A viable platform in the manufacturing of biopharmaceuticals. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 2296-2305, 2010.
- ROSEVEAR, A.; KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S. *Immobilized Enzymes and Cells*. Adam Hilger: Bristol and Philadelphia, cap. 5, 1987.
- JOSÉ, S. C. B. J.; PINHO, E. V. R. V.; PINHO, R. G. V.; SILVEIRA, C. M. Padrões eletroforéticos da enzima α -amilase em sementes de milho submetidas a alta temperatura de secagem, *Revista Brasileira de Sementes*, v. 26, p. 77-83, 2004.
- SALLEH, A.B.; RAHMAN, R.N.Z.R.A. *New lipases and proteases*, Nova Biomedical, New York, 159 p., 2006.
- SARAVANAN, S.; RAO, J. R.; NAIR, B. U.; RAMASAMI, T. Aqueous two-phase poly(ethylene glycol)-poly(acrylic acid) system for protein partitioning: influence of molecular weight, pH and temperature, *Process Biochemistry*, v. 43, p. 905-911, 2008.
- SATO, K.; SUDO, S. *Small-scale solid-state fermentations*, *Manual of industrial microbiology and biotechnology*, 2^a ed., Washington DC, 1999.
- SAXENA, R. K.; DAVIDSON, W. S.; SHEORAN, A.; GIRI, B. Purification and characterization of an alkaline thermostable lipase from *Aspergillus carneus*, *Process Biochemistry*, v. 39, p. 239-247, 2003.
- SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, P.O. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production, *Canadian Journal of Microbiology*, Canada, 50, p. 1-17, 2004.
- SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotechnologia Industrial*. Vol. 2, Ed. Edgard Blücher, 541 pgs, 2005.
- SELVAKUMAR, P.; LING, T. C.; WALKER, S.; LYDDIATT, A. A practical implementation and exploitation of ATPS for intensive processing of biological feedstock: A novel approach for heavily biological feedstock loaded ATPS. *Separation and Purification Technology*, doi: 10.1016/j.seppur.2010.08.022, 2010.
- SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.*, v. 19, p. 627-662, 2001.
- SILVA, L. H. M. D.; LOH, W. *Sistemas Aquosos Bifásicos: Fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas*, *Química Nova*, v. 29, p. 1345-1351, 2006.

- SING, M.; SAURAV, K.; SRIVASTAVA, N.; KANNABIRAN, K. Lipase production by *Bacillus subtilis* OCR-4 in solid state fermentation using ground nut oil cakes as substrate. *Current Research Journal of Biological Sciences*, v. 2(4), p. 241-245, 2010.
- SUN, S. Y.; XU, Y.; WANG, D. Novel minor lipase from *Rhizopus chinensis* during solid-state fermentation: Biochemical characterization and its esterification potential for ester synthesis, *Bioresource Technology*, v. 100, p. 2607–2612, 2009.
- TYNDALL, J. D. A.; SINCHAIKUL, S.; FOTHERGILL-GILMORE, L. A.; TAYLOR, P.; WALKINSHAW, M. D. Crystal structure of a thermostable lipase from *Bacillus stearothermophilus* P1. *Journal of Molecular Biology*, v. 323 (5), p. 859-869, 2002.
- VIEIRA, G. A. B.; LEMOS, T. L. G.; MATTOS, M. C.; OLIVEIRA, M. C. F.; MELO, V. M. M.; GONZALO, G.; GOTOR-FERNANDEZ, V.; GOTOS, V. Chemoenzymatic synthesis of optically active Mugetanol isomers: use of lipases and oxidoreductases in fragrance chemistry, *Tetrahedron: Asymmetry*, v. 20(2), p. 214-219, 2009.
- VILLENEUVE, P. Lipases in lipophilization reactions, *Biotechnol. Advances*, 25 (6), p. 515-536, 2007.
- VULFSON, E. N. Lipases: their Structure, Biochemistry and Application. (eds.) Woolley, P., and Petersen, S. B., Cambridge University Press, United Kingdom, p. 271–288, 1994.
- WANG, X.; YU, X.; XU, Y. Homologous expression, purification and characterization of a novel high-alkaline and thermal stable lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25416, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 45, p. 94-102, 2009.
- WILLIAMS, A.C.; WOODLEY, J. M.; ELLIAS, P.A.; LILLY, M. D. In: *Biocatalysis in Organic Media*, (Eds: LAANE, C.; TRAMPER, J.; LILLY, M.D.) Amsterdam: Elsevier; 1987, 348p.
- WISEMAN, A.. *Handbook of Enzyme Biotechnology*, 3^a ed., Ellis Horwood: London, 1995.
- WOLSKI, E.; MENUSI, E.; MAZUTTI, M.; TONIAZZO, G.; RIGO, E.; CANSIAN, R. L.; MOSSI, A.; OLIVEIRA, J. V.; LUCCIO, M. D.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H. Response Surface Methodology for Optimization of Lipase Production by an Immobilized Newly Isolated *Penicillium* sp., *Ind. Eng. Chem.*, v. 47, p. 9651-9657, 2008.
- WOLSKI, E.; MENUSI, E.; REMONATTO, D.; VARDANEGA, R.; ARBTER, F.; RIGO, E.; NINOW, J.; MAZUTTI, M. A.; LUCCIO, M.; OLIVEIRA, D. Partial characterization of lipases produced by a newly isolated *Penicillium* sp. In solid state and submerged fermentation: A comparative study, *Food Science and Technology*, v. 42, p. 1557-1560, 2009.

- YADAV, G. D.; LATHI, P. S., Synthesis of citronellol laurate in organic media catalyzed by immobilized lipases: kinetic studies., J.Mol. Catal. B: Enzym. v. 27 (2/3), p. 113-119, 2004.
- YANG, J.; GUO, D.; YAN, Y. Cloning, expression and characterization of a novel thermal stable and short-chain alcohol tolerant lipase from *Burkholderia cepacia* strain G63, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 45, p. 91-96, 2007.
- YANG, L.; HUO, D.; HOU, C.; HE, K.; LV, F.; FA, H.; LUO, X. Purification of plant-esterase in PEG 1000/NaH₂PO₄ aqueous two-phase system by a two-step extraction. Process Biochemistry, v. 45, p. 1664-71, 2010.
- YANG, S.; HUANG, Z.; JIANG, Z.; LI, L. Partition and purification of a thermostable xylanase produced by *Paecilomyces thermophila* in solid-state fermentation using aqueous two-phase systems. Process Biochem., v. 43: 56–61, 2008.
- YANG, X.; WANG, B.; CUI, F.; TAN, T. Production of lipase by repeated batch fermentation with immobilized *Rhizopus arrhizus*, Process Biochemistry, v. 40, p. 2095-2103, 2005.
- YAN-MIN, L.; YAN-ZHAO, Y.; XI-DAN, Z.; CHUAN-BO, X. Bovine serum albumin partitioning in polyethylene glycol (PEG)/potassium citrate aqueous two-phase systems. Food and Bioproducts Processing, v. 88, p. 40-46, 2010.
- YU, H-W.; HAN, J.; LI, N.; QIE, X-S.; JIA, Y-M. Fermentation Performance and Characterization of Cold-Adapted Lipase Produced with *Pseudomonas* Lip35, Agricultural Sciences in China, v. 8, p. 956-962, 2009.
- ZAFARANI-MOATTAR, M. T.; NASIRI, S. (Liquid + liquid) and (liquid + solid) equilibrium of aqueous two-phase systems containing poly ethylene glycol di-methyl ether 2000 and di-sodium hydrogen phosphate. J. Chem. Thermodynamics, v. 42, p. 1071-78, 2010.
- ZHANG, Y-Y.; LIU, J-H. Purification and in situ immobilization of lipase from of a mutant of *Trichosporon laibacchii* using aqueous two-phase system. Journal of Chromatography B, v. 878, p. 909-912, 2010.
- ZUÑIGA, A. D. G.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A. Coeficientes de partição da α -lactoalbumina e β -lactoglobulina em sistemas aquosos bifásicos: Influência da massa molar do polímero, Ciência y Tecnología Alimentaria, v. 3 (3), p. 149-155, 2001.