



PURIFICAÇÃO DE LIPASE PRODUZIDA POR *Aspergillus niger* SELVAGEM

Jéssica Simões Pereira, Amanda Souto Machado, Prícila Julieta Dantas Rocha Lobato, Adriana Martins Pereira, Luiz Felipe da Silva Xavier, Janete Maria da Silva Alves, Henrique Maia Valério

Introdução

As lipases (triacilgliceroléster hidrolases, EC (3.1.1.3), correspondem a um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam na interface orgânica-aquosa, catalisando a hidrólise de triglicerídeos de cadeia longa. Em meios com baixa concentração de água, as lipases catalisam reações de esterificação, interesterificação e transesterificação [1]. Lipases são importantes biocatalisadores amplamente utilizadas na indústria. Os fungos filamentosos são reconhecidos como sendo os melhores produtores de lipases uma vez que podem ser obtidas a partir de processos que possibilitam a utilização em escala industrial com baixos custos. E [2].

Os procedimentos de purificação de proteínas, geralmente se baseiam em uma série de técnicas e de múltiplas etapas, tais como precipitação com sulfato de amônio seguida da combinação de vários tipos de cromatografia, pois, na maioria das vezes, uma única etapa de cromatografia não é suficiente para obter o nível de pureza desejado. Para purificar uma proteína até a homogeneidade, com um rendimento global de aproximadamente 30%, quatro ou cinco passos de purificação normalmente são necessários [3].

Os principais inconvenientes dos processos de purificação incluem baixos rendimentos e procedimentos demorados. Novas técnicas de purificação vêm sendo testadas com o intuito de purificar lipases como: utilização de membranas, sistemas de duas fases aquosas e imunopurificação. Estes fatores contribuem para produção em alta escala. Uma das principais é a cromatografia de afinidade, que permite uma purificação mais rápida e eficiente. [4]. Desse modo, o trabalho tem como objetivo purificar lipases produzidas por *Aspergillus niger* selvagem.

Material e métodos

A. Purificação com sulfato de amônio

O volume de 500 ml do caldo fermentado de *Aspergillus niger*, foi clarificado por fermentação, em seguida o sobrenadante foi precipitado usando sulfato de amônio a 75% e 100% (p/v) de saturação sob agitação lenta a 4 °C. Após uma hora de repouso o precipitado de proteína foi recolhido por centrifugação a 7.826 g, por 15 minutos e dissolvido em volume mínimo de Tris-HCl 20 mM pH 7,0.

B. Cromatografia em coluna de Interação Hidrofóbica (Phenyl Sepharose)

Os precipitados de 75% (A) e de 100% (B) foram então solubilizados em solução tampão fosfato de sódio 20 mM; pH 7,0 contendo 2,0 M de sulfato de amônio e cromatografados em uma coluna de interação hidrofóbica Phenyl Superose HR 5/5. Primeiramente a coluna foi equilibrada utilizando como fase móvel a mesma solução tampão citada acima, operando-se com um fluxo de 60,0 mL.h⁻¹ acoplada em um sistema de FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography). A eluição do material aplicado na coluna correu por um gradiente linear de 2,0 M a 0 de sulfato de amônio, utilizando um segundo tampão, porém sem o sal de sulfato de amônio, sendo coletadas frações de 1,5 mL que foram monitoradas usando-se uma região do ultravioleta com comprimento de onda de 280 nm. A cromatografia foi realizada em temperatura de aproximadamente 24 °C. Posteriormente, todas as frações geradas foram concentradas com auxílio de um concentrador a vácuo, e logo em seguida foram submetidas ao teste de atividade contra o substrato *p*-NPL, sendo aquelas que apresentaram atividade enzimática encaminhadas em forma de *pool* para a cromatografia seguinte.

C. Cromatografia em coluna de Filtração molecular (Superose 12)

O *pool* das frações ativas das amostras A e B provenientes da cromatografia anterior foi submetido ao ensaio cromatográfico de filtração molecular em coluna Superose 12 10/300 GL (Amersham Biosciences, Sweden) também acoplada em sistema FPLC, previamente equilibrada com uma solução tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,0, operando em um fluxo de 30,0 mL.h⁻¹. A eluição das frações foi monitorada usando-se comprimento de onda de 280 nm sendo a cromatografia realizada a uma temperatura próxima a 24 °C. O teor de proteína foi estimado utilizando o



método descrito por Bradford [5]. As frações coletadas de 1,5 mL também foram submetidas ao teste de atividade frente ao substrato *p*-NPL.

D. Eletroforese

A massa molecular aparente das lipases foi determinada por SDS-PAGE utilizando o sistema descrito por Laemmli [6] com acrilamida 12,5%. A detecção das proteínas no gel foi feita usando o método de coloração pela prata [7].

Resultados e discussão

As Figuras 1A e 1B apresentam os perfis cromatográficos na coluna de interação hidrofóbica, na amostra A (Figura 1A) as frações de 48 a 55 apresentaram atividade enzimática, e na amostra B (Figura 1B) as frações de 18 a 25 apresentaram atividade enzimática. Nas Figuras 1C e 1D estão os perfis cromatográficos provenientes da coluna de filtração molecular, na amostra A, as frações de 6 a 12 apresentaram atividade enzimática, e na amostra B as frações de 6 a 10 apresentaram atividade enzimática.

Tanto na amostra A quanto na B o rendimento da precipitação com sulfato de amônio foi alto, sendo de 102% e 96%, respectivamente. No estudo realizado por Souza e colaboradores [8] a lipase produzida pelo *A. japonicus* também obtiveram alto rendimento ao ser purificada, com 106% após o processo de precipitação com sulfato de amônio, porém neste caso, a lipase precipitou em uma saturação de 60% de sal.

A amostra B da coluna de filtração molecular apresentou maior rendimento do que a A, sendo de 37% e 25%, respectivamente. No caso do *A. niger* F044 o rendimento após a aplicação na coluna de filtração molecular reduziu para 33,99% [9].

Foi possível observar no SDS-PAGE que as amostras apresentaram uma quantidade grande de proteínas. Nas canaletas 7, 8, 9 e 10 (Figura 2) foi isolado somente uma proteína que corresponde a uma lipase com peso molecular de aproximadamente 65 kDa. E nas canaletas 11, 12, 13, 14 e 15 (Figura 2) foram identificadas duas proteínas uma de aproximadamente 65 kDa, e outra de cerca de 18-20 kDa. A maioria das lipases produzidas por *A. niger* já relatadas apresentaram peso molecular aparente na faixa de 29 a 70 kDa [10].

Conclusão

Os métodos de purificação utilizados foram eficientes no isolamento da enzima, apresentando um bom rendimento. A lipase do *A. niger* apresentou características interessantes como peso molecular de aproximadamente 65 kDa. A realização de novos trabalhos de otimização da purificação de lipase extracelular poderão contribuir para aplicação biotecnológica em grande escala.

Referências

- [1] J. Jeganathan, A. Bassi, and G. Nakhla. "Pre-treatment of high oil and grease pet food industrial wastewaters using immobilized lipases hydrolyzation". **Journal of Hazardous Material**, vol. 137, pp. 121-128, 2006.
- [2] G. Reed. "Enzymes in food processing". **Wisconsin: Academic Press**, 2 ed., pp. 573, 1975.
- [3] M.R. Aires-Barros, M. A. Taipa, and J. M. S. Cabral. "Selective separation and purification of two lipases from *Chromobacterium viscosum* using AOT reversed micelles". **Biotechnology Bioengineering**, Vol. 38, pp. 1302-1307, 1991.
- [4] R. K. Saxena *et al.* "Purification strategies for microbial lipases", **Journal of Microbiological Methods**, vol. 52, pp. 1-18, 2003.
- [5] M. M. Bradford. "A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", **Analytical Biochemistry**, vol. 72, pp. 248-254, 1976.
- [6] U. K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4," **Nature**, vol. 227, no. 5259, pp. 680-685, 1970.
- [7] V. Paschon *et al.* "Blocking of connexin-mediated communication promotes neuroprotection during acute degeneration induced by mechanical trauma," **PlusS One**, vol. 7, no. 9, 2012.
- [8] L. T. A. Souza *et al.* "Lipolytic potential of *Aspergillus japonicus* LAB01: Production, Partial Purification, and Characterisation of an extracellular lipase", **Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International**, vol. 2014, pp. 11, 2014.
- [9] Z. Shu, J. Yang, and Y. Yan. "Purification and Characterization of a Lipase from *Aspergillus niger* F044", **Chinese Journal of Biotechnology**, vol. 23, n. 1, pp. 96-101, 2007.
- [10] J. B. Macris, E. Kourntzi, and D. G. Hatzinikolaou. "Studies on localization and regulation of lipase production by *Aspergillus niger*", **Process Biochemistry**, vol. 8, pp. 807-812, 1996.

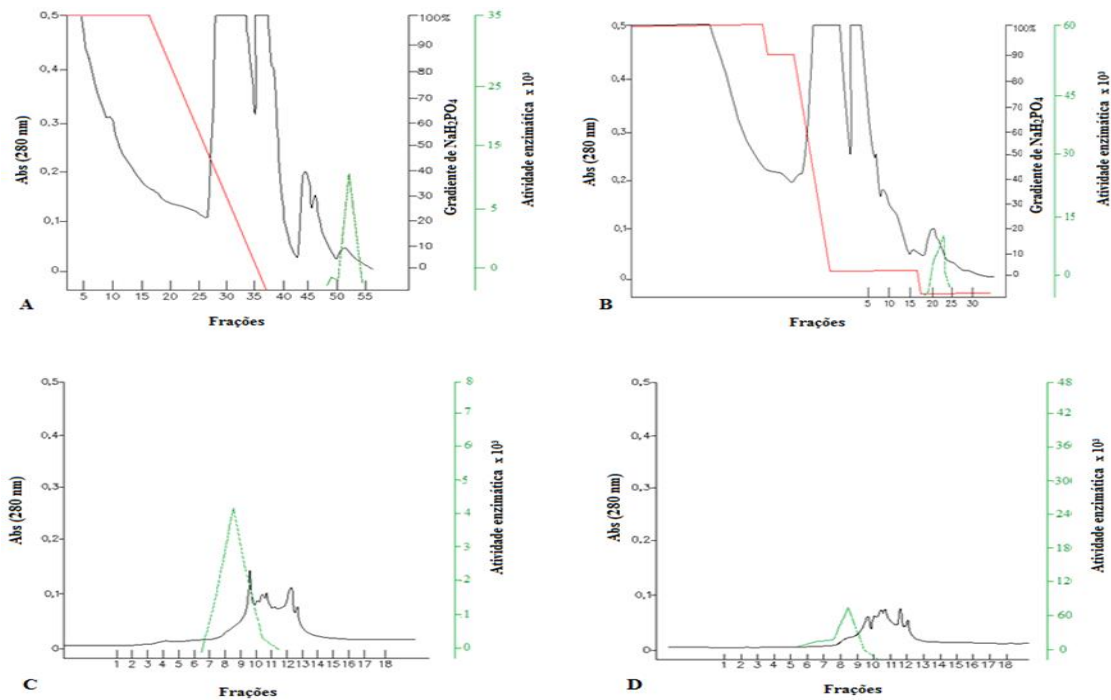


Figura 1: Perfis cromatográficos das amostras de A e B gerados durante o processo de purificação parcial do extrato bruto derivado do caldo da FSM. Em **A**, cromatograma da coluna de interação hidrofóbica da amostra A. Em **B**, cromatograma da coluna de interação hidrofóbica da amostra de B. Em **C**, cromatograma da coluna de filtração molecular da amostra A. Em **D**, cromatograma da coluna de filtração molecular da amostra de B. A linha pontilhada em verde corresponde às frações que apresentaram atividade enzimática.

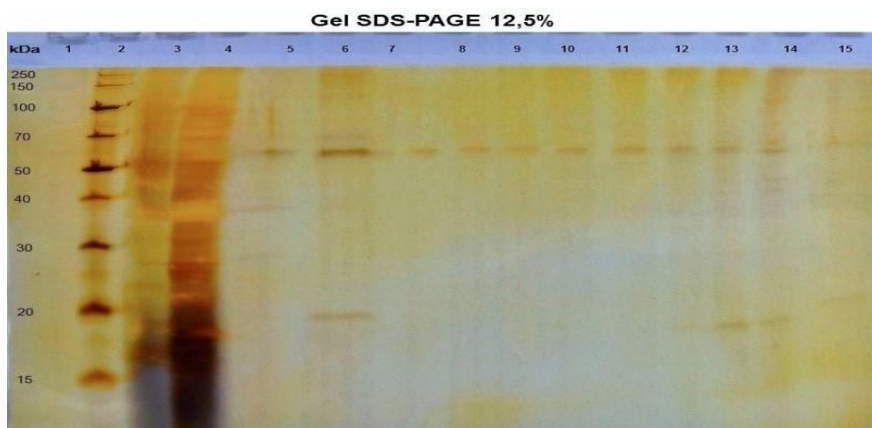


Figura 2: Gel de SDS-PAGE 12,5%. Canaletas 7, 8, 9 e 10 correspondem às frações da coluna de filtração molecular da amostra B; Canaletas 11, 12, 13, 14 e 15 correspondem às frações da coluna de filtração molecular da amostra A.