



**Universidade Federal Rural de Pernambuco**  
**Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação**  
**Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal**

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E PURIFICAÇÃO DE FITASE**  
**PRODUZIDA POR *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924**

**JÚLIO CÉZAR DOS SANTOS NASCIMENTO**

**Recife, 2011**

**Universidade Federal Rural de Pernambuco**  
**Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação**  
**Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal**

**JÚLIO CÉZAR DOS SANTOS NASCIMENTO**

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E PURIFICAÇÃO DE FITASE**  
**PRODUZIDA POR *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de **MESTRE** em Biociência Animal na área de concentração de Biotecnologia e Microbiologia Aplicada.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Tatiana Souza Porto

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Recife, 2011

Ficha catalográfica

N244p Nascimento, Júlio César dos Santos  
Produção, caracterização bioquímica e purificação de fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 / Júlio César dos Santos Nascimento. -- 2011.  
115 f.: il.

Orientadora: Tatiana Souza Porto.  
Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) –  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento  
Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2011.  
Referências.

1. Fitase 2. *Aspergillus niger* var. *phoenicis* 3. Sistemas de duas fases aquosas 4. Caracterização bioquímica  
I. Porto, Tatiana Souza, orientadora II. Título

CDD 591.192

**JÚLIO CÉZAR DOS SANTOS NASCIMENTO**

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E PURIFICAÇÃO DE FITASE  
PRODUZIDA POR *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatiana Souza Porto  
(Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristina Maria de Souza Motta  
(Departamento de Micologia – UFPE)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares  
(Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Polyanna Nunes Herculano  
(Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE)

Data da aprovação: 28 de Fevereiro de 2011

Recife, 2011

**A Deus, fonte de todo conhecimento e  
sabedoria, dedico**

*“Confie no **SENHOR** de todo o teu coração e não se apóie no seu próprio entendimento; Reconhece-o em todos os teus caminhos e Ele endireitará as tuas veredas”.*

*Salomão em Provérbios 3:5-6*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatiana Souza Porto pela orientação e competência. À minha co-orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Figueiredo Porto, pelos ensinamentos e pela oportunidade de ingresso no campo da pesquisa científica. À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pelo financiamento deste projeto. À Dra. Daniela de Araújo de Viana Marques pelos muitos ensinamentos durante o período de iniciação científica. À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares, pela orientação durante o período de estágio docência, juntamente com todos que formaram as turmas SV<sub>1</sub> e SV<sub>3</sub>, 2º período de Medicina Veterinária 2010.1 (UFRPE). Tive um imenso aprendizado com vocês.

.Aos meus pais, que sempre me ensinaram a vida, fornecendo oportunidades de estudo e crescimento tanto como ser humano, como profissional. A eles, meus agradecimentos mais sinceros. Também, a todos os meus familiares que me apoiaram na minha carreira acadêmica. Sem a força de vocês, eu não teria conseguido chegar até aqui. À minha namorada, Inês Oliveira, pelo amor, paciência e, sobretudo, pelo incentivo. Eu te amo, minha dádiva.

Aos colegas de turma do mestrado em Biociência Animal, pela amizade e cooperação. Aos parceiros do Laboratório de Tecnologia de Bioativos (LABTECBIO), especialmente Milena Fernandes, Sheylla Araújo, Carla Lêdo, Eduardo Santos, Iêda Cabral, Laura Trajano, Polyanna Herculano, Thiago Nascimento, Tatiana Liu, Camila Porto, Luiza Neves e Flávio Silva. Muito obrigado pela vossa cooperação!

Ao Grupo FAMÍLIA, formado por Alane Moura, Diogo Santos, Leidiane Arcanjo, Marliene Ruth, Rilson Joás, Tiago Lima e Samelly Oliveira. Vocês são de extrema importância para mim. Em suma, a todos os meus amigos que estiveram comigo durante este período da minha formação acadêmica.

E finalmente, à pessoa mais importante, em todas as áreas da minha vida: meu Deus. Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas. Glória, pois a Ele eternamente, amém!

## SUMÁRIO

SUMÁRIO .....	II
LISTA DE FIGURAS .....	VI
LISTA DE TABELAS .....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	IX
Resumo.....	X
Abstract.....	XI
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1. Objetivo Geral .....	4
2.2. Objetivos Específicos .....	4
3.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1 A Utilização de Enzimas na Nutrição Animal .....	5
3.2 Fitases .....	7
3.3 Fitato .....	12
3.4 Sistemas de Duas Fases Aquosas .....	16
4.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	20
CAPÍTULO 1 .....	29
Produção de Fitase por <i>Aspergillus niger</i> var. <i>phoenicis</i> URM 4924 Utilizando Planejamentos Fatoriais.....	29
Resumo .....	31
Abstract .....	32
INTRODUÇÃO .....	33
MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
Micro-organismo .....	35
Meios de Culturas .....	35

Reagentes.....	35
Preparação do Inóculo .....	35
Fermentação Submersa.....	35
Determinação da Atividade Fitásica.....	36
Determinação do Fósforo Inorgânico (P <sub>i</sub> ).....	36
Planejamentos Fatoriais para a Produção de Fitase.....	36
Resultados e Discussão.....	37
Conclusão .....	47
Agradecimentos .....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
CAPÍTULO 2 .....	52
Caracterização Bioquímica de Fitase Produzida <i>Aspergillus niger</i> var. <i>phoenicis</i> URM 4924.....	52
Resumo .....	54
Abstract .....	55
INTRODUÇÃO .....	56
MATERIAL E MÉTODOS.....	57
Micro-organismos.....	57
Produção do Extrato Bruto Enzimático .....	57
Determinação da Atividade Fitásica.....	57
Determinação do Fósforo Inorgânico (P <sub>i</sub> ).....	58
Determinação da Temperatura Ótima e Estabilidade à Temperatura .....	58
Determinação do pH Ótimo e Estabilidade ao pH.....	58
Estudo dos Parâmetros Cinéticos .....	58
Efeito dos Íons .....	59
Efeito de Substâncias Moleculares .....	59
Teste de Seletividade quanto ao Substrato .....	59

RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	60
Temperatura Ótima .....	60
Estabilidade à Temperatura .....	61
pH Ótimo .....	63
Estabilidade ao pH .....	64
Constante de Michaelis-Menten e Velocidade Máxima.....	65
Efeito de Íons .....	67
Efeito de Substâncias Moleculares .....	69
Afinidade Quanto ao Substrato .....	70
CONCLUSÃO .....	71
Agradecimentos .....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
CAPÍTULO 3 .....	76
Partição e Purificação de Fitase Produzida por <i>Aspergillus niger</i> var. <i>phoenicis</i> URM 4924 Utilizando Sistemas de Duas Fases Aquosas PEG/Citrato.....	76
Resumo .....	78
Abstract .....	79
INTRODUÇÃO .....	80
MATERIAL E MÉTODOS.....	81
Reagentes.....	81
Micro-organismo e Inóculo.....	81
Preparação do Sistema de Duas Fases Aquosas.....	81
Determinação do Conteúdo Protéico e da Atividade Fitásica .....	81
Planejamento Experimental .....	82
Metodologia de Análise dos Resultados .....	82
RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	83
CONCLUSÃO .....	94

Agradecimentos .....	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Hidrólise enzimática catalisada pela fitase na molécula do ácido fítico.	8
<b>Figura 2.</b> Estrutura molecular do ácido fítico ( <i>mio</i> -inositol - 1,2,3,4,5,6 hexafosfato).	13
<b>Figura 3.</b> Interação química entre o ácido fítico, cátions e aminoácidos.	15
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>Figura 1.1.</b> Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis para produção de fitase (%FC - concentração da fonte de carbono e %FN - concentração da fonte de nitrogênio).	45
<b>Figura 1.2.</b> Gráfico de projeção de superfície de resposta para a produção de fitase realizada em função dos fatores experimentais: concentração da fonte de carbono (%FC) e concentração da fonte de nitrogênio (%FN).	46
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>Figura 2.1.</b> Efeito da temperatura na atividade da fitase produzida por <i>Aspergillus niger</i> var. <i>phoenicis</i> URM 4924.	60
<b>Figura 2.2.</b> Estabilidade à temperatura da fitase produzida por <i>Aspergillus niger</i> var. <i>phoenicis</i> URM 4924.	61
<b>Figura 2.3.</b> Efeito do pH na atividade da fitase produzida por <i>Aspergillus niger</i> var. <i>phoenicis</i> URM 4924.	63
<b>Figura 2.4.</b> Estabilidade ao pH da fitase produzida por <i>Aspergillus niger</i> var. <i>phoenicis</i> URM 4924.	64
<b>Figura 2.5.</b> Gráfico duplo-recíproco para a hidrólise do fitato de sódio catalisado pela fitase produzida por <i>Aspergillus niger</i> var. <i>phoenicis</i> URM 4924.	66

**Capítulo 3**

- Figura 3.1.** Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta o coeficiente de partição ( $K$ ). 85
- Figura 3.2.** Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos da interação entre concentração de citrato e massa molar do PEG ( $C_{CIT}$  e  $M_{PEG}$ ) obtendo como variável-resposta o coeficiente de partição ( $K$ ). 87
- Figura 3.3.** Gráfico de Pareto dos efeitos principais, obtendo como variável-resposta a recuperação em atividade da fitase (% $REC$ ). 89
- Figura 3.4.** Gráfico cúbico das variáveis ( $M_{PEG}$ ,  $C_{CIT}$  e pH) em função da resposta recuperação em atividade (% $REC$ ) da fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924. 90
- Figura 3.5.** Gráfico de Pareto dos efeitos principais, obtendo como variável-resposta o aumento de pureza ( $AP$ ) da fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924. 91
- Figura 3.6.** Gráfico cúbico das variáveis concentração de citrato, concentração do PEG e massa molar do PEG ( $C_{CIT}$ ,  $C_{PEG}$  e  $M_{PEG}$ ) em função da resposta aumento da pureza ( $AP$ ) da fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924. 92
- Figura 3.7.** Representação gráfica do aumento de pureza ( $AP$ ) da fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 em relação à concentração de citrato e massa molar do PEG. 94

## LISTA DE TABELAS

## CAPÍTULO 1

- Tabela 1.1.** Resultados do planejamento fatorial ( $2^2$ ) para avaliar a influência das variáveis da concentração da fonte de carbono (%FC) e concentração da fonte de nitrogênio (%FN) na produção de fitase (U/mL) por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924. 39
- Tabela 1.2.** Efeito calculado das respostas do planejamento fatorial  $2^2$  para produção de fitase por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924. 40
- Tabela 1.3.** Produção de fitase (U/mL) obtida no caminho da máxima inclinação por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924. 42
- Tabela 1.4.** Produção de fitase por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 obtida nos ensaios de metodologia de superfície de resposta. 43

## CAPÍTULO 2

- Tabela 2.1.** Resultados do estudo do efeito de ativação ou inibição de cátions na atividade da fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924. 68
- Tabela 2.2.** Resultados dos testes de ativação ou inibição da fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924. 69

## CAPÍTULO 3

- Tabela 3.1.** Condições e resultados do planejamento fatorial completo ( $2^4$ ) para purificação de fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 por SDFA. 84

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- AP* – Aumento de pureza
- BDA – Batata dextrose ágar
- BSA – Albumina de soro bovino
- $C_{PEG}$  – Concentração do PEG
- $C_{CIT}$  – Concentração de citrato
- E.C. – Enzyme Commission
- FN* – Fonte de nitrogênio
- $IP_x$  – Fosfatídeos de inositol
- kDa – Quilodaltons
- $M_{PEG}$  – Massa molar do PEG
- K* – Coeficiente de partição
- $K_m$  – Constante de Michaelis-Menten
- $P_i$  – Fósforo inorgânico
- PEG – Polietileno glicol
- ppm – Partes por milhão
- SDFA – Sistema de duas fases aquosas
- URM – Universidade Recife Micologia
- $V_{máx}$  – Velocidade máxima
- %*REC* – Recuperação da atividade enzimática
- %*FN* – Concentração da fonte de nitrogênio
- %*FC* – Concentração da fonte de carbono

## Resumo

Durante o amadurecimento, sementes de legumes e cereais acumulam quantidade substancial de ácido fítico, representando mais de 60% do fósforo total dos mesmos. O fitato serve como fonte de energia para a germinação da semente, sendo pouco disponível para animais não-ruminantes, pois esses não sintetizam a fitase. Devido à indisponibilidade biológica do fósforo fítico em diversos alimentos de origem vegetal, as pesquisas têm buscado por fontes alternativas de fósforo, visando um melhor aproveitamento. Inseridas neste contexto estão as fitases, que formam um grupo de enzimas que catalisam reações graduais de defosforilação do fitato. Para a purificação de enzimas os sistemas de duas fases aquosas (SDFA) têm sido amplamente usados para separação de proteínas por conta do seu baixo custo quando comparado a outros processos de purificação. O objetivo deste trabalho foi a avaliação das variáveis que influenciam a produção e purificação da enzima por sistemas de duas fases aquosas, bem como a determinação das características bioquímicas de fitase produzidas por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924. Os meios de cultivo para a produção de fitases foram estudados utilizando planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta. A melhor condição para a produção de fitase (8,80 U/mL) foi encontrada combinando 1,25% de farelo de arroz e 3,0% de milhocina. A fitase apresentou temperatura ótima a 60°C e manteve 38,4% da atividade residual a 90°C por 120 minutos. O pH ótimo foi 5,0, e permaneceu com mais de 80% da atividade residual na faixa de pH 5,0 a 9,0 por 15 horas. A fitase apresentou constante de afinidade de 0,12  $\mu\text{M}$  e velocidade máxima de 7,9  $\eta\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ . As melhores condições de extração em sistemas de duas fases aquosas foram obtidas com 26% (m/m) de PEG 8000 (g/mol), pH 8,0 e 12% (m/m) de citrato promovendo assim, aumento de pureza de 7,58, coeficiente de partição de 3,62 e recuperação de 113,4%. A extração utilizando SDFA PEG/citrato demonstrou ser promissora para purificação de fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924, podendo ser aplicada na composição de rações de animais não-ruminantes.

**Palavras-chave:** Fitase, *Aspergillus niger* var. *phoenicis*, fermentação submersa, caracterização bioquímica, sistemas de duas fases aquosas.

## Abstract

During ripening, vegetable seeds and grain accumulated substantial amount of phytic acid, representing over 60% of total phosphorus in them. Phytate acts as an energy source for seed germination and is rarely available for non-ruminants, since they do not synthesize the enzyme. Due to the unavailability of biological organic phosphorus in many vegetable foods, research has sought alternative sources of phosphorus in order to better use. Incorporated in this context are the phytases, which form a group of enzymes that catalyze reactions gradual dephosphorylation of phytate. For enzyme purification the aqueous two-phase systems (ATPS) have been widely used for protein separation due to its low cost compared to other purification processes. The aim of this study was to evaluate the variables that influence production and purification of phytase by aqueous two-phase systems, as well as the biochemical characteristics of phytase produced by *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924. The culture medium for the production of phytase were studied using factorial design and response surface methodology. The best condition for the production of phytase (8.80 U/mL) was found matching 1.25% of rice bran and 3.0% corn steep liquor. The optimum pH was 5.0, and remains at over 80% of residual activity at pH 5.0 to 9.0 for 15 hours. The phytase showed affinity constant of 0.12 mM and maximum velocity of 7.9  $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ . The best conditions of extraction in aqueous two-phase systems were obtained with 26% (w/w) PEG 8000 (g/mol), pH 8.0 and 12% (w/w) citrate thus promoting purification factor of 7.58, partition coefficient of 3.62 and yield of 113.4%. The extraction using ATPS PEG/citrate proved to be promising for purification of phytase produced by *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 and may be applied in the composition of animal feed non-ruminants.

**Key-words:** Phytase, *Aspergillus niger* var. *phoenicis*, submerged fermentation, biochemical characterization, aqueous two phases systems.

## 1. INTRODUÇÃO

Durante o amadurecimento, sementes de legumes e cereais acumulam uma quantidade substancial de ácido fítico [(ácido *mio*-inositol 1,2,3,4,5,6-hexafosfórico ou 1,2,3,4,5,6 hexaquis (diidrogênio fosfato) *mio*-inositol) - (C<sub>6</sub>H<sub>18</sub>O<sub>24</sub>P<sub>6</sub>)]. Como resultado, a maioria dessas sementes e seus co-produtos contem ácido fítico, o qual representa mais de 60% do fósforo total dos mesmos. Deste modo, uma grande porção, se não toda, do ácido fítico em sementes está na forma de sais chamados genericamente de fitatos. Além disso, o fitato serve como a maior fonte de energia e fósforo para a germinação da semente, sendo pouco disponível para animais não-ruminantes, pois esses animais não sintetizam ou produzem em pequenas quantidades a fitase, enzima responsável pela hidrólise do fitato para posterior absorção do fósforo inorgânico. Desta maneira, o ácido fítico apresenta-se como um forte agente quelante de minerais essenciais, tais como cálcio, magnésio e zinco, sendo caracterizado como um fator anti-nutricional por diminuir a disponibilidade de minerais e outros nutrientes (LEI e PORRES, 2003).

Os ingredientes de origem vegetal utilizados na formulação de ração para animais não-ruminantes, como o milho e o farelo de soja, possuem grande parte do conteúdo de fósforo indisponível, pois é constituinte da molécula do fitato. O fósforo fítico não é aproveitado, sendo necessária a adição de maiores quantidades de fósforo inorgânico na dieta para atender às exigências dos animais em fósforo. Desta forma, há um aumento de fósforo nas excretas de animais não-ruminantes, tanto pela perda de fósforo fítico complexado na molécula do fitato, quanto pelo fósforo não-aproveitado na forma orgânica (PEREIRA, 2010)

O fósforo inorgânico, um mineral não-renovável e dispendioso, é suplementado em dietas de suínos, aves e peixes para atender os requerimentos nutricionais de fósforo. Enquanto isso, o fósforo fítico inutilizado das sementes é excretado nas fezes, tornando-se um poluente ambiental em regiões de intensa produção avícola e suinícola. O excesso de fósforo nos solos pode acarretar a contaminação dos lagos e mares, já que a quantidade de fósforo nas excretas dos animais, quando lançadas ao meio ambiente, pode provocar a poluição do solo e dos mananciais, causando eutrofização (LIGEIRO, 2007).

Fitases formam um grupo de hidrolases que catalisam a defosforilação do ácido fítico a fosfato inorgânico e derivados de inositol fosfatos, promovendo assim, a absorção do fósforo indisponível para animais não-ruminantes, e também contribuindo para a diminuição da excreção do fósforo no meio ambiente (DAHIYA et al., 2009).

O desenvolvimento dos processos fermentativos concentrou-se especificamente na produção de enzimas através do uso de linhagens microbianas produtoras selecionadas, permitindo a obtenção de enzimas purificadas. A produção de enzimas extracelulares sob fermentação tem sido reportada em diversas espécies de fungos filamentosos como resposta a determinados estímulos ambientais, pela expressão de genes e posterior secreção das enzimas formadas (COLÉN, 2006).

Após a fermentação e extração, as enzimas podem ser separadas e purificadas do meio por diversos processos, tais como centrifugação, filtração, precipitação fracionada, separação cromatográfica, separação por membranas, liofilização ou pela combinação desses e de outros métodos menos dispendiosos, tal como o sistema de duas fases aquosas. O grau de pureza necessário da enzima depende de sua aplicação final, sendo determinado pelas características físico-químicas, propriedades biológicas, fonte da qual a enzima está sendo purificada e tecnologia de purificação disponível (PESSOA JR. e KILIKIAN, 2001).

Sistemas de duas fases aquosas (SDFA) têm sido amplamente usados para separação de proteínas por conta do seu baixo custo quando comparado a outros processos de purificação. Existem diversas variáveis que produzem interferência na formação dos sistemas bifásicos, tais como o tipo do polímero e do sal, força iônica e pH do meio, somado com as características inerentes a biomolécula alvo (tamanho, carga e hidrofobicidade), sendo portanto, as variáveis que mais influenciam a partição das moléculas estudadas.

O SDFA tem sido empregado em diversas áreas na indústria biotecnológica para purificação de várias biomoléculas, sendo considerada promissora para a obtenção de enzimas industriais em grande escala, pois possibilita uma minimização da desnaturação das proteínas por se tratar de um sistema aquoso, entre outras vantagens, tendo como objetivo principal um alto rendimento em recuperação em atividade enzimática e também bom aumento de pureza para a biomolécula-alvo,

favorecendo a partição da proteína desejável para uma das fases do sistema (PORTO, 2008; DYR e SUTTNAR, 1997).

A extração líquido-líquido é um método de purificação classificado como de baixa resolução, quando comparado a outros métodos mais acurados, fato esse que é desejável para aplicação na indústria da nutrição animal, pois as enzimas são específicas em suas reações, determinando que os aditivos alimentares que contenham um único tipo de enzima sejam insuficientes para produzir o máximo benefício, sugerindo que misturas de enzimas sejam mais efetivas no aproveitamento dos nutrientes que estão inclusos nas dietas. A vantagem de utilizar SDFA para extrair e purificar fitase produzida por *Aspergillus* está no fato de ser um sistema de purificação de baixo custo, se mostrando possível de ser aplicado para a purificação de fitases que podem ser utilizadas na alimentação de animais não-ruminantes, aumentando os índices produtivos e concomitantemente, diminuindo os gastos da produção animal, tornando a atividade mais lucrativa.

Diante do exposto, este trabalho investigou a produção, caracterização bioquímica e aplicação dos sistemas de duas fases aquosas na purificação de fitase produzida pelo fungo filamentoso *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924.

Foram determinadas as características bioquímicas, tais como, temperatura e pH ótimo, estabilidade frente ao pH e temperatura, propriedades cinéticas, bem como a produção de fitases utilizando planejamentos fatoriais. Atualmente, fitases oriundas de uma grande diversidade de micro-organismos vêm sendo estudadas e purificadas, no entanto a purificação de fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* ainda não foi relatada na literatura.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Estudar as variáveis que influenciam a produção de fitase por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924, caracterização bioquímica e purificação da enzima no extrato bruto enzimático.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Determinar as melhores condições do meio de cultivo para a produção de fitase utilizando planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta (MSR), avaliando a influência da concentração da fonte de carbono (%FC) e da fonte de nitrogênio (%FN);
- Estudar no extrato bruto enzimático as características bioquímicas, tais como temperatura ótima, estabilidade à temperatura, pH ótimo, estabilidade ao pH, influência de íons, inibidores e ativadores moleculares, parâmetros cinéticos ( $K_m$  e  $V_{máx}$ ) e seletividade quanto ao substrato da fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924.
- Estudar a influência das variáveis massa molar do PEG ( $M_{PEG}$ ), concentração do PEG ( $C_{PEG}$ ), concentração do citrato ( $C_{CIT}$ ) e pH na extração de fitases, utilizando sistemas de duas fases aquosas, com o auxílio de planejamento fatorial completo  $2^4$ , obtendo como variáveis-resposta o coeficiente de partição ( $K$ ), a recuperação em atividade (%REC) e o aumento de pureza (AP).

### 3.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 A Utilização de Enzimas na Nutrição Animal

O grande dinamismo da produção animal brasileira, dentre outros fatores, está diretamente relacionado à excelente capacidade dos profissionais da nutrição animal de formular dietas de qualidade e a custo reduzido, como também a um setor empresarial empreendedor, eficiente e, portanto, bastante competitivo. Para tanto, a utilização de modernos compostos, advindos da biotecnologia, é primordial, pois podem aumentar a produtividade, desta forma reduzindo os custos de produção (ARAÚJO, 2005).

Na atividade avícola, a alimentação representa cerca de 70% dos custos de produção, tendo como agravante, o fato de que no Brasil, os principais ingredientes utilizados nas dietas das aves, o milho e a soja, são produtos também consumidos pelo homem. Desta maneira, tem se intensificado a busca por alimentos alternativos e aditivos alimentares que possam suprir as necessidades das aves reduzindo ainda mais os custos de produção, sem comprometer o desempenho zootécnico das mesmas, tais como rendimento de carcaça, ganho de peso, conversão alimentar, índice de postura (VIDAL, 2009; ARAÚJO, 2005).

Segundo o decreto lei nº 76.896 de 06 de janeiro de 1976, atualmente em vigor, define-se como aditivo alimentar toda a substância intencionalmente adicionada ao alimento, com a finalidade de conservar, intensificar ou modificar as suas propriedades, desde que não prejudique o seu valor nutricional. Os aditivos enzimáticos não possuem função nutricional direta, mas auxiliam o processo digestivo melhorando a digestibilidade dos nutrientes presentes na dieta animal. (CAMPESTRINI et al., 2005).

Inserida dentre o grupo dos aditivos alimentares estão as enzimas exógenas que são definidas como proteínas globulares, de estrutura terciária ou quaternária, que agem como catalisadores biológicos, aumentando a velocidade das reações químicas no organismo, sem serem elas próprias alteradas nesse processo. São altamente específicas para os substratos e dirigem todos os eventos metabólicos. As enzimas digestivas têm um sítio ativo que permitem que elas atuem na ruptura de determinada ligação química sob condições favoráveis de temperatura, pH e umidade. A utilização de enzimas exógenas como aditivo alimentar tem por objetivo aumentar a disponibilidade dos nutrientes presentes nos alimentos. Os aditivos

enzimáticos não possuem função nutricional direta, mas auxiliam o processo digestivo, melhorando a digestibilidade dos nutrientes presentes na dieta (YIN et al., 2001).

No mercado, encontram-se vários tipos de enzimas com substratos de ação diferentes, assim como complexos enzimáticos compostos por diversas enzimas. Dentre as principais funções da suplementação com enzimas exógenas nas rações dos animais monogástricos, destacam-se: a remoção ou destruição de fatores anti-nutricionais presentes nos alimentos de origem vegetal, o aumento da digestibilidade das dietas, a potencialização da ação das enzimas endógenas e a redução da poluição ambiental causada pela excreção de nutrientes (GUIMARÃES et al., 2009).

A comprovada eficiência das enzimas em dietas à base de alimentos alternativos tem estimulado o uso destes aditivos alimentares, representando um dos principais avanços no campo da nutrição. O principal objetivo da utilização de um complexo enzimático em dietas à base de milho e soja é aproveitar ao máximo, os nutrientes inseridos na dieta e, com isso, melhorar os resultados zootécnicos dos animais, como por exemplo, estes que não sintetizam ou produzem em quantidades insuficientes certas enzimas endógenas, utilizadas para a digestão dos vários componentes químicos encontrados nos alimentos de origem vegetal ou para atuarem em alguns fatores anti-nutricionais (MURAKAMI et al., 2007; COSTA et al., 2007).

Nesse sentido, as enzimas são excelentes alternativas para reduzir os custos de produção de animais não-ruminantes, uma vez que há uma melhora significativa na digestibilidade dos alimentos, permitindo alterações nas formulações das rações de forma a minimizar os gastos, maximizando o uso de ingredientes energéticos e protéicos nas rações. Mathlouthi e colaboradores (2003) obtiveram *in vitro*, uma diminuição da viscosidade dos grãos de trigo, centeio, milho e soja com o uso de uma combinação de xilanase e  $\beta$ -glucanase. Esse efeito positivo, segundo os autores, foi o responsável pela melhora no índice de conversão alimentar das poedeiras que receberam dietas suplementadas com essas enzimas.

A tecnologia das fermentações tem produzido uma grande quantidade de enzimas de origem microbiana, tais como de fungos e bactérias, que podem degradar várias formas de amido, açúcares, proteínas, celulose e outras moléculas

para uma absorção mais rápida no trato digestório dos animais (COSTA et al., 2007).

Murakami e colaboradores (2007) estudando o efeito da suplementação enzimática no desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais, concluíram que, a adição de um complexo multienzimático ao nível de 400 ppm ou 500 ppm em rações para poedeiras comerciais (29 a 49 semanas de idade) permite uma redução na densidade nutricional do farelo de soja em até 7% em relação ao nível protéico e aminoacídico, e 9% em relação ao nível energético, sem comprometer os resultados produtivos e de qualidade dos ovos. Os autores concluíram ainda que a inclusão de complexos enzimáticos nas rações das aves pode maximizar o uso dos ingredientes energéticos e protéicos das rações.

Costa e colaboradores (2007) avaliaram o efeito da fitase nas rações de frangos de corte, durante as fases pré-inicial, de um a sete dias, e inicial de oito a vinte e um dias de idade. Os autores concluíram que a adição da fitase nas rações dos frangos de corte nas fases pré-inicial e inicial apresentou resultados superiores para desempenho em relação às rações sem adição da enzima.

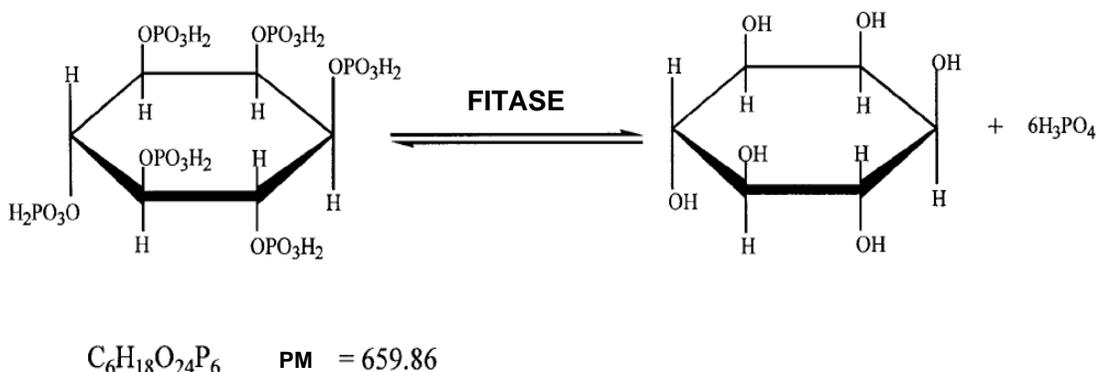
Considerando o aumento da digestibilidade dos nutrientes da ração após a adição de um complexo enzimático, será possível fazer um ajuste adequado dos nutrientes na formulação e atender as exigências nutricionais dos animais não-ruminantes em diferentes categorias, sendo também possível reduzir o custo da ração. A adição de enzimas exógenas em rações contendo ingredientes com alta porcentagem de polissacarídeos não-amiláceos e fatores anti-nutricionais melhora a digestibilidade dos nutrientes e, conseqüentemente, exerce um efeito positivo sobre o desempenho de suínos e aves (HANNAS e PUPA, 2007).

### 3.2 Fitases

Diversos tipos de processamento de alimentos e técnicas de preparação requerem à adição de enzimas exógenas, cujo objetivo é promover a redução do teor de fitato nos alimentos. A hidrólise do fitato durante o processamento dos alimentos é um resultado da degradação química pela atividade enzimática da fitase. Entretanto, as fitases têm importante aplicação na nutrição animal, tanto na degradação do fitato, tanto no processamento de alimentos, como no trato gastrointestinal. No entanto, a capacidade de defosforilação do fitato (Figura 1)

difere grandemente entre diferentes espécies de microorganismos e vegetais, devido à diferença nas suas propriedades bioquímicas em relação ao processo de hidrólise do ácido fítico (EGLI et al., 2002).

As fitases formam um grupo de enzimas que são quimicamente definidas como *mio*-inositol (1,2,3,4,5,6) hexafosfato fosfohidrolases que catalisam a liberação sequencial do fósforo oriundo da molécula de ácido fítico. As fitases retiram os grupamentos ortofosfatos do anel inositol do ácido fítico para produzir fósforo inorgânico livre ( $P_i$ ) (DEBNATH et al., 2005). O fitato possui seis grupos que podem ser liberados, dependendo da fitase utilizada, em velocidades e ordem diferentes. As fitases sintetizadas por fungos filamentosos e pela bactéria *Escherichia coli* conseguem liberar somente cinco dos seis grupos, sendo que os produtos finais são *mio*-inositol 2-monofosfato (WYSS et al., 1999).



**Figura 1.** Hidrólise enzimática catalisada pela fitase na molécula do ácido fítico (Reproduzido de KRISHNA e NOKES, 2001).

Fitases não somente liberam o fósforo de materiais dietéticos de origem vegetal, mas também tornam mais disponível o cálcio, magnésio, proteínas e lipídeos. Desta maneira, pela liberação do fósforo ligado em ingredientes de origem vegetal, tornam o fósforo mais disponível para o crescimento ósseo e protege o meio ambiente contra a contaminação pelo excesso de fósforo livre (BARUAH et al., 2007).

A fitase microbiana tornou-se disponível comercialmente em 1991 (Natuphos<sup>®</sup>, produzida por *A. niger*), quando a legislação introduzida nos Países Baixos para controlar a poluição de fosfatos em unidades de criação de suínos e aves amplificou seu desenvolvimento e aceitação. O que antes era mais restrito aos países que

adotavam essa legislação tornou-se globalmente utilizado com o reconhecimento do perigo ecológico da eutrofização, especialmente na última década. Além disso, essa proliferação das fitases no mercado gerou redução de preços e facilidades na aplicação da criação de animais não-ruminantes (KUMAR et al., 2010).

Com a proibição da adição de farelos de carne e ossos de animais na criação de não-ruminantes, houve um novo incentivo. Esses farelos, que foram proibidos na União Européia em 2000, forneciam 57% do fósforo adicionado às rações. Essa proibição teoricamente gerou uma demanda de 110 mil toneladas de fósforo excedente, mas a utilização da fitase microbiana reduziu essa demanda para 26 mil toneladas (SELLE e RAVINDRAN, 2007). Seguindo a trajetória da fitase comercial no mercado, a sua aceitação como suplemento na alimentação animal começou a ganhar atenção mundial (YI et al., 1996). Contudo, seu potencial na nutrição humana (SILVA et al., 2005) e em outras áreas, tais como aquicultura (YOO et al., 2005) estão também sendo extensamente explorados.

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) lista dois tipos de fitases, as quais tem sido classificadas em dois grupos, dependendo do local onde a hidrólise da molécula do fitato é iniciada e também, no pH da atividade (SELLE et al., 2007). Podem ser categorizadas em 3-fitases e 6-fitases. As 3-fitases (EC 3.1.3.8) são denominadas sistematicamente como *mio*-inositol hexaquis fosfato-3-fosfohidrolase atuando na hidrólise da ligação éster na terceira posição do IP<sub>6</sub> em IP<sub>5</sub> e ortofosfato livre (VATS e BANERJEE, 2004). No entanto, as 6-fitases (EC 3.1.3.26) são designadas quimicamente como *mio*-inositol hexaquis fosfato-6-fosfohidrolase, promovendo a catálise hidrolítica da ligação éster na sexta posição do IP<sub>6</sub>. Recentemente, isto foi reportado para a fitase produzida por *A. niger* que mostra atividade 3-fitase, enquanto *Peniophora lycii* e *Escherichia coli* apresentam uma atividade 6-fitase (SELLE et al., 2007).

As fitases também podem ser categorizadas dentro de duas classes de acordo com o perfil de pH ótimo: fosfatases ácidas histidinas e fitases alcalinas. Fosfatases ácidas histidinas mostram uma atividade de pH ótimo na faixa de 5,0, enquanto as fosfatases alcalinas se mostram mais ativas na faixa de pH próximo a 8,0 (BARUAH et al., 2007). Exceto as fitases produzidas pelo gênero *Bacillus*, a maioria das enzimas degradadoras de fitato, tais como fitases vegetais, pertencem ao tipo acidófilo (SELLE et al., 2007). Além disso, o maior foco tem sido nas fitases

ácidas devido a sua aplicabilidade na nutrição animal e possuir uma maior especificidade quanto ao substrato quando comparadas as fitases alcalinas (KUMAR et al., 2010).

De acordo com Kumar e colaboradores (2010), em geral, as enzimas fitases são encontradas de quatro fontes possíveis: fitases vegetais, fitases microbianas (oriundas de bactérias, leveduras e fungos filamentosos), fitase de mucosa, a qual é produzida pelas células da mucosa do intestino delgado, e a fitase microbiana visceral-associada, produzida pela microflora no intestino grosso.

A fitase já foi encontrada em várias fontes vegetais, como trigo, milho, algumas ervas, arbustos, alfaces, centeio e sementes oleaginosas, sendo que a atividade mais alta foi encontrada no trigo (*Triticum aestivum*), no centeio (*Secale cereale*) e na cevada (*Hordeum vulgare*). As fitases obtidas de sementes em germinação e polén têm sido purificadas e caracterizadas. Fitase alcalina também tem sido identificada no pólen de *Lilium longiflorum*, *Typha latifolia* e em sementes de legumes (ROOPESH et al., 2006). Aos vegetais, geralmente, atribuem-se baixos valores de fitase, mas Jongbloed e Kemme (1994) demonstraram que a fitase do trigo pode melhorar a digestibilidade do fósforo de 27 para 50%. Além disso, Kornegay (1996) demonstrou que a fitase do trigo atua em um limite de pH bem menor do que a fitase fúngica e ressaltou algumas vantagens, tais como maior especificidade quanto ao substrato, portanto uma menor constante de afinidade ( $K_m$ ) da fitase fúngica quando comparada a origem vegetal (FIREMAN e FIREMAN, 1998).

Apesar das fontes animais e vegetais representarem avanços científicos importantes, sua aplicação prática para produção de fitase é limitada. Em compensação, fontes microbianas apresentam características que permitem um alto rendimento e ampliação de escala, tornando-se amplamente utilizadas de maneira efetiva na indústria de rações animais. Várias espécies de fungos, bactérias e leveduras têm sido utilizadas na produção de fitases, geneticamente modificadas ou não (KIM et al., 2006).

Poucas espécies selvagens de bactérias são utilizadas para produção de fitase, principalmente devido ao baixo rendimento e por apresentarem uma faixa ótima de pH não adequada ao sistema digestivo dos animais não-ruminantes. Por isso, a busca concentra-se mais nas bactérias termo-ácidas-tolerantes. A atividade

de fitases podem ser intra ou extracelular. Quando estudada em *Enterobacter sp.*, foi detectada 81,7% de atividade na fração extracelular, 4,4% na fração periplasmática, e o restante na porção intracelular (ROOPESH et al., 2006).

Os fungos filamentosos podem colonizar uma grande variedade de ambientes, seja como saprófitos de plantas ou animais, como colonizador de tecidos vivos (parasitas), produtos de madeiras, papel e solos de composição diversa. Algumas enzimas fúngicas são de grande importância comercial, principalmente na área de alimentos, como proteases ácidas, lipases, nucleases, carboidratases, sendo poucas as enzimas intracelulares de importância. Os *Aspergillus* tem se sobressaído como o gênero mais importante para a produção comercial de enzimas (NOVAKI, 2009).

Pertencente ao filo *Ascomycota*, o gênero *Aspergillus* é de grande importância econômica. Credita-se ao gênero em torno de 250 espécies e ampla distribuição mundial, com a possibilidade de obter-se isolados em ar, solo ou água (KLICH, 2007; HEDAYATE et al., 2007). Industrialmente o gênero tem sido descrito como produtores de enzimas, fármacos, antibióticos e na fermentação de alimentos (WARD et al., 2006), sendo descrita em literatura a produção de diversas enzimas, das quais podemos destacar a  $\alpha$ -amilase, celulases, xilanases, fitases, lipases e  $\beta$ -glicosidases (DEDAVID e SILVA, 2008).

Os *Aspergillus* são muito utilizados na produção de enzimas, cerca de 200 espécies, comumente isolados do solo e de plantas em decomposição (GUIMARÃES et al., 2010). Dentre as espécies mais conhecidas encontram-se o *A. flavus*, *A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. fulmigatus*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. ustus* e *A. versicolor* (SLIVINSKI, 2007).

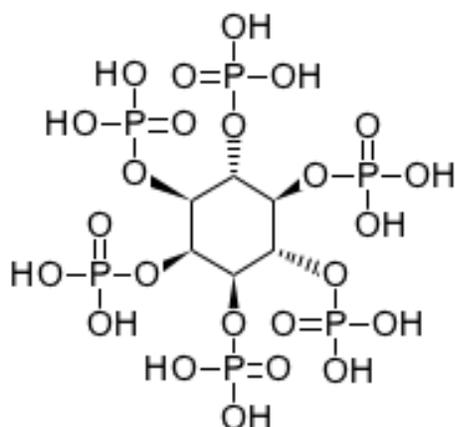
Inúmeras enzimas destes micro-organismos vêm sendo isoladas, purificadas e têm aplicabilidades nos mais diferentes ramos da indústria. Algumas espécies como *A. oryzae* e *A. soyae* são utilizadas na produção de enzimas aplicadas em alimentos. *A. oryzae* é grande produtor de  $\alpha$ -amilases,  $\alpha$ -galactosidases e enzimas pectinolíticas (SHANKAR e MULIMANI, 2007). Botella e colaboradores (2007) avaliaram a produção de xilanases e pectinases por *A. awamori* determinando um grande potencial deste micro-organismo na produção destas enzimas. A utilização dos fungos filamentosos para a produção de enzimas de interesse comercial é também vantajosa devido ao fato destes micro-organismos excretarem estas

proteínas para o meio de cultura, o que facilita o processo de obtenção e purificação destas moléculas (REIS, 2007).

Diversos trabalhos tem sido encontrados em literatura utilizando fungos filamentosos para a produção de fitase. Dentre os tais, podemos destacar: Marlida e colaboradores (2010) que estudaram a produção de fitase por fungos endofíticos e sua aplicação na alimentação animal; Gulati e colaboradores (2007) que investigaram a produção de fitase por *Mucor indicus* MTCC 6333. El-Gindy e colaboradores (2010) avaliaram a produção de fitase por *Malbranchea sulfurea* e *Aspergillus niveus*; Ramachandran e colaboradores (2005) a produção de fitase por *Rhizopus* spp.; Casey e Walsh (2003) utilizaram *Aspergillus niger* ATCC 9142 na produção de fitase.

### 3.3 Fitato

O ácido fítico é definido quimicamente como éster hexafosfórico do álcool cíclico hexaídrico *mio*-inositol, sendo também conhecido como hexafosfato de inositol (IP<sub>6</sub>), ou fitato, quando está na forma de sal, sendo o IP<sub>3</sub>, IP<sub>4</sub> e IP<sub>5</sub> também designados como fitato (Figura 2). Apresenta-se como uma estrutura de baixo peso molecular, formada por seis grupos fosfatos ligados a um álcool cicloexanopoliol, o inositol. O fitato é a principal forma de armazenamento do fósforo em tecidos vegetais, apresentando fórmula molecular C<sub>6</sub>H<sub>18</sub>O<sub>26</sub>P<sub>6</sub> e massa molecular 660,04 g.mol<sup>-1</sup> (KUMAR et al., 2010).



**Figura 2.** Estrutura molecular do ácido fítico (*myo*-inositol-1,2,3,4,5,6 hexafosfato) (Reproduzido de COSGROVE, 1969).

O ácido fítico é um complexo orgânico que ocorre em abundância nos grãos de cereais e oleaginosas, e sua principal função fisiológica nos vegetais é o armazenamento de nutrientes, principalmente de fósforo, que serão liberados pela ação de fitases endógenas à medida que ocorre a germinação da semente. Em média, 70% do fósforo total contido nos grãos de cereais e oleaginosas estão sobre a forma de fitato (CONSUEGRO, 1999). A concentração de fitato nos vegetais varia conforme o estágio de maturação, grau de processamento, tipo de cultivar, clima, disponibilidade de água, localização geográfica e quantidade de fósforo no solo, o qual a planta absorve e armazena complexando-o com o inositol para formar o ácido fítico (SEBASTIAN et al., 1998).

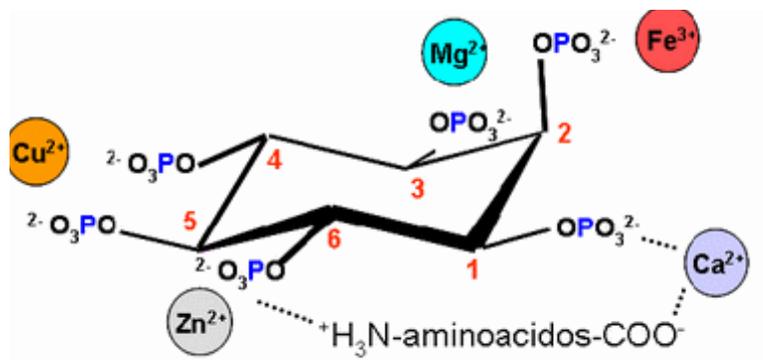
A sociedade e os regulamentos estão cada vez mais exigentes com relação ao controle da poluição agrícola, particularmente na excreção do fósforo inorgânico, fato esse, que tem levado a intensificação das pesquisas sobre a utilização das fitases. O foco tem sido principalmente sobre a produção de fitase e sua utilização como um meio de reduzir a suplementação de fosfato inorgânico na alimentação dos animais não-ruminantes e conseqüente redução na excreção fecal de fósforo. A poluição ambiental, devido ao estrume com muito fosfato, tem resultado na acumulação de fosfato em várias localizações, especialmente em corpos de água (VATS e BANERJEE, 2004).

O fósforo é um macro-mineral essencial para todos os animais. Este é necessário para várias funções no organismo, fundamental para manutenção e

reparo de todos os tecidos, e juntamente com o cálcio e outros minerais são indispensáveis para o crescimento e mineralização do tecido ósseo, assim como desenvolvimento muscular. O consumo de fósforo em níveis adequados é propício para o balanço de minerais essenciais, para o controle do apetite e eficiência alimentar. Aproximadamente 80% do fósforo do organismo animal ocorre como constituinte dos ossos, e os 20% restantes encontrados em vários compostos orgânicos que desempenham função no metabolismo (transferência de energia – ATP, creatinina e enzimas), em ácidos nucleicos, e fosfolípidos de membranas celulares. O fosfato inorgânico participa no tampão de pH dos fluidos biológicos e também apresenta função no transporte de gordura e na síntese de aminoácidos e proteínas (FRANCE et al., 2010)

O ácido fítico possui a habilidade de se ligar à proteína (Figura 3). A interação com a proteína é dependente das condições de pH, pois esta se dá por ligação iônica. Em condições de acidez, o ácido fítico possui carga negativa podendo se ligar a resíduos básicos através de uma forte interação eletrostática, resultando em um complexo insolúvel. Em pH neutro a proteína não irá se ligar ao ácido fítico, pois sua carga é neutra. Com o pH básico, o ácido fítico forma complexo com a proteína na presença de cátions bivalentes, os quais irão agir como ponte entre o grupo carboxila carregado negativamente e o ácido fítico (COUSINS, 1999).

Três terminologias são usadas na literatura para descrever os substratos da fitase. O termo mais comumente usado é o ácido fítico. Já a denominação fitato refere-se a mistura de sais do ácido fítico. No entanto, fitina, descreve especificamente ao complexo depositado de  $IP_6$  com potássio, magnésio e cálcio. Devido ao fitato ser um fator anti-nutricional nos alimentos de origem vegetal para os não-ruminantes, as fezes excretadas por estes animais apresentam altos teores de fósforo fítico e, também, nitrogênio, pois estes nutrientes presentes na molécula do fitato, somado à fonte inorgânica (fósforo) e ao aumento do nível de proteína na ração acima da exigência do animal, serão excretados (SELLE e RAVINDRAN, 2007).



**Figura 3.** Interação química entre o ácido fítico, cátions e aminoácidos (Reproduzido de BROZ et al., 1997).

A defosforilação do fitato é um pré-requisito para o aumento do valor nutricional dos alimentos através da remoção dos grupamentos ortofosfatos do anel inositol, diminuindo assim o seu poder quelante, ou seja, a força de ligação com os minerais dietéticos, em consequência disto, ocorre um aumento na disponibilidade de minerais essenciais (KUMAR et al., 2010). Esta ligação ocorre naturalmente em ingredientes de origem vegetal e podem ser formados na porção inicial do trato gastrointestinal. Vários estudos demonstraram que proteínas da soja, milho, trigo, farelo de girassol e de arroz formam complexos com ácido fítico. Outra possível interação do ácido fítico é com as enzimas endógenas, como a tripsina, quimiotripsina e amilase do trato gastrointestinal, inibindo a atividade dessas enzimas com consequente decréscimo da digestibilidade de carboidratos e proteínas (RAVINDRAN et al., 2001).

Lima e colaboradores (2007), em uma revisão, mostram que a redução da digestibilidade protéica pode ser explicado pela formação de complexos entre o fitato e as proteínas da dieta, ou ainda, se complexar com enzimas proteolíticas (tripsina e pepsina), inibindo as suas atividades. Na digestão de lipídeos dietéticos, o complexo cálcio-fitato pode reagir com ácidos graxos formando sabões insolúveis no lúmen intestinal. Na digestão de carboidratos, liga-se diretamente ao amido ou inibe a ação catalítica da amilase.

### 3.4 Sistemas de Duas Fases Aquosas

Os processos utilizados para a separação e purificação de enzimas geralmente são responsáveis por cerca de 50% a 90% do custo total de produção. Os métodos convencionais utilizados para purificação de proteínas geralmente são dispendiosos, pois envolvem várias etapas de operação, alto custo dos reagentes e são difíceis de dimensionar. Nos últimos anos tem surgido um interesse no setor da biotecnologia para o desenvolvimento de métodos de separação e purificação inovadores que sejam eficientes, econômicos e que atinjam altos graus de recuperação e pureza, mantendo a atividade biológica da molécula. Uma promissora técnica de extração e purificação, que se enquadra nestes critérios, e já vem sendo utilizada industrialmente, envolve a partição de biomoléculas entre duas ou mais fases imiscíveis nos sistemas aquosos (BOERIS, 2009; ANTOV et al., 2006).

Avanços na biotecnologia têm oferecido numerosas possibilidades para o aumento da escala de produção de muitas biomoléculas que são importantes para pesquisas, principalmente para aplicações industriais. O desenvolvimento de técnicas e métodos de separação e purificação de proteínas, entre outras moléculas tem sido de grande importância para muitos desses avanços na biotecnologia (MAZZOLA et al., 2008).

Métodos tradicionais para a purificação de biomoléculas compreendem várias etapas, tais como diálise, cromatografia de troca iônica e de afinidade, entre outros. Entretanto, a extração líquido-líquido consiste de uma alternativa de purificação interessante, pois vários processos podem ser combinados em uma simples operação. Extração líquido-líquido é a transferência de massa de certos componentes de uma fase para outra, quando fases líquidas parcialmente solúveis imiscíveis são colocadas em contato. Este processo é grandemente empregado na indústria química devido a sua simplicidade, baixo custo e facilidade no aumento da escala de produção. A purificação de biomoléculas tem sido bem sucedidamente realizada por mais de uma década. As vantagens deste tipo de sistema são baixa viscosidade, menor custos com reagentes e menor tempo de separação das fases (SIMON e OTTO, 2005).

A extração líquido-líquido trata-se de um processo bem estabelecido na indústria química, incluindo várias aplicações na indústria bioquímica tradicional,

sendo largamente utilizada para substâncias lábeis, uma vez que muitas técnicas de separação sólido-líquido usado nos processos industriais bioquímicos, tais como filtração e centrifugação, são fortemente dependentes do tamanho da partícula e são limitadas quando se trata de processamento de células bacterianas ou de resíduos celulares. A extração líquido-líquido com solventes orgânicos tem apresentado aplicação limitada no processamento de bioprodutos sensíveis como proteínas e ácidos nucleicos devido às suas baixas solubilidades no solvente orgânico e pelo efeito desnaturante deste último (COSTA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2001).

Os sistemas de duas fases aquosas foram primeiramente descritos na literatura por Beijerick (1896), quando ele descobriu que ao se misturar gelatina, ágar e água, em certas concentrações formava um sistema de duas fases, sendo a fase superior rica em gelatina e a fase inferior rica em ágar. Posteriormente, nos anos 50, Per-Aka Albertsson descobriu que o polietileno glicol (PEG), fosfato de potássio e água, e assim como o PEG, dextrana e água formavam sistemas de duas fases. Os sistemas PEG/Dextrana/Água e PEG/Sal/Água têm sido, desde então, os mais frequentemente investigados e utilizados para purificação de um grande número de biomoléculas (COSTA et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2001).

As duas fases imiscíveis em sistemas de duas fases aquosas (SDFA) são geralmente formadas pela mistura das fases acima da concentração crítica dos componentes os quais descrevem diagramas de fases para cada sistema específico (OOI et al., 2011). SDFA são aplicáveis a purificação de células, devido ao alto conteúdo aquoso, baixa tensão interfacial e biocompatibilidade ambiental. O cultivo de células microbianas em SDFA tem sido demonstrado para a extração de enzimas, tais como glicosidases, proteases alcalinas, enzimas do complexo celulolítico, enzimas fibrinolíticas,  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -galactosidase. Os SDFA são compostos principalmente por PEG e dextrana de alto peso molecular, ou sistemas compostos por sais e polímeros, tal como PEG/fosfato e PEG/citrato (CANALES et al., 2009; ZHU et al., 2007; LING e LYDDIATT, 2005).

Os processos de separação, purificação e partição de biomoléculas que promovam bons níveis de recuperação em atividade e alto grau de pureza dos produtos biotecnológicos tem sido demandado pela indústria. Partição em SDFA têm se mostrado como um eficiente processo para a purificação de misturas de proteínas (NALINANON et al., 2009; BENSCH et al., 2007). Quando ocorre a separação das

fases, um polímero é encontrado predominantemente em uma fase (superior) e o outro polímero, ou de sal em outra fase (inferior). Isso proporciona um ambiente adequado para a preservação da atividade biológica da molécula, devido ao alto teor aquoso de cada fase (entre 80% e 90%). Purificação de proteínas utilizando SDFA é influenciada por diversos parâmetros, tais como o pH do sistema, o tipo e a concentração de sais no sistema, a massa molecular e a concentração do polímero e as propriedades da proteína (por exemplo, a estrutura, a hidrofobicidade, a massa molecular) (AZEVEDO et al., 2009).

SDFA apresenta o potencial para produzir uma biomolécula concentrada e purificada em uma única etapa, quando comparado ao número de etapas envolvidas nos processos de separação convencionais, promovendo a recuperação, clarificação, filtração, concentração e purificação do bioproduto. Esta característica é altamente favorável para a purificação de proteínas. É importante saber que a extração de uma proteína-alvo em SDFA é uma opção antecedente a outros processos de separação, buscando uma separação e recuperação ótima (NASCIMENTO et al., 2010; ROSA et al., 2007).

Sistemas de duas fases aquosas, principalmente os sistemas com polietileno glicol (PEG) e sal, têm sido amplamente usados para biosseparação de enzimas e proteínas por conta do seu baixo custo. Além do mais o tipo do polímero e do sal, força iônica e pH do meio, juntamente com as características da molécula alvo (tamanho carga e hidrofobicidade), são as variáveis que mais influenciam a partição das moléculas. SDFA tem também sido empregado em diversos campos na indústria biotecnológica para purificação de enzimas, interferon, anticorpos, e na bioconversão extrativa. Esta técnica é considerada potencialmente atrativa para obter enzimas industriais, com fácil aumento de escala e minimização da desnaturação das proteínas, entre outras vantagens. Com o objetivo de obter alto rendimento e também bom fator de purificação para a proteína-alvo, uma composição adequada para o SDFA deve ser selecionada para se extrair de forma quantitativa a proteína desejável para uma das fases do sistema com a mínima contaminação possível, sendo a purificação o resultado de uma partição diferenciada da molécula-alvo e impurezas entre as duas fases líquidas (PORTO, 2004; PESSOA e KILIKIAN, 2005).

A técnica de separação em sistemas de duas fases aquosas é aconselhável para purificação de proteínas em larga escala porque possibilita separação seletiva, uma baixa tensão superficial. Boa biocompatibilidade, altos rendimentos, bem como a possibilidade de “scale-up” e boa relação custo-benefício. Quando comparada com outras técnicas de recuperação, essa técnica apresenta diversas vantagens, como: operação rápida e contínua, altos rendimentos, baixo custo dos materiais, reciclagem dos polímeros, minimização da desnaturação de proteínas e facilidade de separar materiais particulados. Todavia, apesar da importância das técnicas de sistemas de duas fases aquosas para o futuro das tecnologias de biosseparação, pouco é conhecido sobre as interações básicas moleculares da partição protéica (LIN et al., 2003).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTOV, M.G.; PERICIN, D.M.; DASIC, M.G. Aqueous two-phase partitioning of xylanase produced by solid-state cultivation of *Polyporus squamosus*. **Process Biochemistry** (41):232-235, 2006.

ARAÚJO, D.M. Avaliação do farelo de trigo e enzimas exógenas na alimentação de frangas e poedeiras. Dissertação de mestrado. Universidade Federal da Paraíba, 66p., 2005.

AZEVEDO, A.M.; GOMES, A.G.; ROSA, P.A.J.; FERREIRA, I.F.; PISCO, A.M.M.O.; AIRES-BARROS, M.R. Partitioning of human antibodies in polyethylene glycol - sodium citrate aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology** (65):14-21, 2009.

BARUAH, K.; SAHU, N.P.; PAL, A.K.; JAIN, K.K.; DEBNATH, D.; YENGGOKPAM, S. Interactions of dietary microbial phytase, citric acid and crude protein level on mineral utilization by Rohu, *Labeo rohita* (Hamilton), Juveniles. **Journal of World Aquaculture Society** 38 (2):238-249, 2007.

BEIJERINCK, M.W. **Journal of Colloid and Interface Science** (7):16, 1910.

BENSCH, M.; SELBACH, B.; HUBBUCH, J. High throughput screening techniques in downstream processing: preparation, characterization and optimization of aqueous two-phase systems. **Chemical Engineering Science** (62):2011-2021, 2007.

BOERIS, V.; SPELZINI, D.; FARRUGGIA, B.; PICO, G. Aqueous two-phase extraction and polyelectrolyte precipitation combination: A simple and economically technologies for pepsin isolation from bovine abomasum homogenate. **Process Biochemistry** (44):1260-1264, 2009.

BOTELLA, C.; DIAZ, A.; ORY, I.; WEBB, C; BALANDINO, A. Xylanase and pectinase production by *Aspergillus awamori* on grape pomace in solid fermentation. **Process Biochemistry** (42):98-101, 2007.

BROZ, J.; OLDALE, P.; PERRIN-VOLTZ, A.H. Effects of supplemental phytase on performance and phosphorus utilization in broiler chickens fed a low phosphorus diet

without addition of inorganic phosphates. **Brazilian Poultry Science** 35(2):273-280, 1997.

CAMPESTRINI, E.; SILVA, V.T.M.; APPELT, M.D. Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime** 2(6):259-272, 2005.

CANALES, M.; BALLESTEROS, C.; MORENO-CID, J.A.; ESPINOSA, A.M.; VILLAR M, DE LA FUENTE. Extractive bioconversion to produce the *Aedes albopictus* akirin in an aqueous two-phase system supporting *Pichia pastoris* growth and protein secretion. **Biochemical Engineering Journal** (46):105-114, 2009.

CASEY, A.; WALSH, G. Purification and characterization of extracellular phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142. **Bioresource Technology**. 86 (2) 183-188, 2003.

COLEN, G. Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Minas Gerais, 2006.

CONSUEGRO, J.P. Uso de fitase microbiana em dietas para avicultura. **Indústria Avícola** (46):27-28, 1999.

COSGROVE, D.J. Ion-exchange chromatography of inositol polyphosphates. **New York Academy of Science** (165):677-686, 1969.

COSTA, S.A.; PESSOA JR, A.; ROBERTO, I.C. Partitioning of xylanolytic complex from *Penicillium janthinellum* by an aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography B** (743):339-348, 2000.

COSTA, F.G.P.; BRANDÃO, P.A.; BRANDÃO, J.S.; SILVA, J.H.V. Efeito da enzima fitase nas rações de frangos de corte, durante as fases pré-inicial e inicial. **Ciência e Agrotecnologia** (31):865-870, 2007.

COUSINS, B. Enzimas na nutrição de aves. In: Simpósio Internacional ACAV – **Sobre Nutrição de Aves**. Anais, p.118-130, 1999.

DAHIYA, S.; SINGH, N.; RANA, J.S. Optimazation of growth parameters of phytase producing fungus using RSM. **Journal of Scientific and Industrial Reasearch** (68):955-959, 2009.

DEBNATH, D.; SAHU, N.P.; PAL, A.K.; BARUAH, K.; YENGGOKPAM, S.; MUKHERJEE, S.C. Present scenario and future prospects of phytase in aqua feed – Review. **Asian-Australian Journal of Animal Science** 18 (12):1800-1812, 2005.

DEDAVID E SILVA, L.A. Produção, caracterização de enzimas celulásicas por *Aspergillus phoenicis*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

DYR, J.E.; SUTTNAR, J. Separation used for purification of recombinant proteins. **Journal of Chromatography B** (699):383-401, 1997.

EGLI, I.; DAVIDSSON, L.; JUILLERAT, M.A.; BARCLAY DANDHURRELL, R.F. The influence of soaking and germination on the phytase activity and phytic acid content of grains and seeds potentially useful for complementary feeding. **Journal of Food Science** (67):3484-3488, 2002.

EL-GINDY, A.A.; IBRAHIM, Z.M.; ALI, U.F.; EL-MAHDY, O.M. Extracellular phytase production by solid-states cultures of *Malbranchea sulfurea* and *Aspergillus niveus* on cost-effective medium. **Research Journal of Agricultural and Biological Sciences** 5(1):42-62, 2009.

FIREMAN, A.K.B.A.T.; FIREMAN, F.A.T. Fitase na alimentação de poedeiras; **Revista Ciência Rural** (28):529-534, 1998.

FRANCE, J.; DIAS, R.S.; KEBREAB, E.; VITTI, D.M.S.S.; CROMPTON, L.A.; LOPEZ, S. Kinetic models for the study of phosphorus metabolism in ruminants and monogastric. Phosphorus and calcium utilization and requirements in farm animals. Piracicaba: **Cabi**, Chap. 3, p. 18-44, 2010.

GUIMARÃES, I.G.; FALCON, D.R.; SCHICH, D.; BARROS, M.M.; PEZZATO, L.E. Digestibilidade aparente de rações contendo complexo enzimático para tilápia-do-nylo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia** (61):6, 2009.

GUIMARÃES, I.C.; SOUZA, A.R.M.; CORNÁLIO, V.M.O; PEREIRA, J.; VILLELA, V.A. Identificação de *Aspergillus spp.* toxigênico em arroz. **Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos** 30 (1):60-62, 2010.

GULATI, H.K.; CHADA, B.S.; SAINI, H.S. Production of feed enzymes (phytase and plant cell wall hydrolyzing enzymes) by *Mucor indicus* MTCC 6333: purification and characterization phytase. **Folia Microbiology** 52 (5), 491-497, 2007.

HANNAS, M.I.; PUPA, J.M.R. Enzimas: uma alternativa viável para enfrentar a crise na suinocultura. Capturado em 26 setembro de 2007. Disponível na internet. [http://www.engormix.com/enzimas\\_uma\\_alternativa\\_viavel\\_p\\_artigos\\_26\\_POR.htm](http://www.engormix.com/enzimas_uma_alternativa_viavel_p_artigos_26_POR.htm).

HEDAYATE, M.T.; PASQUALOTTO, A.C.; WARN, P.A.; BOWYER, P.; DENNING, D.W. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Microbiology** 153:1677-1692, 2007.

JONGBLOED, A.W., KEMME, P.A. Apparent digestibility and retention of nutrients bound to phytate complexes as influenced by microbial phytase and feeding regimen in pigs. **Journal of Animal Science** 72 (1):126-132, 1994.

KIM, T.; MULLANEY, E. J.; PORRES, J. M. Shifting the ph profile of *Aspergillus niger* phy A phytase to match the stomach ph enhances its effectiveness as an animal feed additive. **Applied and Environmental Microbiology** 72 (6):4397-4403, 2006.

KLICH, M.A. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. **Molecular Plant Pathology**, London, 8 (6):713-722, 2007.

KORNEGAY, E.T. Effect of phytase on the bioavailability of phosphorus, calcium, amino acids, and trace minerals in broilers and turkeys. **BASF, Technical Symposium. World Congress Center**, p. 39-70, 1996.

KRISHNA, C.; NOKES, S. E. Influence of inoculum size on phytase production and growth in solid-state fermentation by *Aspergillus niger*. **Trans. ASAE** (44):1031-1036, 2001.

KUMAR, V.; SINHA, A.K.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. **Food and Chemistry** (120):945-959, 2010.

LEI, X.G.; PORRES, J.M. Phytase enzymology, application, and biotechnology. **Biotechnology Letters** (25):1787-1794, 2003.

LIGEIRO, E.C. Efeito da utilização de fitase sobre o desempenho, qualidade dos ovos, avaliação econômica e excreção de fósforo e nitrogênio de poedeiras comerciais alimentadas com rações contendo ingredientes alternativos. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, São Paulo, 2007.

LIMA, M.R.; SILVA, J.H.V.; ARAUJO, J.A.; LIMA, C.B.; OLIVEIRA, E.R.A. Enzimas exógenas na alimentação de aves. **Acta Veterinaria Brasilica** 1 (4):99-110, 2007.

LIN, D-Q.; WU, Y-T.; MEI, L-H.; ZHU, Z-Q.; YAO, S-J. Modelling the proteins partitioning in aqueous polymer two-phases systems: influence of polymer concentration and molecular weight. **Chemical Engineering Science** (58):2963-2972, 2003.

LING, T.C.; LYDDIATT, A. Integration of mechanical cell disruption and fluidised bed recovery of G3PDH from unclarified disrupted yeast: a comparative study of the performance of unshielded and polymer shielded dye-ligand chromatography systems. **Journal of Biotechnology** (119):43-48, 2005.

MARLIDA, Y.; DELFITA, R.; ADNADI, P.; CIPTAAN, G. Isolation, characterization and production of phytase from endophytic fungus its application for feed. **Pakistan Journal of Nutrition** 9(5): 471-474, 2010.

MATHLOUTHI, N.; MOHAMED, M.A.; LARBIER; M. Effect of enzyme preparation containing xylanase and  $\beta$ -gucanase on performance of laying hens fed wheat/barley or maize/soybean mealbased diets. **British Poultry Science** (44):60-66, 2003.

MAZZOLA, P.G.; LOPES, A.M.; HASMANN, F.A.; JOZALA, A.F.; PENNA, T.C.V; MAGALHÃES, P.O.; RANGEL-YAGUI, C.O.; PESSOA JR., A. Liquid-liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** (83):143-157, 2008.

MURAKAMI, A.E.; FERNANDES, J.I.M.; SAKAMOTO, I.M.; SOUZA, L.M.G.; FURLAN, A.C. Efeito da suplementação enzimática no desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras comerciais. **Acta Scientiarum Animal Science** (29):165-172, 2007.

NALINANON; S.; BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; KISHIMURA, H. Partitioning of Protease from Stomach of Albacore Tuna (*Thunnus alalunga*) by Aqueous-Two Phase Systems. **Process Biochemistry** (44):471-476, 2009.

NASCIMENTO, K.S.; ROSA, P.A.J.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADAB, B.S.; AZEVEDO, A.M.; AIRES-BARROS, M.R. Partitioning and recovery of *Canavalia brasiliensis* lectin by aqueous two-phase systems using design of experiments methodology. **Separation and Purification Technology** (75):48-54, 2010.

NOVAKI, L. Produção, purificação e caracterização parcial da invertase obtida por fermentação em estado sólido de soja com *Aspergillus casingii*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Engenharia e Ciências Exatas, Paraná, 2009.

OLIVEIRA, L.A.; SARUBBO, L.A.; PORTO, A.L.F.; LIMA-FILHO, J.L.; CAMPOSTAKAKI, G.M.; TAMBOURGI, E.B. Physical and rheological characterization of polyethylene glycol-cashew-nut tree gum aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B** (766):27-36, 2001.

OOI, C.W.; HII, S.L.; KAMAL, S.M.M.K.; ARIFF, A.; LING, T.C. Extractive fermentation on using aqueous two-phase systems for integrated production and purification of extracellular lipase derived from *Burkholderia pseudomallei*. **Process Biochemistry** (46):68-73, 2011.

PEREIRA, R. Eficiência de uma fitase bacteriana na liberação de fósforo fítico em dietas de frangos de corte. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". São Paulo, 2010.

PESSOA, JR., A.; KILIKIAN, B.V. A. Purificação de produtos biotecnológicos. In: SCHMIDEL W. **Biotecnologia industrial: engenharia bioquímica**. 1ª. ed., v. 2. São Paulo: Edgard Blücher, cap. 21, p. 493-521, 2001.

PORTO, T.S. Extração de pró-toxina épsilon em de uma protease de *Clostridium perfringens* em sistemas de duas fases aquosas utilizando PEG/citrato. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2004.

PORTO, T.S. Extração de ascorbato oxidase de *Cucurbita maxima* por processo descontínuo e contínuo em colunas de discos rotativos perfurados utilizando sistemas de duas fases aquosas. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2008.

RAMACHANDRAN, S.; ROOPESH, K.; NAMPOOTHIRI, K.M.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Mixed substrate fermentation for the production of phytase by *Rhizopus* spp. using oilcakes as substrates. **Process Biochemistry** 40 (5) 1749-1754, 2005.

RAVINDRAN, V.; SELLE, P.H.; RAVINDRAN, G.; MOREL, P.C.H.; KIES, A.K.; BRYDEN, W.L. Microbial phytase improves performance, apparent metabolizable energy, and ileal amino acid digestibility of broilers fed a lysine-deficient diet. **Poultry Science** (80):338-344, 2001.

REIS, A. P. Purificação, caracterização bioquímica e aplicações biotecnológicas de  $\alpha$ -galactosidases de *Aspergillus terreus*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, 108 p., 2007.

ROOPESH, K.; RAMACHANDRAN, S.; NAMPOOTHIRI, M.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparison of phytase production on wheat bran and oilcakes in solid-state fermentation by *Mucor racemosus*. **Bioresource Technology** 97(3):506-511, 2006.

ROSA, P.A.J.; AZEVEDO, A.M.; AIRES-BARROS, M.R. Application of central composite design to the optimisation of aqueous two-phase extraction of human antibodies. **Journal of Chromatography A** (1141): 50-60, 2007.

SEBASTIAN, S.; TOUCHBURN, S.P.; CHAVEZ, E.R. Implications of phytic acid and supplemental microbial phytase in poultry nutrition: a review. **Word's Poultry Science** (54):27-47, 1998.

SELLE, P.H.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. **Animal Feed Science and Technology** (135):1-41, 2007.

SELLE, P.H., GILL, R.J., SCOTT, T.A. Effects of pre-pelleted wheat and phytase supplementation on broiler growth performance and nutrient utilisation. **Proceedings of Australian Poultry Science Symposium** (19):182-185, 2007.

SHANKAR, S.K.; MULIMANI, V.H.  $\alpha$ -Galactosidase production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. **Bioresource Technology** (98):958-961, 2007.

SILVA, L.G.; TRUGO, L.C.; TERZI, S. C.; COURI, S. Low phytate lupin flour based biomass obtained by fermentation with a mutant of *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry** (40):951-954, 2005.

SIMON, L.; OTTO, H. Aqueous Two-phase extraction - a case study in process analysis and control. **AIChE Annual Meeting, Cincinnati, OH.**, p. 237, 2005.

SLIVINSKI, C.T. Produção, purificação parcial e caracterização bioquímica de glucoamilase de *Aspergillus niger* obtida por fermentação em estado sólido. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Ponta Grossa, 128p. 2007.

VATS, P.; BANERJEE, U.C. Production studies and catalytic properties of phytases (*myo*-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): An overview. **Enzyme and Microbial Technology** 35 (1):3-14, 2004.

VIDAL, T.F. Qualidade, composição e estabilidade dos ovos de poedeiras alimentadas com farelo de castanha de caju. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará, 2009.

WYSS, M.; BRUGGER, R.; KRONENBERGER, A.; REMY, R.; FIMBEL, R.; OESTERHELT, G. Biochemical characterization of fungal phytases (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase): Catalytic properties. **Applied and Environmental Microbiology** (65):367-373, 1999.

YI, Z., KORNEGAY, E.T., RAVINDRAN, V., DENBOW, D.M. Improving phytate phosphorus availability in corn and soybean meal for broilers using microbial phytase and calculations of phosphorus equivalency values for phytase. **Poultry Science** (75): 240-249, 1996.

YIN, Y.-L.; BAIDOO, S.K.; JIN, L.Z. The effect of different carbohydrase and protease supplementation on apparent (ileal and overall) digestibility of nutrients of five hulless barley varieties in young pigs. **Livestock Production Science** (71):109-120, 2001.

YOO, G.Y.; WANG, X.; CHOI, S.; HAN, K.; KANG, J.C.; BAI, S.C. Dietary microbial phytase increased the phosphorus digestibility in juvenile Korean rockfish *Sebastes schlegelii* fed diets containing soybean meal. **Aquaculture** (243):315-322, 2005.

ZHU, J-H.; YAN, X-L.; CHEN, H-J.; WANG, Z-H. In situ extraction of intracellular L-asparaginase using thermoseparating aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography A** (1147):127-134, 2007.

## CAPÍTULO 1

### **Produção de Fitase por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 Utilizando Planejamentos Fatoriais**

## Produção de Fitase por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 Utilizando Planejamentos Fatoriais

NASCIMENTO, J.C.S.<sup>1</sup>, SILVA, M. F.<sup>1</sup>, MOREIRA, K.A.<sup>1,2</sup>, SOUZA-MOTTA, C.M.<sup>3</sup>  
PORTO, A.L.F.<sup>1</sup>, PORTO, T.S.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Tecnologia de Bioativos, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal. Avenida Dom Manuel de Medeiros, S/N, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Brasil.

<sup>2</sup>Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Avenida Bom Pastor, S/N, Boa Vista, 55.296-901, Garanhuns, Pernambuco, Brasil.

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Micologia. Av. Prof. Nelson Chaves, S/N, Cidade Universitária, 50670-420 – Recife, PE - Brasil.

## Resumo

Os fitatos representam uma classe complexa de compostos de ocorrência natural formados durante o processo de maturação de sementes e grãos de cereais, sendo a principal forma de armazenamento de fósforo em vegetais. A molécula de fitato é um grande fator anti-nutricional para monogástricos, possuindo em sua estrutura grupos ortofosfatos altamente ionizáveis, os quais afetam a disponibilidade de minerais no trato gastrointestinal. Fitases formam um grupo de enzimas com a capacidade de liberar o fósforo ligado à molécula do fitato, com a finalidade de aumentar o aproveitamento do fósforo para absorção. O objetivo deste trabalho foi avaliar parâmetros do meio de cultivo, tais como a concentração da fonte de nitrogênio e da fonte de carbono na produção de fitase por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924, utilizando planejamento fatorial. Para avaliar a influência de parâmetros do meio de cultivo na produção de fitase, realizou-se planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta. As melhores condições para a produção de fitase (8,80 U/mL) em fermentação submersa por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 foram, 1,25% da fonte de carbono (farelo de arroz) e 3,0% da fonte de nitrogênio (milhocina). *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 apresentou potencial biotecnológico para produção de fitase que poderão ser adicionadas a alimentação de animais não-ruminantes, desta maneira, contribuindo para o aumento do aproveitamento de nutrientes e nos índices de produção.

**Palavras-chave:** Fitase; *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924; planejamentos fatoriais; metodologia de superfície de resposta.

## Abstract

Phytates represent a complex class of natural occurring compounds formed during the maturation process of seeds and grains, the main storage form of phosphorus in vegetables. The phytate molecule is a major anti-nutritional factor for monogastrics animals, possessing in their structure highly ionizable groups orthophosphate, which affect the availability of minerals in the gastrointestinal tract. Phytases form a group of enzymes with the ability to release phosphorus bound to phytate molecule, with the aim of increasing the utilization of phosphorus for absorption. The aim of this study was to evaluate parameters of the medium, such as the concentration of nitrogen and carbon source in the production of phytase by *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924, using a factorial design. To evaluate the influence of parameters of the culture medium in the production of phytase was carried out factorial design and response surface methodology. The best conditions for production of phytase (8.80 U/mL) in submerged fermentation by *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 were 1.25% of the carbon source (rice bran) and 3.0% nitrogen source (corn steep liquor). *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 has potential for biotechnological production of phytase can be added to feed non-ruminant animals, thus contributing to the increased use of nutrients and production rates.

**Keywords:** phytase, *Aspergillus niger* var. *phoenicis*, factorial designs, response surface methodology.

## INTRODUÇÃO

Ácido fítico ou fitato (*mio*-inositol 1,2,3,4,5,6-hexafosfato de inositol fosfato) é a principal forma de armazenamento de fosfato e de inositol em plantas, o qual constitui 3-5% do peso seco das sementes de grãos de cereais e legumes (ZHANG, 2010). O fitato existe naturalmente complexado com uma série de minerais essenciais tais como, cálcio, magnésio, ferro, zinco, bem como proteínas (LUO et al., 2007).

Entretanto, o fósforo presente no ácido fítico não pode ser aproveitado por animais não-ruminantes, tais como aves e suínos, bem como humanos, pois estes não sintetizam a enzima capaz de efetuar a hidrólise do fitato (LEI e PORRES, 2003). O fósforo não-absorvido acumula-se no meio ambiente através da excreção das fezes, causando eutrofização (KIM et al., 2006). Além disso, o fitato nos alimentos animais tem sido caracterizado como um fator anti-nutricional, possuindo a capacidade de ligar-se a minerais essenciais e proteínas, diminuindo assim, a disponibilidade dos ingredientes de origem vegetal (KIM et al., 1999).

Com o intuito de diminuir os efeitos das altas concentrações de fitato, a ração dos suínos, aves e peixes tem sido suplementada com fitase, a qual é a chave catalítica para degradação enzimática do fitato (CHOI et al., 2001). Fitases, *mio*-inositol hexafosfato fosfohidrolases (E.C 3.1.3.8 ou 3.1.3.26), possuem a capacidade *in vitro* de liberar o fósforo ligado à molécula do fitato (HAEFNER et al., 2005). Hafner e colaboradores (2005) reportaram que a distribuição da fitase tem sido em bactérias, leveduras, fungos, vegetais, e inclusive em seres humanos.

A fitase pode ser produzida industrialmente por processos biotecnológicos sendo derivada de diferentes fontes de origem animal e vegetal (os grãos de trigo, triticale e cevada contêm fitase, apresentando maior disponibilidade de fósforo). Mas, a síntese de fitase efetuada pela membrana celular de microrganismos é comercialmente a forma mais promissora de produção da enzima, e apesar da habilidade de produção das bactérias e leveduras, os fungos são mais utilizados (PANDEY et al., 2001).

A otimização da composição do meio de cultivo para obter-se máximo rendimento em produto é uma difícil etapa na produção de uma biomolécula. As fontes de carbono são examinadas primeiramente e, posteriormente, as fontes de nitrogênio, até que todas as combinações dos componentes do meio sejam

estudadas, atingindo-se um meio de “composição otimizada”. Ressalta-se que este procedimento envolve um grande número de experimentos e demanda um tempo muito grande para se chegar a composição otimizada do meio. Um procedimento alternativo pode ser utilizado na otimização de meios em bioprocessos, baseado em métodos estatísticos que permitem otimizar as concentrações dos componentes fundamentais do meio é a utilização de planejamentos fatoriais. Após seleção dos principais componentes do meio que afetam o rendimento em produto e a produtividade, procede-se a combinação dos mesmos de acordo com uma metodologia estatística (planejamento fatorial), que permite o planejamento dos experimentos. Desta forma, os efeitos de vários componentes podem ser determinados simultaneamente, com um número relativamente pequeno de experimentos (PEREIRA-JÚNIOR, 2008).

Segundo Almeida-Filho (2006), quando o experimento envolve o estudo dos efeitos de dois ou mais fatores, a estratégia mais eficiente é o planejamento fatorial. Nesta estratégia, os fatores são variados juntos e não um por vez, ou seja, em cada tentativa completa ou réplica do experimento, todas as combinações possíveis dos níveis são investigadas.

Esta estratégia é mais eficiente que a abordagem um fator por vez, pois permite que os efeitos de um fator sejam estimados em diversos níveis dos outros fatores conduzindo a conclusões que são válidas dentro da abrangência das condições experimentais (MONTGOMERY, 2001) e é a única forma de descobrir interações entre os fatores (MONTGOMERY, 2001; MONTGOMERY e RUNGER, 2003) evitando conclusões incorretas quando houver interações entre fatores. O problema central num planejamento fatorial é o crescimento exponencial das combinações de níveis com o aumento do número de fatores (KLEIJNEN, 1998).

O objetivo deste trabalho foi avaliar parâmetros do meio de cultivo, tais como concentração da fonte de nitrogênio e de carbono na produção de fitase por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 em fermentação submersa, utilizando planejamento fatorial e metodologia de superfície resposta.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Micro-organismo

O fungo utilizado para a produção da fitase foi o *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924, cedido pela coleção de culturas URM do Departamento de Micologia – UFPE.

### Meios de Culturas

O meio de cultura utilizado para a manutenção do *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 foi o Ágar Extrato de Malte [extrato de malte (2%), peptona (0,1%), glicose (2%) e ágar (1,5%)]. O meio de cultura utilizado para esporulação foi ágar Czapek [3% de sacarose (p/v), nitrato de sódio 0,3% (p/v), sulfato de magnésio 0,05% (p/v), cloreto de potássio 0,05% (p/v), sulfato ferroso 0,001% (p/v), ágar 1,6% (p/v)]. A esterilização dos meios de cultura foi realizada em autoclave a 121°C, 1 atm de pressão, durante 20 minutos.

### Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico obtidos da Sigma (St. Louis, MO, USA). Todas as soluções utilizaram água ultra-pura, devido à grande quantidade de fósforo inorgânico presente nos demais tipos de água.

### Preparação do Inóculo

*A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 foi repicado em tubos de ensaio contendo meio de cultura ágar Czapek incubados a 30°C em estufa por 7 (sete) dias até ocorrer esporulação. A dispersão dos esporos foi obtida através da adição de solução salina 0,9% (p/v) e Tween 80 (0,1% p/v) previamente esterilizada, após a dispersão dos esporos por agitação com auxílio do vórtex, foi realizada contagem em câmara de Neubauer para posterior inoculação no meio de cultivo. A concentração do inóculo foi de  $10^6$  esporos/mL.

### Fermentação Submersa

Para a realização dos ensaios de produção de fitase (U/mL) foram realizadas fermentações submersas. Foi realizada a seleção da fonte de nitrogênio (milhocina,

uréia ou extrato de levedura) para o crescimento microbiano e produção de fitases. Foram utilizadas as fontes anteriormente citadas associada com a fonte de carbono (farelo de arroz a 0,5%), acrescido de solução salina (composição  $\text{gL}^{-1}$ : KCl 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,5;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2,0) por 60, 72, 84, 96, 120 horas em agitador orbital (90 rpm), pH 5,0 a 30°C.

### Determinação da Atividade Fitásica

A atividade fitásica foi determinada pela mensuração da quantidade de fósforo inorgânico liberado, baseado no método modificado proposto por Heinonen e Lathi (1981). Foram incubados 350  $\mu\text{L}$  de fitato de sódio (875  $\eta\text{M}$ , em tampão acetato pH 4,5) e 50  $\mu\text{L}$  do extrato bruto enzimático na temperatura de 37°C por 30 minutos. A reação foi parada pela adição de 1,5 mL da solução AAM (molibdato de amônio 10 mM, ácido sulfúrico 5,0 N e acetona na proporção 1:1:2). Em seguida, adiciona-se 100  $\mu\text{L}$  de ácido cítrico 1M foi adicionada. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1,0  $\mu\text{mol}$  de fosfato inorgânico por minuto sob condições de reações definidas. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### Determinação do Fósforo Inorgânico ( $\text{P}_i$ )

O fósforo inorgânico do extrato enzimático foi determinado utilizando água ultra-pura (350  $\mu\text{L}$ ) mais o extrato enzimático (50  $\mu\text{L}$ ) acrescido da solução AAM e ácido cítrico 1 M como descrito pelo método anteriormente citado. A quantidade de fósforo total para o cálculo da atividade fitásica foi o valor obtido no ensaio da determinação quantitativa subtraído da quantidade de fósforo inorgânico contido no extrato bruto. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### Planejamentos Fatoriais para a Produção de Fitase

Para avaliar a influência de parâmetros do meio de cultivo, realizaram-se planejamentos fatoriais, foram analisados os efeitos das fontes de carbono (farelo de arroz) e da fonte de nitrogênio (milhocina) na produção de fitase. Os nutrientes do meio de cultura foram selecionados em experimento prévios e foi elaborada uma matriz do planejamento fatorial completo ( $2^2$ ), para estudar a influência das

concentrações da fonte de nitrogênio (%FN = 1,0; 1,5 e 2,0%) e da fonte de carbono (%FC = 0,25, 0,5 e 0,75%) sobre a produção de fitases (U/mL) em 60, 72 e 84 horas.

Sequencialmente foi realizado um experimento denominado caminho da máxima inclinação, onde a resposta varia de forma mais pronunciada (BARROS NETO et al., 2003). Com o objetivo de determinar as melhores condições para a produção de fitase, realizou-se a metodologia de superfície de resposta (MSR). As análises das atividades foram realizadas em triplicata. Todas as análises estatísticas e gráficos foram realizados utilizando o auxílio do software *Statistica* 8.0 (STATSOFT INC, 2008).

## Resultados e Discussão

Inicialmente foram avaliadas diferentes fontes de nitrogênio e observou-se que a melhor produção de fitase (6,60 U/mL) foi encontrada em meios de cultivo contendo milhocina a 1,5% e com farelo de arroz a 0,5% em 72 horas de fermentação submersa.

Várias pesquisas tem sido realizadas com o intuito de estudar a influência de fontes de nitrogênio em fermentação para a produção de enzimas por fungos filamentosos. Bertolin e colaboradores (2003) e Anto e colaboradores (2006) utilizaram uréia e sulfato de amônio como fontes de nitrogênio, no entanto estes autores verificaram o aumento da produção da enzima estudada com o uso de uréia.

Todavia, no presente trabalho encontraram-se resultados distintos dos autores supracitados, a produção de fitase diminuiu com a adição de uréia e aumentou com a inclusão de milhocina. Fato esse, que pode ser explicado pela maior assimilação do nitrogênio da milhocina pelo *A. niger var. phoenicis* URM 4924, quando comparado com a assimilação da uréia, pois a milhocina tem a composição química mais rica quando comparado a uréia.

A milhocina é um subproduto da produção de amido de milho. Industrialmente, o milho seco é macerado em uma solução de ácido sulfúrico a elevadas temperaturas, sua fração solúvel sofre uma suave fermentação láctica natural que ocorre devido à presença de bactérias na solução, é então, submetida a uma operação de evaporação, na qual a milhocina é concentrada, sendo usada

principalmente como suplemento alimentício para ruminantes, fonte de nutrientes para aves, na confecção de iscas atrativas para as moscas das frutas e fonte de nutrientes para o processo de fermentação industrial (FILIPOVIC et al., 2002). A composição da milhocina é muito variável, dependendo da origem da matéria-prima e de seu processamento. Dentre os compostos variados encontram-se íons metálicos, vitaminas e outros compostos em pequenas quantidades.

Lan e colaboradores (2002) utilizaram o farelo de arroz para fermentação com *Mitsuokella jalaludini* e verificaram que o aumento na produção da fitase (10,69 U/g), visto que este farelo possui alto teor de ácido fítico. O farelo de arroz é, entre os alimentos de origem vegetal, o que possui uma das maiores porcentagens de fósforo total (1,5%), enquanto o milho possui 0,28% e o farelo de soja, 0,65% (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1994). Por outro lado, é o alimento que possui uma das menores taxas de disponibilidade de fósforo, devido ao seu alto teor de fitato. Segundo Conte e colaboradores (2002), o farelo de arroz tem de 5,1% a 8,6% de fitato na sua composição, embora os demais cereais possuam entre 1% e 2% de fitato.

Papagianni e colaboradores (1999) encontraram diferentes resultados para a produção de fitase por *A. niger*. Esses autores constataram que a otimização da produção de fitase por *A. niger* foi realizada usando farelo de trigo, acrescido de meio semi-sintético, composto por amido de milho, glicose e peptona.

El-Gindy e colaboradores (2009) avaliaram a produção de fitase extracelular por *Malbranchea sulfurea* e *A. niveus*, testando meios de cultura compostos por extrato de levedura, extrato de malte, milhocina, melado de cana-de-açúcar e soro de leite. Os mesmos destacam o efeito da inclusão da milhocina, pois observaram o aumento da produção de fitase por *M. sulfurea* 2,89 U/g em fermentação no estado sólido.

A produção de enzimas extracelulares tem sido comum por muitas espécies de fungos filamentosos como resposta a determinados estímulos ambientais, pela expressão de genes e posterior secreção das enzimas fornecidas. A síntese dessas enzimas está sujeita aos diversos mecanismos de regulação passíveis de indução e repressão, sendo a secreção direcionada por peptídeos sinal, que fazem parte da proteína a ser exportada, e que ao serem reconhecidos pela célula garantem a passagem através do canal exportador (COLEN, 2006).

Após a análise dos resultados da seleção da fonte de nitrogênio, experimentos foram realizados com o intuito de melhorar as condições de produção da fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924, no qual selecionou-se fonte de nitrogênio (%FN - milhocina), associada a fonte de carbono e fósforo (%FC - farelo de arroz). Foi realizado o planejamento fatorial 2<sup>2</sup> para melhorar as condições da produção de fitase. Observou-se que as melhores condições de produção foram obtidas com o meio contendo as seguintes características: %FC 0,75 e %FN 2,0 em 84 horas de produção. Na Tabela 1.1 encontram-se os resultados do planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup>.

**Tabela 1.1.** Produção de fitase por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924, utilizando planejamento fatorial (2<sup>2</sup>) para avaliar a influência das variáveis da concentração da fonte de carbono e concentração da fonte de nitrogênio na produção de fitases (U/mL).

Experimentos	%FC	%FN	60 h	72 h	84 h
1	0,25	1,0	5,24	4,61	2,75
2	0,75	1,0	6,75	7,60	7,88
3	0,25	2,0	8,10	7,41	5,90
4	0,75	2,0	9,94	10,80	11,67
5	0,5	1,5	6,27	6,84	6,31
6	0,5	1,5	6,42	6,71	6,22
7	0,5	1,5	6,42	6,69	5,77
8	0,5	1,5	6,55	6,73	5,91

%FC – concentração da fonte de carbono (farelo de arroz); %FN – concentração da fonte de nitrogênio (milhocina).

Adinarayana e Ellaiah (2003) estudaram os componentes do meio de cultivo para produção de protease utilizando planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup>. Segundo os autores, o método foi eficiente, pois somente 12 experimentos foram necessários para determinar as condições ótimas, o modelo descrito foi satisfatório.

Lan e colaboradores (2002) estudaram a influência das fontes de carbono e nitrogênio na produção de fitase por *Mitsuokella jalaludini*, uma bactéria isolada do suco ruminal do gado bovino, a qual se mostrou capaz de hidrolisar o fitato (*in vitro*). Eles testaram diversos ingredientes de origem vegetal (farelo de arroz, torta de

dendê e melaço), acrescido de fontes de nitrogênio (peptona, extrato de levedura e leite de soja) e fontes de carbono (glicose, celobiose e amido solúvel). A melhor condição encontrada foi a combinação de farelo de arroz e leite de soja obtendo 11,63 U/L em 12 horas de fermentação submersa a 39°C.

Shah e colaboradores (2009) obtiveram valor de 6,18 U/mL na produção de fitase extracelular por *A. niger* NCIM 563 em fermentação submersa, utilizando farelo de arroz (1%) e 144 horas de cultivo. Vale salientar que o tempo é um fator muito importante para a produção enzimática, pois quanto menor o tempo, maior será a eficiência do processo. Então, os resultados do presente trabalho são mais satisfatórios, pois, verificou-se uma maior produção de fitase (11,67 U/mL) em menor tempo de cultivo (84 horas).

**Tabela 1.2.** Efeito calculado das respostas do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> para produção de fitase *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924.

Efeitos	60 h	72h	84h
%FC (1)	14,74 <sup>a</sup>	48,48 <sup>a</sup>	21,48 <sup>a</sup>
%FN (2)	26,75 <sup>a</sup>	45,47 <sup>a</sup>	13,67 <sup>a</sup>
1 x 2	1,45	3,00	1,24

<sup>a</sup> Valores estatisticamente significativos (95% de confiança).

%FC - concentração da fonte de carbono (1) e %FN- concentração da fonte de nitrogênio (2).

Na análise dos efeitos das variáveis (Tabela 1.2), verificou-se que as variáveis estudadas apresentaram efeitos significativos e positivos em todos os tempos de produção. A interação entre a concentração da fonte de carbono (1) e a concentração da fonte de nitrogênio (2), não apresentou efeitos significativos. Isto mostra que com o aumento da concentração da fonte de carbono e da concentração da fonte de nitrogênio há uma tendência para o aumento da produção de fitase (U/mL).

Marlida e colaboradores (2010) trabalharam com o isolamento, caracterização e produção de fitase por fungos filamentosos endofíticos isolados da soja (*Glycine max*) e selecionaram *Rhizoctonia* sp. e *Fusarium verticillioides* como os mais

eficientes na produção de fitase, pois apresentaram produção de fitase de 2,72 e 6,11 U/mL respectivamente, em 28°C por 48 horas.

Thyagarajan e Namasivayam (2010) estudaram a influência da fonte de carbono para a produção de fitase por *Aspergillus niger* em fermentação submersa. Os mesmos testaram a inclusão de frutose, maltose, lactose e sacarose, como fontes de carbono, na concentração de 5%. Os melhores resultados de produção foram encontrados usando o meio basal padrão (g/l: amido, 28; glucose, 5; peptona, 18; cloreto de potássio, 0,5; sulfato de magnésio, 1,5; fosfato de potássio dibásico, 1; cloreto de cálcio, 2) acrescido de frutose e sacarose, ambos apresentando valores de 33,33 U/mL.

Na Tabela 1.3 estão apresentados os resultados do caminho da máxima inclinação correlacionando as variáveis %FC e %FN. Este ensaio é decorrente das melhores condições obtidas no planejamento fatorial  $2^2$ , que corresponderam aos maiores níveis estudados. O caminho da máxima inclinação parte do melhor ponto de produção e se desloca na direção indicada pelo planejamento fatorial para verificar qual o valor máximo destas variáveis em estudo. Pode-se observar que a melhor condição determinada pelo caminho de máxima inclinação foi obtida com concentração de fonte de carbono de 1,25% e 3,0% de fonte de nitrogênio em todos os tempos estudados, sendo 60 horas o melhor tempo de produção. Nesta condição, a atividade fitásica obtida foi de 8,58 U/mL.

**Tabela 1.3.** Produção de fitase (U/mL) produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 obtida no caminho da máxima inclinação.

<b>Experimentos</b>	<b>%FC</b>	<b>%FN</b>	<b>60 h</b>	<b>72 h</b>	<b>84 h</b>
1	0,75	2,0	5,71	5,79	5,37
2	1,0	2,5	6,66	7,35	5,17
3	1,25	3,0	8,58	8,51	6,24
4	1,5	3,5	4,05	2,81	1,32
5	1,75	4,0	3,65	2,00	1,12
6	2,0	4,5	0,83	0,73	0,31

%FC – concentração da fonte de carbono (farelo de arroz); %FN – concentração da fonte de nitrogênio (milhocina).

Soni e Khire (2007) encontraram 10,47 U/mL como o maior valor de atividade para a produção de fitase por *A. niger* NCIM 563 em fermentação submersa, quando utilizaram dextrina como fonte de carbono e nitrato de sódio como fonte de nitrogênio. Esses valores de atividade fitásica corroboram com os dados presentes neste estudo.

A partir dos dados obtidos na curva de máxima inclinação foi realizada a metodologia de superfície resposta com o intuito de obter as condições máximas de produção de fitase por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924.

A metodologia de superfície de resposta (MSR) é aplicada em experimentos industriais para encontrar condições ótimas para fatores de delineamento. É atualmente, o mais popular conjunto de técnicas para otimização, sendo composta de duas etapas: modelagem e deslocamento. O desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos, além de considerações técnicas, legais e mercadológicas, requer também processos de otimização que possam buscar melhores condições de processamento e formulação, com alta qualidade e baixo custo (CASTRO et al., 2003).

Em muitos casos, a interação de parâmetros que influenciam processos fermentativos pode ser avaliada com um número reduzido de ensaios através de um planejamento experimental. Em relação às enzimas, a metodologia de superfície de

resposta é frequentemente utilizada para a otimização e verificação da influência dos componentes do meio de cultivo (FLEURI e SATO, 2008).

Na Tabela 1.4 estão descritos os valores da atividade fitásica (U/mL) obtidos no experimento da metodologia de superfície de resposta. Observa-se que o valor ótimo da produção da fitase por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 estavam localizados nos ensaios correspondentes ao ponto central, os quais são compostos: concentração da fonte de carbono (1,25%) e concentração da fonte de nitrogênio (3,0%).

**Tabela 1.4.** Produção de fitase por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 obtida nos ensaios de metodologia de superfície de resposta em diferentes níveis da concentração da fonte de carbono e concentração da fonte de nitrogênio.

Experimentos	%FC	%FC	%FN	%FN	AF (U/mL)
1	-1	1,0	-1	2,5	5,90
2	-1	1,0	+1	3,5	2,85
3	+1	1,5	-1	2,5	5,87
4	+1	1,5	+1	3,5	2,84
5	- $\alpha$	0,9	0	3,0	7,82
6	+ $\alpha$	1,6	0	3,0	8,50
7	0	1,25	- $\alpha$	2,3	4,35
8	0	1,25	+ $\alpha$	3,7	1,39
9 (C)	0	1,25	0	3,0	8,78
10 (C)	0	1,25	0	3,0	8,72
11 (C)	0	1,25	0	3,0	8,80
12 (C)	0	1,25	0	3,0	8,80

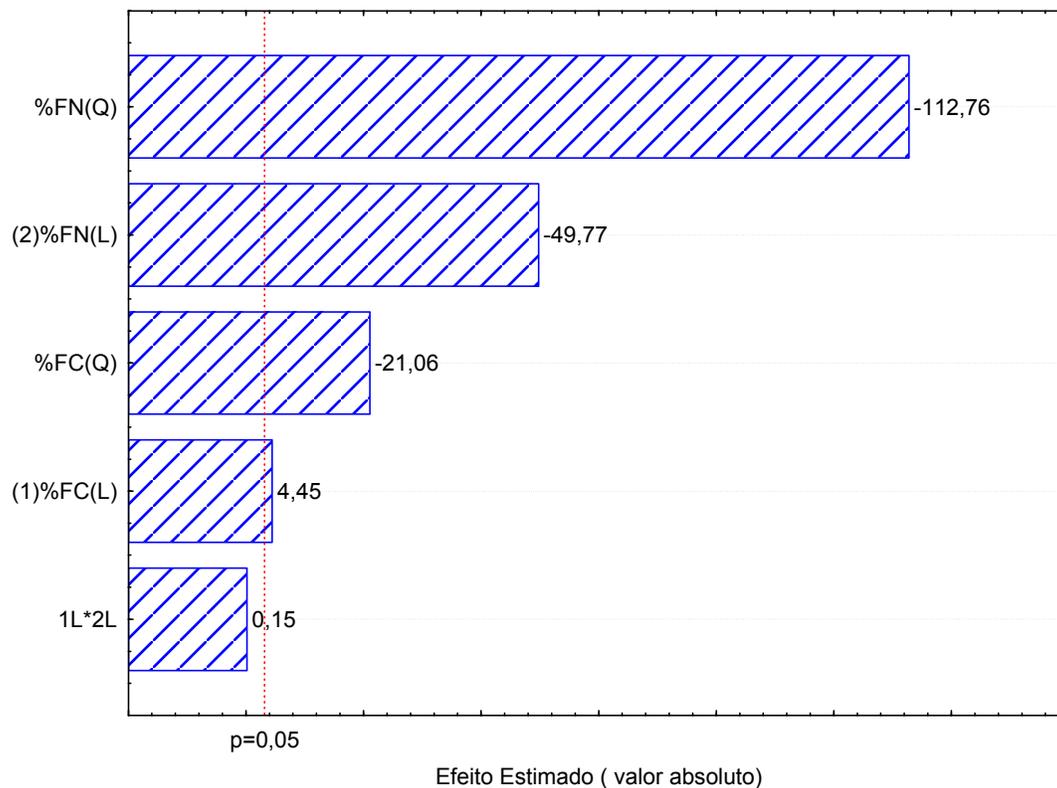
%FC – concentração da fonte de carbono (farelo de arroz); %FN – concentração da fonte de nitrogênio (milhocina); AF - atividade fitásica.

Singh e Satyanarayana (2009) estudaram variáveis para produção de fitase pelo fungo termofílico *Sporotrichum thermophile* em fermentação submersa. Os

fatores mais significativos identificados pelo planejamento Plackett-Burmann que afetaram a produção de fitase foram amido solúvel, peptona, Tween 80 (0,1% p/v) e fitato de sódio. Um planejamento estatístico do tipo  $2^4$  foi aplicado para as variáveis significativas e para delinear suas interações. As concentrações de amido, Tween-80 (0,1% p/v), peptona e fitato de sódio correspondentes à máxima atividade da enzima foram 0,4%, 1,0%, 0,3% e 0,3%, respectivamente. Quando o fitato de sódio foi substituído por farelo de trigo (3,0%), a atividade da fitase obtida foi semelhante. Portanto, o fitato poderia ser substituído pelo farelo, diminuindo os custos da fermentação.

Nampoothiri e colaboradores (2004) avaliaram a produção de uma fitase termoestável pelo *Thermoascus aurantiacus* em fermentação submersa. Os autores encontraram valores de 468,22 U/mL de produção de fitase por *T. aurantiacus*, usando 3,75% de farelo de arroz em 72 horas de fermentação submersa. Quando a concentração do farelo de arroz foi aumentada para 5,0% a produção diminuiu para 104,26 U/mL, demonstrando o efeito negativo para esta fonte de carbono. Todavia no presente estudo, a produção de fitase aumentou até a inclusão de 1,25% do farelo de arroz no meio de cultivo (8,80 U/mL), diminuindo quando utilizou-se 1,5% (2,84 U/mL).

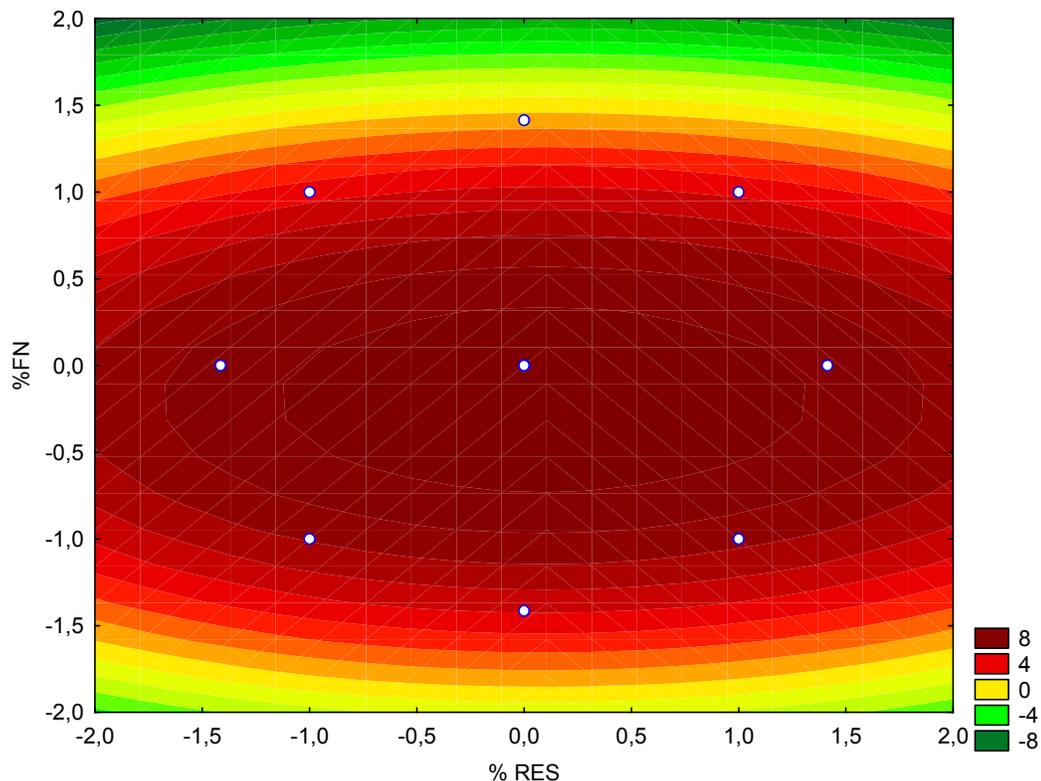
A Figura 1.1 apresenta o gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis avaliadas na superfície de resposta para produção de fitase (U/mL).



**Figura 1.1.** Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis para produção de fitase. %FC - concentração da fonte de carbono em %FN - concentração da fonte de nitrogênio.

Observa-se que os efeitos quadráticos e lineares foram estatisticamente significativos para a variável concentração da fonte de nitrogênio, sendo que o modelo quadrático apresentou um efeito negativo, enquanto o linear foi positivo. O efeito da concentração da fonte de carbono, também foi estatisticamente significativo, tanto para o modelo quadrático, como para o linear (Figura 1.1).

Na Figura 1.2 observa-se o gráfico de projeção da superfície de resposta em função dos fatores experimentais: concentração da fonte de nitrogênio (%FN) e concentração da fonte de carbono (%FC). Pode-se verificar que as melhores condições para a produção de fitase em fermentação submersa por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 foram %FC 1,25 e %FN 3,0, observou-se que a melhor produção de fitase correspondeu a região central da matriz do planejamento.



**Figura 1.2.** Gráfico de projeção de superfície de resposta para a produção de fitase realizada em função dos fatores experimentais (concentração da fonte de carbono e concentração da fonte de nitrogênio).

Dahiya e Colaboradores (2009) investigaram a otimização dos parâmetros de crescimento e de produção de fitase por fungos filamentosos, usando a metodologia de superfície de resposta. Os mesmos avaliaram as variáveis pH, temperatura, concentração da fonte de carbono. Com relação a esta última, sendo que a melhor faixa para produção foi entre 0,27 e 0,3% da fonte de carbono. Porém, o presente trabalho encontrou um resultado distinto, apresentando maior produção de fitase com uma maior porcentagem de fonte de carbono, que foi de 1,25%, confirmando os dados encontrados na curva da máxima inclinação.

## Conclusão

As melhores condições para a produção de fitase em fermentação submersa por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 foram, 1,25% da fonte de carbono (farelo de arroz) e 3,0% da fonte de nitrogênio (milhocina). *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 apresentou potencial biotecnológico para produção de fitases que poderão ser adicionadas a alimentação de animais não-ruminantes, desta maneira, contribuindo aumento do aproveitamento de nutrientes e dos índices de produção.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a FACEPE, CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro e ao LABTECBIO (DMFA/UFRPE), pela infra-estrutura para a realização deste trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADINARAYANA, K.; ELLAIAH, P. Production of alkaline protease by immobilized cells of alkalophilic *Bacillus* sp. **Journal of Scientific & Industrial Research** (62):589-592, 2003.

ALMEIDA FILHO, R. G.; MONTEVECHI, J. A. B.; MEDEIROS, A. L.. Simulação de uma célula de manufatura de uma empresa de material de defesa para avaliação de desempenho e análise de alternativas. In: Simpósio de Pesquisa Operacional e Logística da Marinha, 8., 2005.

ANTO, H.; TRIVEDI, U.B.; PATEL, K.C. Glicoamylase production by solid state fermentation using rice flake manufacturing waste products as substrate. **Bioresource Technology** (97):1161-1166, 2006.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2ª ed. Campinas: UNICAMP, 401p., 2003.

BERTOLIN, T.E.; CASARA, J.; COSTA, J.A.V. Influence of carbon, nitrogen and phosphorus source on glucoamylase production by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation. **Zeitschrift Für Naturforschung C-A Journal of Bioscience** (58): 708-712, 2003.

CASTRO, I.A.; SILVA, R.S.F.; TIRAPEGUI, J.; BORSATO, D.; BONA, E. Simultaneous optimization of response variables in protein mixtures formulation: constrained simplex method approach. **International Journal of Food Science and Technology** (38):103-110, 2003.

CHOI, Y.M.; SUH, H.J.; KIM, J.M. Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus* sp. KHU-10. **Journal of Protein Chemistry** (20):287-292, 2001.

COLEN, G. Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Minas Gerais, 2006.

CONTE, A.J.; TEIXEIRA, A.S.; FIGUEIRÊDO, A.V.; SCHIMIDT, D.M.S.V.; SILVA FILHO, J.C. Efeito da fitase na biodisponibilidade do fósforo do farelo de arroz em frangos de corte. **Pesquisa agropecuária brasileira** 37 (4):547-552, 2002.

DAHIYA, S.; SINGH, N.; RANA, J.S. Optimazation of growth parameters of phytase producing fungus using RSM. **Journal of Scientific and Industrial Reasearch** (68): 955-959, 2009.

EL-GINDY, A.A.; IBRAHIM, Z.M.; ALI, U.F.; EL-MAHDY, O.M. Extracellular phytase production by solid-states cultures of *Malbranchea sulfurea* and *Aspergillus niveus* on cost-effective medium. **Research Journal of Agricultural and Biological Sciences** 5(1):42-62, 2009.

FILIPOVIC, S.S.; RISTIC, M.D.; SAKAC, M.B. Technology of Corn Steep Application in Animal Mashs and their Quality. **Roumanian Biotechnology Letters** (7):705-710, 2001.

FLEURI, L.F.; SATO, H.H.; Estudo da influência de diferentes parâmetros na produção de enzimas líticas. **Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos** 28 (2):299-310, 2008.

HAEFNER, S.; KNIETSCH, A.; SCHOLTEN, E.; BRAUN, J.; LOHSCHIEDT, M.; ZELDER, O. Biotechnological production and applications of phytases. **Applied of Microbiology and Biotechnololy** (68):588-597, 2005.

HEINONEN, J.; LATHI, R. A new and convenient colorimetric determination to the assay of inorganic pyrophosphate. **Analytical Biochemistry** (13):313-317, 1981.

KIM, D.S.; GODBER, J.S.; KIM, H.R. Culture conditions for a new phytase producing fungus. **Biotechnology Letters** (21):1077-1081, 1999.

KIM, T.; MULLANEY, E.J.; PORRES, J.M.; RONEKER, K.R.; CROWE, S.; RICE, S.; KO, T.; ULLAH, A.H.; DALY, C.B.; WELCH, R.; LEI, X.G. Shifting the pH profile of *Aspergillus niger* PhyA phytase to match the stomach pH enhances its effectiveness

as an animal feed additive. **Applied and Environmental Microbiology** (72):4397-4403, 2006.

KLEIJNEN, J.P.C.; RUBINSTEIN, R.Y. Optimization and sensitivity analysis of computer simulation models by the score function method. *European Journal of Operational Research* (88):1-15, 1998.

LAN, G.Q.; ABDULLAH, S.; JALALUDIN, S.; HO, Y.W. Optimization of carbon and nitrogen sources of phytase production by *Mitsuokella jalaludini*, a new rumen bacterial species. **Letters in Applied Microbiology** (35):157-161, 2002.

LEI, X.G.; PORRES, J.M. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. **Biotechnology Letters** (25):1787-1794, 2003.

LUO, H.; HUANG, H.; YANG, P.; WANG, Y.; YUAN, T.; WU, N.; YAO, B.; FAN, Y. A novel phytase appA from *Citrobacter amalonaticus* CGMCC 1696: gene cloning and overexpression in *Pichia pastoris*. **Current Microbiology** (55):185-192, 2007.

MARLIDA, Y.; DELFITA, R.; ADNADI, P.; CIPTAAN, G. Isolation, characterization and production of phytase from endophytic fungus its application for feed. **Pakistan Journal of Nutrition** 9(5): 471-474, 2010.

MONTGOMERY, D.C. *Design and analysis of experiments*. 5th ed. New York: John Wiley & Sons. 684 p. ISBN 0-471-31649-0, 2001.

MONTGOMERY, D.C.; RUNGER, G.C. *Estatística aplicada e probabilidade para engenheiros*. 2. ed. Rio de Janeiro: LTC. 463 p. ISBN 85-216-1360-1, 2003.

NAMPOOTHIRI, K.M.; TOMES, G.J.; ROOPESH, K.; SZAKACS, G.; NAGY, V.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Thermostable phytase production by *Thermoascus aurantiacus* in submerged fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology** (118):205-214, 2004.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of poultry**. 9. ed. Washington: National Academy, 155 p., 1994.

PAPAGIANNI, M.; NOKES, S.E.; FILER, K. Production of phytase by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry** (35):397-402, 1999.

PEREIRA JR., N. **Séries em Biotecnologia**. Tecnologia de bioprocessos, v. 1, 62 p., 2008.

SHAH, P.; BHAVSAR, K.; SONI, S.K.; KHIRE, M.J. Strain improvement and up scaling of phytase production by *Aspergillus niger* NCIM 563 under submerged conditions. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology** (36):373-380, 2009.

SINGH, B.; SATYANARAYANA, T. Characterization of a HAP-phytase from a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile*. **Bioresource Technology** (100):22046-2051, 2009.

SONI, S.K.; KHIRE, J.M. Production and partial characterization of two types of phytase from *Aspergillus niger* NCIM 563 under submerged fermentation condition. **World Journal Microbiology Biotechnology** (23):1585-1593, 2007.

STATSOFT INC. STATISTICA (data analysis software systems) version 8.0., 2008.

THYAGARAJAN, R.; NAMASIVAYAM, S.K.R.N. Influence of carbon source phytase production by *Aspergillus niger*. **International Journal of Biological Technology** 1(2):78-80, 2010.

ZHANG, G.Q.; DONG, X.F.; WANG, Z.H.; ZHANG, Q.; WANG, H.X.; TONG, J.M. Purification, characterization, and cloning of a novel phytase with low pH optimum and strong proteolysis resistance from *Aspergillus ficuum* NTG-23. **Bioresource Technology** (101):4125-4131, 2010.

## CAPÍTULO 2

### Caracterização Bioquímica de Fitase Produzida *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924

Artigo a ser submetido à *Biotechnology Progress*

## Caracterização Bioquímica de Fitase Produzida *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924

NASCIMENTO, J.C.S.<sup>1</sup>, SILVA, M. F.<sup>1</sup>, MOREIRA, K.A.<sup>1,2</sup>, PORTO, A.L.F.<sup>1</sup>,  
PORTO, T.S.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Tecnologia de Bioativos, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal. Avenida Dom Manuel de Medeiros, S/N, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Brasil.

<sup>2</sup>Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Avenida Bom Pastor, S/N, Boa Vista, 55296-901, Garanhuns, Pernambuco, Brasil.

## Resumo

Aproximadamente 66% do fósforo total dos vegetais se encontram na forma de ácido fítico, que é indisponível para animais monogástricos devido à baixa ou ausência de atividade de fitase no trato gastrointestinal. Por possuir alto teor de fósforo, o ácido fítico representa a principal forma de armazenamento de fósforo em vegetais e, como tal, é a fonte natural deste mineral na alimentação animal. Entretanto, possui alto poder quelante influencia negativamente, diminuindo a disponibilidade destes nutrientes. As fitases hidrolisam o fósforo fítico liberando o fósforo inorgânico, sendo encontradas na natureza nas sementes de plantas e em bactérias, fungos e leveduras. O objetivo deste trabalho foi caracterizar bioquimicamente a fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924, identificando a temperatura e pH ótimos, estabilidade ao pH e a temperatura, bem como estudar as propriedades cinéticas, efeitos da ativação e inibição por íons e por substâncias moleculares. Observou-se que a temperatura ótima da fitase foi de 60°C, com estabilidade até 80°C por 120 minutos, onde manteve 38,4% da atividade residual. O pH 5,0 foi o ótimo para a atividade fitásica, permanecendo ativa nos vários pH testados (2,4 a 9,0) por 15 horas. Em pH 2,4, a fitase conservou 90% da sua atividade residual por 15 horas. O  $K_m$  calculado foi de 0,12  $\mu\text{M}$  e a  $V_{\text{máx}}$  foi de 7,9  $\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}$ . A fitase foi ativada pelos seguintes cátions:  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{3+}$ ,  $\text{Pb}^{3+}$  e  $\text{Ag}^{3+}$  e apresentou maior afinidade com o fitato de sódio quando comparado com o *p*-nitrofenilfosfato. A fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 apresentou características bioquímicas desejáveis para a aplicação na dieta de animais não-ruminantes, tais como termoestabilidade e afinidade ao fitato, que são propriedades requeridas para aplicabilidade industrial.

**Palavras-chave:** Fitase; *Aspergillus niger* var. *phoenicis*; caracterização bioquímica; propriedades cinéticas; termoestabilidade;

## Abstract

Approximately 66% of total phosphorus in plants are in the form of phytic acid, which is unavailable to monogastric animals due to low or no phytase activity in the gastrointestinal tract. How has a high phytate phosphorus, phytic acid represents the major storage form of phosphorus in plant and as such is the natural source of this mineral in animal feed. However, chelation has a high negative impact, reducing the availability of these nutrients. The phytases hydrolyze phytic acid releasing inorganic phosphorus being found in nature in the seeds of plants and bacteria, filamentous fungi and yeasts. The purpose of this work was to characterize biochemically the phytase produced by *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924, identifying the optimum temperature and pH, stability to pH and temperature as well as studying the kinetic properties, effects of activation and inhibition by ions and molecular substances. It was observed that the optimum temperature of phytase was 60°C with stability up to 80°C for 120 minutes, which kept 38.4% of residual activity. The pH 5.0 was optimal for phytase activity and remained active in various pH tested (2.4 to 9.0) for 15 hours. At pH 2.4, phytase retained 90% residual activity after 15 hours. The calculated  $K_m$  was 0.12 mM and  $V_{max}$  was 7.9 nmol.s<sup>-1</sup>. The enzyme was activated by the following cations: Zn<sup>2+</sup>, Ni<sup>3+</sup>, Pb<sup>3+</sup> and Ag<sup>3+</sup> and showed higher affinity for sodium phytate compared with *p*-nitrophenylphosphato. The phytase produced by *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 showed biochemical characteristics desirable for application in the diet of non-ruminant animals, such as thermostability and affinity for phytate, which are required properties for industrial applicability.

**Keywords:** phytase, *Aspergillus niger* var. *phoenicis*, biochemical characterization, kinetic properties, thermostability.

## Introdução

O fitato é capaz de quelar vários íons metais, tais como  $Mg^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$  e também forma complexos com proteínas presentes na alimentação, sendo categorizado como fator anti-nutricional, por diminuir a disponibilidade de nutrientes (MARLINDA et al., 2010). Entretanto, o fitato não é metabolizado pelos animais não-ruminantes, os quais possuem baixos níveis de enzimas com capacidade de degradação do fitato em seus tratos gastrointestinais. Além disso, o fosfato inorgânico tem sido adicionado à alimentação animal para assegurar a suplementação de fosfato para esses animais (LIU et al., 2007). Consequentemente, o excesso de fitato não-metabolizado oriundo da alimentação animal é excretado nas fezes, próximos a rios e lagos, o qual contribui para a contaminação das superfícies das águas, particularmente em áreas de produção animal intensiva (CAO et al., 2007; MARTIN et al., 2005).

Fitases (*mio*-inositol hexafosfato fosfoidrolases; E.C. 3.1.3.8 e 3.1.3.26) catalisam as reações de degradação hidrolítica do fitato (*mio*-inositol hexafosfato ou  $IP_6$ ) à fosfato inorgânico livre (Pi), sais de inositol fosfato ( $IP_5$ - $IP_1$ ), e em alguns casos, *mio*-inositol livre, tornando o fósforo disponível para absorção. A inclusão de fitase na alimentação animal aumenta a biodisponibilidade do fósforo fítico da dieta e também, reduz a quantidade do fósforo nas excretas dos animais não-ruminantes (SHAH et al., 2009).

Embora uma grande diversidade de micro-organismos, tais como bactérias, leveduras e fungos filamentosos têm sido reportados na produção de fitase (VOHRA e SATYANARAYANA, 2003), fitases de origem fúngica tem sido largamente utilizadas na alimentação animal devido a sua tolerância ácida e alta produção em comparação as fitases de origem bacteriana. Entretanto, o pH da mucosa do trato digestório dos animais não-ruminantes varia de 2,5 a 6,0, por isso fitases ativas e estáveis em ambientes ácidos são mais desejáveis (SONI e KHIRE, 2007).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar bioquimicamente a fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924, identificando a temperatura e pH ótimo,

estabilidade ao pH e a temperatura, bem como estudar as propriedades cinéticas e efeitos da ativação e inibição por íons e substâncias moleculares.

## Material e Métodos

### Micro-organismos

O fungo utilizado para a produção da fitase foi o *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924, o qual foi obtido da coleção de culturas URM do Departamento de Micologia (Universidade Federal de Pernambuco). O meio de cultura utilizado para a manutenção do micro-organismo foi o ágar extrato de malte. O meio de cultura utilizado para esporulação foi o BDA. A esterilização dos meios de cultura foi realizada em autoclave a 121°C, 1 atm de pressão, durante 20 minutos. As culturas foram incubadas em estufa microbiológica a 30°C por sete dias.

### Produção do Extrato Bruto Enzimático

O extrato bruto da fitase foi obtido por fermentação submersa com farelo de arroz (1%), acrescido de meio semi-sintético (composição em gL<sup>-1</sup>: peptona 18; KCl 0,5; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,5; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 2,0) por 144 horas em agitador orbital, 90 rpm, 30°C, pH 5,0. Para a suspensão dos esporos do *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 utilizou-se solução estéril de Tween 80 (0,1% p/v). A concentração do inóculo foi de 10<sup>6</sup> esporos/mL.

### Determinação da Atividade Fitásica

A atividade fitásica foi determinada pela mensuração da quantidade de fósforo inorgânico liberado, baseado no método modificado proposto por Heinonen e Lathi (1981). Foram incubados 350 µL de fitato de sódio (875 ηM, em tampão acetato pH 4,5) e 50 µL do extrato bruto enzimático na temperatura de 37°C por 30 minutos. A reação foi parada pela adição de 1,5 mL da solução AAM (molibdato de amônio 10 mM, ácido sulfúrico 5,0 N e acetona na proporção 1:1:2). Em seguida, adiciona-se 100 µL de ácido cítrico 1M foi adicionada. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1,0 µmol de fosfato inorgânico por minuto sob condições de reações definidas. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

## Determinação do Fósforo Inorgânico (P<sub>i</sub>)

O fósforo inorgânico do extrato enzimático foi determinado utilizando água ultra-pura (350 µL) mais o extrato enzimático (50 µL) acrescido da solução AAM e ácido cítrico 1,0 M como descrito pelo método anteriormente citado. A quantidade de fósforo total para o cálculo da atividade fitásica foi o valor obtido no ensaio da determinação quantitativa subtraído da quantidade de fósforo inorgânico contido no extrato bruto. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

## Determinação da Temperatura Ótima e Estabilidade à Temperatura

Para a determinação da temperatura ótima a atividade quantitativa da fitase foi realizada em diferentes temperaturas, variando de 30°C a 90°C. Para a realização da estabilidade térmica da enzima, incubou-se o extrato bruto enzimático em diferentes temperaturas (30°C a 90°C) nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos. O cálculo da atividade nos diversos tempos foi realizado com base na atividade residual da enzima.

## Determinação do pH Ótimo e Estabilidade ao pH

O pH ótimo foi estudado através da realização da análise da atividade em tampões com diferentes valores de pH (2,4 a 9,0). Para a obtenção da estabilidade ao pH, o extrato bruto enzimático foi submetido aos seguintes tampões: KCl-HCl 0,2M (pH 1,5 e 2,0), tampão glicina-HCl 0,2M (pH3,0), tampão ácido acético-acetato de sódio (pH 4,0, 5,0 e 6,0) e tampão TRIS-HCl (pH 7,0, 8,0 e 9,0). Foram retiradas alíquotas nos seguintes intervalos de tempos 0, 4, 15 horas, as quais foram aplicadas à determinação quantitativa da fitase para o cálculo da atividade residual da enzima.

## Estudo dos Parâmetros Cinéticos

A constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e a velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) da fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 foram determinadas utilizando-se fitato de sódio como substrato nas concentrações de 5 a 2000 µM em tampão acetato pH 4,5 a 60°C (temperatura ótima da enzima). A atividade da enzima foi determinada como descrito anteriormente. Os valores de  $K_m$  e  $V_{m\acute{a}x}$  foram

determinados de acordo com o método gráfico de Lineweaver-Burk (gráfico duplo-recíproco).

### Efeito dos Íons

Foram testados diversos cátions que são descritos como inibidores ou ativadores de fitases microbiana. A influência dos íons foi avaliada em duas concentrações distintas (10 mM e 100 mM). Os sais utilizados foram: sulfato de zinco  $[(ZnSO_4).7H_2O]$ , cloreto de manganês  $[(MnCl_2).4H_2O]$ , sulfato de magnésio  $[MgSO_4]$ , sulfato de cobre  $[CuSO_4]$ , nitrato de níquel  $[Ni(NO_3)_2.6H_2O]$ , cloreto de cálcio  $[CaCl_2]$ , cloreto de magnésio  $[(MgCl_2).6H_2O]$ , borato de sódio  $[(Na_2B_4O_7).10H_2O]$ , nitrato de chumbo  $[Pb(NO_3)_2]$ , cloreto de bário  $[(BaCl_2).2H_2O]$ , sulfato ferroso  $[FeSO_4]$  e nitrato de prata  $[AgNO_3]$ . Os ensaios foram realizados em triplicata. A metodologia de determinação da atividade fitásica foi conduzida como descrita anteriormente

### Efeito de Substâncias Moleculares

Realizaram-se testes para avaliar o efeito de algumas substâncias na ativação ou inibição da fitase. Foram utilizadas as seguintes substâncias na concentração 100 mM: citrato de Sódio  $[C_6H_5Na_3O_7]$ , ácido cítrico  $[C_6H_8O_7]$ , TRIS [tris (hidroximetil) aminometano -  $C_4H_{11}NO_3$ ], SDS [Sulfato Dodecil de Sódio -  $(C_{12}H_{25}SO_4Na)$ ] e EDTA [ácido etilenodiamino tetra-acético -  $C_{10}H_{16}N_2O_8$ ]. Os ensaios foram realizados em triplicata. A metodologia de determinação da atividade fitásica foi conduzida como descrita anteriormente.

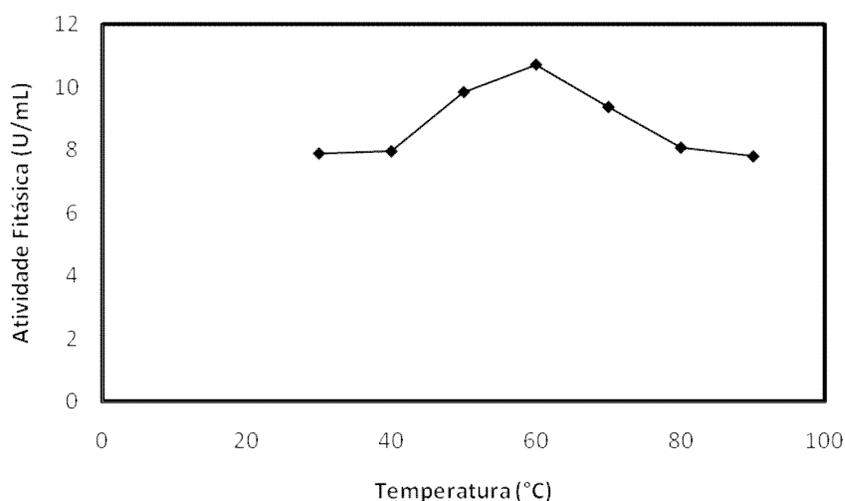
### Teste de Seletividade quanto ao Substrato

A seletividade da fitase ao substrato foi realizada analisando a atividade da fitase em dois substratos: fitato de sódio e *p*-NPP (*p*-Nitrofenil fosfato). Os ensaios foram realizados em triplicata. A metodologia de determinação atividade fitásica foi conduzida como descrita anteriormente, apenas substituindo o substrato.

## Resultados e Discussão

### Temperatura Ótima

A atividade da fitase (U/mL) produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 foi avaliada em diferentes faixas de temperaturas (30 a 90°C) (Figura 2.1). Observou-se que a temperatura ótima da fitase foi a 60°C, apresentando atividade de 10,71 U/mL.



**Figura 2.1.** Efeito da temperatura na atividade da fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924.

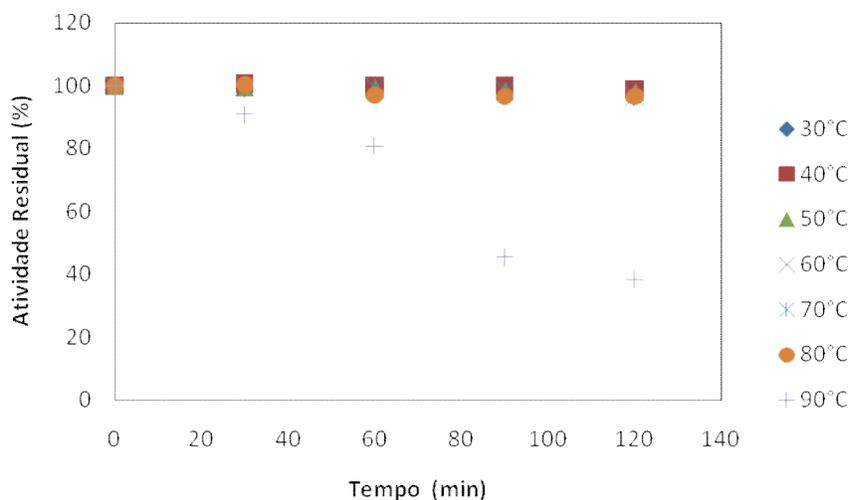
Boyce e Walsh (2007) caracterizaram bioquimicamente uma fosfatase ácida (com atividade fitásica) produzida por *Mucor hiemalis* Wehmer, a qual mostrou atividade ótima em 55°C, sendo o comportamento desta enzima similar a outras fitases reportadas na literatura. No entanto, Casey e Walsh (2003) caracterizaram bioquimicamente uma fitase extracelular de *A. niger* ATCC 9142 e obtiveram uma temperatura ótima mais elevada de 65°C.

A fitase parcialmente purificada produzida por *A. niger* NCIM 563 foi caracterizada bioquimicamente, onde se encontrou valores de 6,0 e 55°C, para pH ótimo e temperatura ótima, respectivamente.

Rizzatti e colaboradores (2001) analisaram a purificação e propriedades bioquímicas da  $\beta$ -D-xilosidase extracelular e termoestável produzida pelo fungo termotolerante *A. niger* var. *phoenicis*. Observaram uma temperatura ótima e pH

ótimo de 75°C e 4,5, respectivamente, permanecendo estável em 60°C. Esses dados juntamente com o presente trabalho sugerem o *A. niger* var. *phoenicis* como produtor de enzimas termoestáveis.

### Estabilidade à Temperatura



**Figura 2.2.** Estabilidade à temperatura da fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924.

A Figura 2.2 apresenta a estabilidade à temperatura da fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 (30°C-90°C por 120 minutos). A atividade residual corresponde o percentual em relação ao tempo zero de cada temperatura. Pode-se verificar que a enzima apresenta boa estabilidade à temperatura, pois observou-se uma resistência até 80°C, onde manteve 38,4 % da atividade residual por 120 minutos. Sendo assim podemos considerar a fitase em estudo como sendo termoestável.

Boyce e Walsh (2007) estudando a purificação e caracterização bioquímica de uma fosfatase ácida (com atividade fitásica) produzida por *Mucor hiemalis* Wehmer, constataram que o extrato bruto enzimático reteve 64%, 63% e 61% de sua atividade original depois de ser submetida ao aquecimento por 1, 3 e 5 minutos, respectivamente, a 80°C. Os mesmos autores destacaram que quando a

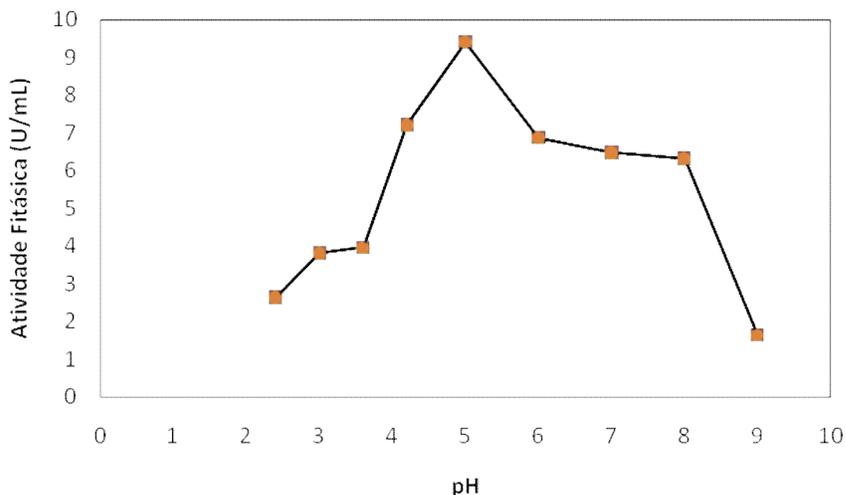
termoestabilidade de fitases comerciais foram mensuradas, a enzima purificada é significativamente menos estável do que o extrato bruto enzimático, retendo 21% da atividade residual após 80°C por 1 minuto.

A fitase secretada por *A. fumigatus* foi caracterizada como termo-resistente, mantendo 90% da sua atividade inicial após ser aquecida a 100°C por 20 minutos. Em comparação, a fitase de *Aspergillus niger* PhyA possui muito menos resistência térmica. Todavia, essas duas fitases apresentam homologia em 66% de suas sequências, além de suas estruturas tridimensionais serem muito semelhantes (ZHANG et al., 2007).

Segundo Bedford (2005), no caso de rações peletizadas, onde ração é submetida às condições diversas de temperatura, umidade e pressão, é importante estar seguro de que a fitase realmente está presente na ração em que os animais estão consumindo. Fatores como tempo de condicionamento, temperatura e pressão de vapor são críticos para estabilidade da enzima na ração. Por isso, se torna fundamental fazer um controle criterioso do que está acontecendo com a enzima adicionada à ração. A capacidade de analisar a atividade enzimática na ração final é fundamental se um produtor quer estar seguro do produto que está utilizando. Voeten e Van de Leest (1989) afirmam que para diminuir a contaminação das rações de frangos de corte, a temperatura de peletização deve ser entre 80°C e 82°C. A fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* apresentou 96,67% da atividade residual à 80 °C por 120 minutos.

O perfil da atividade fitásica em relação ao pH está apresentado na Figura 2.3, sendo o pH 5,0 foi o ótimo para a atividade fitásica. Mullaney e colaboradores (2000) reportaram que perfil da atividade depende do pH, e de acordo com pH ótimo para catálise, as fitases são classificadas como fosfatases ácidas, neutras e alcalinas.

## pH Ótimo



**Figura 2.3.** Efeito do pH na atividade da fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924.

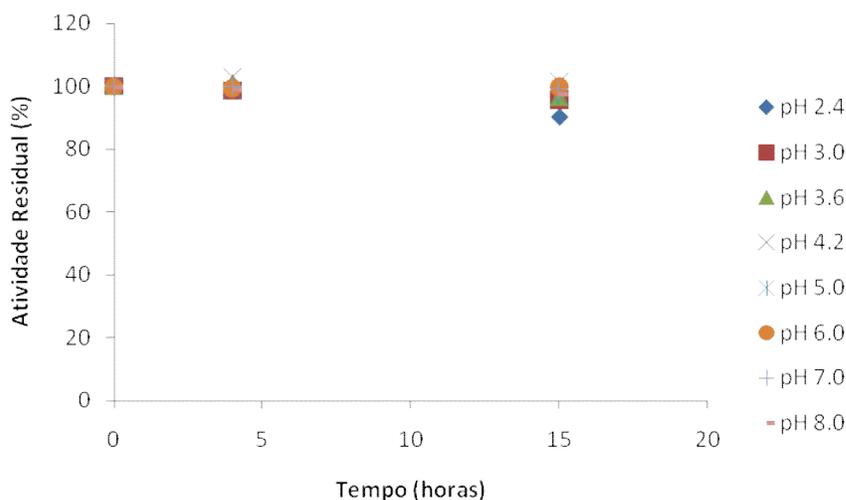
O resultado encontrado neste trabalho corrobora com dados reportados na literatura, tais como os obtidos por Boyce e Walsh (2007), que caracterizaram as propriedades bioquímicas da fitase purificada produzida pelo fungo *Mucor hiemalis* Wehmer, a qual obteve um valor de pH ótimo igual a 5,0.

No entanto, In e colaboradores (2009) pesquisaram sobre o pH ótimo entre outras propriedades bioquímicas, da fitase extracelular produzida por *Saccharomyces cerevisiae* CY, o qual obteve um valor de pH ótimo de 3,6, perdendo completamente a atividade em pH 5,0. Estes resultados são inferiores aos obtidos no presente estudo. .

Há diversos valores de pH's ótimo reportados na literatura para fitases de diversas origens, tais como *Escherichia coli* (pH 4,5) (GREINER, KONIETZNY e JANE, 1993), *S. castelli* (pH 4,4) (SEGUEILHA, 1992), *Penicillium simplicissimum* (pH 4,0) (TSENG et al., 2000). In e colaboradores (2009) destacam que as fitases ácidas são mais aplicadas como aditivos alimentares, as quais podem liberar o fósforo inorgânico contido nos alimentos dentro do trato gastrointestinal dos animais não-ruminantes.

A Figura 2.4 apresenta a estabilidade ao pH da fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924. A enzima permaneceu ativa sem perda de atividade nos vários pH's testados (2,4 a 8,0) por 15 horas. Em pH 2,4, a fitase conservou 90% da sua atividade residual por 15 horas. A fitase produzida por *M. hiemalis* Wehmer exibiu atividade máxima na faixa de pH 3,5 - 5,0, as quais são características do conteúdo estomacal após a digestão do alimento (BOYCE e WALSH, 2007).

### Estabilidade ao pH



**Figura 2.4.** Estabilidade ao pH da fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924.

In e colaboradores (2009), em estudos de estabilidade frente ao pH da fitase extracelular secretada por *S. cerevisiae* CY, determinaram o perfil da atividade residual após a incubação do extrato enzimáticos em diversos valores de pH. Os mesmos constataram que a fitase pesquisada permaneceu estável em uma faixa de pH entre 2,0-5,0, mantendo mais de 80% da atividade residual.

Soni e Khire (2007) estudaram a produção e caracterização parcial de dois tipos de fitase produzidas por *A. niger* NCIM 563 sob fermentação submersa. Esses autores concluíram que as propriedades físico-químicas da fitase parcialmente purificada indicaram a possibilidade de duas isozimas de fitase, chamadas de Phy I e Phy II. O pH e temperatura ótimos para a Phy I foi de 2,5 e 60°C, enquanto a Phy II foi de 4,0 e 60°C, respectivamente. A Phy I apresentou-se estável entre pH 1,5 a

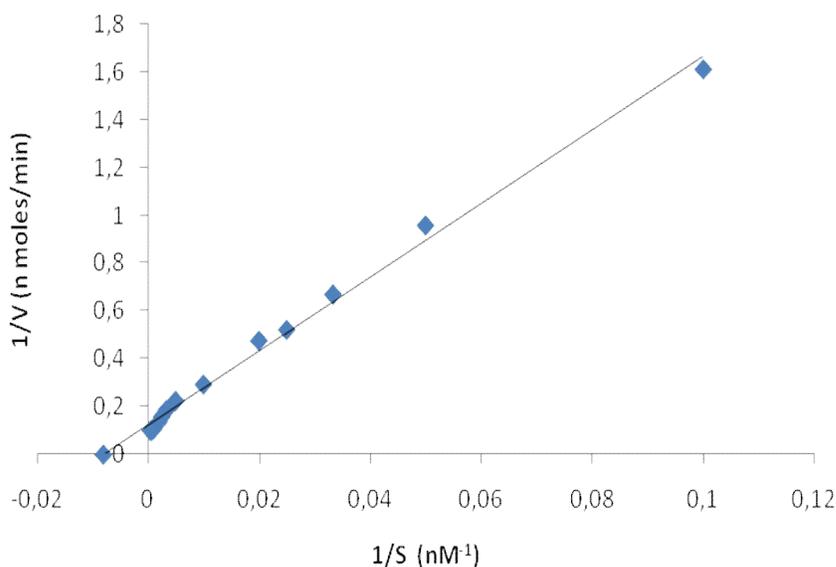
3,5, no entanto a Phy II mostrou-se estável em um maior intervalo de pH (entre 2,0 a 7,0).

Ma e colaboradores (2010) avaliaram a introdução de um gene de *A. aculeatus* RCEF 4894 em *Pichia pastoris* e avaliaram a expressão do gene na produção de fitase e encontram um valor de pH ótimo de 5,5. Esta fitase termoestável e recombinante foi capaz de permanecer ativa em temperaturas acima de 90°C por 10 minutos, com perda de 13,9% da atividade enzimática residual, mantendo estabilidade em pH no intervalo de 2,5 a 6,5.

A fitase parcialmente purificada produzida por *A. niger* NCIM 563 reteve 75% da atividade residual em pH variando entre 2,0 a 7,0 (BHAVSAR et al., 2010).

### Constante de Michaelis-Menten e Velocidade Máxima

A Figura 2.5 ilustra o gráfico de Lineweaver-Burk (duplo recíproco) da fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924. A partir dos dados obtidos foi possível traçar uma reta cujo intercepto nas ordenadas é  $1/V_{\text{máx}}$ , e nas abscissas,  $-1/K_m$ .



**Figura 2.5.** Gráfico duplo recíproco para a hidrólise do fitato de sódio catalisado pela fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924.

A velocidade máxima ( $V_{\text{máx}}$ ) e a constante de Michaelis ( $K_m$ ) foram encontradas através do cálculo da equação da regressão linear, e o  $K_m$  calculado foi de 0,12  $\mu\text{M}$  e a  $V_{\text{máx}}$  foi de 7,9  $\eta\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ . O valor resultante de  $K_m$  da fitase produzida por *A. phoenicis* foi menor comparado ao das fitases de outros fungos filamentosos (GULATI et al., 2007; AZEKE et al., 2009; BHAVSAR et al., 2010).

Casey e Walsh (2004) estudaram a identificação e caracterização de fitases com interesses industriais comparando com fitases comerciais. A fitase extracelular produzida por *Rhizopus oligosporus* ATCC 22959 apresentou valor de  $K_m$  10,4  $\mu\text{M}$  e velocidade máxima de 1,3  $\eta\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$  (usando o gráfico de Lineweaver Burk). Esses valores estão dentro do que foi previamente descrito na literatura, reportados para fitases de origem microbiana (WODZINSKI e ULLAH, 1996; TSENG et al., 2000; CASEY e WALSH, 2003).

O  $K_m$  da fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 encontrado neste trabalho é menor do que os valores geralmente encontrados por outros autores (entre 27  $\mu\text{M}$  – 813 mM, segundo Casey e Walsh 2004), já descritos para fitases de origem fúngica, indicando a alta afinidade pelo seu substrato. Soni e colaboradores (2010) investigaram as propriedades cinéticas da fitase produzida por

*A. niger* NCIM 563 em cultura sólida. O valor do  $K_m$  e da  $V_{m\acute{a}x}$  observada foram 0,156 mM e 220  $\mu\text{M}/\text{min}$ .

Gulati e colaboradores (2007) estudaram as propriedades cinéticas da fitase termoestável produzida pelo fungo *Thermomyces lanuginosus* TL-7. A fitase mostrou  $K_m$  4,55  $\mu\text{M}$  e  $V_{m\acute{a}x}$  0,833  $\mu\text{M}/\text{min}$  utilizando o fitato de sódio como substrato. O valor de  $V_{m\acute{a}x}$  (7,9  $\eta\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$ ) no presente trabalho foi menor, indicando a eficiência da fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 em defosforilar o ácido fítico.

Zhang e colaboradores (2010) estudaram a purificação e caracterização da fitase produzida por *A. ficuum* NTG-23. Os autores encontraram os seguintes resultados: pH ótimo de 1,3 e temperatura ótima de 67°C, mostrando um  $K_m$  de 0,295 mM e uma  $V_{m\acute{a}x}$  de 55,9  $\mu\text{mol}$  fosfato/min.

## Efeito de Íons

Na Tabela 2.1 encontram-se os resultados do estudo de ativação e inibição enzimática por íons. Em concentrações de 10 mM a fitase foi ativada pelos seguintes cátions:  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{3+}$ ,  $\text{Pb}^{3+}$  e  $\text{Ag}^{3+}$ . O chumbo teve um efeito de destaque como bom ativador da catálise enzimática da fitase em estudo (292,88% da atividade residual do extrato bruto enzimático). Nesta mesma concentração,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ba}^{2+}$  apresentaram um efeito inibitório. Os íons  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Fe}^{3+}$  não exerceram efeito significativo na ativação ou inibição enzimática da fitase.

No entanto em concentração maior (100 mM), foi verificado resultado distinto, pois os íons  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Na}^+$ , mostraram-se como ativadores enzimáticos nesta concentração. O cálcio foi o principal íon ativador da atividade fitásica em concentração de 100 mM (327,34% da atividade residual do extrato bruto enzimático). Os cátions  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Ni}^{3+}$  inibiram completamente a atividade da fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924.

El-Gindy e colaboradores (2009) investigaram o efeito de íons na atividade da fitase produzida por *Malbranchea sulfurea* e *A. niveus*. Eles obtiveram que  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  melhoraram a atividade de *M. sulfurea* enquanto  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Cd}^{2+}$  inibiram a atividade. No entanto, em *A. niveus*, o  $\text{Fe}^{3+}$  aumenta a

atividade da fitase, entretanto  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  e  $Fe^{2+}$  observam-se uma inibição de atividade da fitase.

**Tabela 2.1.** Resultados do estudo do efeito de ativação ou inibição de íons na atividade da fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924.

ÍON	VALOR DA ATIVIDADE RESIDUAL (%)	
	10 Mm	100 mM
$Zn^{2+}$	117,22	213,10
$Mn^{2+}$	77,52	102,62
$Mg^{2+}$	91,01	201,12
$Cu^{2+}$	100,74	0,0
$Ni^{3+}$	160,67	0,0
$Ca^{2+}$	98,12	327,34
$Cl^-$	99,62	104,11
$Na^+$	93,63	112,35
$Pb^{3+}$	292,88	*
$Ba^{2+}$	70,03	*
$Fe^{3+}$	101,87	96,62
$Ag^{3+}$	222,84	100,37

\* Atividade residual não pode ser calculada pela formação de precipitado, impedindo a leitura das absorbâncias das amostras.

Soni e Khire (2007) estudando a purificação e caracterização bioquímica de duas isozimas de fitase (Phy I e Phy II) produzidas por *A. niger* NCIM 563 em

condições de fermentação submersa. A atividade de Phy I foi moderadamente estimulada na presença de 1 mM de íons  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Fe^{3+}$  e inibida por íons  $Zn^{2+}$  e  $Cd^{2+}$ . No entanto, a atividade enzimática de Phy II foi moderadamente estimulada por íons  $Fe^{3+}$  íons foi inibida por íons  $Hg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  em 1 mM. A inibição por estes cátions pode ser explicada pela formação de complexos insolúveis do fitato, os quais diminuem a disponibilidade de substrato para a enzima (SINGH e SATYANARAYANA, 2009).

Segundo Casey e Walsh (2004), como as rações animais típicas contém cerca de 1,5 % (m/m) de matéria mineral, o efeito destes íons na atividade fitásica é um fator de interesse para pesquisas.

### Efeito de Substâncias Moleculares

Na Tabela 2.2 estão descritos os dados encontrados em relação aos testes de ativação ou inibição da fitase por substâncias moleculares.

**Tabela 2.2.** Resultados dos testes de ativação ou inibição da fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924.

Substância	Atividade Residual (%)
Citrato de sódio	158,80
Ácido cítrico	167,41
TRIS	101,87
SDS	122,09
EDTA	0,0

Os reagentes citrato de sódio, ácido cítrico e SDS apresentaram um efeito ativador na atividade da enzima fitase. O EDTA inativou completamente a enzima em estudo. Entretanto, resultados distintos foram encontrados por Greiner e colaboradores (1993), os quais descreveram o agente quelante EDTA e outros moduladores de atividade enzimática, sem nenhum efeito observável nas propriedades catalíticas da fitase. Segundo estes autores, a atividade de fitase não foi afetada por íons metais, tais como  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ , porém apresentou

aumento na atividade na presença de EDTA. Entretanto, neste trabalho, o EDTA inibiu a atividade da fitase, sugerindo que esta substância se liga a enzima impedindo a ocorrência da reação.

Ácido cítrico e citrato de sódio tem sido destacado como substâncias que intensificam a defosforilação do fitato pela fitase *in vitro*, dados estes que se encontram de acordo com os resultados do presente estudo (GULATI et al., 2007).

### Afinidade Quanto ao Substrato

No teste de seletividade quanto ao substrato observou-se que a fitase de *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 teve maior afinidade com o fitato de sódio quando comparado com o *p*-NPP. A atividade da fitase em *p*-NPP foi 33,22% (1,32 U/mL) da atividade em fitato de sódio.

Estudos de especificidade quanto ao substrato ilustram a capacidade da fitase em defosforilar outros substratos fosforilados diferentes do fitato de sódio. Casey e Walsh (2004) estudaram a especificidade da fitase purificada produzida por *R. oligosporus* ATCC 22959. Estes autores testaram uma série de compostos fosforilados tais como, fitato de sódio, fitato de cálcio, AMP, ADP, ATP, glicerol 2-fosfato, glicose 1-fosfato e *p*-NPP. A atividade residual do *p*-NPP foi de 59,6% comparando com usando fitato de sódio. Esses dados corroboram com os resultados encontrados no presente estudo.

A especificidade quanto ao substrato tem sido pesquisado em várias fitases produzidas por *Aspergillus*. As fitases produzidas por *A. niger* ATCC 9142 tem alta especificidade por fitato de sódio e fitato de cálcio, porém apresenta menor atividade para ATP, ADP, AMP, glicose-1-fosfato e *p*-NPP (CASEY e WALSH, 2003). Dvorakova e colaboradores (1997) reportaram que a fitase produzida por *A. niger* mostra-se com afinidade a uma maior quantidade de substratos diferentes. A fitase estudada por estes autores apresentou maior atividade para o ácido fítico. Esses dados corroboram com os dados encontrados neste trabalho.

## Conclusão

A fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 apresentou temperatura ótima da fitase foi de 60°C, com estabilidade até 80°C por 120 minutos, onde manteve 38,4% da atividade residual, mostrando assim ser termoestável. O pH 5,0 foi o ótimo para a atividade fitásica, permanecendo ativa nos vários pH testados (2,4 a 8,0) por 15 horas, mantendo-se ativa em uma faixa de pH ácido a básico, fato esse, requerido para a manutenção da integridade catalítica durante a passagem no trato gastro-intestinal dos animais. Em pH 2,4, a fitase conservou 90% da sua atividade residual por 15 horas, apresentando  $K_m$  calculado foi de 0,12  $\mu\text{M}$  e a  $V_{\text{máx}}$  foi de 7,9  $\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}$ , evidenciando a sua eficiência em defosforilar o fitato, e por conseguinte liberar o fósforo fítico para a absorção. A fitase foi ativada pelos cátions  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{3+}$ ,  $\text{Pb}^{3+}$  e  $\text{Ag}^{3+}$  e apresentou maior afinidade com o fitato de sódio quando comparado com o *p*-NPP. A fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 apresentou características bioquímicas desejáveis para a aplicação na dieta de animais não-ruminantes, tais como termoestabilidade e afinidade ao fitato, que são propriedades requeridas para aplicação industrial.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a FACEPE, CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro e ao LABTECBIO (DMFA/UFRPE), pela infra-estrutura para a realização deste trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZEKE, M.A.; GREINER, R.; DIETER, K. Purification and characterization of two intracellular phytases from the tempeh fungus *Rhizopus oligosporus*. **Journal of Food Biochemistry** (35):213-227, 2011.

BHAVSAR, K.; RAVI KUMAR, V.; KHIRE, J.M. High level phytase production by *Aspergillus niger* NCIM 563 in solid state culture: response surface optimization, up-scaling, and its partial characterization. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** 36(3): 373-380, 2010.

BEDFORD, M. Nuevas tecnologías en materia de enzimas para piensos de aves de corral. Congresso Latino-americano de Avicultura, Panamá, 2005.

BOYCE, A.; WALSH, G. Purification and characterization of an acid phosphatase with phytase activity from *Mucor hiemalis* Wehmer. **Journal of Biotechnology** (132): 82-87, 2007.

CAO, L.; WANG, C.; YANG, Y.; YANG, J.; DIANA, A.; YAKUPITIYAGE, Z.; LI, D. Application of microbial phytase in fish feed. **Journal Enzyme and Microbial Technology** (40):497-507, 2007.

CASEY, A.; WALSH, G. Purification and characterization of extracellular phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142. **Bioresource Technology** (86):183-188, 2003.

CASEY, A.; WALSH, G. Identification and Characterization of a phytase of potential commercial interest. **Industrial Biochemistry Program**, Department of chemical and Environmental Sciences. University of Limerick City, Ireland, 2004.

DVORAKOVA, J.; VOLFOVA, O.; KOPECKY, J. Characterization of phytase produced by *Aspergillus niger*. **Folia Microbiologica** (Praha) (42):349-352, 1997.

EL-GINDY, A.A.; IBRAHIM, Z.M.; ALI, U.F.; EL-MAHDY; Extracellular phytase production by solid-states cultures of *Malbranchea sulfurea* and *Aspergillus niveus* on cost-effective medium. **Research Journal of Agricultural and Biological Sciences** 5 (1):42-62, 2009.

GREINER, R.; KONIETZNY, U.; JANY, K.D. Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. **Archives of Biochemical and Biophysical** (303):107-113, 1993.

GREINER, R.; JANY, K.D.; ALMINGER, M.L. Identification and properties of myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases (phytases) from barley (*Hordeum vulgare*). **Journal of Cereal Science** (31):127-139, 2000.

GULATI, H.K.; CHADA, B.S.; SAINI, H.S. Production, purification and characterization of thermostable phytase from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* TL-7. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica** 54(2):121-138, 2007.

HEINONEN, J.; LATHI, R. A new and convenient colorimetric determination to the assay of inorganic pyrophosphate. **Analytical Biochemistry** (113):313-317, 1981.

IN, M.J.; SEO, W.S.; KIM, D.C.; OH, N.S.; Purification and biochemical properties of an extracellular acid phytase produced by the *Saccharomyces cerevisiae* CY strain. **Process Biochemistry** (44):122-126, 2009.

LIU, Z.H.; WANG, E.; XIU WANG, H.; XU, D. GAO, G.; ZANG, P.; LIU, D. Effect of wheat pearling on flour phytase activity, phytic acid, iron and zinc content. **Food Science and Technology Swiss**, 41(3):521-527, 2007.

MA, ZONG-YOU.; PU, SHUN-CHANG.; JIANG, JING-JING.; HUANG, BO.; FAN, MEI-ZEN.; LI, ZHEN-ZI. A novel thermostable phytase from the fungus *Aspergillus aculeatus* RCEF 4894: gene cloning and expression in *Pichia pastoris*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 27(3):679-686, 2010.

MARLINDA, Y.; DELFITA, R.; ADNADI, P.; CIPTAAN, G. Isolation, characterization and purification of phytase from endophytic fungus its application for feed. **Pakistan Journal of Nutrition** 9 (5):471-474, 2010.

MARTIN, J.A.; MURPHY, R.A.; POWER, R.F.F. Purification and physical-chemical characterization of genetically modified phytases expressed in *Aspergillus awamori*. **Bioresource Technology** 97(14):1703-1708, 2005.

MULLANEY, E.; DALY, C; ULLAH, A. Advances in phytase research. **Advances in Applied Microbiology** (47):157-199, 2000.

RIZZATTI, A.C.S.; JORGE, J.A.; TERENCE, H.F.; RECHIA, C.G.V; POLIZELI, M.L.T.M. Purification and properties of a thermostable extracellular  $\beta$ -xilosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** (26):156-160, 2001.

SHAH, P.; BHAVSAR, K.; SONI, S.K.; KHIRE, M.J. Strain improvement and up scaling of phytase production by *Aspergillus niger* NCIM 563 under submerged conditions. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology** (36):373-380, 2009.

SEGUEILHA, M.; LAMBRECHTS, C.; BOZE, H.; MOULIN, G.; GALZY, P. Purification and properties of the phytase from *Schwanniomyces castellii*. **Journal of Fermentation and Bioengineering** (74):7-11, 1992.

SINGH, B.; SATYANARAYANA, T.; Characterization of a HAP-phytase from a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile*. **Bioresource Technology** (100):2046-2051, 2009.

SONI, S.K.; KHIRE, J.M. Production and partial characterization of two types of phytase from *Aspergillus niger* NCIM 563 under submerged fermentation condition. **World Journal Microbiology Biotechnology** (23):1585-1593, 2007.

SONI, S.K.; MAGDUM, A.; KHIRE, J.M. Purification and characterization of two distinct acidic phytases with broad pH stability from *Aspergillus niger* NCIM 563. **World Journal Microbiology and Biotechnology** (26):2009-2018, 2010.

TSENG, Y.H.; FANG, T.J. TSENG, S.M. Isolation and characterization of a novel phytase from *Penicillium simplicissimum*. **Folia Microbiologica** (45):121-127, 2000.

VOETEN, A.C.; VAN DE LEEST, L. Influence of the peletting temperature used for feed on salmonella infection in broilers. **Archives Geflugelk** 53(6):225-230, 1989.

VOHRA, A.; SATYANARAYANA, T. Phytases: Microbial sources, production, purification and potential biotechnological applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, 23(1): 29-60, 2003.

WODZINSKI, R.J.; ULLAH, A.H.J. Phytase. **Advances in Applied Microbiology** (42):263-301, 1996.

ZANG, W.; MULLANEY, E.J.; LEI, X.G. Adopting selected bonding and ionic interaction from *Aspergillus fumigates* phytase structure improves the thermostability of *Aspergillus niger* Phy A. **Applied and Environmental Microbiology** 73 (9):3069-3076, 2007.

ZHANG, G.Q.; DONG, X.F.; WANG, Z.H.; ZHANG, Q.; WANG, H.X.; TONG, J.M. Purification, characterization, and cloning of a novel phytase with low pH optimum and strong proteolysis resistance from *Aspergillus ficuum* NTG-23. **Bioresource Technology** (101):4125-4131, 2010.

## CAPÍTULO 3

Partição e Purificação de Fitase Produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 Utilizando Sistemas de Duas Fases Aquosas PEG/Citrato

Artigo a ser submetido a *Applied Biotechnology and Microbiology*

Partição e Purificação de Fitase Produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 Utilizando Sistemas de Duas Fases Aquosas PEG/Citrato

NASCIMENTO, J.C.S.<sup>1</sup>, SILVA, M. F.<sup>1</sup>, PORTO, A.L.F.<sup>1</sup>, PORTO, T.S.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Tecnologia de Bioativos, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal. Avenida Dom Manuel de Medeiros, S/N, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, Brasil.

<sup>2</sup>Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Avenida Bom Pastor, S/N, Boa Vista, 55.296-901, Garanhuns, Pernambuco, Brasil.

## Resumo

A purificação de biomoléculas são processos caros, constituindo a maior parte do custo do processo de produção de uma molécula biológica. A extração usando sistemas de duas fases aquosas vem sendo estudada como uma técnica alternativa, a fim de reduzir os custos de produção de biomoléculas. As Fitases são enzimas que catalisam a hidrólise de moléculas de fosfato ligadas ao fitato, aumentando a disponibilidade do fósforo para absorção pelos animais. Este trabalho teve como objetivo o uso de sistema de duas fases aquosas PEG/citrato na purificação de fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924. Os experimentos foram realizados utilizando um planejamento fatorial completo  $2^4$ , onde os parâmetros de extração estudados foram: massa molar do PEG ( $M_{PEG}$ ), concentração do PEG ( $C_{PEG}$ ), concentração de citrato ( $C_{CIT}$ ) e pH no aumento de pureza, coeficiente de partição e recuperação em atividade da fitase. Obteve-se aumento de pureza de 7,58, coeficiente de partição de 3,62 e recuperação de 113,4%, com 26% de PEG 8000 (g/mol), pH 8,0 e 12% de citrato. A extração utilizando SDFA PEG/citrato demonstrou ser promissora para extração e purificação de fitase produzida por *A.niger* var. *phoenicis* URM 4924, podendo ser aplicada na composição de rações de animais não-ruminantes.

**Palavras-chave:** sistemas de duas fases aquosas; fitase; *Aspergillus niger* var. *phoenicis*; planejamento fatorial.

## Abstract

The purification of biomolecules are costly processes, constituting the bulk of the cost of the production process of a biological molecule. Extraction using aqueous two-phase systems has been studied as an alternative technique in order to reduce the cost of production of biomolecules. Phytases are enzymes that catalyze the hydrolysis of phosphate molecules linked to phytate, increasing the availability of phosphorus for absorption by animals. This work aimed at the use of aqueous two-phase system PEG/citrate in the purification of phytase produced by *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924. The experiments were conducted using a factorial design  $2^4$ , where the extraction parameters were studied: molar mass of PEG ( $M_{\text{PEG}}$ ), concentration of PEG ( $C_{\text{PEG}}$ ), citrate concentration ( $C_{\text{CIT}}$ ) and pH evaluating purity, partition coefficient and yield of activity phytase. It obtained an increase in purity of 7.58, partition coefficient of 3.62 and yield of 113.4%, with 26% PEG 8000 (g/mol), pH 8.0 and 12% citrate. The extraction using ATPS PEG/citrate proved to be promising for the extraction and purification of phytase produced by *A.niger* var. *phoenicis* URM 4924 and can be applied in the composition of animal feed non-ruminants.

**Keywords:** aqueous two-phase systems; phytase; *Aspergillus niger* var. *phoenicis*; factorial design.

## Introdução

A recuperação e purificação de biomoléculas são processos complicados e dispendiosos, podendo ser até 70% dos custos das biomoléculas. Para desenvolver um processo de purificação viável, alguns fatores devem ser considerados, tais como recuperação, partição e aumento de pureza. Devido a esses obstáculos, os custos dos processos de separação tornam-se altos. Porém, tem-se encontrado um aumento pelo interesse de desenvolvimento métodos econômicos e eficientes para a separação de enzimas e proteínas (NAGANAGOUDA e MULIMANI, 2008).

Fitases (*mio*-inosito-hexafosfato fosfohidrolases, E.C. 3.1.3.8 ou 3.1.3.26) formam um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de moléculas de fosfato ligados ao ácido fítico (*mio*-inositol-1,2,3,4,5,6-hexafosfato) (GREINER e KONIETZNY, 2006). Cerca de 2/3 do fósforo total presente em grãos de cereais, legumes e óleos de sementes estão na de ácido fítico (ou fitato), o qual se apresenta pouco disponível para peixes e outros animais não-ruminantes, incluindo as aves, suínos e humanos, devido a ausência desta enzima no trato gastro-intestinal destas espécies (EL-GINDY et al., 2009).

Sistemas de duas fases aquosas (SDFA) são formados quando dois polímeros ou um polímero e um sal são solubilizados na água acima de determinadas concentrações. O SDFA é um método versátil e adequado para a separação partículas biológicas, inclusive macromoléculas. Comparado com outros processos de separação comumente usados, esta técnica tem uma série de vantagens, como o aumento da escala, facilidade de processo contínuo, menor tensão interfacial e biocompatibilidade (AZEVEDO et al., 2009; YAN-MIN et al., 2010).

Os sistemas contendo PEG/citrato tem sido empregados na extração e purificação de diversas biomoléculas, dentre as quais podemos destacar penicilina acilase (MARCOS et al., 1999), hexoquinase (OLIVEIRA et al., 2003) e a insulina (ALVES et al., 2000). O SDFA por ser um sistema de purificação de baixo custo, é adequado para a obtenção de fitase que será utilizada na alimentação de animais não-ruminantes, diminuindo assim os custos da produção animal. Este trabalho teve como objetivo o uso de sistema de duas fases aquosas PEG/citrato na purificação de fitases produzidas por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924.

## Material e Métodos

### Reagentes

Todos os produtos químicos utilizados neste trabalho foram de grau analítico e foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha) e Sigma (St. Louis, MO, USA).

### Micro-organismo e Inóculo

Para a produção do extrato bruto enzimático contendo a fitase, *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 obtido da Coleção de Culturas URM do Departamento de Micologia/UFPE foi mantido em ágar extrato de malte por sete dias, em estufa a 30°C. O micro-organismo foi inoculado com uma suspensão de esporos na concentração final de 10<sup>6</sup> esporos/mL, em Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura composto por 1% de farelo de arroz e solução semi-sintética (composição em g/L: peptona 18; KCl 0,5; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,5; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 2,0) durante 5 dias a 30 °C sob agitação de 90 rpm em agitador orbital.

### Preparação do Sistema de Duas Fases Aquosas

Os sistemas foram preparados com PEG de diferentes massas molares (400, 3350 e 8000 g/mol) e sal citrato de sódio (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O<sub>7</sub>.2H<sub>2</sub>O) segundo Oliveira e colaboradores (2001). Em tubos de centrifuga graduados (15 mL), previamente calibrados, 1mL do extrato bruto contendo a fitase, e misturados com o PEG e com o sal citrato de sódio. Em seguida, a água ultra-pura foi adicionada para ajustar a concentração final desejada dos componentes e, ainda, manter constante a massa final do sistema (5,0 g). Em seguida, a mistura foi agitada em vórtex por 1 minuto para a separação das fases. Após este tempo, as amostras foram colocadas em repouso por 1 hora para a aferição do volume das fases (superior e inferior) e retirada das fases para posterior análise da atividade fitásica e do conteúdo protéico. A variação da proporção entre o citrato de sódio e o ácido cítrico foi o que definiu o valor do pH.

### Determinação do Conteúdo Protéico e da Atividade Fitásica

A concentração de proteína total foi quantificada de acordo com o método proposto por Bradford (1971). A atividade fitásica foi determinada segundo o método proposto por Heinonen e Lathi (1981), o qual utiliza fitato de sódio (875 ηM)

acrescido de uma solução AAM, contendo ácido sulfúrico (5N), molibdato de amônio (10 mM) e acetona (1:1:2) para a determinação quantitativa do fósforo inorgânico ( $P_i$ ). A curva padrão foi realizada utilizando fosfato de potássio ( $KH_2PO_4$ ) em concentrações de fósforo inorgânico variando de 10 a 600  $\eta$ M.

## Planejamento Experimental

Os parâmetros de extração estudados foram: massa molar do PEG, concentração do PEG, concentração de citrato e pH na purificação de fitase de *A. niger var. phoenicis* URM 4924. Os experimentos foram realizados utilizando um planejamento fatorial completo  $2^4$  (Tabela 1) contendo 20 ensaios e 4 pontos centrais, que permitiram a estimativa do erro experimental. A melhor condição final de extração foi definida como aquela que proporcionou a melhor combinação entre as três respostas (coeficiente de partição, recuperação em atividade e aumento de pureza). Após a realização dos experimentos, foi feita a análise estatística dos resultados, com o auxílio do software *Statistica* 8.0 (STATSOFT INC., 2008).

## Metodologia de Análise dos Resultados

O coeficiente de partição ( $K$ ) é o parâmetro que define o comportamento de partição da biomolécula estudada entre as fases do SDSA. Pode ser definido pela expressão:

$$K = \frac{A_s}{A_i} \quad (1)$$

onde  $A_s$  e  $A_i$  correspondem as atividades da fitase nas fases superior e inferior do sistema, respectivamente.

A recuperação em atividade (%REC) da biomolécula-alvo é definida pela seguinte expressão:

$$REC = \left( \frac{A_s \cdot V_s}{A_i \cdot V_i} \right) \times 100 \quad (2)$$

onde  $A_S$  e  $A_i$  correspondem as atividades da fitase e  $V_S$  e  $V_i$  são os volumes nas fases superior e no extrato bruto inicial, respectivamente.

O aumento de pureza ( $AP$ ) é definido como a razão entre a atividade da fitase e a concentração de proteínas totais no produto final (após a extração), dividido pela mesma razão determinada para o extrato impuro.

$$AP = \frac{A_S / C_S}{A_i / C_i} \quad (3)$$

## Resultados e Discussão

Na Tabela 3.1 estão apresentados os resultados do planejamento completo  $2^4$  para avaliação da influência das variáveis  $M_{PEG}$  (massa molar do PEG),  $C_{PEG}$  (concentração do PEG),  $C_{CIT}$  (concentração de citrato) e pH na partição da fitase, obtendo como variáveis-respostas:  $K$  (coeficiente de partição),  $\%REC$  (recuperação em atividade) e o  $AP$  (aumento de pureza).

Os experimentos 1, 3, 9 e 11 não formaram duas fases aquosas, devido às concentrações dos componentes estarem abaixo da concentração crítica, ou seja, abaixo da curva binodal (PORTO et al., 2007).

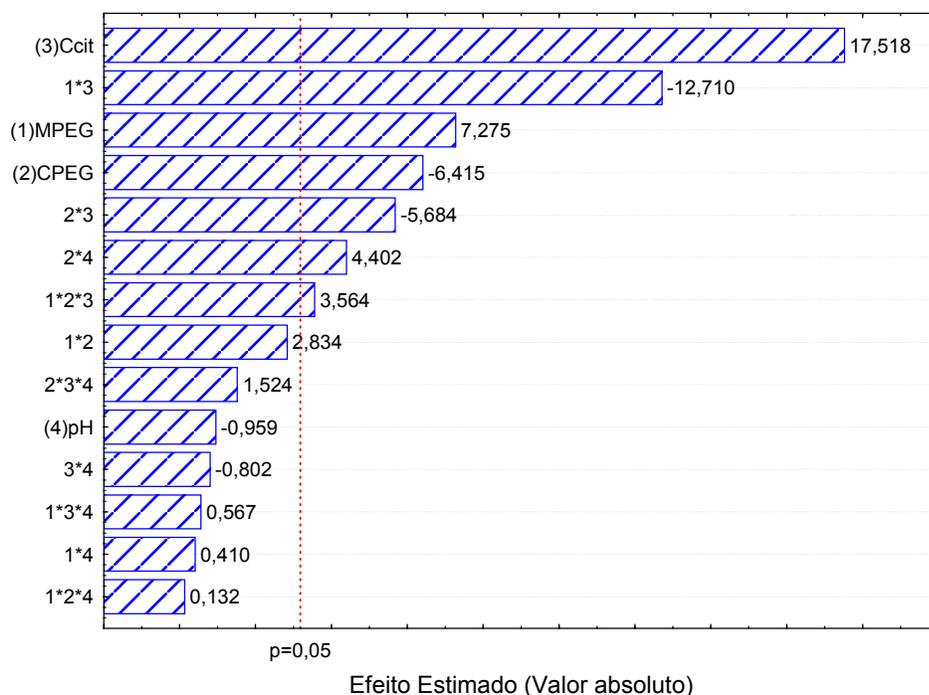
**Tabela 3.1.** Condições e resultados do planejamento fatorial completo ( $2^4$ ) para purificação de fitase de *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 por SDFA.

Ensaio	$M_{PEG}$ (g/mol)	$C_{PEG}$ (%m/m)	$C_{CIT}$ (%m/m)	pH	$K$	$AP$	% $REC$
1	400	20	12	6,0	-	-	-
2	8000	20	12	6,0	3,91	0,99	93,30
3	400	26	12	6,0	-	-	-
4	8000	26	12	6,0	2,72	1,52	85,31
5	400	20	20	6,0	7,43	1,92	120,41
6	8000	20	20	6,0	4,89	1,18	78,18
7	400	26	20	6,0	2,97	1,15	105,83
8	8000	26	20	6,0	3,40	1,44	95,50
9	400	20	12	8,0	-	-	-
10	8000	20	12	8,0	2,91	2,30	104,19
11	400	26	12	8,0	-	-	-
12	8000	26	12	8,0	3,62	7,58	113,39
13	400	20	20	8,0	5,57	2,22	240,82
14	8000	20	20	8,0	4,21	3,88	120,95
15	400	26	20	8,0	3,93	2,03	278,35
16	8000	26	20	8,0	3,82	2,85	185,31
17 (C)	3350	23	16	7,0	3,81	1,21	149,52
18 (C)	3350	23	16	7,0	3,63	1,31	144,55
19 (C)	3350	23	16	7,0	4,39	1,03	148,53
20 (C)	3350	23	16	7,0	4,05	1,06	145,05

$M_{PEG}$  - massa molar do PEG,  $C_{PEG}$  - concentração do PEG,  $C_{CIT}$  - concentração de citrato,  $K$  - coeficiente de partição, % $REC$  - Recuperação e  $AP$  - Aumento de pureza. (-) Não formação de fases

No gráfico de Pareto (Figura 3.1), observa-se que algumas variáveis e as interações entre elas apresentam efeito estatisticamente significativo para o coeficiente de partição, pois os valores de efeito estimado estão acima do nível de significância  $p=0,05$ . Ou seja, as variáveis e as interações que estão acima do nível de significância estão contribuindo (positivamente ou negativamente) para a partição da enzima para a fase PEG do sistema. O comprimento de cada barra é proporcional ao efeito da variável. A linha vertical pode ser usada para julgar os efeitos estatisticamente significativos, ou seja, as barras que se estenderem através desta linha correspondem aos efeitos estatisticamente significativos com nível de confiança de 95% ou  $p=0,05$  (PORTO et al., 2007).

Foram analisados os resultados de cada resposta separadamente, mas os efeitos das variáveis estudadas foram analisados em conjunto, inclusive as interações entre eles.



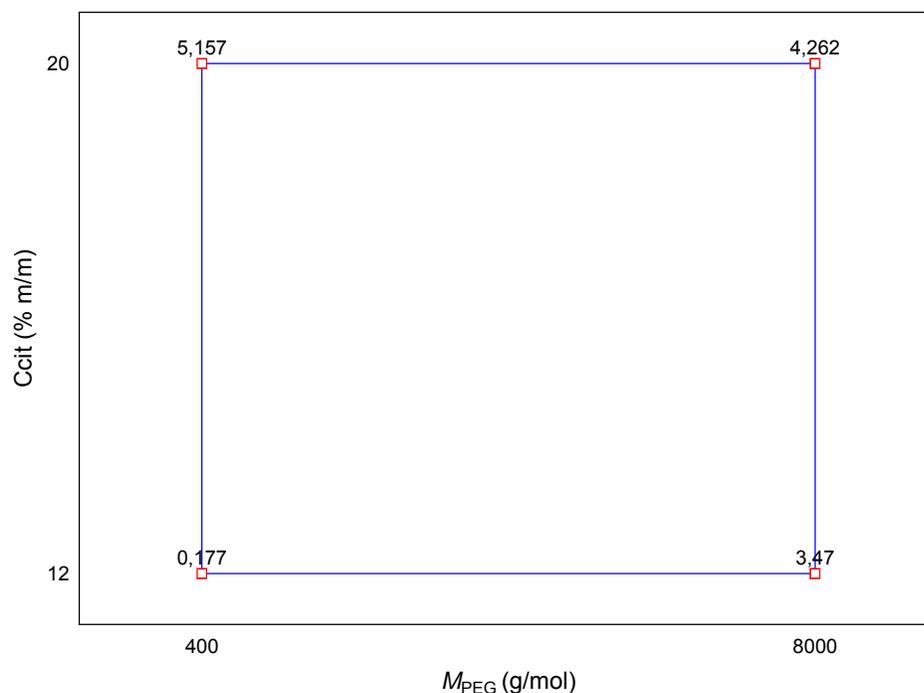
**Figura 3.1.** Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável de resposta o coeficiente de partição ( $K$ ). Os significados dos símbolos na ordenada são: (1)  $M_{PEG}$  - massa molar do PEG, (2)  $C_{PEG}$  - concentração do PEG, (3)  $C_{CIT}$  - concentração de citrato, (4) pH.

A variável que mais influenciou o coeficiente de partição ( $K$ ) foi a  $C_{CIT}$  com efeito positivo, ou seja, quanto maior a concentração de citrato maior será o coeficiente de partição (Figura 3.1). O melhor valor de coeficiente de partição ( $K=7,43$ ) foi encontrado no ensaio 5 (Tabela 3.1), composto de:  $M_{PEG}$  400 g/mol,  $C_{PEG}$  20%  $C_{CIT}$  20% e pH 6,0.

O efeito positivo da  $C_{CIT}$  sobre a variável-resposta coeficiente de partição ( $K$ ) indica que o aumento da  $C_{CIT}$  favorece a partição da fitase para a fase PEG (polimérica), fenômeno este que pode ser explicado pela teoria do *salting-out*, pois quando a concentração na fase salina aumenta, as proteínas são forçadas a particionar para a fase superior (LUECHAU et al., 2010; RAWDKUEN et al., 2011; SELVAKUMAR et al., 2010)

Oliveira e colaboradores (2003), que estudaram o comportamento da partição da hexoquinase em SDFA com sistemas PEG/citrato, verificaram que e altas concentrações de citrato (20%) associadas a baixas massas molares do PEG (400 g/mol) promoveram altos valores de coeficiente de partição da hexoquinase produzida por *S. cerevisae*.

SDFA são bem aplicados ao aumento de escala de produção, possibilitando operações de separação. Além da vantagem da possibilidade de reciclagem dos materiais que são usados nos processos de extração. A partição em SDFA é potencialmente aplicável para a clarificação ou purificação parcial por várias razões: (1) por ter pequeno ou nenhum efeito adverso na atividade biológica na maioria das proteínas; (2) muitos dos polímeros utilizados, tais como PEG e dextrana, apresentam propriedade estabilizantes de proteínas; (3) as atividades das proteínas recuperadas são elevadas e (4) por apresentar poucas dificuldades no aumento da escala produtiva (SPELZINI et al., 2005).



**Figura 3.2.** Diagrama para interpretação geométrica dos efeitos da interação entre concentração de citrato e a massa molar do PEG tendo como variável-resposta o coeficiente de partição ( $K$ ).

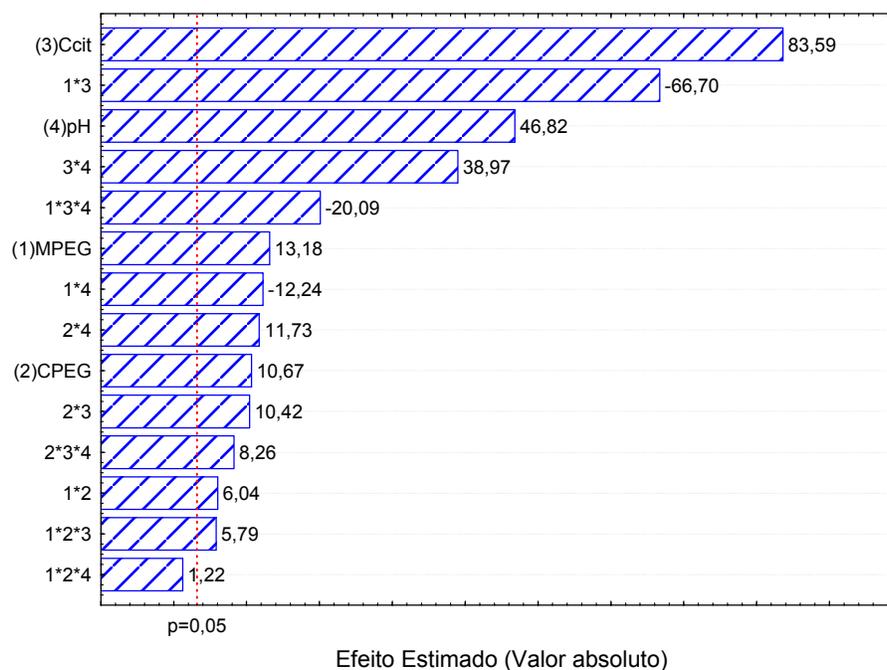
A interação entre  $C_{CIT}$  e  $M_{PEG}$  foi significativa ( $p=0,05$ ) (Figura 3.1). O resultado dos efeitos das variáveis envolvidas na interação é melhor interpretado utilizando o diagrama de interpretação geométrica. A Figura 3.2 mostra a relação de interação existente entre as variáveis  $C_{CIT}$  e  $M_{PEG}$ . Percebe-se que ocorreu um maior  $K$  com o aumento da  $C_{CIT}$  e uma diminuição da  $M_{PEG}$ . Então, a melhor condição para a resposta  $K$  foi obtida em a  $M_{PEG}$  (400 g/mol) e  $C_{CIT}$  (20%). Os dados obtidos nesta pesquisa têm mostrado a afinidade da fitase pela fase polimérica ou superior. Este comportamento pode ser atribuído à inclusão desta proteína no volume disponível da fase PEG.

A  $M_{PEG}$  apresentou efeito significativo e positivo para o coeficiente de partição ( $K$ ), ou seja, com o aumento da  $M_{PEG}$  (400 g/mol para 8.000 g/mol) ocorreu um aumento do coeficiente de partição da fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924. No entanto, com um aumento da massa molar (8000 g/mol), geralmente ocorre uma diminuição do  $K$  devido a teoria do volume excluído (LUECHAU et al.,

2010; DREYER et al., 2009; BARBOSA et al., 2010). Desta maneira, neste presente trabalho, verificou-se que a teoria do volume excluído não influenciou a partição da fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924.

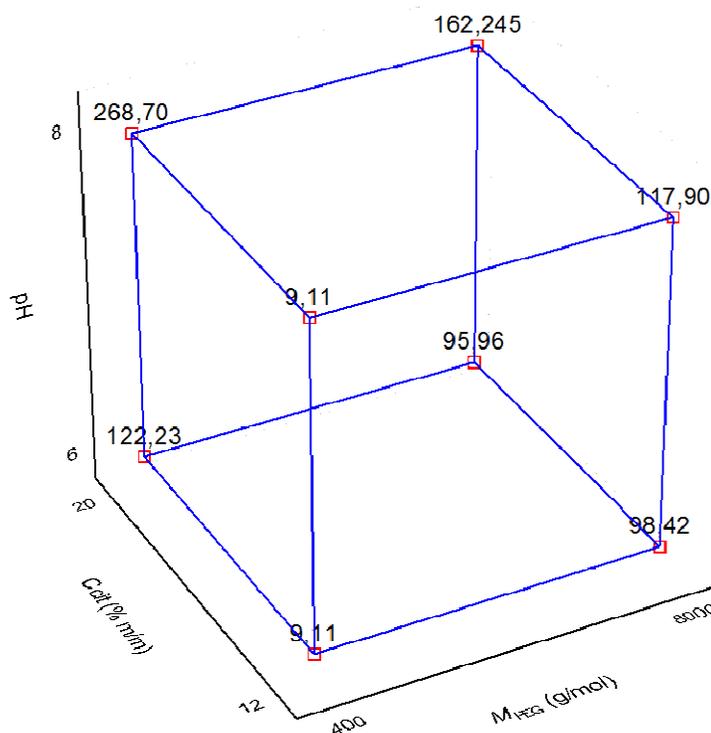
Tubio e colaboradores (2004) ressaltaram que em solução aquosa o PEG atua como uma grande molécula móvel apresentando um grande volume excluído. Embora este efeito de exclusão aumente com a massa molar, polímeros de grande massa molar possuem a capacidade de formar ligações intramoleculares, adquirindo desta forma uma conformação mais compacta.

O fenômeno do volume excluído ocorre devido à elevada massa molar do polímero aumentar a área de contato entre a biomolécula e os componentes do sistema, de acordo com as características da molécula e com o tipo de interação, mas de um modo geral o coeficiente de partição diminui (PESSOA-JR. e KILIKIAN, 2005). Uma explicação para este fenômeno foi descrita quando se avaliou a interação entre o polímero e a proteína nos sítios hidrofóbicos da molécula, este efeito foi mais importante que o efeito do volume excluído. Este efeito foi observado na partição da pepsina e quimosina em sistemas de duas fases aquosas PEG/fosfato (SPELZINI et al., 2005).



**Figura 3.3.** Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável de resposta a recuperação em atividade da fitase (%REC). Os significados dos símbolos na ordenada são: (1)  $M_{PEG}$  - massa molar do PEG, (2)  $C_{PEG}$  - concentração do PEG, (3)  $C_{CIT}$  - concentração de citrato, (4) pH.

A Figura 3.3 representa o gráfico de Pareto mostrando os efeitos principais para a %REC (Recuperação em atividade) da fitase produzida com *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924. Observa-se que a variável mais significativa para esta resposta é a concentração de citrato ( $C_{CIT}$ ), ou seja, com o aumento da  $C_{CIT}$ , há um aumento da recuperação da enzima fitase em estudo.



**Figura 3.4.** Gráfico cúbico das variáveis ( $M_{PEG}$ ,  $C_{CIT}$  e pH) em função da resposta recuperação em atividade da fitase.

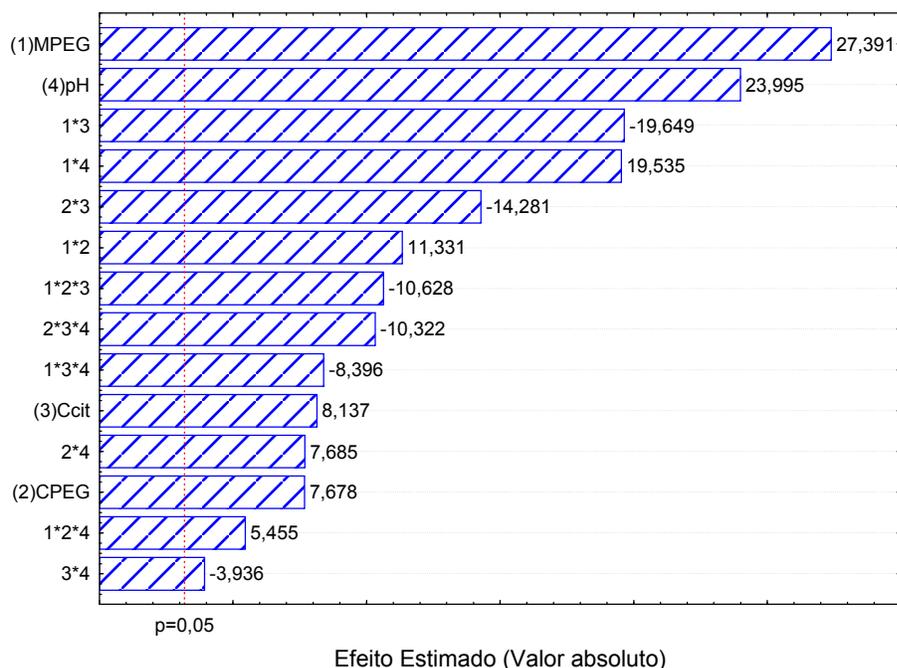
A interação variáveis massa molar do PEG, concentração do PEG e pH foram significativa e positiva para a variável-resposta recuperação. Isto mostra que o aumento simultâneo da massa molar do PEG, concentração do PEG e pH favorece o recuperação em atividade da fitase. A Figura 3.4 representa um cubo, no qual as três principais variáveis estão correlacionadas ( $M_{PEG}$ ,  $C_{CIT}$  e pH). Esta análise relaciona as variáveis para a resposta recuperação em atividade, a melhor condição encontrada para as três variáveis foi obtida com a  $M_{PEG}$  de 400 (g/mol),  $C_{CIT}$  de 20% (m/m) e pH 8.0.

Combinando a  $M_{PEG}$  de 400 (g/mol) juntamente com a concentração de citrato de 20% (m/m) obteve-se o maior valor de recuperação em atividade (278,35%). Valores de recuperação acima de 100% são frequentemente reportados para extração enzimática usando extração líquido-líquido. Estes altos valores de recuperação são provavelmente explicados pela eliminação dos inibidores durante o processo de purificação e pela composição do sistema que favorece a atividade

enzimática (MAYERHOFF et al., 2004). Esses resultados corroboram com os resultados encontrados por Porto e colaboradores (2007) que estudou extração de uma protease, sendo os melhores foram encontrados em sistemas compostos por  $M_{PEG}$  de 400 (g/mol),  $C_{PEG}$  de 24% (m/m) e  $C_{CIT}$  de 20% (m/m).

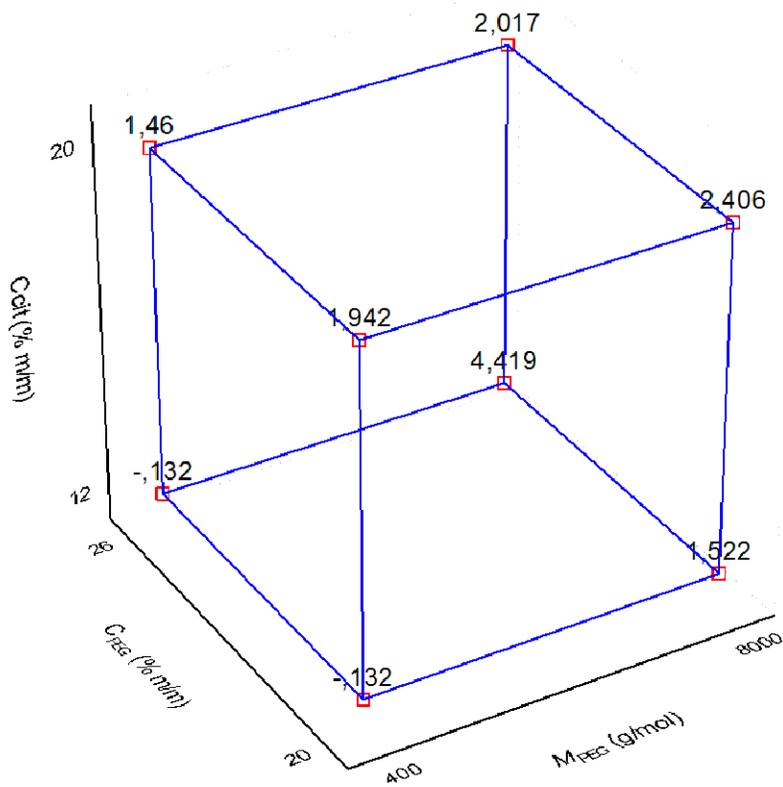
Naganagouda e Mulimani (2008) utilizaram sistemas de duas fases aquosas para extrair  $\alpha$ -galactosidase produzida por *Aspergillus oryzae*. O sistema ótimo foi encontrado em pH 5,0, formado por  $M_{PEG}$  de 4000 (g/mol),  $C_{PEG}$  12%,  $C_{FOSF}$  11,9% com coeficiente de partição de 0,156, aumento de pureza de 3,6 e 87,71 de recuperação em atividade na fase salina do sistema.

Yang e colaboradores (2008) estudaram a partição e purificação da xilanase produzida por *Paecilomyces thermophila* em fermentação sólida em sistemas de duas fases aquosas. Conseguiram um aumento de pureza de 5,54 e recuperação em atividade de 98,7 na fase superior do sistema, utilizando  $C_{PEG}$  de 12,5%,  $M_{PEG}$  4000 (g/mol), 25%  $(NH_4)_2SO_4$  e pH 7,2.



**Figura 3.5.** Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável de resposta o aumento de pureza (AP). Os significados dos símbolos na ordenada são: (1)  $M_{PEG}$  - massa molar do PEG, (2)  $C_{PEG}$  - concentração do PEG, (3)  $C_{CIT}$  - concentração de citrato, (4) pH.

Nota-se que todos os fatores e interações foram significativos para o aumento da pureza ( $AP$ ), pois os valores do efeito estimado estão acima do nível de significância  $p = 0,05$  (Figura 3.5). A interação entre a  $M_{PEG}$  (1) e a  $C_{CIT}$  (3) possui um efeito estimado negativo para o aumento de pureza. Isto significa que o aumento da  $M_{PEG}$  e a diminuição da  $C_{CIT}$  simultaneamente, favoreceram o aumento da pureza ( $AP$ ).



**Figura 3.6.** Gráfico cúbico das variáveis (concentração de citrato, concentração de PEG, massa molar do PEG) em função da resposta aumento da pureza.

As três principais variáveis correlacionadas ( $M_{PEG}$ ,  $C_{PEG}$  e  $C_{CIT}$ ) estão representadas em um cubo (Figura 3.6). Esta análise relaciona as variáveis para a resposta aumento da pureza, a melhor condição encontrada para as três variáveis foi obtida com a  $M_{PEG}$  de 8000 (g/mol),  $C_{PEG}$  de 20% (m/m) e  $C_{CIT}$  de 12% (m/m).

O maior valor do aumento de pureza (7,58) foi obtido no sistema com a seguinte característica:  $M_{PEG}$  de 8000 (g/mol),  $C_{PEG}$  de 26% (m/m), pH 8,0 e  $C_{CIT}$  de 12% (m/m) (Tabela 3.1, ensaio 12). Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Porto e colaboradores (2007) que estudou a extração e purificação

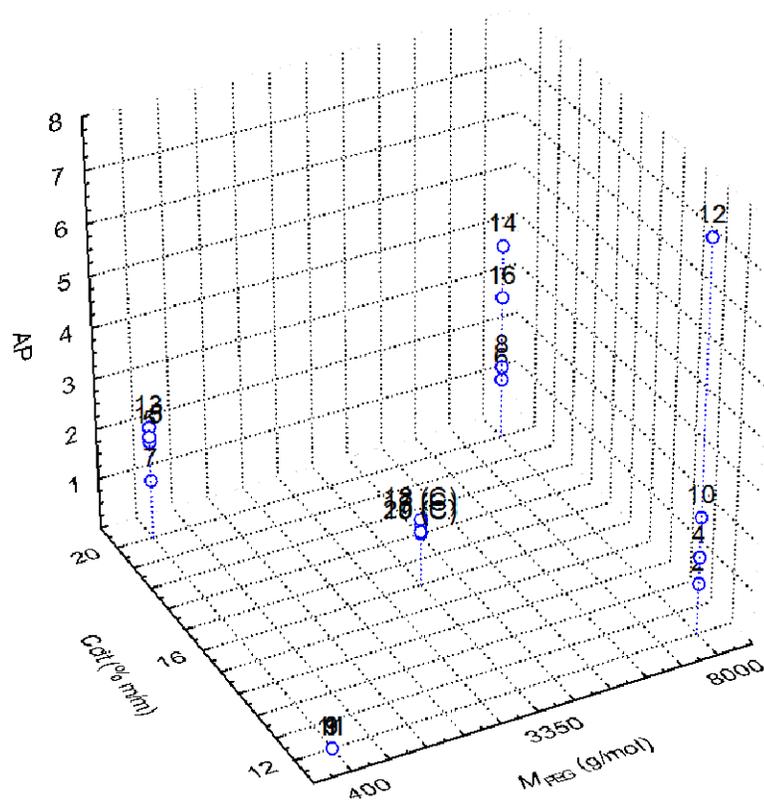
de protease produzida por *Clostridium perfringens* em sistemas de duas fases aquosas utilizando PEG/citrato, no qual obteve os seguintes resultados: um aumento de pureza (2,69) obtido no sistema com a seguinte característica:  $M_{PEG}$  de 8000 (g/mol),  $C_{PEG}$  de 24% (m/m), pH 8,0 e citrato de 15% (m/m).

Alguns resultados apresentados pela literatura são distintos aos obtidos no presente trabalho. Oliveira e colaboradores (2003), que estudaram o comportamento da partição da hexoquinase em SDFA com sistemas PEG/citrato, verificaram que baixas massas molares do PEG (400 g/mol) e altas concentrações de citrato (20%) promoveram altos valores de coeficiente de partição da enzima hexoquinase produzida por *S. cerevisiae*.

Estudos realizados por Mayerhoff e colaboradores (2004) mostraram os efeitos das variáveis sobre o aumento de pureza da xilose redutase produzida por *Candida mogii*, os quais apresentaram a massa molar do PEG como efeito significativo, mas o efeito foi negativo. Os autores obtiveram um aumento de pureza de 1,24, com massa molar do PEG de 1500 (g/mol), concentração de PEG de 22% (m/m), concentração de fosfato de 10% (m/m), utilizando um planejamento fatorial  $2^4$ .

Kammoun e colaboradores (2009) estudaram a purificação de  $\alpha$ -amilase CBS 81972 através de sistemas de duas fases aquosas, os quais encontraram resultados de 3,35 de aumento de pureza, 62,8 de recuperação em atividade em sistemas com 20,0% de  $C_{PEG}$  e 4,0% de  $C_{CIT}$ .

Vaidya e colaboradores (2006) investigaram a purificação da polifenol oxidase (PPO) da batata (*Solanum tuberosum*) pela partição em sistemas de duas fases aquosas e estudaram os efeitos da  $M_{PEG}$ ,  $C_{PEG}$ , pH e  $C_{FOSF}$ . Esses autores encontraram os seguintes resultados: coeficiente de partição de 32,3, aumento de pureza de 15,7 e recuperação em atividade de 7,0% na fase polimérica do sistema, em ensaios com pH 7,0, contendo 5% PEG 8000 (g/mol) e 28,5% de fosfato.



**Figura 3.7.** Representação gráfica do aumento de pureza em relação à concentração de citrato e massa molar do PEG.

Analisando a Figura 3.7, onde está representada a distribuição dos sistemas de extração da fitase em relação à resposta aumento de pureza pode-se concluir que o sistema de extração número 12 obteve a melhor purificação 7,58, todavia obteve uma recuperação de 113,38%, o qual obteve os melhores resultados para as três variáveis-resposta simultaneamente.

## Conclusão

Neste trabalho conseguiu-se um aumento de pureza de aproximadamente 7,58 em relação ao extrato bruto, com a 26% (m/m) de PEG 8000 (g/mol), pH 8,0 e 12% (m/m) de citrato. A extração utilizando SDA PEG/citrato demonstrou ser promissora

para extração e purificação de fitases produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924, podendo ser aplicada na composição de rações de animais não-ruminantes.

### Agradecimentos

Os autores agradecem a FACEPE, CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro e ao LABTECBIO (DMFA/UFRPE), pela infra-estrutura para a realização deste trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, J.; CHUMPITAZ, L.D.A.; SILVA, L.H.M.; FRANCO, T.T.; MEIRELLES, A.J.A. Partitioning of whey proteins, bovine serum albumin and porcine insulin in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 743: 235-239, 2000.

AZEVEDO, A.M.; GOMES, A.G.; ROSA, P.A.J. Partitioning of human antibodies in polyethylene glycol–sodium citrate aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology** ( 65):14-21, 2009.

BARBOSA, H.S.C.; HINEB, A.V.; BROCCINIC, S.; SLATER, N.K.H.; MARCOS, J.C. Dual affinity method for plasmid DNA purification in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography A** (1217):1429-1436, 2010.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** (72):248-254, 1976.

DREYER, S.; SALIMB, P.; KRAGL, U. Driving forces of protein partitioning in an ionic liquid-based aqueous two-phase system. **Biochemical Engineering Journal** (46):176-185, 2009.

EL-GINDY, A.A.; IBRAHIM, Z.M.; ALI, U.F.; EL-MAHDY, O.M. Extracellular phytase production by solid-states cultures of *Malbranchea sulfurea* and *Aspergillus niveus* on cost-effective medium. **Research Journal of Agricultural and Biological Sciences** 5 (1):42-62, 2009.

GREINER, R.; KONIETZNY, U. Phytase for food application. **Food Technology and Biotechnology** 44(2):125-140, 2006.

HEINONEN J, LATHI R. A new and convenient colorimetric determination to the assay of inorganic pyrophosphate. **Analytical Biochemistry** (113):313-317, 1981.

KAMMOUN, R.; CHOUAYEKH, H.; ABID, H.; NAILI, B.; BEJAR, S. Purification of CBS 819.72  $\alpha$ -amylase by aqueous two-phase systems: Modelling using Response Surface Methodology. **Biochemical Engineering Journal** (46):306-312, 2009.

LUECHAUA, F.; CHUAN-LINGA, T.; LYDDIATTA, A. Descriptive model and methods for up-scaled process routes for interfacial partition of bioparticles in aqueous two-phase systems. **Biochemical Engineering Journal** (50):122-130, 2010.

MARCOS, J.C.; FONSECA, L.P.; RAMALHO, M.T.; CABRAL, J.M.S. Partial purification of penicillin acylase from *Escherichia coli* in poly(ethylene glycol)-sodium citrate aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B** (734):15-22, 1999.

MAYERHOFF, Z.D.V.L.; ROBERTO, I.C.; FRANCO, T.T. Purification of xylose reductase from *Candida mogii* in aqueous two-phase systems. **Biochemical Engineering Journal** (18):217-223, 2004.

NAGANAGOUDA, K.; MULIMANI, V.H. Aqueous two-phase extraction (ATPE): An attractive and economically viable technology for downstream processing of *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -galactosidase. **Process Biochemistry** (43):1293-1299, 2008.

OLIVEIRA, L.A.; SARUBBO, L.A.; PORTO, A.L.F.; LIMA-FILHO, J.L.; CAMPOSTAKAKI, G.M.; TAMBOURGI, E.B. Physical and thermological characterization of polyethylene glycol-cashew-nut tree gum aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B** (766):27-36, 2001.

OLIVEIRA, G.G.G.; SILVA, D.P.; ROBERTO, I.C.; VITOLO, M.; PESSOA-JUNIOR, A. Partition behavior and partial purification of hexokinase in aqueous two-phase polyethylene glycol/citrate systems. **Applied Biochemistry and Biotechnology** (105):787-797, 2003.

PESSOA JR., A.; KOLIKIAN, B.V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**, Manole: São Paulo, 2005.

PORTO, T.S.; PESSOA FILHO, P.A.; BARROS NETO, B.; LIMA FILHO, J.L.; CONVERTI, A.; PORTO, A.L.F.; PESSOA JR, A. Removal of proteases from

*Clostridium perfringens* fermented broth by aqueous two-phase systems (PEG/citrate). **Journal of Industrial and Microbiology Biotechnology** (34):547-552, 2007.

RAWDKUENA, S.; PINTATHONGB, P.; CHAIWUTB, 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** (89):73-80, 2011.

SELVAKUMARA, P.; CHUAN-LINGA, T.; WALKERA, 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** (75):323-331, 2010.

SPELZINI, D.; FARRUGGIA, B.; PICÓ, G. Features of the acid protease partition in aqueous two-phase systems of polyethylene glycol-phosphate: chymosin and pepsin. **Journal of Chromatography B** (821):60-66, 2005.

STATSOFT INC. STATISTICA (data analysis software systems) version 8.0., 2008.

TUBIO, G.; NERLI, B.; PICO, G. Relationship between the protein surface hydrophobicity and its partitioning behaviour in aqueous two-phase systems of polyethyleneglycol–dextran. **Journal of Chromatography B** 799 (2):293-301, 2004.

VAIDYA, BK.; SUTHAR, HK.; KASTURE, S.; NENE, S. Purification of potato polyphenol oxidase (PPO) by partitioning in aqueous two-phase system. **Biochemical Engineering Journal** (28):161-166, 2006.

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** (88):40-46, 2010.

YANG, S.; HUANG, Z.; JIANG, Z.; LITE, L. Partition and purification of a thermostable xylanase produced by *Paecilomyces thermophila* in solid-state

fermentation using aqueous two-phase systems. **Process Biochemistry** (43):56-61, 2008.