

## ESTUDO DA PARTIÇÃO DE FITASE PRODUZIDA POR *Aspergillus niger* var. *phoenicis* UTILIZANDO BIOCONVERSÃO EXTRATIVA EM SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS PEG/CITRATO

Júlio César dos S. Nascimento<sup>1</sup>, Fabiana América S. D. de Souza<sup>1</sup>, Rúben André G. de Oliveira<sup>2</sup>, Milena Fernandes da Silva<sup>1</sup>, Raquel Pedrosa Bezerra<sup>1</sup>, José António de C. Teixeira<sup>3</sup>, Ana Lúcia F. Porto<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Área de Bioquímica e Biofísica, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>2</sup> Escola de Ciência, Departamento de Química, Universidade do Minho, Campus Gualtar, 4710-057, Braga, Portugal.

<sup>3</sup> Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus Gualtar, 4710-057, Braga, Portugal.

E-mail para contato: juliozootecnista@hotmail.com

### RESUMO

*Existem diversos métodos tradicionais que são utilizados para extrair biomoléculas produzidas por fermentação convencional. Um método alternativo é o sistema de duas fases aquosas, o qual foi desenvolvido para a extração de bioprodutos. A bioconversão extrativa trata-se de um sistema de duas fases aquosas que integra cultivo microbiológico à produção e recuperação do bioproduto. Fitases são fosfatases específicas que estão envolvidas na catálise do ácido fitico. O objetivo deste trabalho foi estudar a partição da fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* por bioconversão extrativa utilizando PEG/citrato. Realizou-se um planejamento fatorial completo 2<sup>5</sup>, estudando as seguintes variáveis: massa molar do PEG, concentração do PEG, concentração de citrato, pH e agitação, onde obteve-se como variável-resposta o coeficiente de partição em atividade ( $K_{ATIV}$ ). Neste trabalho conseguiu-se um coeficiente de partição de 25,77 utilizando  $M_{PEG}$  (8000 g/mol),  $C_{PEG}$  (26,0% m/m),  $C_{CIT}$  (20,0% m/m), pH (6,0) e agitação (100 rpm). Através dos resultados obtivos, pode-se concluir que a fitase utilizada no presente estudo apresenta uma tendência de particionar para a fase superior do sistema ( $K > 1$ ). A técnica de fermentação extrativa utilizando SDFA PEG/citrato demonstrou ser promissora para extração de fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis*, podendo ser aplicada na composição de rações comerciais.*

### 1. INTRODUÇÃO

Existem diversos métodos tradicionais que são utilizados para purificar biomoléculas produzidas por fermentação convencional (Mazzola et al., 2008). Um método alternativo alternativo que tem sido usado na extração de bioprodutos é o sistema de duas fases aquosas (SDFA), o qual foi desenvolvido baseado no uso de dois polímeros ou polímero-sal para a purificação de produtos biotecnológicos (Sousa et al., 2009). A bioconversão extrativa trata-se de um sistema de duas fases

aquosas que integra o cultivo microbiológico à produção e recuperação do bioproduto *in situ* de maneira simultânea, sendo utilizado para aumentar o rendimento dos processos fermentativos convencionais. Esta técnica pode representar uma alternativa para superar a inibição do bioproduto e a pequena produtividade volumétrica que geralmente está associado aos processos biotecnológicos (Marques et al., 2009).

Fitases são fosfatases específicas que estão envolvidas na degradação catalítica do ácido fítico. Durante o amadurecimento, cereais e sementes de leguminosas acumulam uma quantidade substancial de ácido fítico, o que representa de 60% a 80% do total de fósforo vegetal total. Este fósforo fítico não é utilizado por aves e suínos, e é excretado nas fezes destes animais que consequentemente ficam expostas no solo, particularmente em áreas de produção intensiva de criações zootécnicas (Naves et al., 2014). As aves e suínos apresentam baixa atividade de fitase endógena, logo, fitases microbianas têm sido adicionadas à dieta de aves e suínos para melhorar o aproveitamento do fósforo fítico presente nos ingredientes de origem vegetal (Karimi et al., 2011). Como benefícios secundários, mas não menos importantes, o uso da fitase na nutrição de aves e suínos reduz o custo da ração pela menor inclusão de fonte de fósforo inorgânico e diminui o impacto ambiental (Bedford & Partridge, 2010). O objetivo deste trabalho foi estudar a partição da fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 por bioconversão extrativa utilizando SFA PEG/citrato.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Micro-organismo

O micro-organismo utilizado neste trabalho foi *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924, cedido pela Coleção de Cultura do Departamento de Micologia, Universidade Federal de Pernambuco (Recife, Brasil).

### 2.2. Meios de Culturas para a Produção e Extração de Fitase

Os ensaios foram realizados utilizando meio de cultura com a seguinte composição: farelo de arroz 1.0% (*m/v*), como fonte de carbono, milhocina 3.0% (*v/v*) como fonte de nitrogênio, 0.5 g/L KCl, 1.5 g/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 2.0 g/L CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 1.5 g/L Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O. De acordo com o pH a ser estudado tampões específicos foram adicionados ao meio, tais como: tampão acetato 0.2 M pH 4.0, tampão acetato 0.2 M pH 6.0, ou tampão TRIS-glicina 0.2 M pH 8.0.

### 2.3. Preparação dos sistemas de duas fases aquosas em bioconversão extrativa

Foi realizado um planejamento fatorial completo 2<sup>5</sup> para a produção e extração da fitase, estudando as seguintes variáveis: Massa molar do PEG (MPEG, 400, 3350 e 8000 g/mol), concentração do PEG (20, 23 e 26,0% *m/m*), concentração de citrato (12, 16 e 20,0% *m/m*), pH (6, 7 e 8,0) e agitação (100, 150, 200 rpm). Utilizou-se estas concentrações e valores para as variáveis, devido a estudos prévios. Os sistemas foram preparados utilizando Erlenmeyers (250 mL), solução

de citrato e solução de PEG e acrescido de meio de cultura descrito no item anterior. Água ultra-pura foi adicionada para um sistema com volume final de 50 mL, e inóculo com concentração de  $10^6$  esporos/mL. Os sistemas foram incubados em agitador orbital a 30°C e agitação alternada de acordo com os ensaios durante 120 horas. Ao final do processo, os erlenmeyers foram mantidos em repouso por 2 h para separação das fases que foram posteriormente centrifugadas separadamente a 11.000 xg por 20 minutos para obtenção das fases (superior ou rica em PEG e inferior ou rica em sal) e as fases foram submetidas às determinações analíticas (proteínas totais e atividade fitásica).

#### 2.4. Metodologia de análise dos resultados

O coeficiente de partição da enzima é definido como a razão da atividade volumétrica da fase superior ( $A_S$ ) e a fase inferior ( $A_i$ ):

$$K = A_S/A_i \quad (1)$$

Após a obtenção dos resultados dos ensaios propostos em planejamento estatístico, procedeu-se a análise estatística dos dados através do Software Statistica 8.1 (Statsoft Inc, 2008), no qual o efeito das variáveis sobre a respostas coeficiente de partição. As significâncias dos efeitos foram analisadas por análise de variância (ANOVA). A análise estatística do planejamento experimental, incluindo os diagramas apresentados foram realizados utilizando o software Statistica versão 8.0 (Statsoft Inc, Tulsa, OK, USA).

#### 2.4. Determinações analíticas (conteúdo protéico e atividade fitásica)

A determinação do conteúdo protéico foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. A atividade fitásica foi determinada pela utilização do método do molibdato de amônio modificado, de acordo com Heinonen and Lathi (1981). Uma unidade de foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de fósforo inorgânico por minutos sob as condições padrão de ensaio. A atividade enzimática foi expressa em unidades por mL (U/mL).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir do caldo fermentativo produzido durante o crescimento de *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924, realizou-se as análises quantitativas de atividade fitásica e conteúdo protéico nas fases superior e inferior. Na tabela a seguir (Tabela 1) estão listados os resultados obtidos em fermentação extrativa conforme planejamento fatorial completo  $2^5$ , para avaliar à influência da massa molar do PEG, concentração do PEG, concentração de citrato, pH e agitação, a obter como variável-resposta o  $K_{AT}$  (coeficiente de partição em atividade fitásica).

Tabela 01. Resultados do coeficiente de partição em atividade ( $K_{ATIV}$ ) de acordo com planejamento fatorial completo  $2^5$  utilizando bioconversão extrativa em SDFA PEG/citrato.

Ensaio	$M_{PEG}$ (g/mol)	$C_{PEG}$ (%)	$C_{CIT}$ (%)	pH	Agitação (rpm)	$K_{ATIV}$
01	400	20	12	6	100	*
02	8000	20	12	6	100	8,30
03	400	26	12	6	100	*
04	8000	26	12	6	100	15,16
05	400	20	20	6	100	4,00
06	8000	20	20	6	100	25,54
07	400	26	20	6	100	5,80
08	8000	26	20	6	100	25,77
09	400	20	12	8	100	*
10	8000	20	12	8	100	12,04
11	400	26	12	8	100	*
12	8000	26	12	8	100	13,61
13	400	20	20	8	100	17,26
14	8000	20	20	8	100	9,21
15	400	26	20	8	100	9,41
16	8000	26	20	8	100	20,21
17	400	20	12	6	200	*
18	8000	20	12	6	200	14,70
19	400	26	12	6	200	*
20	8000	26	12	6	200	22,15
21	400	20	20	6	200	9,30
22	8000	20	20	6	200	17,61
23	400	26	20	6	200	6,25
24	8000	26	20	6	200	14,42
25	400	20	12	8	200	*
26	8000	20	12	8	200	24,37
27	400	26	12	8	200	17,23
28	8000	26	12	8	200	13,19
29	400	20	20	8	200	8,91
30	8000	20	20	8	200	17,97
31	400	26	20	8	200	7,40
32	8000	26	20	8	200	17,92
33 (C)	3350	23	16	7	150	24,36
34 (C)	3350	23	16	7	150	24,87
35 (C)	3350	23	16	7	150	23,03
36 (C)	3350	23	16	7	150	22,62

Legenda: \* estes ensaios não apresentaram formação de duas fases pois as concentrações do meio de cultivo se encontraram abaixo das concentrações críticas, ou seja, inferior a curva binodal para o sistema PEG/citrato.

O melhor resultado para partição e extração integrada da fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 encontra-se no ensaio 8, o qual possui como composição: MPEG (8000 g/mol),

CPEG, (26,0% m/m), CCIT (20,0% m/m), pH (6,0) e agitação (100 rpm). Em todos os ensaios estudados, coeficiente de partição em atividade ( $K_{AT}$ ) apresentou-se maior do que 1,0 ( $K_{AT} > 1$ ). Este resultado mostra que a enzima fitase após ser produzida e secretada no meio de cultura, particiona preferencialmente para a fase superior do sistema (fase PEG). Os valores de  $K_{AT}$  encontrados variaram de 4,0 (ensaio 5), até 25,77 (ensaio 8).

Os resultados encontrados neste trabalho são semelhantes aos reportados por Ooi et al. (2011), que utilizaram SFA PEG/sais para extrair e purificar uma lipase produzida por *Burkholderia pseudomallei*, e obtiveram valores de  $K_{AT}$  entre (0,83 a 7,86), onde na maior parte dos sistemas estudados a lipase particionou para a fase PEG. Segundo Zafarani-Moatar & Hanzehzadeh (2011) sugerem que este comportamento de uma proteína particionar preferencialmente para a fase superior em altas concentrações salinas, é denominado *Salting Out*. Isto pode ser explicado pelo resultado da competição entre os compostos iônicos acrescidos nos sistemas, e desta maneira a biomolécula diminui a capacidade de solvatação no solvente aquoso, particionando para a fase superior. Neste trabalho, a fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 foi impulsionada para a fase superior do sistema, onde a biomolécula encontrou uma maior solubilidade.

A Figura 01 ilustra um gráfico de projeção de superfície representando o coeficiente de partição em atividade de acordo com a concentração de citrato e massa molar do PEG usados em fermentação extrativa da fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924. O melhor valor de coeficiente de partição em atividade ( $K_{AT}$ ) encontrou-se no ensaio 06 (25,54), indicando que a fitase apresenta tendência de particionar para a fase superior do sistema ( $K_{ATIV} > 1,0$ ).

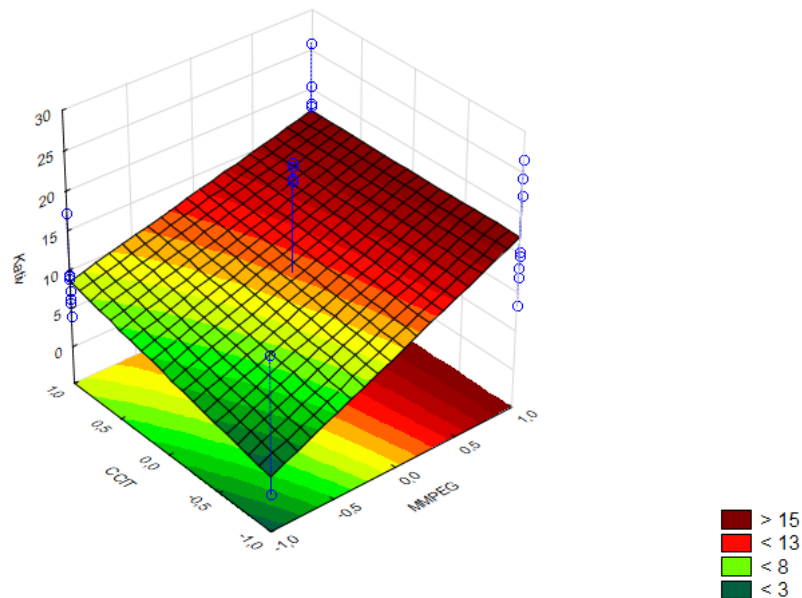


Figura 01. Gráfico de projeção de superfície representando o coeficiente de partição em atividade ( $K_{AT}$ ) de acordo com a concentração de citrato (CCIT) e massa molar do PEG (MPEG) usados em fermentação extrativa da fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924.

## 4.0 CONCLUSÃO

A técnica de fermentação extrativa utilizando SFA PEG/citrato demonstrou ser promissora para extração e purificação de fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924, podendo ser aplicada na composição de rações de aves e suínos.

## 5.0 REFERÊNCIAS

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Bioch.* 72:248-254.
- Bedford, M.R., Partridge, G.G., 2010. *Enzymes in farm animal nutrition*. Oxfordshire: CABI Publishing, 319p. DOI: 10.1079/9781845936747.0000.
- Heinonen, J.K., Lathi, R.J., 1981. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Anal. Biochem.* 113(2):313-317.
- Karimi, A., Bedford, M.R., Sadeghi, G.H., Ghobadi, Z., 2011. Influence of dietary nonphytate phosphorous levels and phytase supplementation on the performance and bone characteristics of broilers. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v.13, p.43-51. DOI: 10.1590/S1516-635X2011000100007.
- Marques, D.A.V., Torres, B.R., Porto, A.L.F., Pessoa-Júnior, A., Converti, A., 2009. Comparison of oxygen mass transfer coefficient in simple and extractive fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, vol. 47, 1-3, p. 122-126.
- Naves, L.P., Rodrigues, P.B., Bertechini, A.G., Lima, E.M.C., Teixeira, L.V., Alvarenga, R.R., Nardelli, N.B.S., Oliveira, D.H., Oliveira, M.H., 2014. Redução de fósforo em dietas para frangos com base em valores de equivalência da fitase. *Pesq. Agropec. Bras.*, 49, n.1, p.71-77. DOI: 10.1590/S0100-204X2014000100010.
- Ooi, C.W., Hii, S.L., Kamal, M.M., Ariff, A., Ling, T.C., 2011. Extractive fermentation using aqueous two-phases systems for integrated production and purification of extracellular lipase derived from *Burkholderia pseudomallei*. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 68-73.
- Sousa, R.C.S., Coimbra, J.S.R., Silva, L.H.M., Silva, M.C.H., Rojas, E.E.G., Vicente, A.A., 2009. Thermodynamic studies of partitioning behavior of lysozyme and conalbumin in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B*, Vol. 877: (24), p. 2579-2584.
- Zafarani-Moattar, M.T., Hamzehzadeh, S., 2011. Partitioning of amino acids in the aqueous biphasic system containing the water-miscible ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium bromide and the water-structuring salt potassium citrate. *Biotechnol Prog.* 27(4):986-97. DOI: 10.1002/btpr.613.
- 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.
- StatSoft, Inc., Tulsa, OK.: STATISTICA, Version 8. **AStA Advances in Statistical Analysis**, (91):339-341, 2007.