

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. Nascimento¹, Fabiana América S. D. de Souza¹, Rúben André G. de Oliveira², Milena Fernandes da Silva¹, Raquel Pedrosa Bezerra¹, José António de C. Teixeira³, Ana Lúcia F. Porto¹

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

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

³ 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 2⁵, 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 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 MgSO₄.7H₂O, 2.0 g/L CaCl₂.2H₂O, 1.5 g/L Fe₂SO₄.7H₂O. 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 2⁵ 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 μ 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 ($K_{ATIV} > 1,0$).

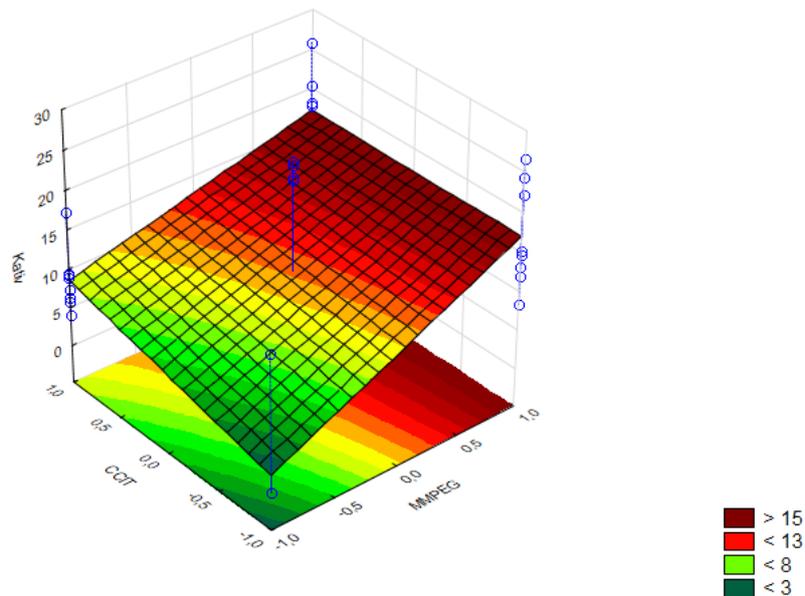


Figura 01. Gráfico de projeção de superfície representando o coeficiente de partição em atividade (K_{AT}) de acordo com a concentração de citrato (CCIT) e massa molar do PEG (MPEG) usados em fermentação extrativa da fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924.

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.