



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

**Produção, Purificação e Caracterização Parcial da Fitase Extracelular Produzida
por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 e sua Atividade Hidrolítica e Anti-
proteolítica *in vitro* em Rações Comerciais de Aves e Suínos**

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Ana Lúcia Figueiredo Porto

Co-orientador: Prof^º Dr. José António Couto Teixeira

Recife, PE

Março, 2015

JÚLIO CÉZAR DOS SANTOS NASCIMENTO

Produção, Purificação e Caracterização Parcial da Fitase Extracelular Produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 e sua Atividade Hidrolítica e Anti-proteolítica *in vitro* em Rações Comerciais de Aves e Suínos

Trabalho de Tese apresentado ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do título de **DOCTOR** em Biociência Animal, área de Biotecnologia e Microbiologia Aplicada.

Recife, PE

Março, 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

N244p Nascimento, Júlio César dos Santos
Produção, purificação e caracterização parcial da fitase extracelular produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 e sua atividade hidrolítica e anti-proteolítica *in vitro* em rações comerciais de aves e suínos / Júlio César dos Santos Nascimento. – Recife, 2015.
192 f. : il.

Orientador(a): Ana Lúcia Figueiredo Porto.
Tese (Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2015.

Referências.

1. Fitase
 2. Sistemas de duas fases aquosas
 3. Caracterização bioquímica
 4. *Aspergillus niger*
- I. Porto, Ana Lúcia Figueiredo, orientadora II. Título

CDD 591.4

JÚLIO CÉZAR DOS SANTOS NASCIMENTO

Produção, Purificação e Caracterização Parcial da Fitase Extracelular Produzida por
Aspergillus niger var. *phoenicis* URM 4924 e sua Atividade Hidrolítica e Anti-
proteolítica *in vitro* em Rações Comerciais de Aves e Suínos

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Ana Lúcia Figueiredo Porto - Presidente
(Professor Associado, Universidade Federal Rural de Pernambuco)

Prof^a Dr^a Daniela de Araújo Viana Marques
(Professor Assistente, Universidade de Pernambuco)

Prof^a Dr^a Thaysa Rodrigues Torres
(Professor Adjunto, UAST - Universidade Federal Rural de Pernambuco)

Dr^a Fabiana América Silva Dantas de Souza
(Pesquisadora Autônoma)

Prof^a Dr^a Raquel Pedrosa Bezerra
(Professor Adjunto, Universidade Federal Rural de Pernambuco)

Recife, PE

Março, 2015

JÚLIO CÉZAR DOS SANTOS NASCIMENTO

Produção, Purificação e Caracterização Parcial da Fitase Extracelular Produzida por
Aspergillus niger var. *phoenicis* URM 4924 e sua Atividade Hidrolítica e Anti-
proteolítica *in vitro* em Rações Comerciais de Aves e Suínos

Data de Aprovação: 27 de Fevereiro de 2015

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Ana Lúcia Figueiredo Porto (Presidente)
(Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE)

Profª Drª Daniela de Araújo Viana Marques
(Universidade de Pernambuco, Campus de Serra Talhada)

Profª Drª Thaysa Rodrigues Torres
(Departamento de Zootecnia, UAST-UFRPE)

Drª Fabiana América Silva Dantas de Souza
(Pesquisadora Autônoma)

Profª Drª Raquel Pedrosa Bezerra
(Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE)

À minha família, pelo apoio e incentivo durante esta fase da minha vida; À Inês Oliveira, minha noiva, pela força, carinho e compreensão durante esta etapa; A Deus, por sua graça e misericórdia, sem as quais eu não teria conseguido vencer, dedico.

"Eu segurei muitas coisas em minhas mãos, e
perdi tudo; mas tudo que eu coloquei nas
mãos de Deus eu ainda possuo."

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

Fico extremamente satisfeito por ter recebido o apoio de tantas pessoas, familiares, amigos e colegas de trabalho, que me ajudaram e que são em parte responsáveis por toda a minha formação acadêmica.

À meus pais, Berta Maria e Jorge Cândido, que estiveram comigo em todos os momentos, sempre me ensinando o caminho a seguir. A todos os meus familiares, em especial a minha irmã Juliana, Danielly, Odair, Maria Clara, Maria Beatriz, Rosa, Amara, Gilma, Antônia, Hosana, Berto, Conceição, e todos os outros que sempre me apoiaram.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Ana Lúcia Figueiredo Porto, por todos os ensinamentos e pela oportunidade de ingressar na carreira científica. Ao Prof^o Dr^o José Antônio de Couto Teixeira, pela co-orientação e por ter me aceitado para a realização do meu estágio de doutoramento no exterior.

Ao Prof^o Dr^o João Carlos Marcos, pelas valiosas contribuições durante meu período de intercâmbio. À Prof^a Dr^a Marleyne José Affonso Aciolly Lins Amorim, por todo o incentivo desde a minha graduação.

À minha amada noiva, Inês Oliveira. Agradeço toda a paciência dispensada, pelo apoio durante os momentos mais difíceis. Por ter me suportado e por sempre estar tão perto de mim, mesmo distante. Te amo, meu amor! Também não poderia me esquecer de Noé Filho, Noé Neto e Carmelita Oliveira. Muito obrigado por tudo.

Aos meus queridos amigos: Adelaine de Sousa, Aderlan de Sousa, Adson Marques, Ana Elizabeth, Alane Moura, André Santos, Carlos Diogo, Dafne Loi, Edneide Santana, Edjane Santana, Eduardo Felipe, Fabiana Souza, Jailson Nascimento,

Leidiane Arcanjo, Marliene Ruth, Paulo Mateus, Rafael Campos, Raphael Andrade, Raphael Rodrigues, Rilson Joás, Tiago Lima, Thiago Campos, Samelly Lima e Wallace Neto. E a tantos outros que me ajudaram de alguma forma.

Aos meus amigos portugueses, que me receberam tão bem em terras lusitanas: Jorge Jesus, Nuno Ribeiro, Pedro Silva, Rúben Oliveira, Rui Sousa, Veríssimo Santos. Saudades vossas! A todos os amigos brasileiros que me acolheram em Portugal: Alessandra Accioly, Anabela Alves, Felipe Nascimento, Jadilson Lins, Jocemar Accioly, Robson Silva, Salatiel Almeida, Tiago Libório, Wellington Alves, Wellington Gusmão e Willams Ruocco.

Aos colegas do CENAPESQ (Centro de Apoio à Pesquisa da UFRPE): Daniela Viana, Diego Dias, Eduardo Felipe, Elaine Cristina, Gabriela Fernandes, José Noé, Ketyline Lira, Milena Fernandes, Meire Falcão, Pablo, Priscila Santos, Raquel Pedrosa, Rogério Veloso. E aos funcionários Edna, Terezinha e Mirela. Agradeço a toda cooperação.

A todos os meus mestres, em especial: Ana Maria Carneiro Leão (Metodologia do Ensino Superior), Carlos Bôa-Viagem Rabello (Avicultura), Cristiane Farrapeira (Zoologia Geral), Frederico Maia (Patologia Geral), Jaqueline Bianque (Parasitologia Veterinária), Marleyne Accioly (Anatomia Descritiva), Romildo Nogueira (Bioestatística). Obrigado por todo o conhecimento compartilhado.

E por fim, agradeço ao Deus criador, dono de toda a sabedoria e conhecimento. Obrigado, SENHOR, por não ter me deixado desistir. Rendo-TE graças pela vida, e sobretudo pela oportunidade de ter chegado até aqui.

RESUMO

As enzimas exógenas têm a capacidade de auxiliar na degradação de ingredientes específicos presentes em alimentos. Dentre os principais aditivos enzimáticos utilizados na alimentação de animais aves e suínos pode-se destacar as lipases, xilanases, glucanases, proteases e fitases. O fitato é um composto considerado como fator anti-nutricional, pois é responsável por perdas nutricionais significativas. Fitases formam um grupo de enzimas, denominadas genericamente de *mio*-inositol-hexafosfato fosfohidrolase, que hidrolizam o fitato, liberando sais de inositol e fosfato inorgânico. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito das variáveis (pH e temperatura) que influenciam à produção de fitase por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924, pré-purificação da enzima através da fermentação extrativa em S DFA PEG/citrato, caracterização bioquímica do pré e pós-purificado, atividade anti-proteolítica frente à pepsina gástrica suína e à tripsina pancreática, bem como o perfil hidrolítico *in vitro* da fitase em rações comerciais de aves e suínos. Temperatura e pH mostraram ser importantes parâmetros na produção da fitase e o conteúdo de ergosterol mostrou-se como um bom indicador para estimar a produção da biomassa. A fitase em estudo apresentou temperatura ótima a 30 °C e pH ótimo a 4,0. Após a extração e purificação da fitase em sistemas de duas fases aquosas por fermentação extrativa obteve-se máxima recuperação em atividade (150,38%) utilizando M_{PEG} (8000 g/mol), C_{PEG} (20,0% m/m), C_{CIT} (20,0% m/m), pH (6,0) e agitação (100 rpm). Através dos resultados obtidos verifica-se que após o processo de extração e purificação utilizando fermentação extrativa por S DFA PEG/citrato, a termoestabilidade da fitase diminuiu consideravelmente (38,4% da atividade residual em 90°C por 120 minutos para 50,0% da atividade residual em 70°C por 25 minutos). Observa-se que a enzima pré-purificada foi inibida em concentrações de fósforo de 6 μmoles de PO_4^{-2} , entretanto a fitase pós-purificada em S DFA

PEG/citrato foi inibida em concentração de fósforo menor do que a pré-purificada. Quanto a resistência quanto à proteólise, a fitase manteve 60,0% da sua atividade residual por 40 minutos. No entanto, quando exposta a atividade proteolítica da tripsina entérica, a fitase manteve aproximadamente 20,0% da atividade residual. A fitase mostrou-se com bom desempenho na resistência proteolítica, bem como na hidrólise do fitato em rações comerciais de aves e suínos, características bioquímicas essenciais para uma enzima com potencial aplicação industrial. Os resultados deste presente trabalho demonstram o potencial do fungo *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 para produzir fitase sob fermentação submersa para aplicação na alimentação de animais não-ruminantes.

Palavras-chave: Fitase; *Aspergillus niger*; Fermentação Extrativa; Fermentação Submersa; Propriedades Catalíticas; Caracterização Bioquímica.

ABSTRACT

Exogenous enzymes have ability to assist on degradation of specific compounds in foods. Among some enzyme additives fed to poultry and pigs can be lipases, xylanases, glucanases, proteases and phytases. Phytate is a compound considered an anti-nutritional factor since it is responsible for significant nutritional losses. Phytases are a group of enzymes, generically known as *myo*-inositol hexaphosphate fosfohidrolase that hydrolyze phytate, releasing inositol and inorganic phosphate salts. This aim of this study was to evaluate the effect of variables (pH and temperature) that influence the production of phytase by *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924, pre-purification of the enzyme by extractive fermentation in ATPS PEG/citrate, biochemical characterization of pre- and post-purified, anti- proteolytic activity against pig gastric pepsin and pancreatic trypsin, and the profile hydrolytic *in vitro* phytase in commercial diets of poultry and pigs. Temperature and pH proved to be important parameters in the production of phytase. Ergosterol content proved to be a good indicator to estimate biomass production. Phytase studied showed optimum temperature at 30°C and optimum pH 4.0. After extraction and purification of phytase in aqueous two-phase systems by extractive obtained maximum recovery in activity (150.38 %) using M_{PEG} (8000 g/mol), C_{PEG} (20.0 % m/m), C_{CIT} (20.0% w/w), pH (6.0) and agitation (100 rpm). From the results obtained it can be seen that after the extraction process using extractive fermentation and purification in ATPS PEG/citrate, thermostability of phytase decreased significantly (38.4% residual activity at 90° C for 120 minutes to 50.0 % of residual activity at 70° C for 25 minutes). It is observed that the pre- purified enzyme was inhibited by concentrations of phosphorus of 6 μmols of PO_4^{-2} , however post-purified phytase in ATPS PEG/citrate inhibited by low phosphorus concentration of the pre-purified. For resistance to proteolysis as the phytase kept 60.0 % of residual activity

after 40 minutes. However, when exposed to the proteolytic activity of trypsin enteric the phytase kept approximately 20.0 % of residual activity. Phytase proved diserable performance on proteolytic resistance, as well as phytate hydrolysis in commercial diets of poultry and pig, essential biochemical characteritics for an enzyme with potential industrial application. The results of this study demonstrate the potential of *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 to produce phytase in submerged fermentation for use in animal feed.

Keywords: Phytase; *Aspergillus niger*; Extractive fermentation; Submerged fermentation; Catalytic properties; Biochemical characterization

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

® - Registrado

A_i - Atividade fitásica na fase inferior

ANOVA - Análise de variância

AP - Aumento de pureza

AR - Atividade residual (%)

A_s - Atividade de fitase na fase superior

ALP - Fosfatases alcalinas

ATP - Adenosina trifosfato

BDA - Batata dextrose ágar

BPP - β-propeller fitases

BSA - Albumina sérica bovina

C - Carbono

Ca⁺² - Íon cálcio

C_{CIT} - Concentração de citrato

C_{PEG} - Concentração do PEG

E.C. - Enzyme Commission

EE - Efeitos estimados

EM - Energia metabolizável

FE- Fermentação extrativa

FTU - Unidade de Fitase

FP - Fator de purificação

GRAS - Generally Recognised as Safe

HAP - Histidinas ácidas fosfatases

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

IP_x - Fosfatídeos de inositol

IUB - União Internacional de Bioquímica

IUPAC - União Internacional de Química Pura

K - Coeficiente de partição

*K*_{AT} - Coeficiente de partição em atividade fitásica

KDa - Quilodáltons

Kcal.Kg⁻¹ - Quilocaloria por Quilo

*K*_m - Constante de Michaelis-Menten

*K*_{PROT} - Coeficiente de partição das proteínas

L - Litros

LPP - Lipase pancreática porcina

M - Molar

min - Minutos

mL - Mililitros

m/m - Massa/massa

mmol - Milimol

nmol - Nanomol

*M*_{PEG} - Massa molar do PEG

MSR - Metodologia de Superfície de Resposta

N - Nitrogênio

NRC - National Research Council

P - Fósforo

p - Nível de significância

PAP - Fosfatases ácidas púrpuras

PEG - Polietileno glicol

pH - Potencial hidrogeniônico

PheDH - Fenilalanina desidrogenase

Phy - Fitases

P_i - Fósforo inorgânico

PM - Peso molecular

PNA - Polissacarídeos não-amiláceos

PO₄⁻³ - Íons ortofosfatos

ppm - Partes por milhão

R² - Correlação

rpm - Rotação por Minuto

SDFA - Sistema de Duas Fases Aquosas

SE - Standards Errors

TGI - Trato gastro-intestinal

TRIS - Tris-aminometano

UI - Unidades Internacionais

U.Kg⁻¹ - Unidade enzimática por Quilograma

U/mL - Unidades por mL

URM - University Recife Micology

Var - Variedade

V_i - Volume da fase inferior

V_r - Razão de volume entre as fases superior e inferior

V_s - Volume da fase superior

Y - Recuperação em atividade (%)

w/w - Wight/wight

Zn - Zinco

μm - Micrômetro

μmol - Micromol

β -galac - β -galactosidase

SUMÁRIO

Capa.....	i
Contra-capa.....	ii
Ficha Catalográfica.....	iii
Banca Examinadora.....	iv
Folha de Aprovação.....	v
Dedicatória.....	vi
Epígrafe.....	vii
Agradecimentos.....	viii
Resumo.....	x
Abstract.....	xii
Lista de Siglas, Abreviaturas e Símbolos.....	xiv
Sumário.....	xviii
Lista de Tabelas.....	xxiii
Lista de Figuras.....	xxv
1.0 INTRODUÇÃO.....	01
2.0 OBJETIVO.....	05
2.1 Objetivo Geral.....	05
2.2 Objetivos Específicos.....	06
3.0 REVISÃO DE LITERATURA.....	07
3.1 UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM NUTRIÇÃO ANIMAL.....	07
3.2 ÁCIDO FÍTICO.....	13
3.3 FÓSFORO NO ORGANISMO ANIMAL.....	21
3.4 FITASE.....	24
3.4.1 PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FITASES.....	29
3.4.2 PROPRIEDADES CATALÍTICAS DE FITASES.....	34

3.5 <i>Aspergillus spp.</i>	36
3.6 EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO.....	38
3.7 FERMENTAÇÃO EXTRATIVA EM SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS.....	45
4.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
CAPÍTULO I - Effect of pH and temperature on phytase and biomass production by submerged fermentation with <i>Aspergillus niger</i> var. <i>phoenicis</i> URM 4924.....	71
Abstract.....	73
1.0 Introduction.....	74
2.0 Material and Methods.....	77
2.1 Fungal Strain and Inoculum Preparation.....	77
2.2 Fermentation Medium and Condition.....	77
2.3 Analytical Methods.....	78
2.3.1 Phytase Activity.....	78
2.3.2 Ergosterol Analysis.....	79
2.4 Correlation between Dry Wight and Ergosterol Content and Effect of Nutrients on Phytase Production.....	80
2.5 Statistical Analysis.....	80
3.0 Results and Discussion.....	81
3.1 Phytase Production.....	81
3.2 Biomass Content.....	85
3.3 Correlation between Dry Wight and Ergosterol Content	87
4.0 Conclusion.....	92
5.0 Acknowledgements.....	93
6.0 References.....	93
7.0 Figure Caption.....	104
CAPÍTULO II – Processo de Produção e Extração Integrado de Fitase por <i>Aspergillus niger</i> var. <i>phoenicis</i> URM 4924 utilizando Fermentação Extrativa por Sistemas de Duas Fases.....	112

Aquosas.....	
Resumo.....	114
Abstract.....	115
1.0 Introdução.....	116
2.0 Material e Métodos.....	117
2.1 Micro-organismo.....	117
2.2 Meios de Cultura para a Produção de Fitase.....	118
2.3 Preparação dos SDFA (PEG/citrato) em Fermentação Extrativa.....	118
2.4 Planejamento Estatístico Fatorial para a Extração e Purificação de Fitase por Fermentação Extrativa.....	119
2.5 Metodologia de Análise de Resultados.....	120
2.6 Determinação da Concentração Protéica.....	121
2.7 Determinação da Atividade Fitásica.....	122
3.0 Resultados e Discussão.....	122
4.0 Conclusão.....	136
5.0 Agradecimentos.....	136
6.0 Referências Bibliográficas.....	137
CAPÍTULO III – Caracterização Bioquímica Parcial da Fitase Produzida por <i>Aspergillus niger</i> var. <i>phoenicis</i> URM 4924 pré-purificada e pós-purificada em Sistemas de Duas Fases Aquosas PEG/citrato.....	142
Resumo.....	144
Abstract.....	145
1.0 Introdução.....	146
2.0 Material e Métodos.....	148
2.1 Micro-organismos.....	148
2.2 Produção do Extrato Bruto Enzimático.....	148
2.3 Fermentação Extrativa Utilizando PEG/citrato.....	148

2.4 Determinação Quantitativa da Atividade Fitásica.....	149
2.5 Determinação do Conteúdo Protéico.....	150
2.6 Determinação do Fósforo Inorgânico.....	150
2.7 Determinação da Temperatura Ótima e Estabilidade à Temperatura.....	150
2.8 Determinação do pH Ótimo e Estabilidade frente ao pH	151
3.0 Resultados e Discussão.....	151
3.1 Temperatura Ótima.....	151
3.2 Estabilidade à Temperatura.....	153
3.3 pH Ótimo.....	157
3.4 Estabilidade frente ao pH.....	159
4.0 Conclusão.....	162
5.0 Agradecimentos.....	163
6.0 Referências Bibliográficas.....	164
CAPÍTULO IV – Avaliação do Perfil Hidrolítico <i>in vitro</i> e Atividade anti-proteolítica da Fitase Produzida por <i>Aspergillus niger</i> var. <i>phoenicis</i> URM 4924 em Rações Comerciais de Aves e Suínos.....	169
Resumo.....	171
Abstract.....	172
1.0 Introdução.....	173
2.0 Material e Método.....	175
2.1 Micro-organismo.....	175
2.2 Produção do Extrato Bruto Enzimático Pré-purificado.....	175
2.3 Produção do Extrato Bruto Enzimático Pós-purificado em SDFa.....	176
2.4 Determinação da Atividade Fitásica.....	176
2.5 Determinação Quantitativa do Fósforo Inorgânico.....	177
2.6 Determinação da Atividade Anti-proteolítica	177
2.7 Hidrólise <i>in vitro</i> em rações comerciais de aves e suínos.....	178

3.0 Resultados e Discussão.....	178
3.1 Atividade Anti-proteolítica	178
3.2 Hidrólise <i>in vitro</i> em rações comerciais de aves e suínos	181
4.0 Conclusão.....	185
5.0 Agradecimentos.....	185
6.0 Referências Bibliográficas.....	186
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	190

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Principais enzimas exógenas utilizadas como aditivos em rações de aves e suínos (Citado por Krabbe & Lorandi, 2014).....	11
Tabela 02. Conteúdos de fósforo total, fósforo fítico, fósforo não-fítico e digestibilidade do fósforo em ingredientes utilizados na alimentação de aves e suínos (Borgatti et al., 2009).....	20
Tabela 03. Biodisponibilidade relativa do fósforo de alimentos utilizados na alimentação de aves e suínos (Adaptado de Borgatti et al., 2009).....	24
Tabela 04. Exemplos de fitases comerciais disponíveis no mercado mundial (Satyanarayana, 2011).....	30
Tabela 05. Propriedade <i>in vitro</i> e características bioquímicas de fitases comerciais de origem microbiana (Igbassan et al., 2000; Brejnholt et al., 2011)...	33
Tabela 06. Otimização da partição para extração e purificação de diversas enzimas através de sistemas de duas fases aquosas.....	42

CAPÍTULO I

Table 01. Phytase activity and biomass (estimated by the ergosterol content) obtained by submerged fermentation with <i>Aspergillus niger</i> var. <i>phoenicis</i> URM 4924 under different conditions of pH and temperature, according to a 2 ² central composite design. All the experimental assays were carried out in triplicate and results are presented as mean values ± standard errors.....	105
Tabela 02 Effect estimates (EE), standard errors (SE) and level of significance (<i>p</i>) of the variables pH (<i>x</i> ₁) and temperature (<i>x</i> ₂), on the responses phytase activity and biomass by <i>Aspergillus niger</i> var. <i>phoenicis</i> URM 4924, according to a 2 ² central composite design.....	106

CAPÍTULO II

Tabela 01. Níveis das variáveis utilizadas em planejamento estatístico fatorial completo 2^5 para produção e extração integrada de fitase por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924..... 120

Tabela 02. Resultados do planejamento estatístico fatorial completo 2^5 para estudar a extração de fitase por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 utilizando fermentação extrativa em SDFA PEG/citrato..... 124

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Representação do complexo fitato-nutrientes (Reproduzido de Bertechini, 2013)..... 14

Figura 02. Estrutura molecular do fitato, o ácido *myo*-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis(dihidrogenofosfato) (Reproduzido por Faria et al., 2006)..... 15

Figura 03. Estrutura química da molécula de *mio*-inositol (IUPAC, 1968)..... 16

Figura 04. Representação esquemática da interação do ácido fítico com aminoácidos..... 18

Figura 05. Hidrólise enzimática catalisada pela fitase na molécula do ácido fítico (Reproduzido de Krishna e Nokes, 2001)..... 26

Figura 06. Estrutura molecular da fitase produzida por *Aspergillus niger* (Oakley, 2010)..... 28

Figura 07. Micrografia ótica de *Aspergillus niger* (<http://www.inspq.qc.ca>)..... 37

Figura 08. Ilustração simplificada do processo de obtenção de um produto biotecnológico utilizando fermentação extrativa por sistemas de duas fases aquosas (Adaptado de Souza, 2014)..... 46

CAPÍTULO I

Figure 01. Response surfaces representing the phytase activity (*a*) and ergosterol content (*b*) variations according to the pH and temperature used during the fermentation with *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924..... 107

Figure 02. Values predicted by the second order model as a function of the values observed for the response phytase activity (U/mL) during the fermentation with *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924.....

Figure 03. Correlation between the responses phytase activity and ergosterol content obtained according to the 2^2 central composite design. Values were correlated through a second order polynomial..... 109

Figure 04. Correlation between dry weight (g) and ergosterol content (ppm) in submerged fermentation with *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 using phytic acid 1% (w/v), glucose 4 % (w/v), sucrose 4% (w/v), starch 4% (w/v), and corn steep liquor 2% (v/v) as substrate..... 110

Figure. 5. Phytase production (U /mL) after 120 h of submerged fermentation with *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 using different substrates: phytic acid 1% (w/v), glucose 4 % (w/v), sucrose 4% (w/v), starch 4% (w/v), and corn steep liquor 2% (v/v)..... 111

CAPÍTULO II

Figura 01. Gráfico de projeção de superfície representando o coeficiente de partição em atividade (K_{AT}) de acordo com a concentração de citrato (C_{CIT}) e massa molar do PEG (M_{PEG}) usados em fermentação extrativa da fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924..... 126

Figura 02. Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta o coeficiente de partição em atividade (K_{ATIV}) produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4914 na fase superior do sistema de duas fases aquosas PEG/citrato. Utilizou-se 5 (cinco) variáveis em dois níveis. Os significados dos símbolos na ordenada da Figura são: (1) M_{PEG} - massa molar do PEG, (2) C_{PEG} - concentração do PEG, (3) C_{CIT} - concentração de citrato, (4) pH - valor de pH, (5) Agitação..... 129

Figura 03. Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta o coeficiente de partição da proteína (K_{PROT}) produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4914 na fase superior do sistema de duas fases aquosas PEG/citrato. Utilizou-se 5 (cinco) variáveis em dois níveis. Os significados dos símbolos na ordenada da figura são: (1) M_{PEG} - massa molar do PEG, (2) C_{PEG} - concentração do PEG, (3) C_{CIT} - concentração de citrato, (4) pH - valor de pH, (5) Agitação..... 132

Figura 04. Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta a recuperação da fitase (Y) produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4914 na fase superior do sistema de duas fases aquosas PEG/citrato. Utilizou-se 5 (cinco) variáveis em dois níveis. Os significados dos símbolos na ordenada da figura são: (1) M_{PEG} - massa molar do PEG, (2) C_{PEG} - concentração do PEG, (3) C_{CIT} - concentração de citrato, (4) pH - valor de pH, (5) Agitação..... 134

CAPÍTULO III

Figura 01. Efeito da temperatura na atividade da fitase pré e pós-purificada produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924..... 152

Figura 02. Estabilidade à temperatura da fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 no extrato bruto enzimático (pré-purificada)..... 154

Figura 03. Estabilidade à temperatura da fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 pós-purificada em sistemas de duas fases aquosas PEG/citrato..... 155

Figura 04. Efeito do pH na atividade da fitase produzida por *Aspergillus niger* var. 158

phoenicis URM 4924 antes e após a purificação em sistema de duas fases aquosas PEG/citrato.....

Figura 05. Estabilidade ao pH da fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 no extrato bruto enzimático (pré-purificada)..... 160

Figura 06. Estabilidade ao pH da fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 pós-purificada em sistemas de duas fases aquosas PEG/citrato..... 161

CAPÍTULO IV

Figura 01. Atividade da fitase (U/mL) produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 tratada com enzimas proteolíticas (pensina e tripsina)..... 178

Figura 02. **A)** Perfil hidrolítico da fitase pré-purificada produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 em ração comercial de aves ($\mu\text{moles de PO}_4^{-2}/\text{mim}$); **B)** Perfil hidrolítico da fitase pós-purificada em SDFa PEG/citrato produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 em ração comercial de aves ($\mu\text{moles PO}_4^{-2}/\text{mim}$)..... 181

Figura 03. **A)** Perfil hidrolítico da fitase pré-purificada produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 em ração comercial de suínos ($\mu\text{moles de PO}_4^{-2}/\text{mim}$); **B)** Perfil hidrolítico da fitase pós-purificada em SDFa PEG/citrato produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 em ração comercial de suínos ($\mu\text{moles PO}_4^{-2}/\text{mim}$)..... 183

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a produção de aves e suínos evoluiu muito se adequando às técnicas que possibilitam uma melhoria da eficiência zootécnica. A alimentação é o fator de maior influência no custo produtivo representando cerca de 60 a 75 %, portanto, pequenas melhorias na eficiência de utilização dos nutrientes e o uso de alimentos alternativos, podem resultar em grande lucratividade (Costa et al., 2009).

Durante o amadurecimento, sementes de legumes e cereais acumulam uma quantidade substancial de ácido fítico [(ácido *myo*-inositol 1,2,3,4,5,6-hexafosfórico ou 1,2,3,4,5,6 hexaquis (diidrogênio fosfato) *myo*-inositol) - (C₆H₁₈O₂₄P₆)]. 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, denominados genericamente de fitatos. Além disso, o fitato serve como a maior fonte de energia e fósforo para a germinação das sementes, sendo pouco disponível para aves e suínos, pois esses animais não sintetizam ou produzem em pequenas quantidades a fitase, enzima responsável pela hidrólise do fitato para posterior absorção do fósforo inorgânico. Assim, o ácido fítico apresenta-se como um forte agente quelante de nutrientes, caracterizando-se como um fator anti-nutricional por diminuir a biodisponibilidade de minerais e outros nutrientes, tais como proteína e energia (Ries, 2010).

Neste contexto, tem sido objeto de estudo o uso de enzimas exógenas produzidas com fins específicos de auxiliar o processo de aproveitamento de nutrientes pelas aves e suínos, devido à ausência ou à produção ineficiente de algumas enzimas endógenas capazes de atuar na digestão de certos componentes encontrados nos alimentos de origem vegetal (Ries, 2010).

Dentre as enzimas exógenas, a mais estudada e que tem demonstrado maior eficácia é a fitase, produzida principalmente por fungos filamentosos do gênero *Aspergillus*, com capacidade de hidrolisar o ácido fítico ou fitato, disponibilizando fósforo, alguns cátions bivalentes, aminoácidos e energia. Geralmente, 75% do fósforo contido nos grãos de cereais e oleaginosas estão na forma de fitato, portanto o uso da fitase melhora o aproveitamento do P orgânico, reduzindo assim a necessidade de suplementação de P inorgânico na dieta dos animais (Naves et al., 2014).

Fitases formam um grupo de enzimas fosfo-hidrolíticas que catalisam a desfosforilação do ácido fítico a fosfato inorgânico e derivados inosítídeos fosfatos, promovendo assim, a absorção do fósforo indisponível para aves e suínos, e também contribuindo para a diminuição da excreção do fósforo no meio ambiente (Bedford & Partridge, 2010).

A redução da suplementação de P inorgânico proporciona redução significativa dos custos de alimentação, pois este representa o ingrediente com o terceiro maior custo nas dietas para aves, além disso, pode ocorrer diminuição de 20 a 30% na excreção do fósforo. A quantidade de fósforo nas excretas dos animais tornou-se um problema nas regiões de intensa produção avícola e suinícola, pois as excretas com alto teor de fósforo quando lançadas ao meio ambiente podem provocar a poluição do solo e dos mananciais (Slominski, 2011).

Os ingredientes de origem vegetal utilizados na formulação de ração para aves e suínos, como o milho e o farelo de soja, possuem grande parte do conteúdo de fósforo indisponível, pelo alto teor de 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 (Barbosa et al., 2012).

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, já que 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 (Slominski, 2011).

A eutrofização de corpos de águas consiste no excesso de nutrientes, principalmente fósforo e nitrogênio. O crescimento acelerado e a maior abundância de plantas aquáticas causam, frequentemente, deterioração da qualidade da água e crescimento de grandes quantidades de algas, inclusive de cianobactérias potencialmente nocivas, tornando-se um risco à saúde do ecossistema (Rutherford et al., 2012).

Com o intuito de solucionar alguns problemas ambientais, a biotecnologia vem a desenvolver processos fermentativos, que podem concentrar-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 por diversas espécies de fungos filamentosos como resposta a determinados estímulos ambientais, pela expressão de genes e posterior secreção das enzimas formadas. Após a fermentação e extração, as enzimas podem ser purificadas 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 (Slominski, 2011).

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) portanto, tais variáveis também influenciam à partição das moléculas estudadas (Franco et al., 2005).

O SDFA tem sido empregado em diversas áreas na indústria biotecnológica para purificação de várias biomoléculas, sendo considerada uma técnica 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 de atividade enzimática e também bom aumento de pureza para a biomolécula-alvo (Shang et al., 2004).

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 de 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.

O uso de enzimas como aditivo na alimentação expandiu-se rapidamente. Na última década, os estudos conduzidos para estudar os efeitos da utilização de enzimas em alimentação sobre o desempenho de aves e suínos foram extensos. Hoje é possível afirmar que o uso das enzimas traz benefícios à produção avícola que vão desde uma significativa redução no custo das dietas, melhora do desempenho animal e até a contribuição na melhora do ambiente. Com a elevação dos preços das matérias-primas tradicionais, como o milho e o farelo de soja, surge a necessidade da utilização de novas alternativas que, associadas à inclusão de enzimas, tornam-se viáveis e por consequência permitem gerar dietas ainda mais econômicas.

Diante do exposto, este trabalho investigou a produção, caracterização bioquímica pré e pós-purificada e aplicação dos sistemas de duas fases aquosas através da fermentação extrativa, para a purificação da fitase extracelular produzida pelo fungo filamentosso *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924. A atividade anti-proteolítica frente a pepsina gástrica e a tripsina pancreática, bem como o perfil hidrolítico *in vitro* da fitase estudada (pré-purificada e pós-purificada) em adição em rações comerciais de aves e suínos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito das variáveis (pH e temperatura) que influenciam à produção de fitase por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924, pré-purificação da enzima através da fermentação extrativa em SFA PEG/citrato, caracterização bioquímica do

pré e pós-purificado, atividade anti-proteolítica frente à pepsina gástrica suína e à tripsina pancreática, bem como o perfil hidrolítico *in vitro* da fitase em rações comerciais de aves e suínos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a produção de fitase e de biomassa através de fermentação submersa por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924, analisando a influência das variáveis pH e temperatura utilizando planejamento fatorial 2^2 .
- Identificar a influência das variáveis massa molar do PEG (MM_{PEG}), concentração do PEG (C_{PEG}), concentração do citrato (C_{CIT}) e pH na extração de fitases, por fermentação extrativa utilizando sistemas de duas fases aquosas, com o auxílio de planejamento fatorial completo 2^5 , obtendo como variáveis-resposta o coeficiente de partição (K) e a recuperação em atividade (Y)
- Caracterizar parcialmente a fitase extracelular produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924, determinando o pH e temperatura ótima, e também estabilidade da enzima frente à temperatura e pH, tanto no extrato bruto enzimático, quanto no extrato pós-purificado em SDFA PEG/citrato.
- Analisar o efeito do extrato bruto enzimático (pré-purificado) e extrato pós-purificado em SDFA PEG/citrato na hidrólise do ácido fítico em rações comerciais para aves e para suínos.
- Avaliar a atividade anti-proteolítica do extrato bruto enzimático (pré-purificado) e extrato pós-purificado em SDFA PEG/citrato frente à ação da pepsina e tripsina *in vitro*.

3.0 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 UTILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM NUTRIÇÃO ANIMAL

O Brasil é um país que possui lugar de destaque no mercado de agropecuária, onde os profissionais da área buscam sempre aprimorar seus conhecimentos e técnicas em produção animal visando obter cada vez mais produtos de qualidade. Dentro da área de produção de aves e suínos, os avanços vêm ocorrendo ao longo dos anos nas mais diversas áreas, seja genética, manejo, sanidade ou nutrição. Na área da nutrição, especificamente, a preocupação é sempre por melhorar os índices zootécnicos, associada à redução dos custos de produção (Silva, 2004).

Os primeiros relatos em literatura sobre o uso de enzimas em rações de aves e suínos foram obtidas a partir da descoberta de que grãos umedecidos associados à suplementação enzimática tinham maior aproveitamento nutricional pelos animais. A partir de então, o interesse ao uso de enzimas em rações para aves e suínos cresce devido aos gastos das matérias primas tradicionais e à busca por outros ingredientes alternativos como a cevada, aveia, arroz e trigo (Campestrini et al., 2005).

Na última década, a utilização de enzimas em dietas de aves e suínos no Brasil ganhou amplo espaço devido a diversas razões, dentre os quais pode-se salientar: a eficácia técnica-econômica do uso de fitases quebrou paradigmas encontrados na implantação de uma nova ferramenta tecnológica, neste caso, o uso das enzimas e, também dos complexos multi-enzimáticos; a busca por redução no custo por unidade de ganho na indústria avícola que está intrinsecamente ligada à redução no custo com alimentação; variabilidade nos custos dos principais insumos e matérias-primas das

dietas; disponibilidade regional de ingredientes alternativos específicos que apresentam perfil nutricional diferenciada em relação à dieta padrão nacional (milho-farelo de soja) (Araújo et al., 2008).

As enzimas são consideradas também, como uma forma de diminuir a contaminação ambiental com nutrientes nas excretas, tais como o fósforo, nitrogênio, cobre e zinco. Entretanto, existe uma preocupação cada vez maior com a inclusão de aditivos antimicrobianos em rações de aves e suínos. Utilizadas como aditivos, as enzimas, possibilitam o aumento da digestibilidade dos nutrientes, reduzindo a necessidade de um aporte de ingredientes de alto custo de inclusão na formulação da dieta. Dessa forma, o uso de enzimas na ração reduz o custo de produção, através da redução do custo de alimentação, sem prejudicar o desempenho dos animais (Sorio et al., 2011).

Além dessa redução no custo de formulação, a inclusão de enzimas possibilita manter maior uniformidade do lote, o que também pode resultar no aumento dos índices zootécnicos por possibilitar que o volume de ração e nutrientes fornecidos aos animais esteja mais perto da exigência nutricional requerida. Em formulação de rações para aves e suínos, aproximadamente 75% do fósforo proveniente dos alimentos de origem vegetal encontra-se combinado com o inositol formando a molécula do ácido fítico que tem um grande potencial quelatizador, o que diminui a solubilidade e a digestibilidade dos nutrientes. Como o fósforo é um mineral essencial por desempenhar importantes funções em vários processos metabólicos no organismo, ao formular dietas para aves e suínos torna-se necessário suplementar com uma fonte de fósforo inorgânico que, depois da energia e da proteína, é o nutriente que mais onera o custo da ração comercial (Silva et al., 2012).

As enzimas exógenas têm a capacidade de auxiliar na degradação de componentes específicos presentes nos alimentos e são obtidas de forma natural, a partir da fermentação (Liu et al., 2010). São produzidas em todos os organismos vivos, desde animais e plantas mais desenvolvidos às formas mais simples de vida, pois as enzimas são requeridas para o metabolismo celular. Os micro-organismos que geralmente estão envolvidos na produção de enzimas são: bactérias (*Bacillus subtilis*, *B. lentus*, *B. amyloliquifaciens* e *B. stearothermophils*), fungos filamentosos (*Trichoderma longibrachiatum*, *Asperigillus oryzae* e *A. niger*) e levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) (Liu et al., 2010).

A maioria das enzimas correntemente utilizadas na indústria de alimentos e bebidas são derivadas a partir de *Aspergillus*, no entanto, as hemicelulases e celulases são derivadas de fungos do gênero *Trichoderma*. Recentemente, os genes que codificam enzimas diferentes, incluindo fitases, β -glucanases e xilanases estão sendo clonados e expressos em diferentes sistemas de micro-organismos e plantas (Liu et al., 2010).

Dentre os principais aditivos enzimáticos utilizados na alimentação de animais aves e suínos, podemos destacar as lipases, xilanases, glucanases, proteases e fitases. Em seu mecanismo, estas enzimas exógenas atuam de modo semelhante às enzimas endógenas, primeiramente ligando-se a um substrato e formando um complexo enzima-substrato (Henn, 2009).

Enzimas hidrolíticas, ou hidrolases catalisam a clivagem hidrolítica das ligações -C-O, -C-N, -C-C além de outros tipos de ligação, incluindo as ligações de anidrido fosfórico. A classificação sistemática das enzimas pelo seu sistema *Enzyme Comision* (EC) dividiu em seis grandes grupos ou classes, que podem, por sua vez, ser subdivididos em subclasses relacionadas à ação específica da cada enzima (Uenojo & Pastore, 2007).

Graças às suas características, as hidrolases possuem um grande potencial biotecnológico, constituindo um grupo de enzimas mais exploradas comercialmente. As hidrolases comercializadas são empregadas em diversos setores da indústria, tais como detergentes, couro, têxtil, poupa e papel, óleos e gorduras, panificação, laticínios, sucos e vinhos, cervejaria, ração animal, cosméticos, medicamentos, meio ambiente e Engenharia Genética (Krabbe & Lorandi, 2014).

A atividade enzimática é compreendida como a atividade catalítica necessária para converter uma quantidade específica de substrato em uma quantidade específica de um produto, por unidade de tempo sob uma condição específica. É neste contexto que as enzimas são avaliadas quanto a sua atividade. Entretanto, na prática, no trato digestório dos animais, as condições de tempo de passagem e até mesmo condições físico-químicas podem sofrer alterações, em consequência ao tipo de dieta (granulometria, fibras, extrato etéreo, pH e efeito tampão do alimento, dentre outros), condições ambientais (alcalose respiratória e acidose metabólica), qualidade físico-química da água (pH, teor e tipo de minerais presentes), além de outros aspectos (Krabbe & Lorandi, 2014).

Um produto enzimático comercial pode ser definido como um aditivo que contém material enzimático processado e padronizado, produzido para uso em alimentos ou matérias-primas destinado ao consumo animal. As enzimas comerciais (Tabela 01) são obtidas através de processos fermentativos, onde micro-organismos são selecionados para esta finalidade. As enzimas comerciais atuais tem predominância de uma atividade específica, ou são observadas atividades de enzimas secundárias, que na prática podem atuar em outros substratos contidos na ingesta (Krabbe & Lorandi, 2014).

Tabela 01. Principais enzimas exógenas utilizadas como aditivos em rações de aves e suínos.

ENZIMA	SUBSTRATO	EFEITO
Xilanase	Arabinosilanos	Reduz a viscosidade da ração
β -glucanase	β -glucanos	Reduz a viscosidade da ração e menor umidade na cama
Pectinase	Pectina	Reduz a viscosidade da ração
Celulase	Celulose	Degradação da celulose e e liberação de nutrientes
Protease	Proteínas	Suplementação das enzimas endógenas auxiliando na digestibilidade protéica
Amilase	Amido	Suplementação das enzimas endógenas auxiliando na degradação do amido dietético
Fitase	Ácido fítico	Promove a degradação do fósforo fítico
Galactosidase	Galactosídeos	Remoção dos galactosídeos
Lipase	Lipídeos e ácidos graxos	Melhora a utilização dos lipídeos dietéticos
Mananase	glucomanana, galactomanana, glucogalactomanana em polissacarídeos não amiláceos (PNA)	Aumentando a taxa de secreção pancreática

Fonte: Krabbe & Lorandi, 2014.

Entre os benefícios relacionados ao uso de aditivos enzimáticos na dieta dos animais não-ruminantes pode-se destacar: a diminuição da viscosidade da digesta, aumento da digestibilidade e absorção de nutrientes, especialmente os lipídeos e proteína, bem como um aumento na energia metabolizável da dieta, maior consumo de ração e ganho de peso diário, redução do impacto ambiental, reduz a ingestão de água e

o teor de água e amônia das fezes, diminui a produção de dejetos com menores quantidades de nitrogênio e fósforo (Regina, 2010).

É possível obter um aumento na digestibilidade dos alimentos através do uso de enzimas nas dietas, possibilitando mudanças nas formulações das rações de forma a diminuir os custos, maximizando o uso dos ingredientes energéticos e protéicos das rações e viabilizando o uso de ingredientes alternativos regionais, em substituição ao milho e ao farelo de soja (Regina, 2010).

A inclusão da fitase na dieta de aves e suínos possibilita um incremento na qualidade nutricional dietética, favorecendo uma digestão mais rápida, redução dos níveis de excreção de nutrientes. Assim, a fitase também evita a formação de complexos proteína-fitato, aumentando a digestibilidade protéica. Além do que, a hidrólise do fitato através da enzima, minerais como cálcio, magnésio, zinco, ferro e moléculas orgânicas, antes indisponíveis aos animais, são liberados para absorção no trato gastro-intestinal (Rocha, 2014).

Silva e colaboradores (2012) estudaram a associação de carboidrase e fitase em dietas para poedeiras comerciais e verificaram que não houve efeito significativo dos tratamentos sobre a produção, consumo, peso dos ovos e qualidade dos ovos. Os autores concluíram que, a valorização dos nutrientes preconizada com a utilização do complexo enzimático, assim como a fitase, foram eficientes para a manutenção do desempenho e qualidade dos ovos de poedeiras semipesadas nas condições avaliadas.

Segundo Han e colaboradores (2010) no trabalho sobre a influência da inclusão de enzimas e/ou de lisolecitina sobre o desempenho, digestibilidade e qualidade de ovos de poedeiras, a suplementação na dieta de enzimas e/ou lisolecitina sozinhos ou em combinação não promoveu efeito significativo na produção de ovos, assim como no peso dos ovos. A suplementação na dieta de um complexo multienzimático contendo

7 U/g de α -1,6-galactosidase e 22 U/g de β -1,4-mannanase mostrou resultados significativos para conversão alimentar. Segundo os autores este incremento ocorreu devido ao aumento da digestibilidade protéica. No entanto, Araújo e colaboradores (2008) estudaram diferentes níveis de suplementação de farelo de trigo na ração com ou sem a adição de um complexo multienzimático, e observaram que não houve efeito significativo sobre a conversão alimentar das aves.

Silversides & Hruby (2009) em experimento com inclusão de rações de aves poedeiras com fitase, considerando a matriz nutricional da fitase, observaram uma proporcional redução de 34 e 47 kcal kg⁻¹ da energia metabolizável aparente, 0,18 e 0,21% na proteína bruta, 0,12 e 0,15% de proteína digestível com a utilização de 300 e 600 U.kg⁻¹, respectivamente. Os autores concluíram que a fitase aumenta biodisponibilidade de outros nutrientes além do fósforo, especialmente energia e proteína.

3.2 ÁCIDO FÍTICO

Os fitatos possuem diversas funções importantes na fisiologia vegetal durante o ciclo de vida das plantas, incluindo a estocagem de fósforo e alguns cátions, que fornecem matéria-prima para a formação da parede celular após a germinação. Além do mais, o fitato protege a semente contra o estresse oxidativo durante o armazenamento. O maior efeito negativo dos fitatos é o efeito quelante ou ligações fortes com outras moléculas tais como aminoácidos, amido e minerais, tais como cálcio, ferro, zinco e magnésio (Figura 01). Esse efeito provoca a assimilação de nutrientes necessários na alimentação e, por consequência, uma importante diminuição no rendimento das rações empregadas (Yin et al., 2007; Benevides et al., 2011).

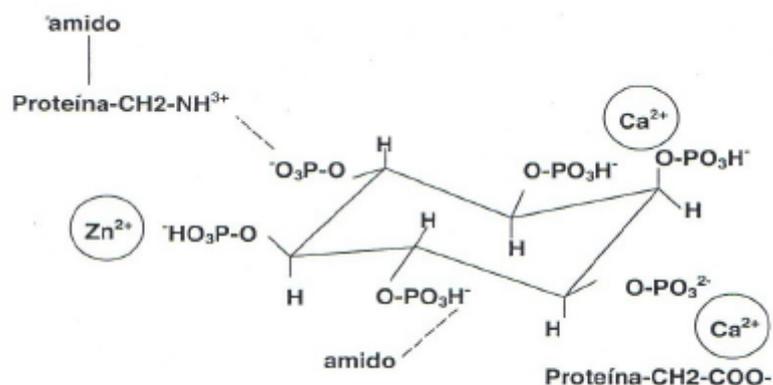


Figura 01. Representação do complexo fitato-nutrientes (Reproduzido de Bertechini, 2013)

Conforme Nagashiro (2007), a natureza antinutricional do fitato pode ser atribuída a diversos fatores, tais como: alta reatividade da molécula proporcionando ação quelante forte, indisponibilizando metais como Ca^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} no trato gastrintestinal dos animais; formação de complexos com aminoácidos que resistem à hidrólise enzimática, pois os grupos fosfato do ácido fítico podem se ligar eletrostaticamente aos grupamentos amina terminais ou aos resíduos dos aminiácidos lisina e arginina; interação com as enzimas amilase, tripsina, fosfatase ácida, dentre outras, havendo redução da atividade e inibição; formação de um complexo fitato-mineral-proteína que pode ser formado com cátions multivalentes, tornando as proteínas ligadas menos susceptíveis à hidrólise proteolítica.

Outro fator negativo dos fitatos, é que estes não são aproveitados durante a alimentação das aves e suínos, levando a sua excreção direta no meio ambiente. Os fitatos são hidrolizados por micro-organismos que fazem parte da microbiota do solo e o fósforo liberado flui para os lençóis freáticos provocando a eutrofização das águas em

locais de produção intensiva de animais. Nos últimos anos, a União Européia tem se aprovado importantes leis ambientais que obrigam os produtores de aves e suínos para alimentação humana suplementar as rações com fitases microbianas exógenas (Leal et al., 2010).

Fitato, ácido fítico, *myo*-inositol, *myo*-inositol hexafosfato (Figura 02) e fitina como termos utilizados para se referir a diversas formas de um fator antinutricional (Figura 02). Apesar das enzimas fitases atuarem hidrolisando todas essas substâncias, são compostos distintos: *myo*-inositol hexafosfato, ácido fítico ou fitato, termo usado para referir-se ao sal misto de ácido fítico; *myo*-inositol é a forma livre do anel aromático do fitato (inositol), sem os grupamentos fosfato (PO_4^{3-}); já a fitina refere-se especificamente ao complexo de *myo*-inositol hexafosfato com potássio, magnésio e cálcio, tal como ocorre em vegetais (Valle, 2010).

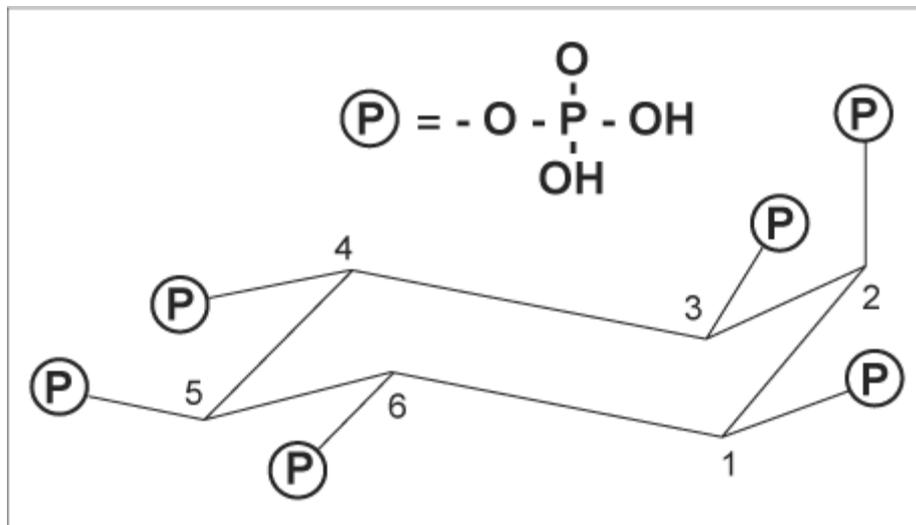


Figura 02. Estrutura molecular do fitato, o ácido *myo*-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis(dihidrogenofosfato) (Reproduzido de Faria et al., 2006).

O inositol (Figura 03), é um poliálcool cíclico contendo um anel de seis átomos de carbono e seis grupos OH (ciclohexanopoliol), sendo um importante constituinte celular, de forma molecular $C_6H_{12}O_6$, e está envolvido em diferentes processos bioquímicos. Em mamíferos, o inositol existe principalmente sob a forma de derivados fosforilados, os quais participam da comunicação celular. A forma mais encontrada comumente na natureza é o *myo*-inositol (cis-1,2,3,5-trans-4,6-ciclohexanohecol). O inositol desempenha um papel importante como a base estrutural de um número de mensageiros secundários em células eucarióticas, inclusive fosfatos inositol, fosfatidil-inositol e fosfato fosfatidil-inositol lipídios (Larner, 2002).

O inositol encontrado em muitos alimentos, especialmente, em cereais. Inositol como a base de um número de sinalização e moléculas de mensageiro secundárias, está implicado em um número de processos biológicos, inclusive na transdução de sinal de insulina, controle na concentração de cálcio intracelular, potencial de membrana da célula, modulação de atividade da serotonina, metabolismo das gorduras e redução dos níveis de colesterol no sangue e expressão gênica (Larner, 2002).

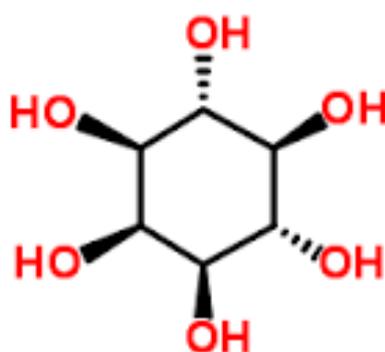


Figura 03. Estrutura química da molécula de *myo*-inositol (IUPAC, 1968)

De acordo com Silva (2004), em pH neutro os grupamentos ortofosfatos apresenta um ou dois átomos de oxigênio carregados negativamente, consequentemente,

vários cátions podem ser fortemente quelatados entre dois grupos fosfatos ou fracamente com um grupo fosfato. A interação com a proteína é dependente das condições de pH, pois se faz pela ligação iônica, conforme a Figura 4. Em condições de acidez, o ácido fítico possui carga negativa podendo se ligar a resíduos básicos através de 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 divalentes, os quais irão agir como ponte entre o grupo carboxila carregado negativamente e o ácido fítico. Vários estudos demonstraram que proteínas da soja, milho, trigo, semente de colza, farelo de girassol e de arroz formam complexos com ácido fítico (Ravindran et al., 2001).

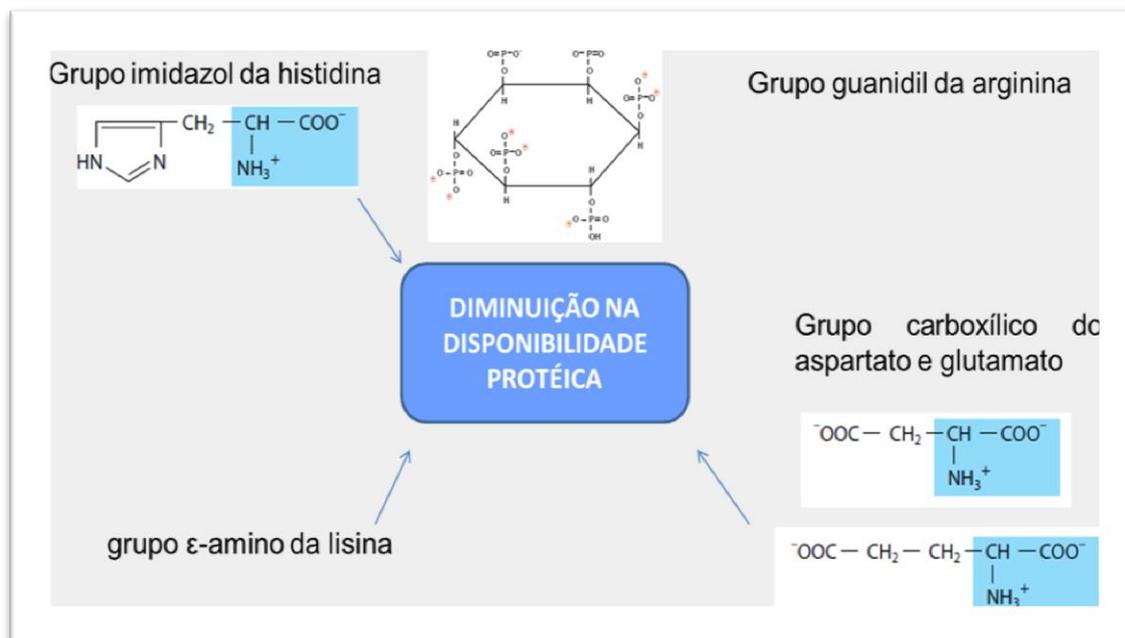


Figura 04. Representação esquemática da interação do ácido fítico com aminoácidos (Arquivo Pessoal).

O fitato é um composto complexo considerado um dos mais potentes fatores antinutricionais. É responsável por perdas nutricionais significativas, por reduzir a disponibilidade protéica e energética ao animal bem como aumentar a produção de mucinas e aumentar o “turnover” celular no trato digestório (Cowieson et al, 2006). O fósforo fítico é o fósforo que faz parte da molécula de hexafosfato de inositol (IP₆), o qual é encontrado somente em vegetais. Os fosfatos de inositol encontrados em grãos cereais contem aproximadamente 90% do inositol na forma hexafosfórica (IP₆), correspondendo, os restantes 10%, à somatória dos penta (IP₅), tetra (IP₄) e trifosfatos (IP₃). Por conseguinte, somente IP₅ e IP₆ tem efeito negativo na biodisponibilidade mineral. Os outros fosfatídeos de inositol formados possuem baixa capacidade de ligar-se a minerais (Valle, 2010).

O fósforo fítico presente nos grãos cereais e nas sementes oleaginosas depende tanto na quantidade quanto em sua localização. No milho, o fitato é encontrado em grande quantidade no gérmen; já em leguminosas acumula-se nos cotilédones e na soja, particularmente, encontra-se unidos a corpos protéicos distribuído por toda semente (Selle et al., 2003; Valle, 2010).

A nutrição animal baseia-se principalmente em ingredientes de origem vegetal, nos quais 66% do fósforo encontra-se na forma de inositol hexafosfato, indisponível para absorção pelos animais não-ruminantes. O teor de fitato varia entre os ingredientes (Tabela 02), afetando diretamente a biodisponibilidade do fósforo. De acordo com NRC (1994), somente 33% e 42% desse mineral é biodisponível no milho e farelo de soja, respectivamente (Borgatti et al., 2009). A determinação da biodisponibilidade de fósforo é fundamental para se avaliar o uso dos ingredientes pelos animais e proteção do meio ambiente, pois é considerável o impacto ecológico reapercebido pela eliminação do fósforo fecal (Borgatti et al., 2009).

Tabela 02. Conteúdos de fósforo total, fósforo fítico, fósforo não-fítico e digestibilidade do fósforo em ingredientes utilizados na alimentação de aves e suínos (Borgatti et al., 2009).

Ingredientes	Fósforo total (%)	Fósforo fítico (%)	Fósforo não-fítico (%)	Digestibilidade do fósforo (%)	Fósforo digestível (%)
Milho	0,24	0,17	0,07	29,0	0,07
Trigo	0,27	0,19	0,08	38,0	0,1
Farelo de arroz	1,31	1,05	0,26	16,0	0,24
Farelo de trigo	0,99	0,79	0,20	37,0	0,37
Farelo de soja	0,39	0,23	0,16	42,0	0,16
Farinha de carne e ossos	5,0	0,0	5,0	61,0	3,05
Farinha de peixe	2,20	0,0	2,20	74,0	1,63

O nível de aproveitamento do fósforo alimentar varia também com a espécie, mantendo relação direta com as particularidades anatômicas e fisiológicas do trato gastrointestinal dos animais. Pode-se assim dizer que, em ordem decrescente de aproveitamento do fósforo dietético, encontram-se os ruminantes, herbívoros monogátricos e, por último, as aves e suínos. Pode-se ressaltar que, para as aves e suínos, valores de biodisponibilidade do fósforo dietético, aproximadamente de 30% e 20 a 60%, respectivamente. Os animais mais jovens estão menos aptos a utilizarem o fósforo fítico, sendo ainda mais susceptíveis à redução da digestibilidade da dieta (Silva, 2012).

Em animais ruminantes, o fósforo fítico é disponibilizado pelos micro-organismos fermentadores, que secretam a enzima fitase que tem ação intensiva sobre os fitatos (Dvoraková et al., 1997). Entretanto, o fósforo que porventura não foi disponibilizado pelos micro-organismos ruminais, flue para outros compartimentos gástricos mantendo-se sob a forma indisponível, sendo finalmente excretado (Silva, 2012).

3.3 FÓSFORO NO ORGANISMO ANIMAL

Os tecidos animais possuem quantidades e proporções variáveis de minerais em sua composição. Nos animais os tecidos representam de 3 a 4% do peso vivo total. Vários estudos evidenciaram a necessidade da presença dos minerais nas dietas, por serem considerados nutrientes fundamentais e participaram de diversas funções no metabolismo animal, compondo estrutura de biomoléculas, interferindo no crescimento e na manutenção dos tecidos, participando como cofatores enzimáticos, ativando ações endócrinas, regulando a pressão osmótica e o equilíbrio ácido básico. Estes nutrientes apresentam grande importância na produção animal, acarretando acréscimos ou decréscimos na produtividade do sistema (Sakomura et al., 2014).

A concentração e as formas de armazenamento dos minerais nos tecidos e fluidos do organismo podem sofrer alterações com a ingestão de dietas deficientes, desbalanceadas ou com excesso de minerais. Em algumas situações, as funções biológicas são alteradas, acarretando lesões e desordens estruturais, as quais variam de acordo com o elemento mineral, o grau de duração da deficiência, a toxicidade da dieta e os fatores intrínsecos dos animais, tais como idade, sexo e espécie (Sakomura et al., 2014).

Os elementos minerais são de extrema importância para o metabolismo animal, cujas deficiências têm marcante interferência nos indicadores de produção e produtividade dos rebanhos. Os sais minerais de maior importância para a alimentação animal podem ser classificados em dois grupos, de acordo com Cortelazzi (2006): macrominerais (cálcio, fósforo, sódio, cloro, potássio, magnésio e enxofre) e microminerais (ferro, iodo, cobre, flúor, manganês, molibdênio, zinco, cobalto, selênio, cromo, estanho, níquel, vanádio e silício).

Biodisponibilidade é a fração do nutriente ingerido que é absorvida, permanecendo disponível para ser utilizada pelo metabolismo animal. Dessa maneira, fatores físico-químicos que reduzem a absorção de minerais do lúmen intestinal influenciam a biodisponibilidade mineral. Dentre eles, pode ocorrer antagonismo entre nutrientes e ingredientes que afetam adversamente a absorção (Richard e Dibner, 2005).

Diversos fatores influenciam de forma direta ou indireta os níveis de minerais nas plantas e, conseqüentemente, os valores disponíveis para os animais, que dependem das plantas para se alimentar e produzir alimentos. A quantidade de um determinado nutriente na dieta pode ser insuficiente para atender as necessidades. Contudo, o metabolismo do animal pode ser modificado pela interação entre dieta, ambiente e fatores genéticos (Sakomura et al., 2014). Outro aspecto que pode interferir a biodisponibilidade mineral são os fatores antinutricionais encontrados nos alimentos de origem vegetal, os quais atuam reduzindo a utilização de nutrientes e o consumo de alimentos, por isso há necessidade de processos adequados, com o intuito de reduzir os fatores antinutricionais dos alimentos (Soetan e Oyewole, 2009).

Os níveis destas substâncias variam de acordo com a espécie de cultivar e o tratamento pós-colheita. Exemplo de fatores antinutricionais que diminuem a biodisponibilidade mineral são o ácido fítico e o ácido oxálico, os quais possuem

capacidade de se ligar a alguns minerais divalentes, tais como o cálcio e magnésio, interferindo no seu metabolismo, formando quelatos e induzindo a deficiência dos mesmos (Soetan et al., 2010). Desta forma, existem indicativos da relação inversa entre o teor de fitato e a biodisponibilidade de cálcio, fósforo, magnésio e zinco em ingredientes de origem vegetal (Soetan et al., 2010). Na Tabela 3, pode-se observar a variabilidade da biodisponibilidade do fósforo de acordo com a fonte do ingrediente.

O fósforo (P), apresenta alta demanda nutricional pelo organismo, sendo classificado como um macroelemento, e encontrado em níveis variáveis em diferentes alimentos. Contudo, a biodisponibilidade do fósforo, ou a proporção do nutriente presente no alimento absorvível e utilizada em funções biológicas, também é variável entre os diferentes ingredientes alimentares, evidenciando-se a necessidade de estratégias para a sua suplementação dietética (Andriguetto et al., 1982).

O fósforo pode ser encontrado em todas as células corporais, sendo responsável por vários processos metabólicos, incluindo os que envolvem os tampões em fluidos corporais. Faz parte dos constituintes dos dentes e ossos, na formação da molécula de adenosina trifosfato (ATP), e de diversos metabólitos intermediários e dos ácidos nucleicos. Possui ação tamponante através das soluções fosfatadas e de formar compostos de alta energia, e síntese de fosfolipídeos e fosfoproteínas (Malhotra, 2003).

Tabela 03. Biodisponibilidade relativa do fósforo de alimentos utilizados na alimentação de aves e suínos (Adaptado de Borgatti et al., 2009).

Alimento	Biodisponibilidade relativa (%)
Milho grão	14
Glúten de milho	59
Sorgo	20
Cevada	30
Trigo	49
Farelo de trigo	29
Triticale	46
Farelo de arroz	25
Farelo de soja	31
Casca de soja	78
Canola	21
Soro de leite	97

3.4 FITASE

A fitase foi descoberta por Suzuki e colaboradores (1908) e começou a ser mais pesquisada a partir de em 1960. A primeira fitase comercial foi produzida por *Aspergillus niger* com capacidade de liberar fósforo ligado ao fitato e reduzir sua excreção. Esta enzima foi comercializada a partir de 1991, conhecida como Natuphos[®], produzida e introduzida ao mercado pela BASF[®] (Engelen et al., 1994; Selle e Ravindran, 2006).

Fitases formam um grupo de enzimas, denominadas genericamente de *mio*-inositol-hexafosfato fosfohidrolase, classificadas como uma monoester fosfatase específica que pode ser diferenciada quanto à posição de hidrólise na molécula de ácido fítico (Selle e Ravindran, 2006).

Conforme a União Internacional de Química Pura e Aplicada e União Internacional de Bioquímica (IUPAC-IUB), duas categorias de fitases são reconhecidas de acordo com a posição onde a hidrólise do fitato é iniciada: 3-fitase (EC 3.1.3.8) que inicia removendo um grupo ortofosfato do carbono 3, no entanto a 6-fitase (EC 3.1.3.26) realiza a reação no carbono 6 da molécula de *myo*-inositol hexafosfato, sendo que a 3-fitase é principalmente de origem microbiana (bacteriana ou fúngica) e 6-fitase é derivada de vegetais, associadas à quebra da dormência em sementes vegetais, liberando grupos ortofosfatos provenientes do fitato para crescimento vegetal (Pandey et al., 2001; Konietzny e Greiner, 2002).

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_6 em IP_5 e ortofosfato livre (Vats e Banerjee, 2004). Entretanto, as 6-fitases (EC 3.1.3.26) são designadas quimicamente como *myo*-inositol hexaquis fosfato- 6-fosfohidrolase, promovendo a catálise hidrolítica da ligação éster na sexta posição do IP_6 . 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).

A reação de desfosforilação catalizada pelas fitases está ilustrada na Figura 5. Nesta reação, o ácido fítico é transformado em ácido fosfórico, inositol, e compostos intermediários (fosfatídeos de inositol) incluindo ésteres de inositol mono-, bi-, tri-,

tetra, e penta-fosfato (IP₁-IP₅) dependendo do grau de desfosforilação catalizado pela enzima (Konietzny e Greiner, 2002).

A via de catabolismo da reação para a degradação do ácido fítico, segue um modelo de desfosforilação gradual: IP₆ → IP₅ → IP₄ → IP₃ → IP₂ → IP₁ → inositol. 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 grupamentos ortofosfatos, sendo que os produtos finais são *myo*-inositol 2-monofosfato (Dasgupta *et al.*, 1996).

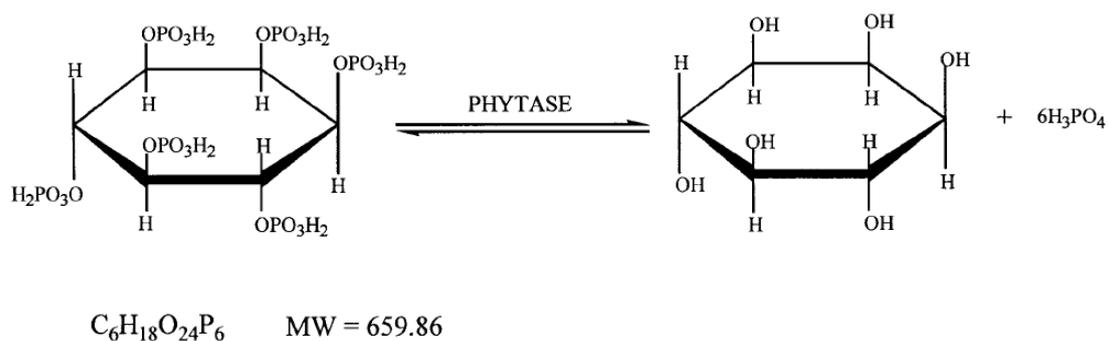


Figura 05. Hidrólise enzimática catalisada pela fitase na molécula do ácido fítico (Reproduzido de Krishna e Nokes, 2001).

A determinação da atividade enzimática utilizando sais de ácido fítico, tais como fitato de sódio, permite separar as fitase de outras fosfatases ácidas, que são ineficientes em hidrolizar ácido fítico. Entretanto, a especificidade do substrato para fitase pode variar devido a diferenças nas características moleculares de enzimas purificadas de diversas fontes (Ries, 2010). O fosfato inorgânico liberado é medido por um método colorimétrico, sendo que metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência de fase

reversa foi bem desenvolvida para separação e determinação de ácido fítico e fosfatídeos de inositol menores resultantes das reações catalizadas pelas fitases (Ries, 2010).

Os métodos colorimétricos para determinação de ortofosfatos inorgânicos estão fundamentados principalmente na redução de um complexo fosfomolibdato por sulfato ferroso ou ácido ascórbico gerando “molibdenio azul” (Engelen, *et al.*, 1994). O método colorimétrico de determinação de fósforo conhecido como método do ácido ascórbico de Fiske e Subbarow (1925), bem como adaptações originadas deste, tem sido utilizados durante décadas por diversos autores para determinação da atividade de fitases (Shieh e Ware, 1968; Heinonen e Lahti, 1981; Lambrechts *et al.*, 1992; Segueilha *et al.*, 1993; Bindu *et al.*, 1998).

A atividade da fitase pode também ser mensurada por meio da atividade de fosfatases ácidas utilizando substratos sintéticos, como por exemplo, *p*-nitrofenilfosfato, conforme descrito por Ullah e Gibson (1986) sendo amplamente utilizada por diversos autores, de acordo com Ries (2010).

A atividade fitásica é medida pela quantidade de fosfato inorgânico liberado pela ação catalítica da enzima. Uma unidade de atividade da enzima fitase pode ser definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um (1,0) μmol de fosfato inorgânico por minuto de reação em condições de pH, temperatura e concentração de fitato em que foram realizados os experimentos (Selle e Ravindran, 2006).

As fitases já foram encontradas em diversas fontes vegetais, tais como trigo, milho, algumas ervas, arbustos, alfaces, centeio e sementes oleaginosas, sendo que as atividades mais elevadas foram encontradas 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. Fitases alcalinas também tem

sido identificadas no pólen de *Lilium longiflorum*, *Typha latifolia* e em sementes de legumes (Ramachandran et al., 2006). Aos vegetais, geralmente, atribuem-se baixos valores de atividade fitásica, entretanto 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 (Figura 06) 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).

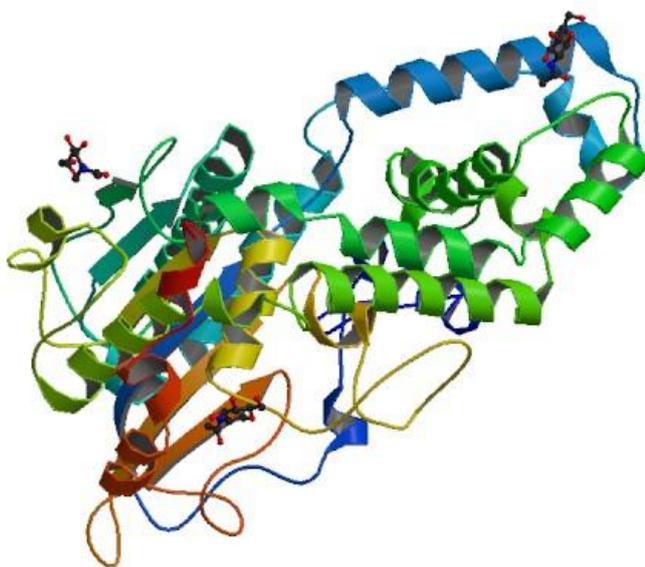


Figura 06. Estrutura molecular da fitase produzida por *Aspergillus niger* (Oakley, 2010).

Apesar das fontes animais e vegetais representarem avanços científicos importantes, suas aplicações práticas para produção de fitase são limitadas. Em contrapartida, fontes microbianas apresentam características mais desejáveis, que

permitem um alto rendimento e ampliação de escala, tornando-se amplamente utilizadas de maneira efetiva na indústria de rações animais. Diversas espécies de fungos, bactérias e leveduras têm sido utilizadas na produção de fitases, geneticamente modificadas ou não (Kim et al., 2006).

Algumas espécies selvagens de bactérias são utilizadas para produção de fitase, principalmente devido aos valores de produção enzimática e por apresentarem uma faixa ótima de pH não adequada ao sistema digestivo dos animais não-ruminantes. 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).

3.4.1 PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE FITASES

A fermentação é muito influenciada por diversas variáveis físico-químicas no meio de produção de biomoléculas. As condições de cultivo, espécie e linhagem microbiana, natureza do substrato e disponibilidade de nutrientes são fatores importantes que afetam a produção e secreção de fitases, obtida a partir da adição do fitato de sódio ao meio como fonte de fósforo inorgânico (Ries, 2010).

A produção de fitase já foi bem citada em meio líquido, ou seja, através da fermentação submersa, entretanto, tem sido reportado a utilização de resíduos agroindustriais para produção de fitase por fungos do gênero *Aspergillus* (Meta et al., 2009). Alguns estudos mostram a utilização de meios de cultivo alternativos na produção de fitases: aveia na produção de fitase por *Kodamaea ohmeri* (Li et al., 2008), resíduos de azeitonas na produção de fitase por *Aspergillus niger* (Vassilev et al., 2007);

melaço de cana na produção de fitase por *Sporotrichum thermophile* (Singh e Satyanarayana, 2006) e por *Pichia anomala* (Vohra e Satyanarayana, 2004). A Tabela 4 cita as principais fitases comerciais disponíveis no mercado mundial.

Tabela 04. Exemplos de fitases comerciais disponíveis no mercado mundial (Satyanarayana, 2011).

Produto	Empresa	Micro-organismo	Fermentação
Natuphos [®]	BASF [®]	<i>A. niger</i>	Líquida
Allzyme phytase [®]	Alltech [®]	<i>A. niger</i>	Sólida
Phyzame [®]	Femic [®]	<i>A. oryzae</i>	Líquida
Ronozyme [®]	Novozyme [®]	<i>A. oryzae</i>	Líquida
Finase [®]	AB Enzyme [®]	<i>A. awamori</i>	Líquida
Amaferm [®]	Biozyme [®]	<i>A. oryzae</i>	Líquida
Bio-Feed Phytase [®]	DSM [®]	<i>Peniphora lycii</i>	Líquida

A próxima etapa à produção e a purificação, que consiste em um conjunto de processos que retiram contaminantes até a obtenção de um produto de elevado grau de pureza. As enzimas são purificadas pelo emprego sucessivo de métodos físico-químicos, e a purificação de fitases normalmente envolve ultrafiltração, centrifugação, filtração em gel e separação por coluna cromatográfica ou ainda purificação parcial por precipitação com sulfato de amônio. O fracionamento de acordo com a solubilidade em soluções de sulfato de amônio é muito utilizado em isolamento de proteínas por fornecer preparações com menor grau de contaminação e mais concentradas em proteínas de interesse (Ries, 2010).

A recuperação de enzimas microbianas, seja de vegetal ou animal, é uma etapa complexa do processo de obtenção de um produto biotecnológico, pois técnicas de purificação dependem das características moleculares específicas a cada enzima. Durante o processo de purificação deve-se preocupar com a estabilidade enzimática, a eficiência da purificação, rendimento em atividade, grau de pureza. Porém, existem enzimas industriais cuja aplicação não requer elevado grau de pureza, de modo que operações cromatográficas não são necessárias, pois uma simples concentração do meio de fermentação é suficiente para a comercialização do bioproduto (Salmon, 2011).

Diversos métodos de purificação de fitases têm sido descritos na literatura, como Spier e colaboradores (2011) que utilizaram cromatografias de troca iônica seguida por cromatofocalização. Greiner e colaboradores (2009) utilizaram os seguintes métodos de purificação da fitase: precipitação com sulfato de amônio, cromatografia por exclusão molecular, cromatografia de troca iônica e cromatografia por filtração em gel. Guo e colaboradores (2007) realizaram microfiltrações, ultrafiltrações e cromatografia de troca iônica.

Descritas em literatura, encontram-se estudos de purificação e caracterização de fitases de diferentes fontes de origem, tais como *Aspergillus ficcum* NRRL 3135 (Ullah e Gibson, 1987); *Schwanniomyces castelli* (Segueilha et al., 1992); *Bacillus subtilis* (Shimizu, 1993); *Bacillus* sp. DS11 (Kim et al., 1998); *Arxula adenivorans* (Sano et al., 1999); *Peniophora lycci*, *Agrocybe pediades*, *Ceriporia* sp. e *Trametes pubescens* (Lassen, et al., 2001); *Pichia anomala* (Vohra e Satyanarayana, 2002); *Rhizopus oligosporus* (Casey e Walsh, 2004); *Lilium longiflorum* (Garchow et al., 2006); *Aspergillus niger* (Casey e Walsh, 2003; Vats e Banerjee, 2006); *Yersinia intermedia* (Huang et al., 2006).

As fitases geralmente se apresentam com massa molecular entre 40 e 100 KDa e temperatura ótima de atividade entre 45° - 60°C (Pandey *et al.*, 2001). A maioria das enzimas de plantas são desnaturadas em temperaturas superiores a 70°C, enquanto que as enzimas de origem microbiana permanecem com atividade significativa após períodos de incubação por mais de 3 horas (Konietzny e Greiner, 2002). Fitases isoladas de *A. fumigatus* (Pasamontes et al., 1997) e *S. castellii* (Segueilha et al., 1992) são relatadas como resistentes a altas temperaturas, ou seja, são termo-tolerantes (Ries, 2010). Na Tabela 5 estão descritas algumas propriedades *in vitro* de algumas fitases de origem microbiana.

Tabela 05. Propriedades *in vitro* e características bioquímicas de fitases comerciais de origem microbiana (Igbassan et al., 2000; Brejnholt et al., 2011).

Origem	Nome comercial	Estabilidade ao pH (%) (atividade)	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Referência
-	Natuphos [®]	2.5 - 6 (50 – 100%)	5.5	50	Igbasan et al., 2000
-	Ronozyme [®]	3.5 – 5.0 (80%)	4.5	50	Igbasan et al., 2000
-	Ronozyme [®]	4.0 – 4.5 (100%)	-	-	Brejnholt et al., 2011
-	Ronozyme [®]	3.0 (35%)	-	-	Brejnholt et al., 2011
-	HiPhos [®]	3.0 – 5.0 (70%)	3.5	-	Brejnholt et al., 2011
-	HiPhos [®]	3.0 – 4.5 (90%)	3.5	-	Brejnholt et al., 2011
<i>E.coli</i>	-	3.5 – 5.5 (60%)	4.5	60	Igbasan et al., 2000
<i>Bacillus sp.</i>	-	5.5 – 7.5 (70%)	7.0	60	Igbasan et al., 2000

Dentre as fitases, grande parte estão ativas dentro da faixa de pH 4,5 - 6,0, e podem ser classificadas de acordo com o pH ótimo de atividade enzimática, e agir em

pH em torno de 5,0 (ácidas) ou de 8,0 (alcalinas). A estabilidade de fitases vegetais diminui em valores de pH abaixo de 4 ou acima que 7,5, enquanto que a maioria das fitases de origem microbiana mantém a atividade entre valores de pH abaixo de 3,0 e acima de 8,0. Essa grande diferença em seus valores de pH ótimo pode ser parcialmente ou totalmente refletida na variação da estrutura molecular ou estereo-especificidade da enzima dependendo da fonte de origem (Konietzny e Greiner, 2002).

Apesar da disponibilidade de diferentes fitases comerciais, trabalhos devem ser desenvolvidos com o intuito investigar a existência de novas fontes microbianas produtoras de fitases, sem necessidade de alteração gênica tornam-se frequentes na busca de características como termoestabilidade e estabilidade ácida.

3.4.2 PROPRIEDADES CATALÍTICAS DAS FITASES

As fitases tem sido isoladas e caracterizadas a partir de vegetais e de diversos micro-organismos e, conforme o pH ótimo da enzima, pode-se classificar em fitases ácidas e fitases alcalinas (básicas). Devido ao ambiente ácido no TGI dos animais não-ruminantes, existe um maior interesse em fitases com perfil ácido. As fitases são ácidas são subdivididas em 3 (três) grupos estruturalmente diferentes: as fosfatases de histidina ácida, fitases β -propeller e as fosfatases ácidas púrpuras (Lei et al., 2007).

As fitases são capazes de reconhecer o ácido fítico como substrato e coincide com as propriedades não-hidrolisantes de fosfatases não-específicas. Em geral, grande parte das enzimas pertence a família das histidinas ácida fosfatase (HAP), que é caracterizada por um sítio ativo conservado RHGXRXP e um dipeptídeo cataliticamente ativo HD (Ries, 2010). Estas enzimas fosfatases raramente tem uma estrutura similar e a clivagem dos grupamentos fosfatos não é realizada pelo mesmo mecanismo. Este grupo

de enzimas catalisa a hidrólise do ácido fítico em duas etapas: ataque nucleofílico da histidina do sítio ativo da enzima na ligação do fosfoéster do ácido fítico mais fácil de ser hidrolizada e protonação do grupo restante pelo resíduo de ácido aspártico do HD (Ostanin et al, 1992).

Xiang e colaboradores (2004) determinaram por cristalografia a estrutura tridimensional da fitase produzida por *Aspergillus fumigatus*. A enzima apresenta em sua estrutura molecular um pequeno domínio α e um grande domínio α/β . O pequeno domínio α -hélice consiste de uma estrutura α -hélice central rodeadas por sete α -hélices. Em relação ao grande domínio α/β , um filamento β -sandwich forma a estrutura do núcleo, com duas longas α -hélices do lado oposto. Os resíduos de aminoácidos conservados, o motivo catalítico 58RHGARXP64, e o motivo de ligação do substrato 338HD339, e estão localizadas entre o grande domínio α/β e o pequeno domínio α .

Vale destacar um outro grupo de fitases ácidas, as fitases β -propeller, que apresentam uma conformação tridimensional denominada β -propeller, as quais são dependentes de cálcio para a sua atividade catalítica, como pode-se citar as fitases produzidas por *Bacillus subtilis* e *B. amyloliquefaciens*. Estas fitases apresentam dois sítios de ligação com o substrato, e a hidrólise é realizada no próprio sítio catalítico (Monteiro, 2011).

As fosfatases ácidas púrpuras são fitases classificadas como metaloenzimas que possuem no seu sítio catalítico um átomo de ferro ou zinco. Tem-se exemplo de fitases deste grupo, as fitases isaladas da soja (*Glycine max*) e a fitase produzida por *A. niger* NRRL 3135. Este grupo de fitases apresenta menor atividade catalítica quando comparadas ao grupo das fitases histidina ácidas (Monteiro, 2011).

3.5 GÊNERO *Aspergillus*

Os fungos filamentosos são constituídos, fundamentalmente, por elementos multicelulares em forma de tubo, as hifas que podem ser contínuas, não-septadas ou cenocíticas e septadas, e ainda podem conter esporos. Ao conjunto de hifas dá-se o nome de micélio. O micélio que se desenvolve no interior do substrato, funcionando também como elemento de sustentação e de absorção de nutrientes, é chamado micélio vegetativo. O micélio que se projeta na superfície e cresce acima do meio de cultivo é o micélio aéreo, onde forma-se as estruturas reprodutoras (Trabulsi et al., 1999).

Os fungos filamentosos podem colonizar uma grande variedade de ambientes, seja como saprófitos de vegetais ou animais, atuando como parasitos em tecidos vivos, produtos de madeiras, papel e solos de composição diversa. Algumas enzimas secretadas por fungos são de grande importância comercial, principalmente na área alimentícia, como proteases ácidas, lipases, nucleases, carboidratases, sendo poucas as enzimas intracelulares de importância. O gênero *Aspergillus* tem se sobressaído como o mais destacado em produção comercial de enzimas (Novaki, 2009).

Pertencente ao filo *Ascomycota*, o gênero *Aspergillus* é de grande importância para a indústria e medicina. Este gênero possui aproximadamente 250 espécies e distribuição cosmopolita, com a possibilidade de se obter 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 industrial de alimentos (Ward et al., 2006), sendo descrito em literatura como produtor de diversas enzimas, das quais podemos destacar a α -amilase, celulasas, xilanases, fitases, lipases e β -glicosidases (Dedavid e Silva, 2008).

Os fungos do gênero *Aspergillus* são muito utilizados na produção enzimática por aproximadamente de 200 espécies, comumente isolados do solo e de vegetais em decomposição (Guimarães et al., 2010). Dentre as espécies mais conhecidas encontram-se o *A. flavus*, *A. niger* (Figura 5), *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *A. clavatus*, *A. glaucus*, *A. ustus* e *A. versicolor* (Slivinski, 2007).

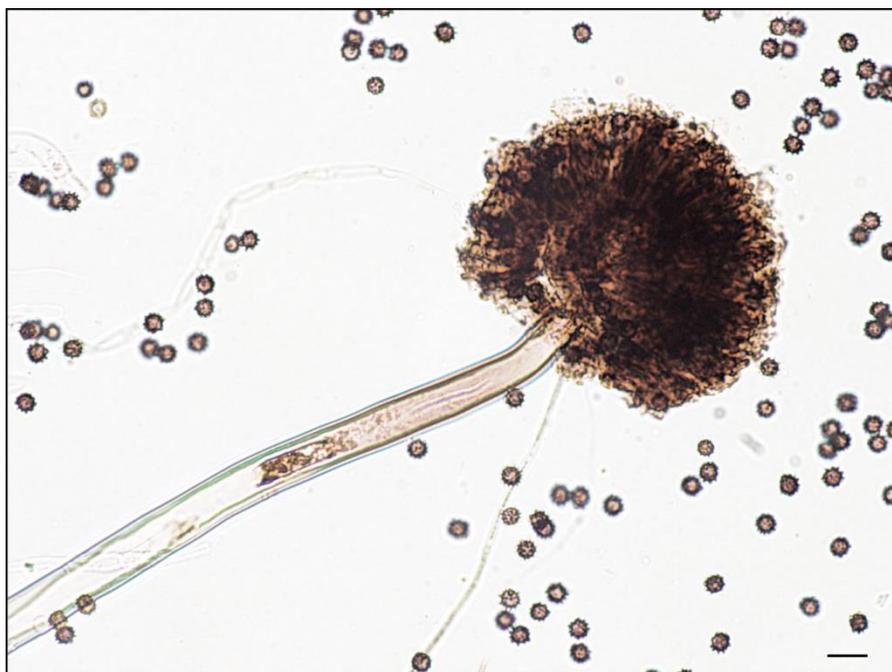


Figura 07. Micrografia ótica de *Aspergillus niger* (<http://www.inspq.qc.ca>)

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 α -amilases, α -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 foram 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.

3.6 EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO

Os processos utilizados para a separação e purificação de um bioproduto 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 surgiu um interesse no setor da biotecnologia para o desenvolvimento de métodos de separação e purificação novos, eficientes, rentáveis e que atinjam altos graus de recuperação e pureza, mantendo a atividade biológica da molécula (Boeris et al., 2009; Antov et al., 2006).

Uma técnica promissora de extração e purificação de bioprodutos, que se enquadra nestes critérios, e utiliza-se industrialmente, envolve a partição de

biomoléculas entre duas ou mais fases imiscíveis nos sistemas aquosos (Boeris, 2009; Antov et al., 2006). Avanços em biotecnologia oferecem 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 foram 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 (Simon e Otto, 2005).

A purificação de biomoléculas tem sido 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 utilizadas 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 (Mazzola et al., 2008).

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 foram, 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 foi demonstrado para a extração de enzimas, tais como glicosidades, proteases alcalinas, enzimas do complexo celulolítico, enzimas fibrinolíticas, α -amilase e β -galactosidase (Ooi et al., 2011).

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. 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 demandados pela indústria (Canales et al., 2009).

Partição em SDFA mostrou-se como um eficiente processo para a purificação de misturas protéicas. 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%) (Nalinanon et al., 2009; Bensch et al., 2007). A Tabela 6 mostra os resultados de diversos autores que utilizaram SDFa para extrair e purificar enzimas para aplicações biotecnológicas.

Tabela 06. Otimização da partição para extração e purificação de diversas enzimas através de sistemas de duas fases aquosas.

Bioproduto	Fonte	Composição (%m/m)	K_{PROT}	Y	pH	Referência
Serina protease	Casca de manga	PEG 8000/fosfato (4.5%)	84,2	97,3	7,5	Mehnroush et al. (2012)
Serina protease	<i>Streblus asper</i>	PEG 6000/ MgSO ₄ (15%)	-	96,7	7,0	Mehnroush et al. (2011)
Papaína	Mamão	PEG 6000/ (NH ₄) ₂ SO ₄ (15%)	-	89,9	5,0	Nitsawang et al. (2006)
Fitase	<i>Aspergillus niger</i>	PEG 8000/citrato (20,5%)	0,96	96,0	5,6	. Bhavsar et al. (2012)
Peroxidase	Soja	PEG 4000 Na ₂ SO ₄ (10%)	0,05	64	-	Da Silva & Franco (2000)
β -gala	Cevada	PEG 1500/ (NH ₄) ₂ SO ₄ (14%)	2,7	98,26	6,9	. Hemavathi & Raghavarao (2011)
Lipase	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	2-propanol/fosfato (16%)	13,5	99	9,0	Ooi et al. (2009)
Invertase	<i>Saccharomyces</i> spp.	PEG 3000/MgSO ₄ (15%)	-	98,0	5,5	Karkas & Önal (2012)
LPP	Sigma (USA)	PEG 1500/fosfato de potássio (13%)	12,7	94,7	7,0	Zhou et al. (2013)
PheDH	Farinha de trigo	PEG 6000/(NH ₄) ₂ SO ₄ (17.5%)	0,027	94,42	8,0	Mohamadi et al. (2007)

Legenda: LPP: Lipase pancreática porcina; β -gala: β -galactosidase; PheDH: Fenilalanina desidrogenase

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 extrair 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 ótima recuperação (Nascimento et al., 2010; Rosa et al., 2007).

Sistemas de duas fases aquosas, principalmente os sistemas com polietileno glicol (PEG) e sal, foram 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 também foram empregados em diversos campos na indústria biotecnológica para purificação de enzimas, interferon, anticorpos, e na bioconversão extrativa (Nascimento et al., 2010; Rosa et al., 2007).

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).

Dentre os sistemas de duas fases aquosas utilizando PEG/sais, pode-se destacar os sistemas PEG/fosfato, PEG/citrato e PEG/sulfato. Estes sistemas tem sido largamente utilizados para extração de proteínas de diversos tipos. Entretanto, o uso do sal citrato de sódio apresenta vantagens em relação ao uso de outros sais, tais como o fosfato e o sulfato, por razões econômicas e ambientais (Mayerhoff et al., 2004).

Oliveira e colaboradores (2003) concluem que o sistema bifásico PEG/citrato é ideal para o uso em extração e purificação de proteínas, pois o citrato é um composto de rápida degradação no meio ambiente e pode ser facilmente descartado em áreas de tratamento de resíduos biológicos.

Marcos e colaboradores (2002) destacaram que o sistema de duas fases PEG/citrato tem sido utilizado para pré-purificação de antibióticos produzidos por micro-organismos, porém não se encontram dados em literatura que reportem o uso

deste sistema para a extração de fitase para posterior utilização em ração de aves e suínos.

3.7 FERMENTAÇÃO EXTRATIVA EM SISTEMAS DE DUAS FASES AQUOSAS

O SDFA é composto por dois polímeros ou um polímero e um sal diluídos em solução aquosa, formando um sistema bifásico. Esta técnica é constituída pela mistura de duas soluções acima de certa concentração crítica, indicada por um diagrama de fases em que a formação de duas fases aquosas imiscíveis é observada (Cisneiros et al., 2004).

Nalinanon e colaboradores (2009) ressaltaram que cada vez mais as indústrias procuram por processos produtivos e de purificação que sejam eficientes em obtenção de bioprodutos com valor comercial. Dentro deste contexto está inserida a técnica de fermentação extrativa, que trata-se de um processo integrado de produção e extração de moléculas bioativas.

A fermentação extrativa é um processo que integra o crescimento do micro-organismo à produção e recuperação do bioprotudo *in situ* de maneira simultânea (Figura 7), sendo utilizado para aumentar o rendimento dos processos fermentativos tradicionais. O sistema de duas fases aquosas (SDFA) utilizado para uma fermentação extrativa é uma alternativa considerada bastante eficaz quando comparado com os processos fermentativos padrão, desde que seja um meio propício para o crescimento e estabilização das células microbianas e adequado para o favorecimento de produção do produto bioativo, sem que ocorra desnaturação estrutural, aumentando desta forma a produtividade do processo (Souza, 2014). A Figura 6 ilustra simplificada como

ocorre o processo de extração e purificação de enzimas extracelulares utilizando fermentação extrativa (Souza, 2014).

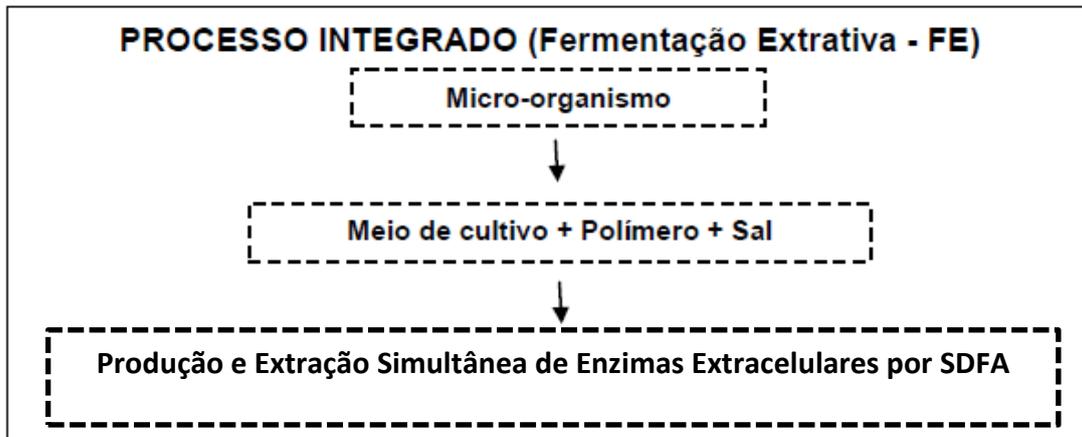


Figura 08. Ilustração simplificada do processo de obtenção de um produto biotecnológico utilizando fermentação extrativa por sistemas de duas fases aquosas (Adaptado de Souza, 2014).

De acordo com Ng e colaboradores (2013), a fermentação extrativa é uma técnica com potenciais desejáveis para obtenção de enzimas microbianas industriais, com facilidade em aumento de escala e minimização da desnaturação protéica, entre outras características. Deve-se salientar que uma composição adequada para a fermentação extrativa deve ser selecionada, para se extrair de forma adequada, e a proteína alvo possa particionar para uma das fases do sistema com a mínima contaminação possível, obtendo alto rendimento e elevado fator de purificação para a biomolécula em estudo.

4.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

ANDRIGUETTO J. P., PERLY, L., MINARDI, I., GEMAEI A., FLEMMING J.S., SOUZA, G.A., BONA, A. **Nutrição animal**. Livraria Nobel: São Paulo,. 385p. v. 1, 1982.

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., SILVA, J.H.V., MIRANDA, E.C. Farelo de trigo e complexo enzimático na alimentação de poedeiras semipesadas na fase de produção. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 5, p. 843-848, 2008.

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.

BARBOSA, N.A.A.; SAKOMURA, N.K.; BONATO, M.A.; HAUSCHILD, L.; OVIEDORONDON, E. Enzimas exógenas em dietas de frangos de corte: desempenho. **Ciência Rural**, v.42, p.1497-1502, 2012. DOI: 10.1590/S0103-84782012000800027.

BEDFORD, M.R.; PARTRIDGE, G.G. Enzymes in farm animal nutrition. Oxfordshire: **CABI Publishing**,. 319 p., 2010. DOI: 10.1079/9781845936747.0000.

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

BENEVIDES, M.V.S., SOUZA, R.D.B, LOPES, M.V. Fatores antinutricionais em alimentos: **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, 18 (2): 67-79, 2011.

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.

BETERCHINI, A.G. **Nutrição de Monogástricos**, 2ª edição revisada, Editora UFLA, Universidade Federal de Lavras - MG, 373 p., 2013.

BHAVSAR, K., RAVI KUMAR, V., KHIRE, J. Downstream Processing of Extracellular Phytase from *Aspergillus niger*: Chromatography Process Vs. Aqueous Two Phase Extraction for its Simultaneous Partitioning and Purification. **Process Biochem** 47: 1066-1072, 2012.

BINDU, S., SOMASHEKAR, D., JOSEPH, R. A comparative study on permeabilization treatments for *in situ* determination of phytase of *Rhodotorula gracilis*. **Lett. Appl.Microbiol.**, v.27, p.336-340, 1998.

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.

BORGATTI, L.M.O., VITTI, D.M.S.S., OLIVEIRA, T.M., MARTINS, B.A.B., ALBUQUERQUE, R., SOUZA, L.W.O. Biodisponibilidade relativa de fósforo em ingredientes com baixo teor de fitato determinada com base na mineralização óssea de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v.38, n.10, p.1901-1906, 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.

BREJNHOLT, S. M., DIONISIO, G., GLITSOE, V., SKOV, L. K., BRINCH-PEDERSEN, H. The degradation of phytate by microbial and wheat phytases is dependent on the phytate matrix and the phytase origin. **J. Sci. Food Agric.** 91: 1398-1405, 2011.

CAMPESTRINI, E., SILVA, V.T.M., APPELT, M.D. Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.2, n.6, p.254-267, 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, 2004.

CISNEIROS, M., BENAVIDES, J., BRENES, C. H., RITO-PALOMARES, M. Recovery in aqueous two-phase systems of lutein produced by the green microalga *Chlorella protothecoides*. **Journal of Chromatography B**, v.807, p.105-110, 2004.

CLEÓPHAS, G.M.L., Van HARTINGSVELDT, W., SOMERS, W.A.C. Enzymes can play an important role in poultry nutrition. **World Poult.**, 11(4):12-15, 1995.

CORTELAZZI, C.Q.L. Fósforo disponível para frangos de corte em fosfatos para a alimentação animal. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, p. 61, 2006.

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.; QUIRINO, B.J.S.; GIVISIEZ, P.E.N.; SILVA, J.H.V.; ALMEIDA, H.H.S.; COSTA, J.S.; OLIVEIRA, C.F.S.; GOULART, C.C. Poedeiras alimentadas com diferentes níveis de energia e óleo de soja na ração Layers fed with different levels of energy and soybean oil in feed. **Arch. zootec.**, v.58, n.223, 2009.

COWIESON, A. J., HRUBY, M., PIERSON, E.E.M. Evolving enzyme technology: impact on commercial poultry nutrition. **Nutrition Research Reviews** 19 (1) 90-103, 2006.

DA SILVA, M.E., FRANCO, T.T. Purification of Soybean Peroxidase (Glycine Max) by Metal Affinity Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems. **J Chromatogr B** 743: 287-294, 2000.

DASGUPTA, S., DASGUPTA, D., SEM, M., BISWAS, B.B. Interaction of myoinositoltriphosphate-phytase complex with the intracellular Ca^{2+} mobilization in plants. **Biochemistry**, v.35, p.4994-5001, 1996.

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

DIBNER, J. J., RICHARDS, J. D. Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action. **Poult. Sci.** 84:634–643, 2005.

DVORAKOVÁ, J. Characterization of Phytase Produced by *Aspergillus niger*. **Folia Microbiol.** 42 (4), p. 349-352, 1997.

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.

NASCIMENTO, J.C.S. Produção, Purificação e Caracterização Parcial da Fitase...

ENGELLEN, A.J., HEEFT, VAN DER., RANSDORP, H.G.P., SMIT, L.C.E. Simple and rapid determination of phytase activity. **J. AOAC Int.**, v.77, p.760-764, 1994.

FARIA, O.L.V., KOETZ, P.R., SANTOS, M.S.; NUNES, W.A. Remoção de fósforo de efluentes da parboilização de arroz por absorção biológica estimulada em reator em batelada sequencial (RBS). **Ciênc. Technol. Aliment.**, vol.26, n. 2, Campinas, 2006.

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

FISKE, C.H., SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **J. Biol.Chem.**, v.66, p.375-410, 1925.

FRANCO, T.T.; KILIKIAN, B.V.; COIMBRA, J.S.R.; MEIRELES, A.J.A. Extração líquido-líquido em sistemas de duas fases aquosas. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**, 1 ed., Editora Manole, p. 114-165, 2005.

FRY, R.E., ALLRED, J.B., JENSEN, L.S., MCGINNIS, J. Influence of enzyme supplementation and water treatment on the nutritional value of different grains for poult. **Poultry Science**, v. 37, p. 372-375, 1958.

GARCHOW, B.G., JOG, S.P., MEHTA, B.D., MONOSSO, J.M., MURTHY, P.P.N.

Alkaline phytase from *Lilium longiflorum*: Purification and structural characterization. **Protein Expres. Purif.**, v.46, p.221-232, 2006.

GREINER, R., SILVA, L.G., COURI, S. Purification and characterisation of an extracellular phytase from *Aspergillus niger* 11T53A9. **Braz. J. Microbiol.**, v. 40, p. 795-807, 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.

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

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

GUO, M-J., ZHUANG, Y-P., CHU, J., ZHANG, S-L., XIONG, A.S., PENG, R.H., YAO, Q-H. Production and purification of a novel thermostable phytase by *Pichia pastoris* FPHY34. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1660-1665, 2007.

NASCIMENTO, J.C.S. Produção, Purificação e Caracterização Parcial da Fitase...

HAN, Y.K., JIN, Y.H., KIM, J.H., TRACKER, P.A. Influence of enzyme and/or lysolecithin supplementation on performance, nutrient digestibility and egg quality for laying hens. **Trends Animal Vet Science Journal**, v. 1, n. 1, p. 28-35, 2010.

HARTER-DENIS, J. **Biotechnology in the feed industry**. Proc. Alltech's 15th Annual Symposium. Ed. T.P. Lyons y K.A. Jacques. Nottingham University Press. pp: 511-522, 1999.

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.

HEINONEN, J.K., LAHTI, R.J. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its applications to the assay of inorganic pyrophosphate. **Anal. Biochem.**, v.113, p.313-317, 1981.

HEMAVATHI, A.B., RAGHAVARAO, K.S.M.S. Differential Partitioning of β -Galactosidase and β -Glucosidase using Aqueous Two Phase Extraction. **Process Biochem** 46: 649-655, 2011.

HENN, J.D. Aditivos Enzimáticos em dietas de suínos e aves. In: **Bioquímica do tecido animal**. Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009. Disponível em: <http://www6.ufrgs.br/bioquimica/>> Acessado em: 12/12/2014.

HUANG, H., HUIYING, L., YANG, P., MENG, K., WANG, Y., YUAN, T., BAI, Y., YAO, B. A novel phytase with preferable characteristics from *Yersinia intermedia*. **Biochem. Bioph. Res. Co.** 350: 884-889, 2006.

IGBASAN, F.A., K. MANNER, G. MIKSCH, R. BORRIS, A. FAROUK, O. SIMON. Comparative studies on the *in vitro* properties of phytases from various microbial origins. **Arch. Anim. Nutr.** 53:353-373, 2000.

IUPAC-IUB. International Union of Pure and Applied Chemistry – International Union of Biochemistry. The nomenclature of cyclitols. **Eur. J. Biochem.** (51), 1968.

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.

KARKAS, T., ÖNAL, S. Characteristics of Invertase Partitioned in Poly (Ethylene Glycol)/Magnesium Sulfate Aqueous Two-Phase System. **Biochem Eng J** 60: 142-150, 2012.

KIM, Y.O., KIM, H.K., BAE, K.S., YU, J.H., OH, T.K. Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus sp.* DS11. **Enz. Microb. Technol.**, v. 22, p. 2–7, 1998.

KIM, S.D., KIM, M.K., WOO, C.J., RHEE, C.H., LEE, S.H. Characterization of psychrophilic yeast in Kimchi. **Food Sci Biotechnol**, 9:277-279, 2006.

KLICH, M.A. *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. **Mol. Plant Pathol.** 8: 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.

KONIETZNY, U., GREINER, R. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). **Int. J. Food Sci. Tech.** 37: 791-812, 2002.

KRABBE, E. L.; LORANDI, S. VI Atualidades e tendências no uso de enzimas na nutrição de aves, **Congresso Latino-Americano de Nutrição Animal**, Universidade Federal de Pelotas – Pelotas/RS, 2014.

LAMBRECHTS, C., BOZE, H., MOULIN, G., GALZY, P. Utilization of phytate by some yeasts. **Biotechnol. Lett.**, v.14, p.61-66, 1992.

LARNER, J. D-chiro-inositol: its functional role in insulin action and its deficit in insulin resistance. **Int J Exp Diabetes Res** 3(1): 47–60, 2002.

LASSEN, S.F., BREINHOLT, J., OSTERGAARD, P.R., BRUGGER, R., BISCHOFF, A., WYSS, M., FUGLSANG, C.C. Expression, gene cloning, and characterization of five novel phytases from four basidiomycete fungi : *Peniophora lycci*, *Agrocybe*

pediades, *Ceriporia* sp., and *Trametes pubescens*. **Appl. Environ. Microb.**, p.4701-4707, 2001.

LEAL, A.S., GONÇALVES, C.G., VIEIRA, I.F.R., CUNHA, M.R.R., GOMES, T.C.B., MARQUES, F.R. Avaliação da concentração de minerais e dos fatores antinutricionais fitato e oxalato em multimisturas da Região Metropolitana de Belo Horizonte/MG. **Rev Soc Bras Alim Nutr.** 35 (2):39-52, 2010.

LEI, X. G., PORRES, J. M., MULLANEY, E. J., BRINCH-PEDERSEN, H. Phytase source, structure and applications, In: Industrial enzymes. Structure, Function and Applications, Polaina, J., MacCabe, A. P., Eds, pp. 505-529, **Springer**, ISBN -78-1-4020-5376-4, Dordrecht, The Netherlands, 2007.

LEI, X.G.; PORRES, J.M. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. **Biotechnology Letters**, v.25, n.21, p.1787-1794, 2003.

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

LIU, B., L.; RAFIQ, A., TZENG, Y.M., ROB, A. The induction and characterization of phytase and beyond. **Enz. Microb. Technol.**, v.22, p.415-424, 2008.

NASCIMENTO, J.C.S. Produção, Purificação e Caracterização Parcial da Fitase...

LIU, D., GUO, Y., WANG, Z., YUAN, J. Exogenous lysozyme influences *Clostridium perfringens* colonization and intestinal barrier function in broiler chickens. **Avian Pathology**, v. 39, n. 1, p. 17-24, 2010.

MALHOTRA, V.K. Biochemistry for Students, 11, Ed. New Delhi, **Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd**, 406 p., 2006.

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.

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.

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.

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.

MEHRNOUSH, A., MUSTAFA, S., YAZID, A.M.M. 'Heat-Treatment Aqueous Two Phase System' for Purification of Serine Protease from Kesinai (*Streblus Asper*) Leaves. **Molecules** 16: 10202-10213, 2011.

MEHRNOUSH A., MUSTAFA, S., SARKER, M.I., YAZID, A.M.M. Optimization of Serine Protease Purification from Mango (*Mangifera Indica* cv. Chokanan) Peel in Polyethylene Glycol/Dextran Aqueous Two Phase System. **Int J Mol Sci** 13: 3636-3649, 2012.

META, A., NAKATAKE, H., IMAMURA, T., NOZAKI, C., SUGIMURA, K. High-yield production and characterization of biologically active recombinant aprotinin expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. **Protein Expres. Purif.**, v.66, p.22-27, 2009.

MOHAMADI, H., OMIDINIA, E., DINARVAND, R. Evaluation of Recombinant Phenylalanine Dehydrogenase Behavior in Aqueous Two-Phase Partitioning. **Process Biochem** 42: 1296-1301, 2007.

MONTEIRO, P.S. Produção e Caracterização Bioquímica de Fitases de *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus niger* UFV-1 e suas aplicações em ração animal. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2011.

NAGASHIRO, C. Enzimas na nutrição de aves. In: CONFERENCIA APINCO, 2007, Santos, SP. Anais. Santos, **FACTA**, 2007. p.307-327.

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.

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. Redução de fósforo em dietas para frangos com base em valores de equivalência da fitase. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, 49, n.1, p.71-77, 2014. DOI: 10.1590/S0100-204X2014000100010.

NG, H. S., OOI, C. W., MOKHTAR, M. N., SHOW, P. L., ARIFF, A., TAN, J. S., LING, T.C. Extractive bioconversion of cyclodextrins by *Bacillus cereus* cyclodextrin glycosyltransferase in aqueous two-phase system. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 723-726, 2013.

NITSAWANG, S., HATTI-KAUL, R., KANASAWUD, P. Purification of Papain from Carica Papaya Latex: Aqueous Two-Phase Extraction versus Two-Step Salt Precipitation. **Enzyme Microb Tech** 39: 1103-1107, 2006.

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.

OOI, C.W., TEY, B.T., HII, S.L., KAMAL, S.M.M., LAN, J.C.W. Purification of Lipase Derived from *Burkholderia pseudomallei* with Alcohol/Salt-Based Aqueous Two-Phase Systems. **Process Biochem** 44: 1083-1087, 2009.

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.

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

OLIVEIRA, A.C. Estudo da produção de poligalacturonase por fermentação em estado sólido utilizando resíduo agroindustrial de manga (*Mangifera indica* L.) Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, 2013.

OLIVEIRA, L.A., SARUBBO, L.A., PORTO, A.L.F., LIMA-FILHO, J.L., CAMPOS TAKAKI, 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.

OSTANIN, K., HARMS, E.H., STEVIS, P.E., ZHOU, M., VAN ETTEN, R.L. Overexpression, site-directed mutagenesis and mechanism of Escherichia coli acid phosphatase. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 22830-22836, 1992.

PANDEY, A., SZKACKS, G., SOCCOL, C.R., RODRIGUEZ-LEON, J.A, SOCCOL VT. Production, purification and properties of microbial phytases. **Bioresource Technol.** 77: 203-214, 2001.

PASAMONTES, L., HAIKER, M., WYSS, M., TESSIER, M., LOON, A.P.G.M. Gene cloning, purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. **Appl. Environ. Microb.**, v.63, p.1696-1700, 1997.

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

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.

PUGH, R. The scope for enzymes in commercial feed formulations. **Proceedings of the 9th Annual Symposium on Biotechnology in the Feed Industry**, p. 369-372, 1993.

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 Biochem**, 40:1749-1754, 2005.

REGINA, R. **Nutrição animal, principais ingredientes e manejo de aves e suínos**. 1ª edição. São Paulo. Fundação Cargill, 413 p., 2010.

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

RICHARDS, J., DIBNER, J. Organic trace minerals are not all equally effective. **World Poultry**, Doetinchem, v. 21, p. 17-19, 2005.

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

RIES, E.F. Estudo da produção, caracterização e aplicação de nova fitase de *Saccharomyces cerevisiae*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

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

ROCHA, C. Impacto de diferentes alimentos sobre a estrutura morfológica intestinal e digestibilidade dos nutrientes em frangos. Tese de Doutorado. Pós graduação em ciências veterinárias. Universidade Federal do Paraná, 168 p. 2014.

ROOPESH, K.; RAMACHANDRAN, S.; NAMPOOTHIRI, M.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparison of phytase production on wheat bran and oilcakes in solidstate 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.

RUTHERFURD, S. M., T. K. CHUNG, D. V. THOMAS, M. L. ZOU, AND P. J. MOUGHAN. Effect of a novel phytase on growth performance, apparent metabolizable

energy, and the availability of minerals and amino acids in a low-phosphorus corn-soybean meal diet for broilers. **Poult. Sci.** 91:1118-1127, 2012.

SAKOMURA, N.K., SILVA, J.H.V., COSTA, F.G.P., FERNANDES, G.P.C., FERNANDES, J.B.K., HAUSCHILD, L. **Nutrição de Não Ruminantes**. Jaboticabal: Ed. FUNEP, 2014.

SALMON, D.N.X. desenvolvimento de um bioprocesso para a produção, caracterização e recuperação da fitase de *Schizophyllum commune* obtida por fermentação em estado sólido. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

SANO, K., FUKUHARA, H., NAKAMURA, Y. Phytase of the yeast *Arxula adenivorans*. **Biotechnol. Lett.**, v.21, p.33-38, 1999.

SEGUEILHA, L., LAMBRECHTS, C., BOZE, H., MOULIN, G., GALZY, P. Purification and properties of the phytase from *Schwanniomyces castelli*. **J. Ferment. Bioeng.**, v.74,p.7-11, 1992

SELLE, P.H., RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. **Anim. Feed Sci. Tech.**135: 1-41, 2006.

SELLE, P.H., WALKER, A.R., BRYDEN, W.L. Total and phytate-phosphorus contents and phytase activity of Australian-sourced feed ingredients for pigs and poultry. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.43, p. 475-479, 2003.

NASCIMENTO, J.C.S. Produção, Purificação e Caracterização Parcial da Fitase...

SHANG, Q.K., LI, W., JIA, Q., LI, D.Q. Partitioning of behaviour of amino acids in aqueous two phase systems containing polyethylene glycol and phosphate buffer. **Fluid Phase Equilibria**, v. 219, p. 195-203, 2004.

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

SHIEH, T.R., WARE, J.H. Survey of microorganisms for the production of extracellular phytase. **Appl. Microbiol.**, p.1348-1351, 1968.

SHIMIZU, M. Purification and characterization of phytase and acid phosphatase produced by *Aspergillus oryzae* K1. **Biosci., Biotechnol., Biochem.**, v. 57, p.1354-1365, 1993.

SILVA, Y.L. Redução dos níveis de proteína e fósforo em rações com fitase para frangos de corte: desempenho, digestibilidade e excreção de nutrientes. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2004. 228p. Tese (Doutorado em Zootecnia), 2004.

SILVA, L.M., GERALDO, A., VIEIRA FILHO, J.A. Associação de carboidrase e fitase em dietas valorizadas para poedeiras semipesadas. **Acta Scientiarum**, v.34, n.3, p.253-258, 2012.

SILVERSIDES, .FG., HRUBY, M. Feed formulation using phytase in laying hen diets. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 18, n. 1, p. 15-22, 2009.

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.

SLOMINSKI, B.A. Recent advances in research on enzymes for poultry diets. **Poultry Science**, v.90, p.20132023, 2011. DOI: 10.3382/ps.2011-01372.

SOETAN, K.O.; OYEWOLE, O.E. The need for adequate processing to reduce the anti-nutritional factors in plants used for human food and animal feeds – a review. **African Journal of Food Science**, Victoria Island, v.4, n.5, p. 200-222, 2010.

SOETAN, K.O., OYEKUNLE, M.A., AIYELAAGBE, O.O., FAFUNSO, M.A. Evaluation of the antimicrobial activity of saponins extract of *Sorghum bicolor* L. Moench. **Afr. J. Biotechnol.**, 5 (23):2405-2407, 2010.

SORIO, A., BRAGA, F., LIMA, F., MAIA, G., RASI, L., DALLONDER, L.O. Estudo de viabilidade técnica e econômica destinado a implantação do parque produtivo nacional de aditivos da indústria de alimentação de animais de produção. **Méritos Editora**, 2012.

SOUZA, F.A.S.D. Produção, purificação parcial por Fermentação Extrativa em Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA) e caracterização bioquímica de enzimas fibrinolíticas do *Bacillus amyloliquefaciens* UFPEDA. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco, 2014.

SPIER, M.R., SCHEIDT, G.N., PORTELLA, A.C., RODRÍGUEZ-LEÓN, J.A., WOICIECHOWSKI, A.L., GREINER, R., SOCCOL, C.R. Increase in Phytase Synthesis During Citric Pulp Fermentation. **Chemical Engineering Communications**, v. 198, p. 286 - 297, 2011.

SUZUKI, U., YOSHIMURA, K., TAKASHI, M. Ueber ein Enzym, "Phytase" das "Anhydro-Oxymwthylen diphosphorsäure" Spaltet. **Tokyo Imper. Univ. Coll. Bull.**, v.7, p.503-512, 1908.

TRABULSI, L.R., ALTERTHUM, F., GOMPERTZ, O. F., CANDEIAS, J.R. **Microbiologia**, 3ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

UENOJO M.; PASTORE, G.M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Quím. Nova**, vol.30 no.2, 2007.

ULLAH, A.H.L., GIBSON, D.M. Purification and characterization of acid phosphatase from cotyledons of germinating soybean seeds. **Arch. Biochem.**, v.260, p.514-520,1986.

VASSILEV, N., VASSILEVA, M., BRAVO, V., FERNANDEZ-SERRANO, M., NIKOLAEVA, I. Simultaneous phytase production and rock phosphate solubilization by *Aspergillus niger* grown on dry olive wastes. **Ind. Crop. Prod.**, v.26, p.332-336, 2007.

VATS, P., BANERJEE, U.C. Production studies and catalytic properties of phytases (myoinositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. **Enzyme Microb. Tech.** 35:3-14, 2004.

VATS, P., BANERJEE, U.C. Catalytic characterization of phytase (myoinosilhexakisphosphate phosphohydrolase) from *Aspergillus niger* van Teighem: Glycosylation pattern, kinetics and molecular properties. **Enz. Microb. Technol.**, v.39, p.596-600, 2006.

VALLE, F.L.P. Uso de fitase em dietas comerciais para frangos de corte contendo ou não ingrediente de origem animal. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2010.

VOHRA, A., SATYANARAYANA, T. Phytase production by the yeast *Pichia anomala*. **Biotechnol. Lett.**, v.13, p.551-554, 2002.

YIN, Q.Q., ZHENG, Q.H., KANG, X.T. Biochemical characteristics of phytases from fungi and the transformed microorganism. **Animal Feed Science and Technology**, v.132, p.341-350, 2007.

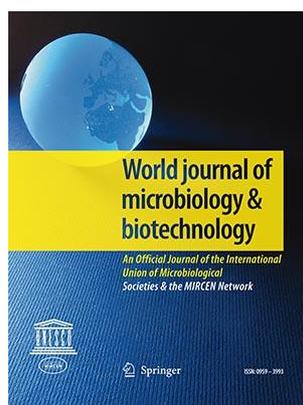
XIANG, T., LIU, Q., DEACON, A.M., KOSHY, M.K., LEI, X.G., HAO, Q., THIEL, D.J. Crystal structure of a heat-resilient phytase from *Aspergillus fumigatus*, carrying a phosphorylated histidine. **J. Mol. Biol.** 339:437-445, 2004.

NASCIMENTO, J.C.S. Produção, Purificação e Caracterização Parcial da Fitase...

ZHOU, Y., HU, C., WANG, N., ZHANG, W., YU, X. Purification of Porcine Pancreatic Lipase by Aqueous Two-Phase Systems of Polyethylene Glycol and Potassium Phosphate. **J Chromatogr B**, 926: 77- 82, 2013.

CAPÍTULO I

Effect of pH and temperature on phytase and biomass production by submerged fermentation with *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924



Artigo a ser submetido revista World Journal of Microbiology and Biotechnology

Fator de Impacto: 1,35

**Júlio C.S. Nascimento^a, Fabiana A.S.D. Souza^a, Tatiana S. Porto^b, Armando A.D. Venâncio^c, Héctor B. Morales-Valle^c, Solange I. Mussatto^{c,*}, José A. Teixeira^c,
Ana Lúcia F. Porto^a**

^a Department of Morphology and Animal Physiology, Federal Rural University of Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife, PE, Brazil

^b Academic Unit of Garanhuns, Federal Rural University of Pernambuco, Avenida Bom Pastor, s/n, Boa Vista, 55292-270, Garanhuns, PE, Brazil

^c Centre of Biological Engineering, University of Minho, Campus Gualtar, 4710-057, Braga, Portugal

* Corresponding authors. Tel.: +55 81 3320 6345

E-mail addresses: analuporto@yahoo.com.br (Ana Lúcia Figueiredo Porto).

Abstract

The production of phytase and biomass by submerged fermentation with *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 was studied. Experimental assays were carried under different conditions of pH and temperature, and the influence of these variables on phytase and biomass production was studied through a 2^2 central composite design and response surface methodology. pH presenting a more significant influence than the temperature in the studied range of values. A 7.8 fold variation (from 1.04 to 8.09 U/mL) in phytase activity and a corresponding 38 fold variation (from 9.3 to 354.09 $\mu\text{g/mL}$) in the ergosterol content were observed in the range of considered values of pH and temperature. The maximum values of both responses were achieved when using pH 4.0 and 30 °C. Good correlation (second-order fit, $R^2 = 0.9875$) was found between the data obtained for phytase activity and ergosterol content, suggesting that the phytase production depends on the biomass formation. The importance of having phytic acid on the culture medium for the production of phytase by *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 was also evaluated. Apart from confirming the importance of phytic acid as an inductor, it was possible to conclude on the suitability of using corn steep liquor as a low cost carbon source for the production of phytase. These results are of interest since they contribute for the development of an industrial process for phytase production with elevated yields by submerged fermentation.

Key words: *Aspergillus niger*; Ergosterol; Phytase; Submerged fermentation

1.0 Introduction

Approximately 60-80% of phosphorus (P) in vegetal feed ingredients is in the form of phytate (myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis dihydrogen phosphate) (Diarra *et al.*, 2010). Due to the lack of phytate-degrading enzymes in the gastrointestinal tract (GIT) of non ruminant animals, phytate P is almost completely unavailable to poultry and pigs. Inorganic P is usually added to pig and poultry diets in order to meet nutritional requirements for optimizing growth performance and bone strength of the animals. If phytate P could be available for absorption in monogastric animals, this might reduce or eliminate the addition of inorganic P to the diet (Esmailipour *et al.*, 2012).

Phytases, myo-inositol hexakisphosphate phosphorhydrolase (EC 3.1.3.8), belong to a sub-class of the family of histidine acid phosphatases with the *in vitro* capability to release at least one phosphate from phytate (Haefner *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2010). The distribution of phytases is widespread among bacteria, yeast, fungi, plants, and also in animals (Mullaney *et al.*, 2000; Haefner *et al.*, 2005). The importance of microbial phytases is to release phytate bound phosphorous and improve phosphorous bioavailability of plant ingredients for non-ruminants animals and to reduce the phosphorous levels in effluent from intensive animal units (Khan *et al.*, 2004). Recently, the production, properties, and structure of phytase have been reviewed (Mullaney *et al.*, 2000; Choi *et al.*, 2001). Extensive studies made on microbial phytases have proved their efficacy that could be tapped for animal nutrition, environment protection, and also for human health (Pandey *et al.*, 2001; Vohra and Satyanarayana, 2003).

Although large number of microorganisms including bacteria, yeast and fungi are reported to produce phytases (Vohra and Satyanarayana, 2003; Vats and Banerjee,

2004), fungal phytases are widely used in animal feed due to their acid tolerance and higher yield in comparison to the bacterial phytases. Among fungi, many *Aspergilli* are known to be active phytase producers (Soni and Khire, 2007). As *Aspergillus niger* is Generally Recognised as Safe (GRAS) it is frequently used in food and feed applications. To enhance plant phosphorus utilization and to circumvent the deleterious effect of phytic acid in animal nutrition, phytases from *Aspergillus* species have been fed to non-ruminants animals (Vats and Banerjee, 2002).

The biomass determination is many times a challenge in fermentative process, and is an essential parameter in kinetic studies and for characterization of the optimum growth and sporulation conditions for different fungi (Augustine *et al.*, 2006). Several indirect methods have been employed in order to determine fungal biomass in submerged fermentation conditions, which are based on measurements of the content of certain cell components like chitin, ergosterol and protein (Desgranges *et al.*, 1991). Such methods include glucosamine estimation, ergosterol accumulation, protein (Kjeldahl) content, DNA estimation, dry weight changes and CO₂ evolution; however, all of these methods have their own weaknesses (Mussatto *et al.*, 2012). The content of the different cell components can markedly change in fungi according to the specie, growth conditions and culture age (Oojikas *et al.*, 1998).

Ergosterol, one of the most important components in fungal membranes, is involved in numerous biological functions, such as, membrane fluidity regulation, activity and distribution of integral proteins and control of the cellular cycle (Alcazar-Fuoli *et al.*, 2008). These facts make ergosterol and its biosynthetic pathway essential for fungal growth. As a marker molecule for fungal biomass, ergosterol has several advantages since it is easy to extract and measure by HPLC (Gessner and Chauvet, 1997a), and in many cases it is also the dominating sterol in fungi. Additionally,

ergosterol is a more sensitive and reliable indicator of viable fungal biomass than other biochemical molecules, such as chitin (Newell, 1996). The determination of ergosterol is also valuable in correlating fungal activity to synthesis of fungal secondary metabolites (Marín *et al.*, 2005).

Although phytase shows great potential for phytate bioconversion, the enzyme activities and yields need to be increased to make them possible for industrial application. Therefore, there is ongoing interest in identifying novel phytases, as well as establishing a process able to produce phytase with elevated yields (Haefner *et al.*, 2005; Luo *et al.*, 2006). Literature data on the production of phytase by submerged fermentation is scarce, and most of the published studies report the production of this enzyme by solid-state fermentation. However, it is well known that submerged fermentation systems present several advantages when compared to solid-state fermentation systems, which includes shorter cultivation times, better aeration, agitation and mass transfer conditions, and others (Mussatto *et al.*, 2012).

For all the above mentioned reasons, the present study consisted in evaluating the production of phytase and biomass (estimated by the ergosterol content) by submerged fermentation with *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924. Experimental assays were carried out under different conditions of pH and temperature, and the influence of these variables on the responses was studied through a 2^2 central composite design and response surface methodology.

2.0 Materials and methods

2.1. Fungal strain and inoculum preparation

Aspergillus niger var. *phoenicis* URM 4924 (non-OTA producer) from the URM Culture Collection of the Department of Mycology, Federal University of Pernambuco (Brazil), was the fungal strain used in the present study. The culture was grown and maintained on potato-dextrose-agar (PDA) slants at 4 °C. An eight-day-old sporulated culture was used for the inoculum preparation. The conidial suspensions were obtained by washing the stock tube cultures with sterile solution of 0.1% Tween 80. The spores' concentration was adjusted to 10^6 spores/mL by counting in a Neubauer chamber.

2.2. Fermentation medium and conditions

Fermentation assays were carried out in 250-mL Erlenmeyers flaks containing 100 mL of medium with the following composition: 1.0% (w/v) rice bran (carbon source), 3.0% (v/v) corn steep liquor (nitrogen source), 0.5 g/L KCl, 1.5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2.0 g/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1.5 g/L $Fe_2SO_4 \cdot 7H_2O$ (salts). According to the pH to be studied, specific buffers were also added to the medium, namely: 0.2 M acetate buffer pH 4.0, 0.2 M acetate buffer pH 6.0, or 0.2 M TRIS-glycina buffer pH 8.0. Fermentation medium was sterilized at 121 °C for 15 min, and was inoculated with 70 μ L of the spore suspension containing 10^6 spores/mL.

The fermentation runs were carried out in orbital shaker at 90 rpm, for 72 h, under different conditions of pH and temperature (Table 1). After fermentation, mycelium was separated by filtration followed by centrifugation (10,000 g, 30 min, 4 °C), and was

used to estimate the ergosterol content. The supernatant was collected and used to estimate phytase activity (U/mL).

2.3. Analytical methods

2.3.1. Phytase activity

Phytase activity was determined by using the method of ammonium molybdate (Heinonen and Lathi, 1981) with modifications. Sodium acetate buffer (350 μ L at 0.2 M, pH 4.8) containing sodium phytate (875 nmol) was used as substrate. After pre-incubation at 37 °C for 10 min, the enzymatic reaction was initiated by the addition of enzyme extract (50 μ L). The homogenized solution was incubated for 30 min at 37 °C. In order to estimate the liberated inorganic phosphate, 1.5 mL of a freshly prepared solution of acetone: 2.5 M H₂SO₄: 10 mM ammonium molybdate (2:1:1 v/v/v) and 100 μ L of 1M citric acid were added to the assay mixture. The absorbance at 355 nm was then read after 10 min of reaction. One unit of phytase was defined as the amount of enzyme that releases 1 μ mol of inorganic phosphorus per min under standard assay conditions. Enzyme activity was expressed in units per milliliter (U/mL). The standard curve was made with dibasic potassium phosphate with 10 to 600 μ M phosphate per mL. The amount of inorganic phosphate present in the medium before inoculation of the microorganism was also determined in order to minimize interference residues of P present in the culture medium.

2.3.2. Ergosterol analysis

Ergosterol content was estimated according to Gourama and Bullerman (1995a) with modifications. The total biomass was filtered and then immediately extracted with 40 mL of 10% KOH in methanol, under magnetically stirring for 30 min. A 10-mL aliquot obtained by suspension was then transferred to a screw-cap tube and placed in a hot water bath at 55-60 °C for 20 min, being subsequently allowed to cool to room temperature. Then, 3 mL of water and 2 mL of hexane were added to the tube and the mixture was agitated in a vortex mixer for 1 min. After separation of the layers, the upper layer (hexane) was transferred to a 10-mL vial. Hexane extraction was repeated twice using 2 mL each time. The extracts were combined and evaporated to dryness under a stream of nitrogen. The dried extracts were dissolved in 2 mL of methanol, and filtered through 0.45 µm acetate filters. Ergosterol was measured by high performance liquid chromatography (HPLC) using a system composed of a UV detector (Waters 2487) at 282 nm, a pump (Varian 9002), a Marathon Basic autosampler with loop of 50 µL, a fluorescence detector (Jasco FP-920), and a Galaxie chromatography data system. The chromatographic separation was carried out with a 20 min isocratic run on a C₁₈ reversed-phase YMC-Pack ODS-AQ analytical column (250 × 4.6 mm i.d., 5 µm), fitted with a pre-column of the same stationary phase. The mobile phase was composed of methanol filtered in 0.45 µm membrane (GHP, Gelman) and degassed. Ergosterol was quantified taking as reference an ergosterol standard calibration curve prepared from a standard solution (1000 µg/mL (1 ppm), purchased from Sigma Chemicals (St. Louis, MO). A linear relationship was observed between peak heights measured on HPLC chromatograms and ergosterol concentration ($R^2 = 0.998$). All the analytical determinations were carried out in triplicate.

2.4. Correlation between dry weight and ergosterol content and effect of nutrients on phytase production

In order to verify a possible correlation between dry weight (g) and ergosterol content (ppm) in the samples, fermentation assays were carried out using the following substrates, instead of rice bran: phytic acid 1% (w/v), glucose 4 % (w/v), sucrose 4% (w/v), starch 4% (w/v), and corn steep liquor 2% (v/v). These substrates were used as rice bran particles cannot be separated from the biomass present in the culture medium. This would make impossible to study a possible correlation between dry weight and ergosterol content in the samples under submerged fermentation. The fermentation runs were carried out in orbital shaker at 90 rpm for 120 h. During the fermentations, samples were withdrawn each 24 h, being filtrated with filter paper. The supernatant was used for phytase activity (U/mL) determination. The fungal biomass was dried in an oven at 80 °C for 2 h. The dried biomass was used to estimate the ergosterol content (ppm).

2.5. Statistical analysis

The influence of the variables pH and temperature on the phytase and biomass production (expressed by ergosterol content) by *A. niger* URM 4924 under submerged fermentation conditions was evaluated through a 2^2 central composite design with three coded levels. For statistical analysis, the variables were coded according to Eq. 1, where each independent variable is represented by x_i (coded value), X_i (real value), X_0 (real

value at the center point), and ΔX_i (step change value). The range and levels of the variables, which were selected based on literature data, are given in Table 1.

$$x_i = \frac{(X_i - X_0)}{\Delta X_i} \quad \text{Eq. 1}$$

All the experimental conditions were carried out in triplicate leading to 27 sets of experiments, and mean values \pm standard errors are presented (Table 1). Repetitions were carried out in order to estimate the experimental error and to examine the presence of curvature in the response surface. Statistical significance of the variables was determined at 5% probability level ($p < 0.05$). Data obtained from the design were fitted to a second order polynomial equation. Statistical significance of the regression coefficients was determined by Student's t-test, and the proportion of variance explained by the model was given by the multiple coefficient of determination, R^2 . Statistica version 7.0 was the software used for regression and graphical analyses of the data.

3.0 Results and discussion

3.1. *Phytase production*

The experimental matrix with the real and coded levels of the process variables, as well as the results of phytase activity and ergosterol content obtained to each experimental assay, is presented in Table 1. As can be seen, the values of the responses were strongly affected by the conditions of pH and temperature used for fermentation. The phytase activity, for example, was increased in up to 7.8-fold (from 1.04 to 8.09 U/mL) while

$$x_i = \frac{(X_i - X_0)}{\Delta X_i}$$

the ergosterol content was increased in up to 38-fold (from 9.3 to 354.09 $\mu\text{g/mL}$). For both responses, the maximum values were achieved when using the lowest pH (4.0) and the intermediate value of temperature (30 $^{\circ}\text{C}$), conditions of the assay 6.

Tab. 1

An analysis for estimation of the effects of the variables on phytase production (Table 2) revealed that the pH was the variable with the highest influence on this response, with both linear (L) and quadratic (Q) terms being significant at $p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively. Fig. 1a clearly shows that the results of phytase activity were improved when the fermentation pH was decreased to 4.0, which is in agreement with the results presented in Table 1. The temperature used for fermentation presented also important influence on the production of phytase, with individual and interaction effects significant at $p < 0.01$ (Table 2). However, for the individual effects, only the quadratic term of this variable was significant on this response, suggesting that the phytase activity was improved when the temperature was increased, but there was a maximum value of temperature after which the results were not improved. Such behavior can be easily visualized in Fig. 1a. Under the lowest pH value (4.0), which improved the results of phytase activity, the temperature increase improved the results of enzyme activity but until a certain value, after which no more significant improvements on phytase production were observed.

Tab. 2; Fig. 1

The statistical significance of the quadratic terms of the variables suggests that a second-order polynomial equation is more suitable than a linear equation to describe the variations of phytase activity as a function of the pH and temperature used for fermentation. The coefficients of the second-order model equation able to estimate the phytase activity variations as a function of the process variables variations were then obtained by multiple regression analysis, and the mathematical model obtained was expressed by the Eq. 2, where the variables pH (x_1) and temperature (x_2) assumed their coded values. This model is very useful for a fast prediction of the phytase activity value to be obtained when using pH and temperature in the range of values here studied. This model presented high coefficient of determination ($R^2 \geq 0.85$), explaining more than 85.0% of the variability in the response. Such a fact can also be verified through Fig. 2, which represents the observed values of phytase activity versus the values predicted by the model equation. As can be seen in this figure, the results are distributed close the medium values, revealing a good agreement between the predicted and observed values of phytase activity when using the established second-order model equation.

$$\text{Phytase activity (U/mL)} = 5.61 - 1.97x_1 - 0.97x_1^2 + 0.18x_2 - 1.51x_2^2 - 0.90x_1x_2$$

$$R^2 = 0.853$$

Eq. 2

Fig. 2

In brief, pH and temperature were demonstrated to be variables of great influence on the production of phytase by submerged fermentation with *A. niger* var. *phoenicis*

URM 4924, the pH presenting more significant influence than the temperature in the studied range of values. The pH was also an important variable affecting the production of phytase by other fungal strains. For example, the phytase production by *A. niger* 307 was maximized at pH 5.0 (Gargova and Sariyska, 2003), while the production of this enzyme by *A. ficuum* was improved when using pH values between 4.0 and 6.0 (Han *et al.*, 1987). Similar to the present study, a pH value of 4.0 was the best for phytase production by *A. niger* NCIM 563 (Soni and Khire, 2007). Vats and Banerjee (2002) analyzed the phytase production by a newly isolated strain of *A. niger* var. *teigham* and found that the optimum growth temperature was 37 °C while the maximum enzyme activity was obtained when the microorganism was grown at 30 °C and at an initial pH of 6.5. Among the various carbon sources used, a combination of glucose and starch (3.0 and 1.0%, respectively) was found as being optimum for phytase production.

It merits emphasizing that, according to the statistical analysis, a pH value of 3.6 and temperature of 32 °C were estimated as being the best conditions to maximize the results of phytase activity by *A. niger* URM 4924. However, increasing the temperature to 32 °C and decreasing the pH to 3.6 will result in a higher cost for the enzyme production, and probably will not justify the little increment that will be obtained in the enzyme activity. Therefore 30 °C and pH 4.0 were considered as optimum values for phytase production by *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924.

The results obtained in the present work can be well compared to other studies. For example, Shah *et al.* (2009) obtained 6.18 U/mL of extracellular phytase by *A. niger* NCIM 563 after 144 h of submerged fermentation using rice bran (1% w/w). In the present study, higher phytase production (8.09 U/mL) was obtained in a shorter cultivation time (72 h). The phytase production by *Rhizoctonia* sp. and *Fusarium*

verticillioides at 28° C for 48 h was also lower than in the present study, with values of 2.72 and 6.11 U/mL respectively (Marlida *et al.*, 2010).

On the other hand, in a study performed by Khan *et al.* (2004) the synthesis of phytase by *Aspergillus niger*-23 reached 84 U/mL when using ammonium nitrate as nitrogen source, and rice bran (1% w/w) as carbon source, after 72 h at 30 °C. Although the lower results, it is noteworthy that the nitrogen source used in the present study is significantly cheaper than that used by Khan *et al.* (2004), since corn steep liquor is a byproduct of the corn industry. Corn steep liquor is composed of (%) water (46), phytic acid (7.8), non-protein nitrogen (7.5), lactic acid (26), fat (0.4) protein (47) and ash (17) (White and Johnson, 2003); and according to Spier *et al.* (2010), substrates with considerable content of phytic acid and inorganic reduced phosphorus content (like corn steep liquor) have potential for inducing the production of phytases.

3.2. Biomass content

Besides the enzyme production, the biomass determination is also a fundamental parameter when studying microbial cultures, since metabolic activities such as substrate consumption and product formation are strongly related to the growth rate and the biomass content. Therefore, the biomass formation in the fermentation medium was also taken into account in the present study. Many studies have described the relationship between ergosterol and biomass in filamentous fungi (among which *A. niger* was quoted) (Bindler *et al.*, 1988). However, the physiological status of mycelium changes with age, and this may have effects on ergosterol content (Bermingham *et al.*, 1995). Different researchers proposed a relationship between ergosterol content of grains and the presence of moulds (Schwadorf and Muller, 1989; Torres *et al.*, 1992). The

determination of ergosterol has also been valuable in correlating fungal activity and the synthesis of fungal secondary metabolites, such as enzymes, aflatoxins and antimicrobial metabolites (Gourama and Bullerman, 1995b; Saxena *et al.*, 2001). Ergosterol analysis has been successfully applied to cereals for estimation of fungal spoilage (Olsson *et al.*, 2002; Saxena *et al.*, 2001). According to Taniwaki *et al.* (2006), the ergosterol content per colony varied widely between genus, medium and even within genus, reflecting differences in growth density and membrane composition. For all the above mentioned reasons, the biomass in the present study was estimated by measurement of the ergosterol content.

Statistical analysis of the results obtained in the present study revealed that the ergosterol content was also influenced by the pH and temperature used during the fermentation; but in this case, only the linear (L) term of pH and the quadratic (Q) term of the temperature affected this response (Table 2). Although the effects of these variables were closing similar, and both significant at $p < 0.01$, the effect of the temperature was slightly higher than the effect of the pH. Such behavior is opposite of that observed for the phytase activity, where the pH showed more significant effects than the temperature. In fact, when comparing the three-dimensional surfaces obtained for these two responses (Fig. 1a, b) it is clear that the effect of the variables was not the same for both the responses, although the results were maximized in a similar region (pH 4.0, 30 °C), as previously discussed.

Gougouli and Koutsoumanis (2010) reported that *A. niger* AN-YV7 presented faster mycelium growth and shorter lag time at 32.8 °C. Nevertheless, there are evidences suggesting optimum temperature for *A. niger* growth at 30 °C (Vats and Banerjee, 2002), 33 °C (Parra and Magan, 2004), 35 °C (Leong *et al.*, 2006), 37 °C (Marín *et al.*, 1998), 35-37 °C (Pitt and Hocking, 1997) and 30-37 °C (Bellí *et al.*,

2004). Among these evidences, the results obtained by Vats and Banerjee (2002) are the most similar to those found in the current study.

Zeng *et al.* (2007) evaluated the effect of the culture medium composition in the lanosterol and ergosterol contents of the filamentous fungus *Inonotus obliquus* by submerged fermentation at 26 °C for 192 h. According to these authors, the highest ergosterol concentration occurred at pH 6.5 using rice bran (0.5% w/w) as carbon source, and yeast extract (0.4%) as nitrogen source. These results are different of the present study where the greater ergosterol accumulation was found when using pH 4.0 and 1.0% rice bran (w/w) in the culture medium.

Finally, a correlation analysis of the data obtained in the present study for phytase activity and ergosterol content (Fig. 3) revealed good correlation (second-order fit - $R^2 = 0.9875$) between these two responses, suggesting a close relationship between them. Other studies with different fungal strains reported also correlation between the phytase production and microorganism growth (Krishna and Nokes, 2001; Spier *et al.*, 2009; Spier *et al.*, 2010). According to these studies, the ergosterol content can be considered a good indicator for biomass.

Fig. 3

3.3. Correlation between dry weight and ergosterol content

Ergosterol is a constituent of membranes in mycelia, spores, and vegetative cells (Newell, 1992). Ergosterol content has been widely used as an estimate of fungal biomass in various environments, e.g., in soil and aquatic systems, because a strong

correlation has been found between ergosterol content and fungal dry mass (Pasanen *et al.*, 1999). However, the amount of ergosterol in fungal tissue is not constant. There are interactions between the amount of ergosterol and fungal species, age of the culture, developmental stage (growth phase, hyphal formation, and sporulation), and growth conditions (growth media, pH, and temperature), although no clear trend for the ergosterol content in any of these factors has yet been detected (Pasanen *et al.*, 1999).

Fig. 4 shows the results obtained in order to correlate the fungal biomass dry weight with the ergosterol content. These experiments clearly shown correlation between these two responses, for all the substrates tested ($R^2 > 0.9936$). Similar results have also been reported by other authors using different fungal strains. Spier *et al.* (2009) observed good correlation ($R^2 = 0.9863$) between these variables during the phytase production by solid state fermentation with *A. niger* FS3. Ng *et al* (2008) found also good correlation between dry biomass and ergosterol content ($R^2= 0.9645$) during the cultivation of *A. niger* ATCC 24126 in grains and feeds. According to Carvalho *et al.* (2006), this correlation should be used with care, since it probably depends on the microorganism used and on the cultivation conditions.

Fig. 4

In hyphomycetes and ascomycetes, ergosterol concentrations ranging from 2.3 to 11.9 mg of ergosterol/mg of dry mycelium have been reported (Gessner and Chauvet. 1997b), and the ergosterol content for *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Candida*, and *Alternaria* species has ranged from 0.4 to 14.3 mg/mg (Schnurer, 1993).

Pasanen et al. (1999) analyzed the ergosterol content in various fungal species and biocontaminated building materials and concluded that there is a good agreement between the ergosterol concentration and viable fungal concentrations was detected in the wood chip ($r > 0.66$, $P < 0.009$) and gypsum board samples ($r > 0.48$, $P < 0.059$), whereas no relationship between these factors was observed in the glass wool samples. The authors emphasized that ergosterol concentration could be a suitable marker for estimation of fungal concentrations in contaminated building materials with certain reservations. Ergosterol analysis has recently been suggested for quantitative monitoring of fungi in solid substrates because of the good agreement between hyphal length and ergosterol content and between total ergosterol concentration and mycelial mass, even with more than one fungal species present (Newell, 1996; Schnürer, 1993). In this work was found a good correlation between ergosterol content and dry weight in *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 under submerged fermentation. This result supports the previous contention that ergosterol is a good indicator of fungal concentrations, particularly for *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924.

However, as discussed by Schnürer (1993), vacuole formation and autolysis of cell contents may occur in aging cultures which would lead to a reduction in weight per unit of length and, consequently, to an increased ergosterol to dry weight ratio. Differences in degree and type of sporulation by the species studied here also clearly play a major part in the variations in the ratios of mycelial dry weight to hyphal length and ergosterol content to hyphal length observed here. For example, *Aspergillus flavus* and the *Penicillium* species produce relatively little vegetative mycelium relative to conidiophores and conidia, increasing mycelial dry weight and probably decreasing ergosterol in relation to hyphal length (Nout et al., 1987; Torres et al., 1992).

Biomass dry weight is considered the target value to be indirectly estimated by the different methods (Schnürer, 1993; Bermingham *et al.*, 1995; Reeslev *et al.*, 2003). Marín *et al.*, (2005) found a good correlation between colony diameters and biomass dry weight for the different species (Pearson correlation coefficients=0.67–0.99). This suggests that the widespread use of colony diameters as fungal growth estimator for research purposes in single cultures is a good choice as it is easier to be obtained (Reeslev and Kjoller, 1995).

A further explanation for variation in the ergosterol content of fungi is that sterols other than ergosterol can be produced by some species. For example, ergosterol and 22-dihydroergosterol have been reported as the predominant sterol in *A. flavus* (Vacheron and Michel, 1968; Weete, 1973). Other sterols identified as products of deuteromycetous fungi include cerevisterol, ergosterol peroxide, lanosterol, 24-methylenelophenol and 14-dehydroergosterol (Weete, 1973).

Ergosterol concentrations have been reported as 2 to 14 $\mu\text{g mg}^{-1}$ for *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *Aspergillus niger*, *Alternaria spp.*, *Cladosporium spp.*, and *Penicillium spp.* cultured on Sabouraud dextrose agar for 2 to 4 days (Axelsson *et al.*, 1995). Nevertheless, *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 presented a higher ergosterol content which was described by the authors cited above ($354.09 \mu\text{g mL}^{-1}$). This fact can be explained by the use of corn steep liquor as a nitrogen source in the fermentation medium submerged. Several authors studied the effect of the inclusion of corn steep liquor on steroid production by filamentous fungi (Ghanem *et al.*, 1990; Naim *et al.*, 1985; Al-Refai, 1964).

Ghanem *et al.* (1990) studied the development of cheap culture medium to ergosterol production under optimized conditions by *Penicillium crustosum*. A cheap

and economic fermentation medium that favoured maximum sterol and ergosterol yields was found to contain 3% of corn steep solid, with the formation of ergosterol (62.1%), stigmasterol (17.2%), fungisterol (16.4%), and lanosterol (4.3%). It was also found that a cheap culture medium consisting of 8% treated molasses and 1% corn steep liquor favoured maximum growth and total lipids yields of *Fusarium oxysporum* (Naim *et al.*, 1985).

Al-Refai (1964) demonstrated the stimulatory effect of the phenylalanine present in corn steep liquor on mycelial growth, total proteins and sterols produced by *Aspergillus fumigatus*. However, Michalin (1958) and Osman *et al.* (1969) have explained stimulatory effects of corn steep liquor on growth and lipid production by fungi as due to the presence of certain sugars, amino acids, keto acids and vitamins.

The production of sterols, more particularly ergosterol, the precursor of vitamin D, was the aim of many investigators since the isolation of ergosterol from ergot (Ghanem *et al.*, 1990). Several workers (Evans and Gealt, 1985; Shapiro and Geatl, 1982; Ruppel, 1949) reported that the sterol contents of a number of *aspergilli* and *penicilla* varied with different species and with the growth medium employed. Usually two or three different sterols form about 90% of the total sterols and the remaining 10% is represented by intermediate structures formed during synthesis of the predominant species (Ghanem *et al.*, 1990).

Fig. 5 reveals that phytase production only occurred when using carbon sources that contained phytic acid in their composition, suggesting that this enzyme behaves as an inductive enzyme or it is only secreted to the culture medium in the presence of phytic acid. In fact, substrates with considerable content of phytic acid and reduced content of inorganic phosphorus have been reported to have potential for inducing the phytases production (Spier *et al.*, 2011). Although the presence of inorganic phosphorus

in the culture media is essential for phytase synthesis, the amount of component must be carefully controlled, since low inorganic-P substrate stimulates phytase synthesis, but an excess of inorganic-P causes a well-known repression of phytase synthesis in many fungi. Phytase synthesis begins when the phosphate in the culture medium is consumed by the cells and then, the repression of phytase synthesis by phosphate is eliminated (Spier et al., 2010).

Fig. 5

4. Conclusion

This study demonstrated the possibility of producing phytase enzyme with elevated values of enzymatic activity under submerged fermentation conditions.

Production of phytase by *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 by submerged fermentation was evaluated and the effect of temperature and pH on phytase and biomass production evaluated. Temperature and pH were shown to be important parameters on the production of the enzyme and the best temperature and pH values for phytase production were found to be 30 °C and pH 4.0.

Phytase production was demonstrated to be correlated with biomass formation and ergosterol was shown to be an useful indicator of *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 growth in submerged fermentation.

The importance of incorporating phytic acid in the culture medium was also confirmed and the suitability of using corn steep liquor, a low cost carbon source, on the production of phytase demonstrated.

These results are of great relevance as they show that the cultivation conditions affect the production phytase by *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 and validate the use of a low cost culture medium (with corn steep liquor as a simultaneous carbon and phytic acid source) for the production of phytase.

5.0 Acknowledgements

The authors acknowledge the financial supported provided by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil - scholarship PDSE, BEX 0244/12-0) and FCT (Fundação para a Ciência e a Tecnologia, Portugal - Contract/Grant numbers: SFRH/BPD/38011/2007 and SFRH/BPD/38212/2007). The authors also thank to URM Culture Collection of the Department of Mycology, Federal University of Pernambuco (Brazil) for the fungal strain donation.

6.0 References

- Alcazar-Fuoli L, Mellado E , Garcia-Effron G, Lopez JF, Grimalt JO, Cuenca-Estrella JM, Rodriguez-Tudela JL (2008) Ergosterol biosynthesis pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Steroids* 73(3):339-347.
- Al-Refai AH (1964) Physiological and biochemical studies on the metabolism of fats and sterols in fungi. Ph D Thesis Fac of Science Cairo Univ Egypt.

Augustine A, Joseph I, Raj RP (2006) Biomass estimation of *Aspergillus niger* S₁₄ a mangrove fungal isolate and *A. oryzae* NCIM 1212 in solid-state fermentation. J. Mar. Biol. Ass. India 48(2):139-146.

Axelsson BO, Saraf A, Larsson L (1995) Determination of ergosterol in organic dust by gas chromatography and mass spectrometry. Journal of Chromatography B. 666:77-84.

Bellí N, Marín S, Sanchis V, Ramos AJ (2004) Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus* section *Nigri* obtained from grapes. Int. J. Food Microbiol. 96(1):19-27.

Berminham S, Maltby L, Cooke RC (1995) A critical assessment of the validity of ergosterol as an indicator of fungal biomass. Mycol. Res. 99(4):479-484.

Bindler GN, Piade JJ, Schulthess D (1988) Evaluation of selected steroids as chemical markers of past or presently occurring fungal infection on tobacco. Beitr. Tabakforsch. Int. 14(2):127-134.

Carvalho JC, Pandey A, Oishi BO, Brand D, Rodriguez-León JA, Soccol CR (2006) Relation between growth, respirometric analysis and biopigments production from *Monascus* by solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal, 29:262–269.

Choi YM, Suh HJ, Kim JM (2001) Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus sp.* KHU-10. *J. Protein Chem.* 20(4):287-292.

Desgranges C, Vergoignan C, Georges M, Durand A (1991) Biomass estimation in solid-state fermentation. I. Manual biochemical methods. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35(2): 200-205.

Diarra SS, Usman BA, Igwebuiké, JU, Yisa AG (2010) Breeding for efficient phytate-phosphorus utilization by poultry. *Int. J. Poult. Sci.* 9(10):923-930.

Esmailipour O, Van Krimpen MM, Jongbloed AW, de Jonge LH, Bikker P (2012) Effects of temperature, pH, incubation time and pepsin concentration on the *in vitro* stability of intrinsic phytase of wheat, barley and rye. *Anim. Feed Sci. Technol.* 175(3-4):168-174.

Evans JL, Gealt MA (1985) The sterols of growth and stationary phases of *Aspergillus nidulans* cultures. *Journal of General Microbiology* 1:131- 279.

Gargova S, Sariyska M (2003) Effect of culture conditions on the biosynthesis of *Aspergillus niger* phytase and acid phosphatase. *Enzyme Microb. Technol.* 32(2): 231-235.

Gessner MO, Chauvet E (1997a) Growth and production of aquatic hyphomycetes in decomposing leaf litter. *Limnol. Oceanogr.* 42(3):496-505.

Gessner MO, Chauvet, E (1997b) Ergosterol-to-biomass conversion factors for aquatic hyphomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:502-507.

Ghanemi KM, Ghanemi NBA, El-Refai H, Michalin AN (1990) Utilization of beet molasse for sterol production by some moulds. *Microbiología SEM* 6:37-44.

Gougouli M, Koutsoumanis K.P (2010) Modelling growth of *Penicillium expansum* and *Aspergillus niger* at constant and fluctuating temperature conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 140(2-3):254-262.

Gourama H, Bullerman LB (1995a) *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: A review. *J. Food Prot.* 58(12): 1395-1404.

Gourama H, Bullerman LB (1995b) Relationship between aflatoxin production and mold growth as measured by ergosterol and plate count. *Food Sci. Technol.* 28(2): 185-189.

Haefner S, Knietsch A, Scholten E, Braun J, Lohscheidt M, Zelder O (2005) Biotechnological production and applications of phytases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68(5): 588-597.

Han YW, Gallagher DJ, Wilfred AG (1987) Phytase production by *Aspergillus ficuum* on semisolid substrate. *J. Ind. Microbiol.* 2(4):195-200.

- Heinonen JK, Lathi, RJ (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.
- Khan AD, Ahmad R, Salman S, Shahzad K, Khaliq A (2004) Biosynthesis of fungal phytase from defatted rice polish. *Pak. J. Food Sci.* 14(1-2):61-64.
- Krishna C, Nokes SE (2001) Influence of inoculum size on phytase production and growth in solid-state fermentation by *Aspergillus niger*. *Trans. ASABE* 44(4): 1031-1036.
- Leong SLL, Hocking AD, Scott ES (2006) Effect of temperature and water activity on growth and ochratoxin A production by Australian *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* isolates on a simulated grape juice medium. *Int. J. Food Microbiol.* 110(3): 209-216.
- Luo H.-Y, Huang H.-Q, Bai Y.-G, Wang Y.-R, Yang P.-L, Meng K, Yuan T.-Z, Yao B (2006) Improving phytase expression by increasing the gene copy number of *appA-m* in *Pichia pastoris*. *Chin. J. Biotechnol.* 22(4):528-533.
- Marín S, Ramos AJ, Sanchis V (2005) Comparison of methods for the assessment of growth of food spoilage moulds in solid substrates. *Int. J. Food Microbiol.* 99(3): 329-341.

- Marín S, Sanchis V, Sáenz R, Ramos AJ, Vinas I, Magan N (1998) Ecological determinants for germination and growth of some *Aspergillus* and *Penicillium* spp. from maize grain. *J. Appl. Microbiol.* 84(1): 25-36.
- Marlida Y, Delfita R, Adnadi P, Ciptaan G (2010) Isolation, characterization and production of phytase from endophytic fungus its application for feed. *Pak. J. Nutr.* 9(5):471-474.
- Mullaney EJ, Daly CB, Ullah AHJ (2000) Advances in phytase research. *Adv. Appl. Microbiol.* 47:157-199.
- Mussatto SI, Ballesteros LF, Martins S, Teixeira JA (2012) Use of agro-industrial wastes in solid-state fermentation processes, in: Show, K.-Y., Guo, X. (Eds.), *Industrial Waste*. InTech - Open Access Publisher, Rijeka, Croatia, p 121-140.
- Naim N, Saad, R, Naim, MS (1985) Production of lipids and sterols by *Fusarium oxysporum* (Schlecht). Utilization of some agro-industrial by-products as additives and basal medium. *Agricultural Wastes* 14:207-220.
- Newell SY (1992) Estimating fungal biomass and productivity in decomposing litter, p. 521–561. *In* G.C. Carroll and D. T. Wicklow (ed.).

Newell SY (1996) The (¹⁴C) acetate-to-ergosterol method: Factors for conversion from acetate incorporated to organic fungal mass synthesized. *Soil. Biol. Biochem.* 28(4/5):681-683.

Ng HE, Raj SS, Wong SH, Tey D, Tan HM (2008) Estimativa de crescimento dos fungos utilizando o ensaio de ergosterol: uma ferramenta rápida em avaliar o estado microbiológico dos grãos e rações. *Lett. Appl. Microbiol.* 46(1):113-118.

Nout MJR, Bonants-van Laarhoven TMG, de Jongh P, Koster PG (1987) Ergosterol content of *Rhizopus oligosporus* NRRL 5905 grown in liquid and solid substrates, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26:456-461.

Olsson J, Börjesson T, Lundstedt T, Schnürer J (2002) Detection and quantification of ochratoxin A and deoxynivalenol in barley grains by GC-MS and electronic nose. *Int. J. Food Microbiol.* 72(3):203-214.

Ooijkaas LP, Tramper J, Buitelaar, RM (1998) Biomass estimation of *Coniothyrium minutans* in solid-state fermentation. *Enzyme Microb. Technol.* 22(6):480-486.

Osman HG, Mostafa MA, El-Refai AH (1969) Production of lipid and sterol by *Aspergillus fumigatus*. I. Culture conditions favouring the formation of lipids and sterols. *J. Chem. UAR* 12(2):185.

- Pandey A, Szakacs G, Soccol CR, Rodriguez-Leon JA, Soccol VT (2001) Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresource Technol.* 77(3):203-214.
- Parra R, Magan N (2004) Modelling the effect of temperature and water activity on growth of *Aspergillus niger* strains and applications for food spoilage moulds. *J. Appl. Microbiol.* 97(2):429-438.
- Pasanen A, Yli-Pietila K, Pasanen P, Pentti K, Tarhanen J (1999) Ergosterol content in various fungal species and biocontaminated building materials fungal. *Appl. Environm. Microbiol.* 65(1):138-142.
- Pitt JI, Hocking AD (1997) *Aspergillus* and related teleomorphs, in: Pitt, J.I., Hocking, A.D. (Eds.) *Fungi and Food Spoilage*. Blackie Academic and Professional, London, United Kingdom, pp. 339-416.
- Reeslev M, Kjoller A (1995) Comparison of biomass dry weights and radial growth rates of fungal colonies on media solidified with different gelling compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 61:4236-4239.
- Reeslev M, Miller M, Nielsen KF (2003) Quantifying mold biomass on gypsum board: comparison of ergosterol and beta-N-acetylhexosaminidase as mold biomass parameters. *Appl. Environm. Microbiol.* 69:3996-3998.
- Ruppel E (1949) Some constituents of *Penicillium notatum*. *J. Pharm. Belg. (U.S)* 4:59.

Saxena J, Munimbazi C, Bullerman LB (2001) Relationship of mould count, ergosterol and ochratoxin A production. *Int. J. Food Microbiol.* 71(1): 29-34.

Schwadorf K, Muller HM (1989) Determination of ergosterol in cereals, mixed feed components, and mixed feeds by liquid chromatography. *J. AOAC Int.* 72(3):457-462.

Schnürer J (1993) Comparison of methods for estimating the biomass of three food-borne fungi with different growth patterns. *Appl. Environm. Microbiol.* 59:552-555.

Shah P, Bhavsar K, Soni SK, Khire MJ (2009) Strain improvement and up scaling of phytase production by *Aspergillus niger* NCIM 563 under submerged fermentation conditions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36(3):373-380.

Shapiro BE, Geatl MA (1982) Ergosterol and lanosterol from *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 128:1053.

Soni SK, Khire JM (2007) Production and partial characterization of two types of phytase from *Aspergillus niger* NCIM 563 under submerged fermentation conditions. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23(11):1585-1593.

Spier MR, Fendrich RC, Almeida PC, Nosedá M, Greiner R, Konietzny U, Woiciechowski AL, Soccol VT, Soccol CR (2011) Phytase produced on citric

byproducts: purification and characterization. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27(2):267-274.

Spier MR, Scheidt GN, Portella AC, Rodríguez-León JA.; Woiciechowski AL, Greiner RC (2010) Increase in phytase synthesis during citric pulp fermentation. *Chemical Engineering Communications* 198 (2):286-297.

Spier MR, Letti LAJ, Woiciechowski AL, Soccol CR (2009) A simplified model for *A. niger* FS3 growth during phytase formation in solid state fermentation. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 52:151-158.

Taniwaki MH, Pitt JI, Hocking AD, Fleet GH (2006) Comparison of hyphal length, ergosterol, mycelium dry weight, and colony diameter for quantifying growth of fungi from foods. *Adv. Exp. Med. Biol.* 571:49-67.

Torres M, Viladrich R, Sanchis V, Canela R (1992) Influence of age on ergosterol content in mycelium of *Aspergillus ochraceus*. *Lett. Appl. Microbiol.* 15(1):20-22.

Vacheron MJ, Michel G (1968) Composition en sterols et en acides gras de deux souches d'*Aspergillus flavus*, *Phytochemistry* 7:1645-1651.

Weete JD (1973) Sterols of fungi: distribution and biosynthesis, *Phytochemistry* 12:1843-1864.

Vats P, Banerjee UC (2002) Studies on the production of phytase by a newly isolated strain of *Aspergillus niger* var *teigham* obtained from rotten wood-logs. *Process. Biochem.* 38(2):211-217.

Vats P, Banerjee UC (2004) Production studies and catalytic properties of phytases (*myo*-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): An overview. *Enzyme Microb. Technol.* 35(1):3-14.

Vohra A, Satyanarayana (2003) Phytases: Microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 23(1):29-60.

White P, Johnson LA (2003) *Corn: Chemistry and Technology*, 2nd ed. American Association of Cereal Chemists, USA.

Zhang GQ, Dong XF, Wang ZH, Zhang Q, Wang HX, Tong JM (2010) Purification, characterization, and cloning of a novel phytase with low pH optimum and strong proteolysis resistance from *Aspergillus ficuum* NTG-23. *Bioresource Technol.* 101(11):4125-4131.

Zheng WF, Liu T, Xiang XY, Gu (2007) Sterol composition in field-grown and culture mycelia of *Inonotus obliquus*. *Acta Pharm. Sin.* 42(7):750-756.

7.0 FIGURE CAPTION

Fig. 1. Response surfaces representing the phytase activity (a) and ergosterol content (b) variations according to the pH and temperature used during the fermentation with *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924

Fig. 2. Values predicted by the second order model as a function of the values observed for the response phytase activity (U/mL) during the fermentation with *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924

Fig. 3. Correlation between the responses phytase activity and ergosterol content obtained according to the 2^2 central composite design. Values were correlated through a second order polynomial

Fig.4. Correlation between dry weight (g) and ergosterol content (ppm) in submerged fermentation with *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 using phytic acid 1% (w/v), glucose 4 % (w/v), sucrose 4% (w/v), starch 4% (w/v), and corn steep liquor 2% (v/v) as substrate.

Fig. 5. Phytase production (U /mL) after 120 h of submerged fermentation with *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 using different substrates: phytic acid 1% (w/v), glucose 4 % (w/v), sucrose 4% (w/v), starch 4% (w/v), and corn steep liquor 2% (v/v).

Table 1. Phytase activity and biomass (estimated by the ergosterol content) obtained by submerged fermentation with *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 under different conditions of pH and temperature, according to a 2² central composite design. All the experimental assays were carried out in triplicate and results are presented as mean values ± standard errors.

Assays	Process variables - real and (coded) values		Responses	
	pH	Temperature (°C)	Phytase activity (U/mL)	Biomass (ergosterol content) (ppm)
1	4.0 (-1)	25 (-1)	3.03 ± 0.003	49.25 ± 2.16
2	8.0 (+1)	25 (-1)	1.97 ± 0.000	17.93 ± 1.10
3	4.0 (-1)	35 (+1)	5.69 ± 0.000	134.41 ± 4.80
4	8.0 (+1)	35 (+1)	1.04 ± 0.003	9.30 ± 0.43
5	6.0 (0)	30 (0)	4.82 ± 0.003	80.69 ± 3.19
6	4.0 (-1)	30 (0)	8.09 ± 0.000	354.09 ± 1.96
7	8.0 (+1)	30 (0)	1.97 ± 0.000	16.52 ± 0.80
8	6.0 (0)	25 (-1)	4.83 ± 0.003	79.10 ± 3.61
9	6.0 (0)	35 (+1)	4.16 ± 0.003	54.87 ± 0.37

Table 2. Effect estimates (EE), standard errors (SE) and level of significance (p) of the variables pH (x_1) and temperature (x_2), on the responses phytase activity and biomass (estimated by the ergosterol content) obtained by submerged fermentation with *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924, according to a 2^2 central composite design.

Factors ^a	Phytase activity			Biomass (ergosterol content)		
	EE	SE	p	EE	SE	p
x_1 (L)	-3.94	± 0.43	0.00***	-164.67	± 30.92	0.00***
x_1 (Q)	-1.94	± 0.74	0.02**	50.73	± 53.56	0.35
x_2 (L)	0.36	± 0.43	0.41	17.43	± 30.92	0.58
x_2 (Q)	-3.01	± 0.74	0.00***	-185.92	± 53.56	0.00***
x_1x_2	-1.79	± 0.52	0.00***	-46.89	± 37.87	0.23

^a(L) linear and (Q) quadratic levels.

*** significant at 99% confidence level; ** significant at 95% confidence level.

Figure 1.

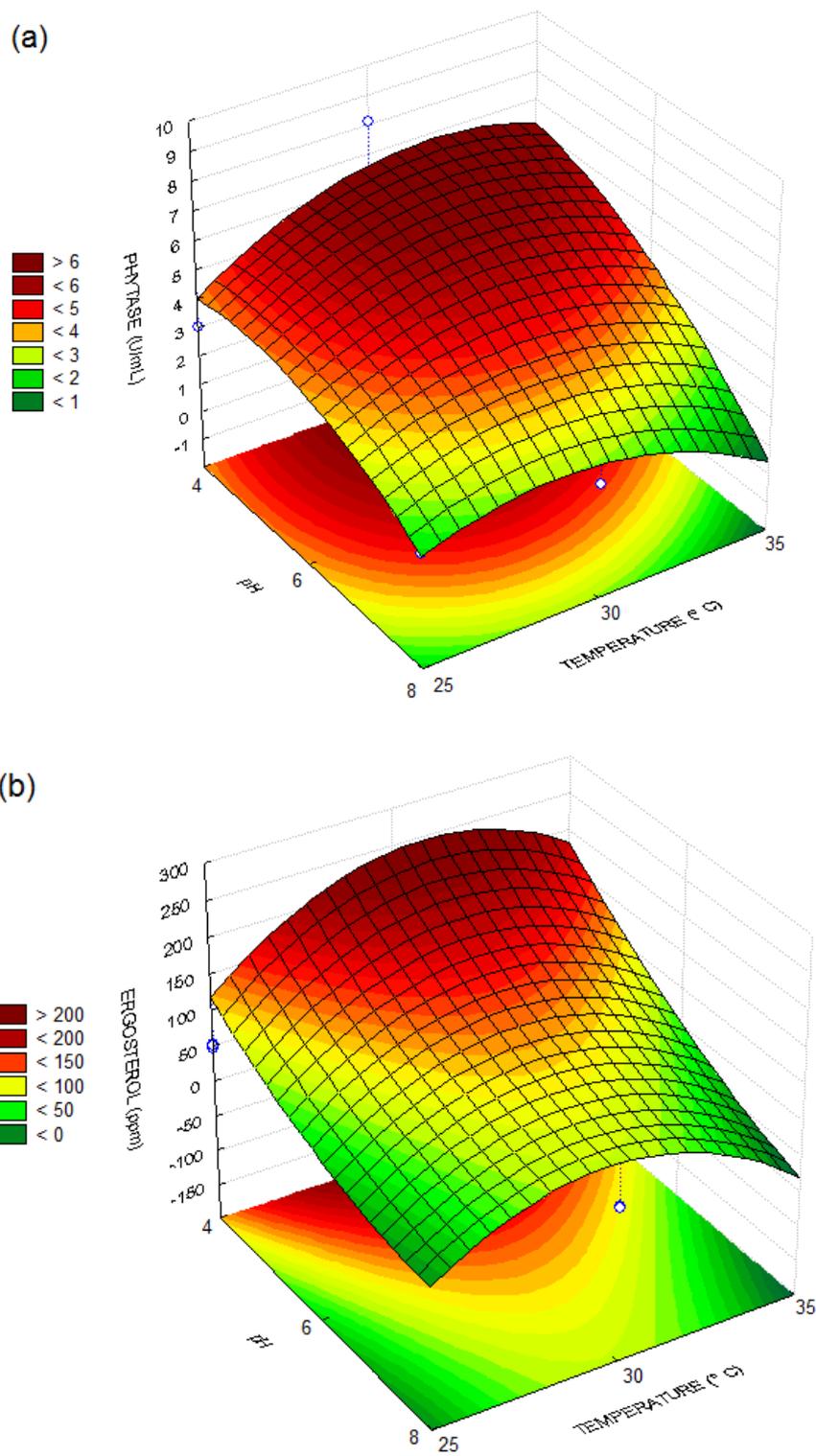


Figure 2.

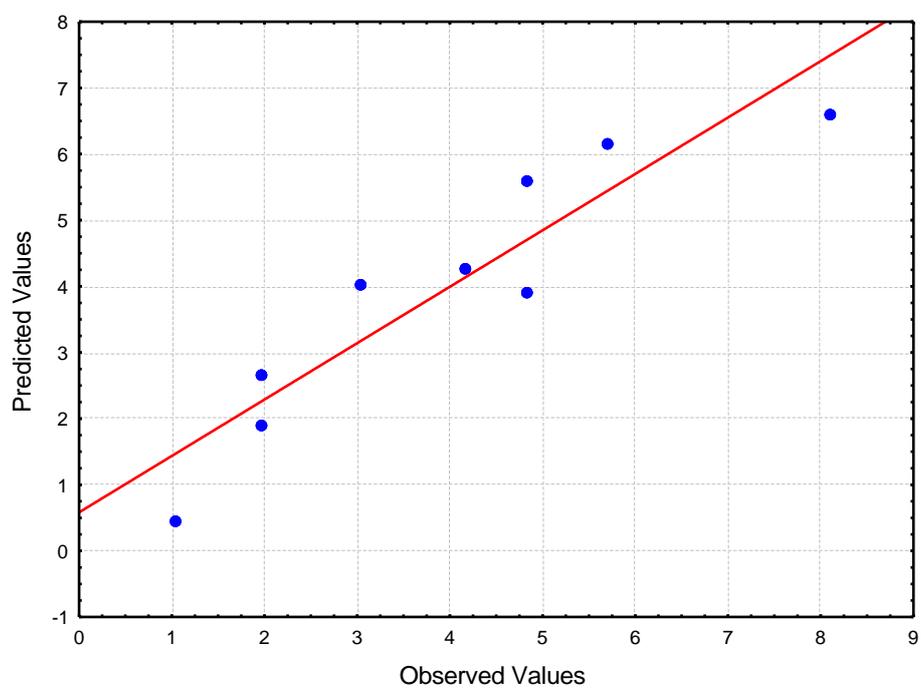


Figure 3.

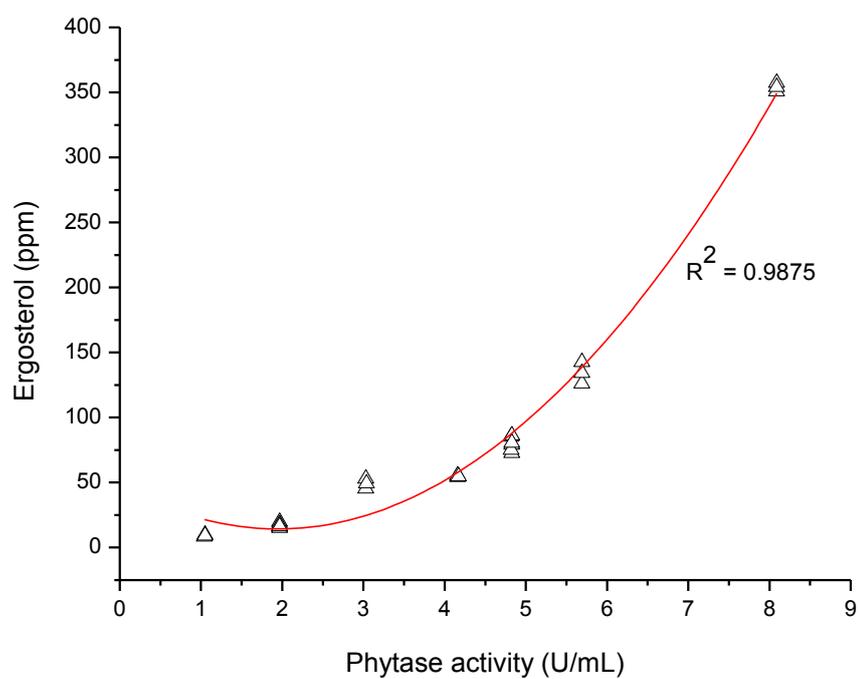


Figure 4.

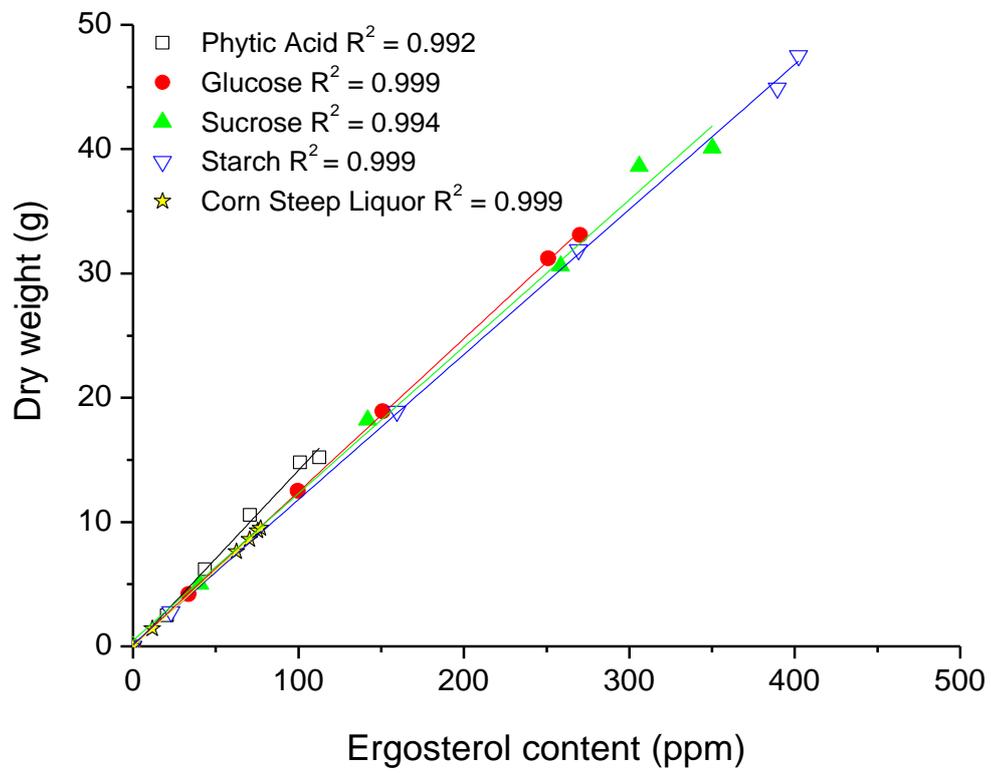
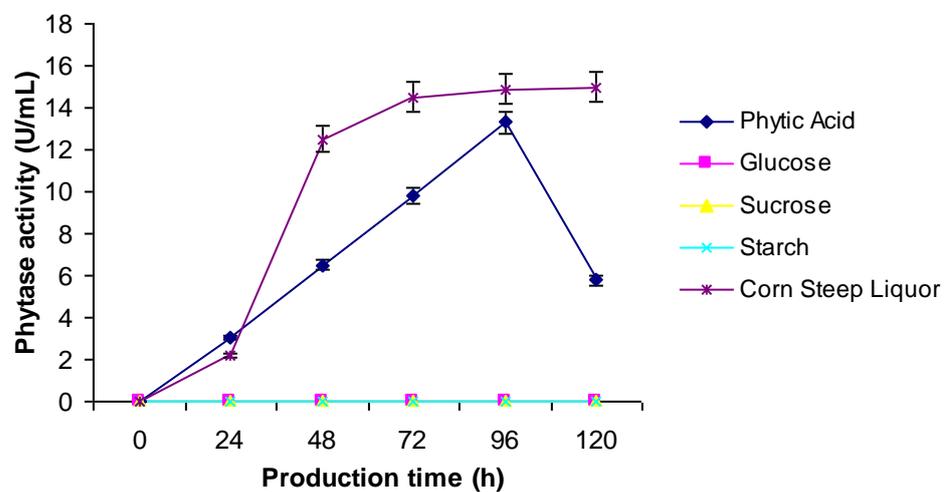


Figure 5.



CAPÍTULO II

Processo de Produção e Extração Integrado de Fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 utilizando Fermentação Extrativa por Sistemas de Duas Fases Aquosas PEG/citrato



Artigo a ser submetido à revista Biochemical and Engineering Journal

Fator de Impacto: 2,3

Processo de Produção e Extração Integrado de Fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 utilizando Fermentação Extrativa por Sistemas de Duas Fases Aquosas PEG/citrato

Júlio C.S. Nascimento ^a, Fabiana A.S.D. Souza ^a, Solange I. Mussatto ^b, Raquel Pedrosa Bezerra ^a, Rúben A. Gomes de Oliveira ^c, João Carlos Ramos Nunes Marcos ^c, José A. Couto Teixeira ^b, Ana Lúcia F. Porto ^{a*}

~

^a Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife, PE, Brazil

^b Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus Gualtar, 4710-057, Braga, Portugal

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

* Autor correspondente. Tel.: +55 81 3320 6345

E-mail: analuporto@yahoo.com.br (Ana Lúcia Figueiredo Porto).

Resumo

Existem diversos métodos tradicionais que são utilizados para purificar biomoléculas produzidas por fermentação convencional. Um método alternativo é o sistema de duas fases aquosas, o qual foi desenvolvido baseado no uso de dois polímeros ou polímero-sal para a purificação de vários produtos biotecnológicos. A fermentação extrativa trata-se de um sistema de duas fases aquosas que integra o cultivo microbiológico à produção e recuperação do bioproduto. Fitases são fosfatases específicas que estão envolvidas na degradação catalítica do ácido fítico. 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. O objetivo deste trabalho foi estudar a produção e extração da fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 por fermentação extrativa utilizando SDFA PEG/citrato. Realizou-se um planejamento fatorial completo 2^5 para a produção e extração da fitase em sistemas de duas fases aquosas, estudando as seguintes variáveis: Massa molar do PEG (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). Neste trabalho conseguiu-se uma recuperação em atividade de 150,38% utilizando M_{PEG} (8000 g/mol), C_{PEG} (20,0% m/m), C_{CIT} (20,0% m/m), pH (6,0) e agitação (100 rpm). A técnica de fermentação extrativa utilizando SDFA 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.

Palavras-chaves: Fitase; Sistemas de duas fases aquosas; Fermentação extrativa; *Aspergillus niger*

Abstract

There are many traditional methods that are used to purify biomolecules produced by conventional fermentation. An alternative method is the aqueous two-phase system (ATPS) which was developed based on the use of two polymers or salt with polymer for the purification of many biotechnological products. Extractive fermentation is a systems aqueous two-phase integrating microbiological culture with production and recovery of byproduct *in situ* simultaneously and is used to increase the yield of processes. Phytases are specific phosphatases that are involved on catalytic degradation of phytic acid. The poultry and pigs have low endogenous phytase activity, however microbial phytases have been added to the diet of poultry and pigs to improve phosphorus utilization in this phytic ingredients of plant origin. The aim of this paper was study production and extraction of phytase produced by *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 by extractive using ATPS PEG/citrate using a full factorial design 2^5 by studying variables: PEG molar mass (400, 3350, 8000 g/mol), PEG concentration (20, 23, 26.0% w/w) citrate concentration (12, 16, 20.0% w/w) , pH (6 , 7, 8.0) and agitation (100, 150, 200 rpm). This study has been achieved to recover in 150.38 % activity using M_{PEG} (8000 g/mol), C_{PEG} (20.0% w/w) , C_{CIT} (20.0% w/w) , pH (6,0) and agitation (100 rpm). The extractive fermentation technique using ATPS PEG/citrate proved to be promising for the extraction and purification of phytase produced by *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 and may be applied on the composition of poultry and pig feed.

Keywords: Phytase; Aqueous two-phase systems; Extractive fermentation; *Aspergillus niger*

1.0 Introdução

Existem diversos métodos tradicionais que são utilizados para purificar biomoléculas produzidas por fermentação convencional. Estes métodos são constituídos de muitas etapas, tais como diálise, cromatografia de troca iônica e de afinidade, entre outros (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 (polietileno glicol e dextrana) ou plímero sal para a purificação de vários produtos biotecnológicos (Sousa et al., 2009).

A fermentação extrativa trata-se de um sistema de duas fases aquosas que integra o cultivo microbiológico à produção e recuperação do bioproducto *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 bioproducto e a pequena produtividade volumétrica que geralmente está associado aos processos biotecnológicos (Marques et al., 2009).

Fitases ou *mio*-inositol-hexafosfato fosfohidrolases 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 conseqüentemente 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 P inorgânico, melhora o aproveitamento de outros nutrientes da dieta pela redução da capacidade complexante do fitato e diminui o impacto ambiental (Bedford & Partridge, 2010).

O objetivo deste trabalho foi estudar a produção e extração da fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 por fermentação extrativa utilizando SDFA PEG/citrato.

2.0 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). A cultura foi cultivada e mantida em placas de Petri contendo meio PDA (Batata Dextose Ágar) a 4°C. Placas com cultura crescida durante 8 dias em estufa microbiológica (30° C) foram usadas para a preparação do inóculo. A solução conidial foi obtida pela aspersão de solução estéril Tween 80 (0.1%) e posterior agitação mecânica em tubos de ensaios contendo a cultura microbiana. A concentração final de esporos foi ajustada para 10⁶ esporos/mL.

2.2 Meio de Cultura para 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 SdFA (PEG/citrato) em Fermentação Extrativa

Foi realizado um planejamento fatorial completo 2⁵ para a produção e extração da fitase em sistemas de duas fases aquosas, estudando as seguintes variáveis: Massa molar do PEG (M_{PEG} , 400, 3350 e 8000 g/mol), Concentração do PEG (C_{PEG} , 20, 23 e 26,0% m/m), Concentração de citrato (C_{CIT} , 12, 16 e 20,0% m/m), pH (6, 7 e 8,0) e agitação (100, 150, 200 rpm). 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 10⁶ esporos/mL.

Após a pesagem das soluções que formam os sistemas, agitou-se em vórtex por 1 minuto e foram autoclavados a 121°C por 20 minutos. 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 Planejamento Estatístico Fatorial Completo para a Extração e Purificação de Fitase por Fermentação Extrativa

Foram estudadas a influência das variáveis : Massa molar do PEG (M_{PEG} , 400, 3350 e 8000 g/mol), Concentração do PEG (C_{PEG} , 20, 23 e 26,0% m/m), Concentração de citrato (C_{CIT} , 12, 16 e 20,0% m/m), pH (6, 7 e 8,0) e agitação (100, 150, 200 rpm), sobre as variáveis-respostas selecionadas: Coeficiente de partição (K) e Recuperação em Atividade (Y), foram avaliados de acordo com o planejamento estatístico fatorial completo 2^5 , composto por 32 ensaios e 4 pontos centrais (Tabela 01). Todos os experimentos foram realizados em triplicata para permitir o cálculo do erro experimental.

As significâncias dos efeitos foram analisadas por análise de variância (ANOVA). Com nível de significância de 95 % para realizar as estimativas dos efeitos principais lineares e de segunda ordem, em valor absoluto, dos fatores em relação às variáveis-respostas. A análise estatística do planejamento experimental, incluindo os diagramas apresentados foram realizados utilizando o software Statistica versão 8.0 (Statsoft Inc, Tulsa, OK,USA).

Tabela 01. Níveis e variáveis utilizadas em planejamento estatístico fatorial completo 2^5 para produção e extração integrada de fitase por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924

Variáveis	Níveis		
	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
M_{PEG} (g/mol)	400	3350	8000
C_{PEG} (%m/m)	20,0	23,0	26,0
C_{CIT} (%m/m)	12,0	16,0	20,0
pH	6,0	7,0	8,0
Agitação (rpm)	100	150	200

2.5 Metodologia de análise dos resultados da fermentação extrativa

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

$$K = \frac{AS}{Ai}$$

A razão dos volumes é a relação entre os volumes apresentados pela fase PEG (superior) e a fase sal (fase inferior):

$$Vr = \frac{Vs}{Vi}$$

A recuperação em atividade (Y) em fermentação extrativa foi calculada utilizando a fórmula proposta por Chouyyok e colaboradores (2005):

$$Y = \frac{100}{1 + \left(\frac{1}{K} * \frac{1}{Vr}\right)}$$

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 as respostas coeficiente de partição e recuperação foram analisados.

2.6 Determinação da concentração protéica

O reagente de Bradford foi preparado pela mistura de 100 mg de Coomassie Blue G-250 em 50 mL de etanol a 95% sob agitação constante, sendo após acrescido 100 mL de ácido ortofosfórico a 85%. Esta solução foi armazenada em vidro âmbar a temperatura ambiente ($26^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$). A solução de uso foi feita com 10 mL de solução estoque e o seu volume final de 100 mL com água deionizada. Esta solução foi filtrada duas vezes em filtro qualitativo. O ensaio foi realizado com 50 μ L da amostra em 2,5 mL de reativo, a solução foi homogeneizada e lida em espectrofotômetro a 595 nm após 2 minutos de descanso, de acordo com Bradford (1976). Os ensaios foram realizados em triplicata. A curva de calibração foi realizada entre as concentrações de 0 a 1000 $\mu\text{g/mL}$, utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

2.7 Determinação da atividade fitásica

A atividade fitásica foi determinada pela utilização do método do molibdato de amônio modificado, de acordo com Heinonen and Lathi, 1981. Tampão acetato de sódio (350 μL at 0.2 M, pH 4.8) diluído em fitato de sódio (875 nmol), utilizado como substrato. Após uma pré-incubação a 37 °C por 10 min, a reação enzimática foi iniciada pela adição de 50 μL do extrato bruto enzimático. A solução foi incubada por 30 min a 37°C. Com o objetivo de estimar a quantidade de fosfato inorgânico liberado em catálise, 1.5 mL de uma solução de acetona: 2.5 M H_2SO_4 : 10 mM molibdato de amônio (2:1:1 v/v/v) previamente preparada, e acrescido de 100 μL de ácido cítrico ao volume final. A absorbância foi medida a 355 nm após 10 min de reação. Uma unidade de foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de fósforo inorgânico por minutos sob as condições padrão de ensaio. A atividade enzimática foi expressa em unidades por mL (U/mL). A curva-padrão foi realizada utilizando solução de fosfato de potássio dibásico de 10 to 600 μM de fosfato por mL. O conteúdo de fosfato inorgânico presente no meio de cultura antes do inóculo do micro-organismo foi determinado com o objetivo de diminuir as interferências que os resíduos de Pi podem causar nas análises de atividade enzimática.

3.0 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 (fase PEG) e inferior (fase SAL). Na tabela a seguir (Tabela 2) estão listados os resultados obtidos em fermentação extrativa,

conforme planejamento fatorial completo 2^5 , para avaliar à influência da massa molar do PEG (M_{PEG} , 400, 3350 e 8000 g/mol), concentração do PEG (C_{PEG} , 20, 23 e 26,0% m/m), concentração de citrato (C_{CIT} , 12, 16 e 20,0% m/m), pH (6, 7 e 8,0) e agitação (100, 150 e 200), a obter como variáveis-resposta o K_{AT} (coeficiente de partição em atividade fitásica), K_{PROT} (coeficiente de partição das proteínas) e Y (recuperação em atividade %).

Tabela 02. Resultados do planejamento estatístico fatorial completo 2^5 para estudar a extração de fitase por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 utilizando fermentação extrativa em SDFA PEG/citrato.

Ensaio	M_{PEG}	C_{PEG}	C_{CIT}	pH	Agitação	K_{AT}	K_{PROT}	Y (%)
1	400	20	12	6	100	*	*	*
2	8000	20	12	6	100	8,30	0,38	109,17
3	400	26	12	6	100	*	*	*
4	8000	26	12	6	100	15,16	0,28	115,84
5	400	20	20	6	100	4,00	0,20	104,76
6	8000	20	20	6	100	25,54	0,32	150,38
7	400	26	20	6	100	5,80	0,26	106,05
8	8000	26	20	6	100	25,77	0,44	126,81
9	400	20	12	8	100	*	*	*
10	8000	20	12	8	100	12,04	0,31	112,87
11	400	26	12	8	100	*	*	*
12	8000	26	12	8	100	13,61	0,50	114,86
13	400	20	20	8	100	17,26	0,33	119,01
14	8000	20	20	8	100	9,21	0,26	110,96
15	400	26	20	8	100	9,41	0,27	109,60
16	8000	26	20	8	100	20,21	0,30	121,17
17	400	20	12	6	200	*	*	*
18	8000	20	12	6	200	14,70	0,23	115,83
19	400	26	12	6	200	*	*	*
20	8000	26	12	6	200	22,15	0,36	122,87
21	400	20	20	6	200	9,30	0,35	110,06
22	8000	20	20	6	200	17,61	0,25	117,81
23	400	26	20	6	200	6,25	0,45	106,51
24	8000	26	20	6	200	14,42	0,43	115,38
25	400	20	12	8	200	*	*	*
26	8000	20	12	8	200	24,37	0,29	125,24
27	400	26	12	8	200	17,23	0,28	118,14
28	8000	26	12	8	200	13,19	0,31	113,84
29	400	20	20	8	200	8,91	0,27	109,69
30	8000	20	20	8	200	17,97	0,26	119,91
31	400	26	20	8	200	7,40	0,46	107,63
32	8000	26	20	8	200	17,92	0,35	118,92
33 (C)	3350	23	16	7	150	24,36	0,39	125,77
34 (C)	3350	23	16	7	150	24,87	0,37	125,29
35 (C)	3350	23	16	7	150	23,03	0,37	123,95
36 (C)	3350	23	16	7	150	22,62	0,39	123,54

Vale destacar que os ensaios 1, 3, 9, 11, 17, 19 e 25 não apresentaram formação de fases aquosas, pois as concentrações críticas mínimas se encontraram abaixo da curva binodal para o sistema PEG/citrato. Este comportamento foi observado por Porto e colaboradores (2007).

O melhor resultado para extração e purificação integrada da fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 encontra-se no ensaio 6, o qual possui como composição: M_{PEG} (8000 g/mol), C_{PEG} (20,0% m/m), C_{CIT} (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 ($K_{\text{AT}} > 1$). 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 25,54 (ensaio 6).

Os resultados encontrados neste trabalho são semelhantes aos reportados por Ooi e colaboradores (2011), que utilizaram SDFA 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 (K_{AT}) de acordo com a concentração de citrato (C_{CIT}) e massa molar do PEG (M_{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 ($K_{AT} > 1,0$).

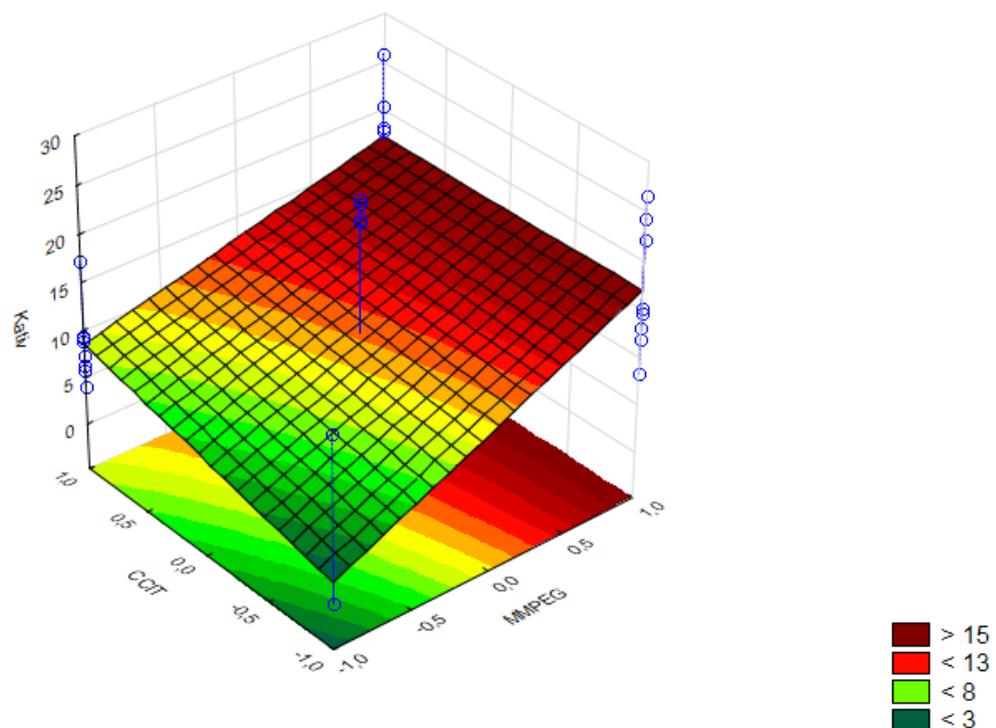


Figura 01. Gráfico de projeção de superfície representando o coeficiente de partição em atividade (K_{AT}) de acordo com a concentração de citrato (C_{CIT}) e massa molar do PEG (M_{PEG}) usados em fermentação extrativa da fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924.

Oliveira e colaboradores (2003), que estudaram a partição da hexoquinase em SDFA com sistemas PEG/citrato, verificaram que e altas concentrações de citrato (20%) promoveram altos valores de coeficiente de partição da hexoquinase produzida por *S. cerevisiae*. Estes resultados são semelhantes aos encontrados neste trabalho, o qual obteve-se um coeficiente de partição em atividade de aproximadamente 25,54. 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.

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).

Na Figura 02 apresenta o gráfico de Pareto que representa os efeitos estimados das variáveis e das interações no coeficiente de partição em atividade em ordem decrescente de magnitude, sendo que o comprimento de cada barra horizontal é proporcional ao efeito das variáveis e as possíveis interações entre elas. A linha vertical é utilizada para prever quais os efeitos são estatisticamente significantes ($p=0,05$). No entanto, as barras que ultrapassam a linha vertical sinalizam os efeitos estatisticamente significantes com um nível de confiança de 95%.

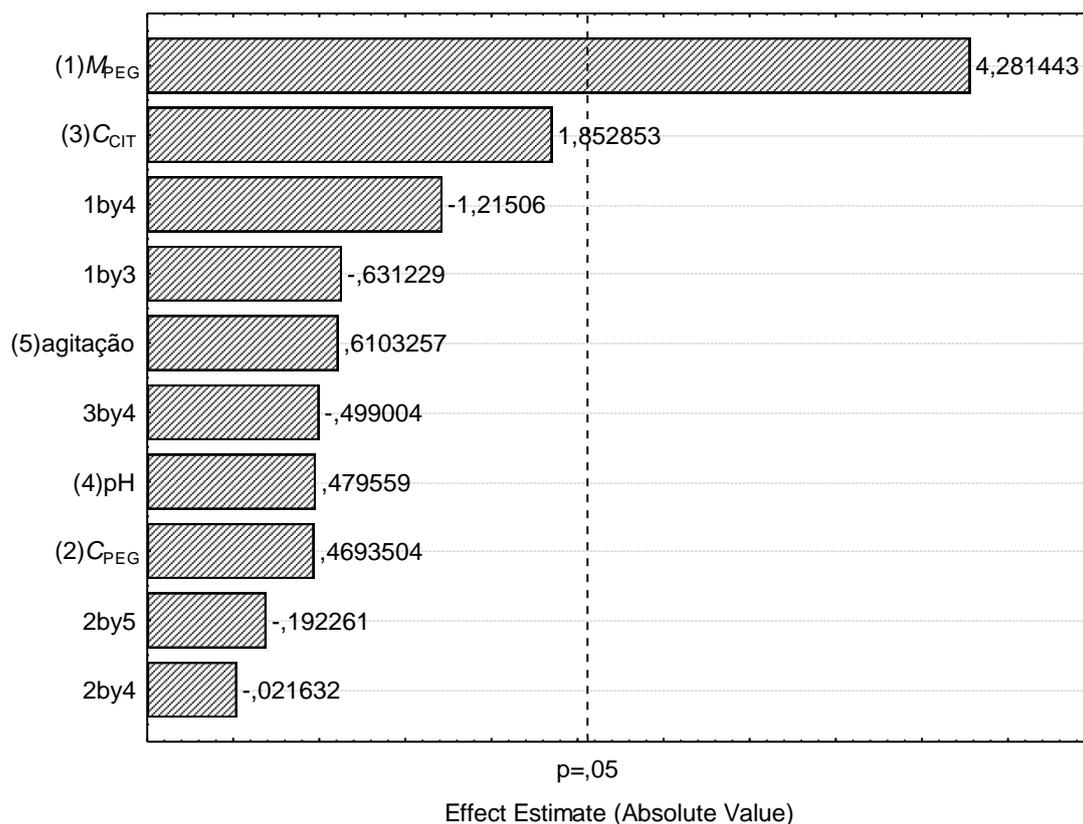


Figura 02. Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta o coeficiente de partição em atividade (K_{ATIV}) produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4914 na fase superior do sistema de duas fases aquosas PEG/citrato. Utilizou-se 5 (cinco) variáveis em dois níveis. Os significados dos símbolos na ordenada da figura são: (1) M_{PEG} - massa molar do PEG, (2) C_{PEG} - concentração do PEG, (3) C_{CIT} - concentração de citrato, (4) pH - valor de pH, (5) Agitação.

A única variável que influenciou o K_{ATIV} foi a massa molar do PEG, apresentando um efeito positivo sobre esta variável, pois ao aumentar a massa molar do PEG de 400 g/mol para 8.000 g/mol, o coeficiente de partição da fitase aumenta de 5,80 para 25,77. Todas as outras variáveis, C_{PEG} - concentração do PEG, (3) C_{CIT} - concentração de citrato, (4) pH - valor de pH, (5) Agitação, e as interações entre estas

não se mostraram importantes para a partição da fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 usando SDFa PEG/citrato.

Alves e colaboradores (2000) obtiveram resultados semelhantes a este trabalho, os quais obtiveram valores de coeficiente de partição de 22,4 em média para a insulina em sistemas PEG/citrato, entretanto foi observado um aumento do coeficiente de partição (K_{ATIV}) com a elevação da massa molar do PEG, tal fato como encontrado no presente estudo.

A M_{PEG} apresentou efeito significativo e positivo para o coeficiente de partição (K_{ATIV}), 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. Contudo, com um aumento da massa molar (8000 g/mol), geralmente ocorre uma diminuição do K_{ATIV} 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 PEG aumentar a área de contato entre a biomolécula e os componentes do sistema bifásico, de acordo com as características da molécula e com o tipo de interação, entretanto 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).

A Figura 04 apresenta o gráfico de Pareto onde estão representados os resultados dos efeitos das variáveis e as interações entre elas para o coeficiente de partição da proteína em fermentação extrativa utilizando SDFA PEG/citrato.

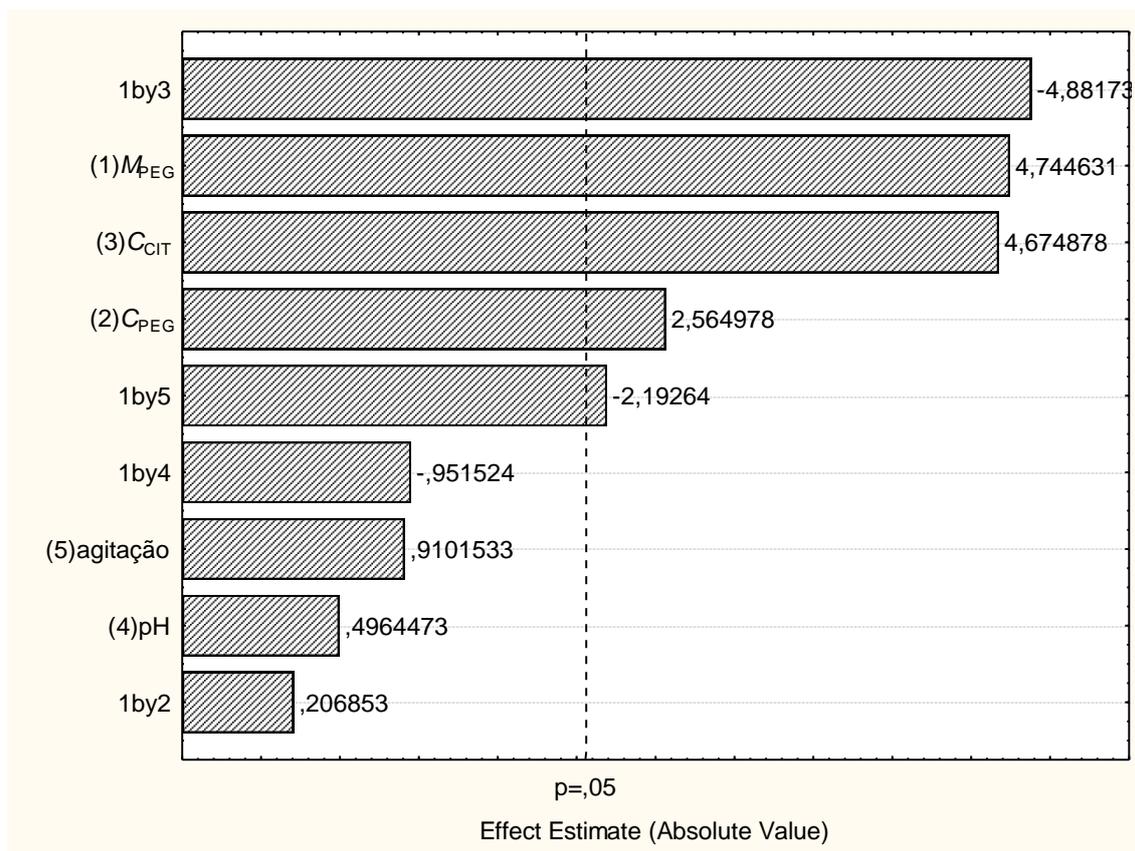


Figura 03. Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta o coeficiente de partição da proteína (K_{PROT}) produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4914 na fase superior do sistema de duas fases aquosas PEG/citrato. Utilizou-se 5 (cinco) variáveis em dois níveis. Os significados dos símbolos na ordenada da figura são: (1) M_{PEG} - massa molar do PEG, (2) C_{PEG} - concentração do PEG, (3) C_{CIT} - concentração de citrato, (4) pH - valor de pH, (5) Agitação.

As variáveis (1) massa molar do PEG, (3) C_{CIT} - concentração de citrato foram apresentaram efeitos significativos e positivos, pois como o aumento da massa molar do PEG e concentração de citrato observou-se que as proteínas do sistema apresentaram uma tendência a particionar para a fase salina do sistema. Os resultados dos coeficientes de partição da proteína no planejamento 2^5 , variaram de 0,20 a 0,50, mostrando que em todos os sistemas estudados as proteínas produzidas durante a fermentação extrativa

migram preferencialmente para a fase salina do sistema, rica em citrato de sódio. Este comportamento é desejável pois a fitase em estudo demonstrou ter afinidade à particionar para a fase PEG, possibilitando uma separação entre a fitase extraída e as proteínas contaminantes produzidas e secretadas no meio de cultivo durante a fermentação extrativa.

Bhavsar & Khire (2012) realizaram uma comparação entre o processo cromatográfico e extração de duas fases aquosas para simultânea partição e purificação da fitase extracelular produzida por *Aspergillus niger*. Com relação a extração desta fitase, os referidos autores obtiveram $K_{\text{PROT}} = 0,96$ e $Y = 96,0\%$, utilizando sistemas com PEG 8.000 e citrato de sódio a 20,0%. Estes resultados corroboram com o presente trabalho.

Naganagouda e Mulimani (2008) utilizaram sistemas de duas fases aquosas para extrair α -galactosidase produzida por *Aspergillus oryzae*. O sistema ótimo foi encontrado em pH 5,0, formado por MPEG de 4000 (g/mol), $C_{\text{PEG}} 12\%$, $C_{\text{FOSF}} 11,9\%$ com coeficiente de partição de 0,156 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% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e pH 7,2.

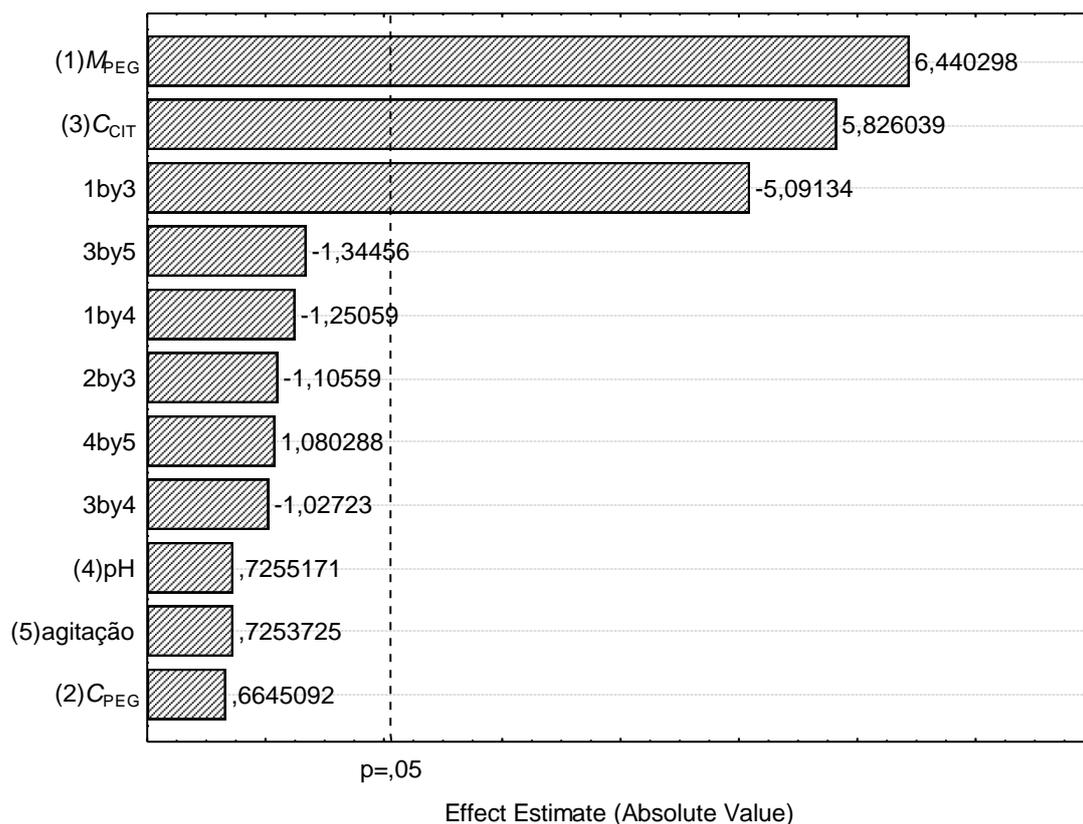


Figura 04. Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável-resposta a recuperação da fitase (Y) produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4914 na fase superior do sistema de duas fases aquosas PEG/citrato. Utilizou-se 5 (cinco) variáveis em dois níveis. Os significados dos símbolos na ordenada da figura são: (1) M_{PEG} - massa molar do PEG, (2) C_{PEG} - concentração do PEG, (3) C_{CIT} - concentração de citrato, (4) pH - valor de pH, (5) Agitação.

No gráfico de Pareto (Figura 4), observa-se que algumas variáveis e as interações entre elas apresentam efeito estatisticamente significativo para a recuperação em atividade (Y), 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 estudada. 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). Analisou-se os resultados de cada resposta separadamente, mas os efeitos das variáveis estudadas foram analisados em conjunto, inclusive as interações entre elas.

As variáveis que mais influenciaram a recuperação da fitase em estudo foi a massa molar do PEG (M_{PEG}) concentração de citrato (C_{CIT}), ambas com efeito positivos, ou seja, quanto maior a M_{PEG} e C_{CIT} , maiores são os valores de recuperação da fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4914 na fase rica em PEG. O maior valor de recuperação da fitase (150,38%) se encontrou no sistema 6, o qual foi composto por: M_{PEG} (8000 g/mol), C_{PEG} (20,0% m/m), C_{CIT} (20,0% m/m), pH (6,0) e agitação (100 rpm).

Na análise dos efeitos das variáveis verifica-se que há maiores efeitos significativos na interação entre a massa molar do PEG (1) e a concentração de citrato (3), apresentando efeito negativo para a recuperação (Figura 4). Isto significa que o aumento da concentração de citrato com concomitante diminuição da massa molar do PEG favorece o aumento da fitase na fase polimérica do sistema.

Combinando a M_{PEG} de 8000 (g/mol) juntamente com a concentração de citrato de 20% (m/m) obteve-se o maior valor de recuperação em atividade (150,38%). Valores de recuperação acima de 100% são frequentemente reportados para extração enzimática usando fermentação extrativa por sistemas de duas fases aquosas. 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).

4.0 Conclusão

Neste trabalho conseguiu-se uma recuperação em atividade de 150,38% utilizando M_{PEG} (8000 g/mol), C_{PEG} , (20,0% m/m), C_{CIT} (20,0% m/m), pH (6,0) e agitação (100 rpm). A técnica de fermentação extrativa utilizando SDFa 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 Agradecimentos

Os autores agradecem a FACEPE, CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro e ao Centro de Apoio à Pesquisa (CENAPESQ/UFRPE), Laboratório de Fermentações e Laboratório de Química Biológica (UMINHO, Braga, Portugal) pela infra-estrutura para a realização deste trabalho.

6.0 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.

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.

BHAVSAR, K., RAVI KUMAR, V., KHIRE, J. Downstream Processing of Extracellular Phytase from *Aspergillus niger*: Chromatography Process Vs. Aqueous Two Phase Extraction for its Simultaneous Partitioning and Purification. **Process Biochem** 47: 1066-1072, 2012.

BEDFORD, M.R.; PARTRIDGE, G.G. Enzymes in farm animal nutrition. Oxfordshire: **CABI Publishing**, 2010. 319p. DOI: 10.1079/9781845936747.0000.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Bioch.** 1976;72:248-254.

CHOUYYOK, W., WONGMONGKO, N.L. , SIWARUNGSON, N., PRICHANONT, S. Extraction of alkaline protease using an aqueous two-phase system from cell free *Bacillus subtilis* TISTR 25 fermentation broth. **Process Biochemistry**, v. 40 (11), p. 3514-3518, 2005.

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.

HEINONEN, J.K., LATHI, R.J. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. **Anal. Biochem.** 113(2):313-317, 1981.

KARIMI, A.; BEDFORD, M.R.; SADEGHI, G.H.; GHOBADI, Z. 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, 2011. DOI: 10.1590/S1516-635X2011000100007.

LUECHAU, 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.

MARQUES, D.A.V., TORRES, B.R., PORTO, A.L.F., PESSOA-JÚNIOR, A., CONVERTI, A. Comparison of oxygen mass transfer coefficient in simple and

extractive fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 47, 1-3, p. 122-126, 2009.

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 and overview and update of main techniques. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.83, p.143-157, 2008.

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* α -galactosidase. **Process Biochemistry** (43):1293-1299, 2008.

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. Redução de fósforo em dietas para frangos com base em valores de equivalência da fitase. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, 49, n.1, p.71-77, 2014. DOI: 10.1590/S0100-204X2014000100010.

OLIVEIRA, G. G. G.; SILVA, D. P.; ROBERTO, I. C.; VITOLO, M.; PESSOA-JUNIOR, A. Partition behavior and partial purification of hexoquinase in aqueous two-phase polyethyleneglicol/citrate systems. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.105-108, p. 787-797, 2003.

OOI, C.W., HII, S.L., KAMAL, M.M., ARIFF, A., LING, T.C. 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, 2011.

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.

SOUSA, R.C.S., COIMBRA, J.S.R., SILVA, L.H.M., SILVA, M.C.H., ROJAS, E.E.G., VICENTE, A.A. Thermodynamic studies of partitioning behavior of lysozyme and conalbumin in aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography B**, Vol. 877: (24), p. 2579-2584, 2009.

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.

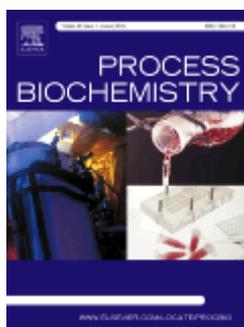
TUBIO, G., NERLI, B., PICO, G. Relationship between the protein surface hydrophobicity and its partitioning behaviour in aqueous two-phase systems of polyethyleneglycol–dextran. **Journal of Chromatography B**, 799 (2):293-301, 2004.

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.

ZAFARANI-MOATTAR, M,T., HAMZEHZADEH, S. 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, 2011. DOI: 10.1002/btpr.613.

CAPÍTULO III

Caracterização Bioquímica Parcial da Fitase Produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 pré-purificada e pós-purificada por Sistemas de Duas Fases Aquosas PEG/citrato



Artigo a ser submetido à revista Process Biochemistry

Fator de Impacto: 2,52

Caracterização Bioquímica Parcial da Fitase Produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 pré-purificada e pós-purificada por Sistemas de Duas Fases Aquosas PEG/citrato

Júlio C.S. Nascimento ^a, Fabiana A.S.D. Souza ^a, Tatiana Souza Porto ^c, João Carlos Ramos Nunes Marcos ^d, José A. Couto Teixeira ^b, Ana Lúcia F. Porto ^{*a}

^a Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife, PE, Brasil

^b Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus Gualtar, 4710-057, Braga, Portugal.

^c Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Bom Pastor, s/n, Boa Vista, CEP 55292-270, Garanhuns, Pernambuco, Brasil.

^d Escola de Ciência, Universidade do Minho, Campus Gualtar, 4710-057, Braga, Portugal

* Autor correspondência. Tel.: +55 81 3320 6345

E-mail: analuporto@yahoo.com.br (Ana Lúcia Figueiredo Porto).

Resumo

O ácido fítico é um composto orgânico de ocorrência natural em vegetais, o qual pode ser encontrado em diversos grãos, cereais e seus subprodutos. Fitases são enzimas que são denominadas como fosfomonoesterases e iniciam a desfosforilação gradual do fitato, em derivados de inositol e fosfato inorgânico. Após o processo de produção de uma produto biotecnológico, a etapa seguinte é a purificação, que consiste em uma série de processos que separam os contaminantes, resultando na obtenção de um produto de elevado grau de pureza. Dentre estes métodos de purificação está a fermentação extrativa utilizando sistema de duas fases aquosas (SDFA). A fermentação extrativa é um método de produção e extração integrada e tem sido descrito como adequado para o crescimento da célula microbiana devido ao alto teor de água e baixa tensão interfacial. O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização parcial do extrato bruto da fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 antes e após a purificação através de SDFA PEG/citrato. A fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 apresentou temperatura ótima da fitase foi de 60°C e pH ótimo 5,0. Através dos resultados obtidos verifica-se que após o processo de extração e purificação utilizando fermentação extrativa por SDFA PEG/citrato, a termoestabilidade da fitase diminuiu consideravelmente (38,4% da AR em 90°C por 120 minutos para 50,0% da AR em 70°C por 25 minutos). Conclui-se que a fitase pré-purificada produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 é mais adequada para ser adicionada na alimentação de aves e suínos, pois apresentou-se ativa em uma faixa de pH ácido a básico, fato esse, requerido para a manutenção das propriedades catalíticas durante a passagem no trato gastrointestinal dos animais.

Palavras-chave: Fitase, *Aspergillus niger*, Fermentação Extrativa, Caracterização bioquímica, propriedades catalíticas.

Abstract

Phytic acid is a naturally organic compound in plants, which may be found in various grains, seeds, cereals and their by-products. Phytases are enzymes which are named as fosfomonoesterases that catalyze gradual dephosphorylation of phytate to inositol derivatives and inorganic phosphate. After the process of biotechnological production, the next step is purification, which consists of a series of processes that separate contaminants, resulting in obtaining a high purity product. Among these purification methods is extractive fermentation using aqueous two-phase system (ATPS). The extractive fermentation is a method for producing integrated extraction and has been described as suitable for the growth of the microbial cell due to the high water content and low interfacial tension. The objective of this work was the partial characterization of the crude extract of phytase produced by *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 before and after purification by ATPS PEG/citrate. The phytase produced by *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 presented optimum temperature of the enzyme was 60° C and optimum pH 5.0. From the results obtained it can be seen that after the extraction process using extractive fermentation and purification in ATPS PEG/citrate, thermostability of phytase decreased significantly (38.4% residual activity at 90° C for 120 minutes to 50.0 % of residual activity at 70° C for 25 minutes). It concludes that the pre-purified phytase produced by *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 is more suitable to be added to the feed of poultry and swine, as presented is active in a pH range the basic acid , a fact required for the maintenance of the catalytic properties during the passage on gastrointestinal tract of animals.

Keywords: Phytase, *Aspergillus niger*, Extractive Fermentation, Biochemical Characterization, catalytic properties.

1.0 Introdução

O ácido fítico (*mio*-inositol hexafosfato), também denominado como fitato, é um composto orgânico de ocorrência natural em vegetais, o qual pode ser encontrado em diversos grãos, cereais e seus subprodutos, sementes oleoginosas e legumes, perfazendo cerca de 60-70% do fósforo vegetal, sendo desta maneira o estoque de fósforo para os vegetais (Zuo et al., 2010).

Devido a presença de grupamentos ortofosfatos ionizados em sua estrutura molecular, o fitato apresenta a capacidade de ligar-se a proteínas, amido e cátions bivalentes, indisponibilizando nutrientes, e por isto é considerado como um fator nutricional para aves e suínos. Além do que, o fitato não é aproveitado por estes animais pois, não possuem no trato gástrico-intestinal (TGI) a fitase, enzima que cataliza a hidrólise do ácido fítico (Greiner & Konietzny, 2011).

Fitases são enzimas que são denominadas como fosfomonoesterases e iniciam a desfosforilação gradual do fitato, em derivados de inositol e fosfato inorgânico. Podem ser produzidas por plantas, alguns animais e mais largamente por micro-organismos (Shaw et al., 2010). Bactérias, leveduras e fungos tem sido descritos como produtores de fitases intra ou extracelulares, bem como na forma ligada à célula (Rao et al., 2009).

A maioria das fitases de origem microbiana isoladas são ativa dentro da faixa de pH 4,5-6,0. Pode-se classificar as fitases de acordo com o pH ótimo de atividade catalítica, podendo agir em pH em torno de 5,0 (fitases ácidas) ou ainda em torno de 8,0 (fitases alcalinas ou básicas). A estabilidade das fitases enzimas vegetais decresce drasticamente em valores de pH abaixo de 4 ou maiores que 7,5, enquanto que a maioria das fitases de

origem microbiana mantém atividade a valores de pH abaixo de 3,0 e acima de 8,0 (Xin et al., 2013).

Após o processo de produção de uma produto biotecnológico, a etapa seguinte é a purificação, que consiste em uma série de processos que separam os contaminantes, resultando na obtenção de um produto de elevado grau de pureza. As enzimas são purificadas pelo emprego sucessivo de métodos químicos ou físicos. Dentre estes métodos está a fermentação extrativa utilizando sistema de duas fases aquosas (SDFA). A fermentação extrativa é um método de produção e extração integrada e tem sido descrito como adequado para o crescimento da célula microbiana devido ao alto teor de água e baixa tensão interfacial (Pandey e Banik, 2011).

O SDFA é formado por mútua incompatibilidade entre dois polímeros ou um polímero e um sal em solução aquosa. SDFA fornece uma alternativa eficaz para a purificação de bioprodutos através partição entre duas fases líquidas imiscíveis (Pericin et al., 2009). Estes sistemas contém aproximadamente de 80-90% de água e, desta maneira proporcionam um ambiente adquado para o cultivo microbiano. Em fermentação extrativa utilizando SDFA, as células são mobilizadas em uma das fases do sistema e o produto desejado é particionado para a outra fase (Banik et al., 2003).

O objetivo desta trabalho foi realizar a caracterização parcial do extrato bruto da fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 (pré-purificada) e comparar com a fitase pós-purificada através da fermentação extrativa utilizando sistemas de duas fases aquosas PEG/citrato.

2.0 Material e Métodos

2.1 Micro-organismo

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 e o meio de cultura utilizado para esporulação foi o BDA (Batata Dextrose Ágar). 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.

2.2 Produção do extrato bruto enzimático

A produção do extrato bruto enzimático (pré-purificado) foi realizada em erlenmeyers (250 mL) contendo 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, diluídos em tampão acetato 0.2 M pH 4.0. Os meios de culturas foram esterelizados em autoclave a 121°C por 20 minutos. Em seguida, procedeu-se o inóculo com concentração final de esporos em 10⁶ esporos/mL. Os fracos foram incubados em agitador orbital a 30°C, 100 rpm por 96 horas de cultivo.

2.3 Fermentação extrativa utilizando S DFA PEG/citrato

A produção do extrato enzimático pós-prificado foi preparado utilizando Erlenmeyers (250 mL), solução de citrato e solução de PEG e acrescido de meio de cultura descrito no item anterior. A composição do sistema foi a seguinte: massa molar do PEG (M_{PEG} , 8000 g/mol), concentração do PEG (C_{PEG} , 20 m/m), concentração de citrato (C_{CIT} ,

20,0% m/m), pH (6,0) e agitação (100 rpm). Água ultra-pura foi adicionada para um sistema com volume final de 50 mL, e inóculo com concentração de 10^6 esporos/mL. Após a pesagem das soluções que formam os sistemas, agitou-se em vortex por 1 minuto e foram autoclavados a 121°C por 20 minutos. Os sistemas foram incubados em agitador orbital a 30°C . 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 da fase superior (rica em PEG) e as fases foram submetidas às determinações analíticas (Proteínas totais e atividade fitásica) para posterior caracterização bioquímica.

2.4 Determinação quantitativa da atividade fitásica

A atividade fitásica foi determinada pela utilização do método do molibdato de amônio modificado, de acordo com Heinonen and Lathi (1981). Tampão acetato de sódio (350 μL at 0.2 M, pH 4.8) diluído em fitato de sódio (875 nmol), utilizado como substrato. Após uma pré-incubação a 37°C por 10 min, a reação enzimática foi iniciada pela adição de 50 μL do extrato bruto enzimático. A solução foi incubada por 30 min a 37°C . Com o objetivo de estimar a quantidade de fosfato inorgânico liberado em catálise, 1.5 mL de uma solução de acetona: 2.5 M H_2SO_4 : 10 mM molibdato de amônio (2:1:1 v/v/v) previamente preparada, e acrescido de 100 μL de ácido cítrico ao volume final. A absorbância foi medida a 355 nm após 10 min de reação. Uma unidade de foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de fósforo inorgânico por minutos sob as condições padrão de ensaio. A atividade enzimática foi expressa em unidades por mL (U/mL). A curva-padrão foi realizada utilizando solução de fosfato de potássio dibásico de 10 to 600 μM de fosfato/mL. O conteúdo de fosfato

inorgânico presente no meio de cultura antes do inóculo do micro-organismo foi determinado com o objetivo de diminuir as interferências que os resíduos de Pi podem causar nas análises de atividade enzimática.

2.5 Determinação do conteúdo protéico

Com o intuito de determinar o conteúdo protéico foi utilizado o método de Bradford (1976). Realizou-se curva de calibração padrão utilizando BSA (Soroalbumina bovina).

2.6 Determinação do fósforo inorgânico (P_i)

O fósforo inorgânico do extrato enzimático foi determinado utilizando água ultra-pura (350 µL) mais o extrato enzimático (50 µL) acrescido de 2,5 mL solução AAM (Ácido sulfúrico, acetona e molibdato de amônio) 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.

2.7 Determinação da Temperatura Ótima e Estabilidade à Temperatura

Para a determinação da temperatura ótima a atividade quantitativa da fitase foi realizada em diferentes temperaturas, submetendo as amostras da enzima pré purificada e amostras da enzima pós-purificada em SDFa PEG/citrato. As análises variaram de 30°C a 90°C. Para a realização da estabilidade térmica da enzima, incubou-se os extrato enzimáticos pré e pós-purificado 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.

2.8 Determinação do pH ótimo e Estabilidade frente 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 pré e pós-purificado 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.

3.0 Resultados e Discussão

3.1 Temperatura ótima

A atividade da fitase (U/mL) produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 foi avaliada em diferentes faixas de temperaturas (30 - 90°C), ilustrado na Figura 01. Observou-se que a temperatura ótima da fitase foi a mesma (60°C), tanto para a enzima pré-purificada, quanto para o extrato pós-purificado em SDFa PEG/citrato. A atividade enzimática apresentada foi de aproximadamente 10 U/mL para ambos os extratos. Através dos resultados obtidos, percebe-se que o processo de purificação utilizado neste trabalho não alterou a temperatura ótima da enzima em estudo.

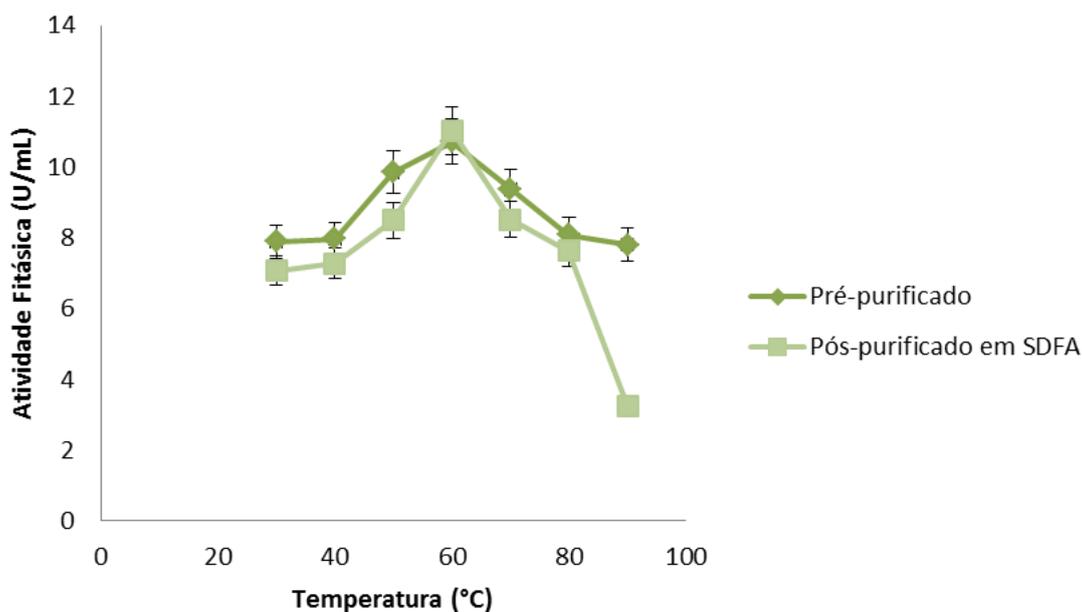


Figura 01. Efeito da temperatura na atividade da fitase pré e pós-purificada produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924.

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 β -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 com temperaturas ótimas próximas a 60°C.

De acordo com Igbasan e colaboradores (2000), a temperatura afeta grandemente a atividade enzimática. A temperatura de atividade ótima para grande parte das enzimas produzidas por fungos e bactérias estão 45 - 60°C. Entretanto, considerando que a temperatura média do corpo de um animal, esteja na faixa de 37 - 39°C, apenas 40 a 60% da atividade enzimática máxima será alcançada dentro do trato gastro-intestinal dos animais.

3.2 Estabilidade à Temperatura

Em nutrição animal, a peletização é uma prática comum, onde as enzimas utilizadas como aditivos são expostas a temperaturas entre 60 - 95 °C por curtos períodos durante o método de processamento. As enzimas que possuem a habilidade de permanecerem ativas depois deste processo de aquecimento são mais desejáveis para a aplicação em rações de aves e suínos (Greiner & Konietzny, 2011).

A Figura 2 apresenta a estabilidade à temperatura da fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 em extrato bruto pré-purificado (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, pode-se considerar a fitase em estudo como sendo termoestável.

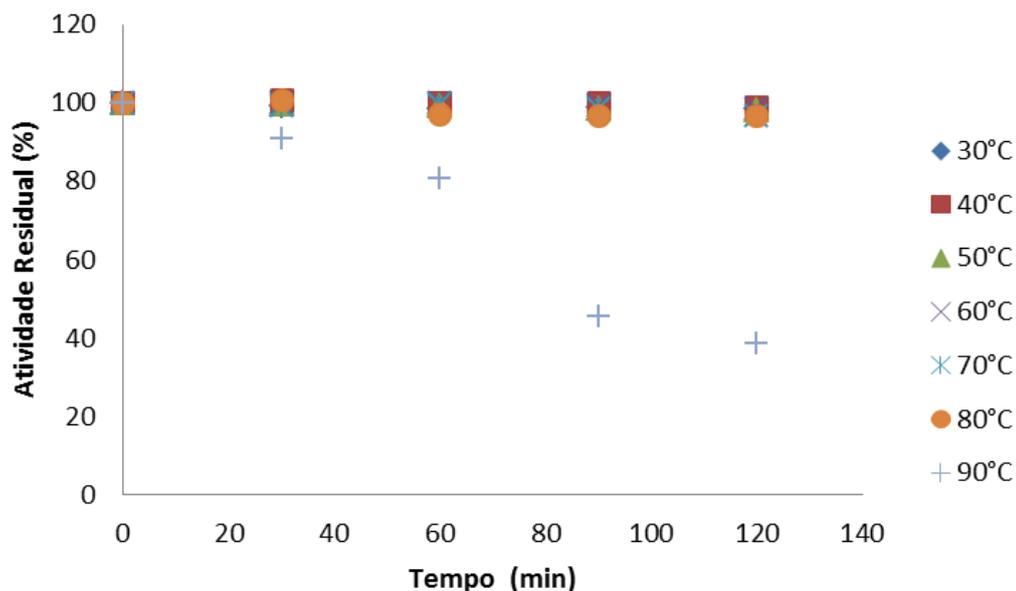


Figura 02. Estabilidade à temperatura da fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 no extrato bruto enzimático (pré-purificada).

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).

De acordo com 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.

Na Figura 03 estão representados os resultados obtidos de estabilidade à temperatura do extrato de fitase pós-purificado em PEG/citrato produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 (30°C-90°C por 120 minutos). Através dos resultados analisados, pode-se afirmar o processo de extração e purificação desta enzima em estudo torna-a menos termoestável, pois a fitase pós-purificada apresentou 50,0% da AR em 70°C por 25 minutos, enquanto que a fitase pré-purificada apresentou uma resistência até 80°C, a qual manteve 38,4 % da atividade residual por 120 minutos.

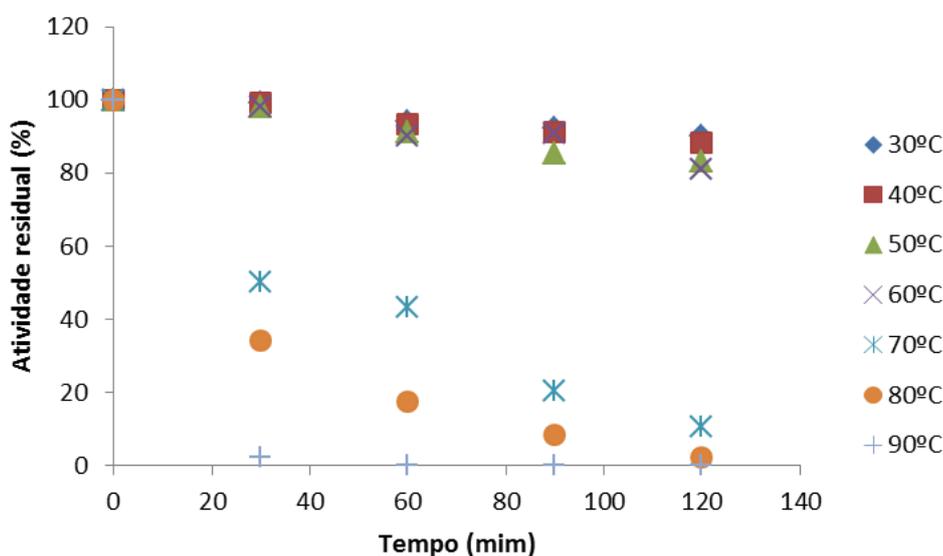


Figura 03. Estabilidade à temperatura da fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 pós-purificada em sistemas de duas fases aquosas PEG/citrato.

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.

Igbasan e colaboradores (2000) determinaram a termoestabilidade das fitases produzidas por *A. niger*, *P. lycii* and *E. coli*. Todas as enzimas testadas mantiveram até 65,0% da atividade residual em temperaturas de processamento a 70° C e se apresentaram estáveis em temperaturas de peletização abaixo de 70 ° C. Estes autores destacaram que após a aquecimento ocorre uma mudança na conformação tridimensional que usualmente conduz a uma desnaturação das fitases utilizadas como aditivos.

Segundo Bedford (2005), no processo de peletização, a ração é submetida às condições diversas de temperatura, umidade e pressão, destaca-se a importância de 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* URM 4924 apresentou 96,67% da atividade residual à 80 °C por 120 minutos.

3.3 pH ótimo

O perfil da atividade da fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 em relação ao pH está apresentado na Figura 4, sendo o pH 5,0 foi o ótimo para a atividade fitásica em extrato pré-purificado e após a extração por fermentação extrativa. Através da análise da Figura 04, pode-se afirmar até o pH 5,0 (pH ótimo da enzima), o perfil de atividade foi semelhante, porém após o pH 5,0 observa-se um comportamento diferente. A enzima contida no extrato enzimático pós-purificado apresentou-se com menor atividade fitásica (U/mL) quando comparada ao extrato enzimático antes do processo de purificação. Mullaney e colaboradores (2000) destacaram que o perfil da atividade depende do pH, e de acordo com pH ótimo para catálise, as fitases são classificadas como fosfatases ácidas, neutras e alcalinas.

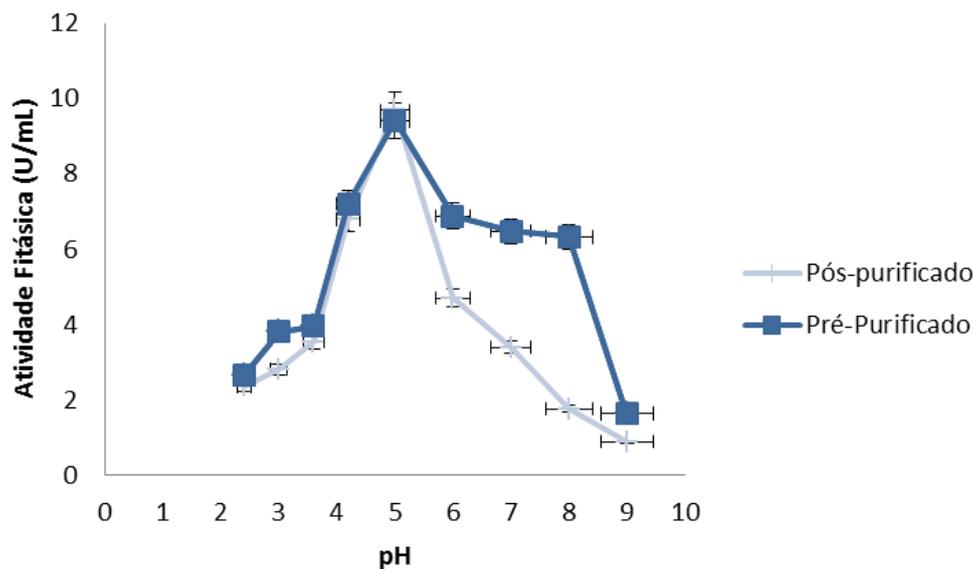


Figura 04. Efeito do pH na atividade da fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 antes e após a purificação em sistema de duas fases aquosas PEG/citrato.

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

Entretanto, In e colaboradores (2009) estudaram 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 diferentes aos obtidos no presente estudo.

Pode-se ressaltar diversos valores de pH's ótimo reportados em literatura para fitases de origens diversas, tais como *E. coli* (pH 4,5) (Greiner et al.,1993), *S. castelli* (pH 4,4) (Segueilha, 1992), *Penicillium simplicissimum* (pH 4,0) (Tseng et al., 2000). In e colaboradores (2009) afirmaram que as fitases que possuem características ácidas são

mais requeridas como aditivos alimentares, as quais podem liberar o fósforo inorgânico contido nos alimentos, e manter um perfil catalítico estável ao serem expostas as secreções ácidas produzidas pela mucosa do trato gastro intestinal de aves e suínos.

3.4 Estabilidade frente ao pH

Ao se estudar a produção e purificação de uma biomolécula deve-se avaliar à sua estabilidade quanto ao pH, pois irá diminuir a possibilidade de desnaturação durante o processo de purificação ou no uso comercial da molécula-alvo. O pH é uma variável que influencia diretamente na estabilidade da molécula e em função disso, realizou-se estudos sobre o efeito de parâmetro bioquímico.

Na figura 05 estão representados os resultados obtidos quanto à estabilidade ao pH da fitase pré-purificada produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924. A fitase permaneceu ativa sem perda de atividade nos diversos 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. De acordo com Boyce e Walsh (2007) 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.

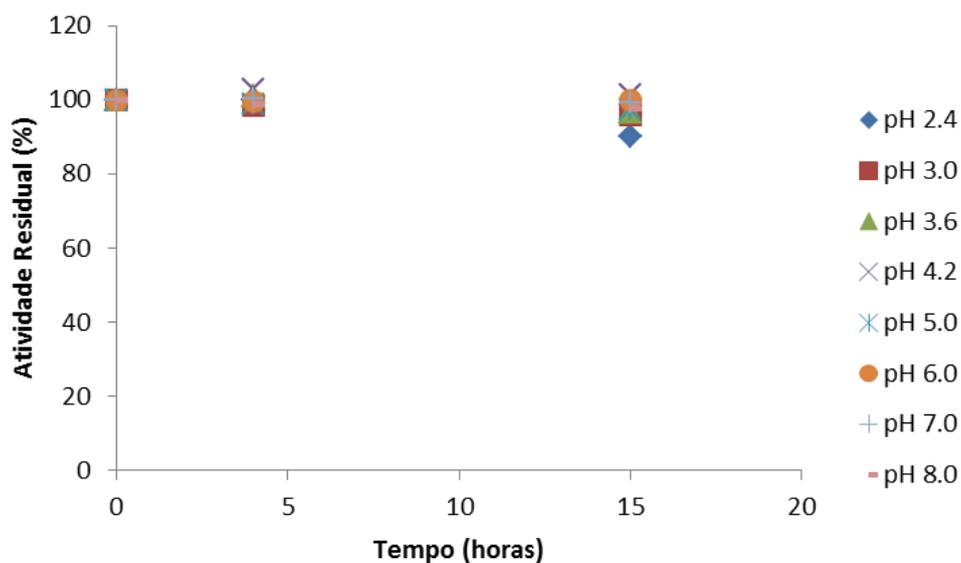


Figura 05. Estabilidade ao pH da fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 no extrato bruto enzimático (pré-purificada).

In e colaboradores (2009), pesquisaram quanto à estabilidade frente ao pH da fitase extracelular secretada por *S. cerevisiae* CY, e determinaram o perfil da atividade residual após a incubação do extrato enzimáticos em diversos valores de pH, semelhante aos experimentos realizados neste presente trabalho. 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. Os resultados deste trabalho são superiores ao relatado pelos autores citados anteriormente, pois a fitase pré-purificada produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 permaneceu ativa sem perda de atividade na faixa de pH entre 2,4 a 8,0 por 15 horas sem perda da sua função hidrolítica.

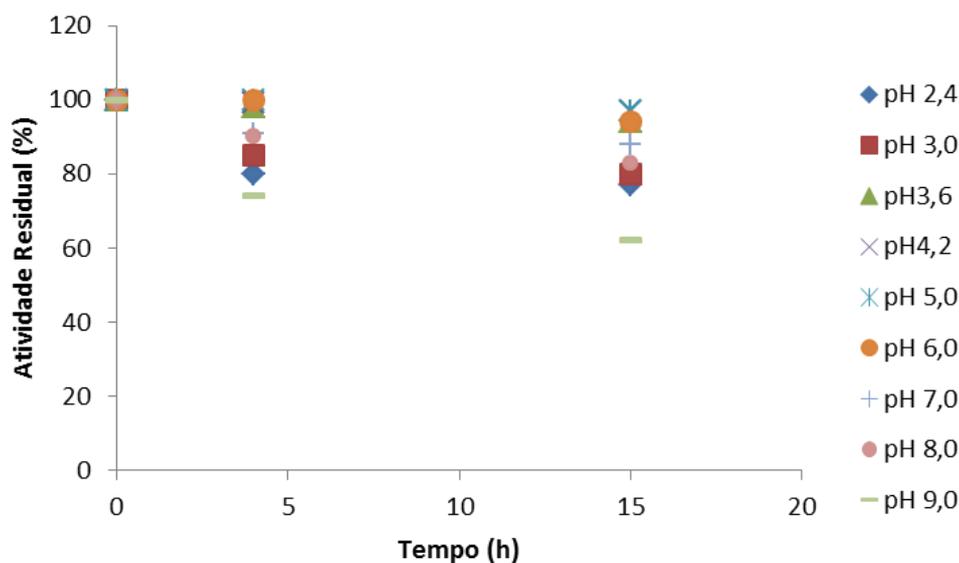


Figura 06. Estabilidade ao pH da fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 pós-purificada em sistemas de duas fases aquosas PEG/citrato.

Soni e Khire (2007) estudaram a produção e caracterização parcial de dois tipos de fitase produzidas por *A. niger* NCIM 563 utilizando a fermentação submersa. Os mesmos 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 65 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 específico de *A. aculeatus* RCEF 4894 em *Pichia pastoris* e estudaram a expressão do gene na produção de fitase extracelular. Estes autores 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). Em comparação com os presentes resultados a fitase pré-purificada apresentou 80,0% da AR em pH 2,4 por 15 minutos, enquanto que a fitase pós-purificada através da fermentação extrativa S DFA PEG/citrato manteve 60,0% da AR em pH 3,6 por 15 minutos. Através, destes dados pode-se afirmar que no processo de extração e purificação usado neste trabalho, a fitase em estudo perde 20,0% da AR em relação à enzima pré-purificada em pH 3,6.

Esta aparente perda da atividade pós-purificação da fitase em estudo pode ser explicada por Monteiro Filho (2010). De acordo com este autor, quando uma proteína é adicionada a um sistema de duas fases aquosas, haverá uma reorganização das moléculas. Com isso, a proteína pode particionar para a fase rica em polímero (fase superior ou fase PEG) ou a fase rica em sal (fase inferior). Os contaminantes que estão presentes no meio de cultivo podem particionar uma fase diferente da biomolécula, pode-se dizer que ocorreu uma purificação. No entanto, alguns contaminantes do meio de cultivo estabilizam a proteína em estudo, tornando a tornando a molécula-alvo menos estável quando comparada ao extrato bruto antes da purificação.

4.0 Conclusão

A fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 apresentou temperatura ótima da fitase foi de 60°C e pH ótimo 5,0. Através dos resultados obtidos verifica-se que após o processo de extração e purificação utilizando fermentação extrativa por S DFA PEG/citrato, a termoestabilidade da fitase diminuiu

consideravelmente (38,4% da AR em 90°C por 120 minutos para 50,0% da AR em 70°C por 25 minutos). Em relação a estabilidade frente ao pH, a fitase pré-purificada apresentou uma perda 20,0% da AR em relação à enzima pré-purificada em pH 3,6. Conclui-se que a fitase pré-purificada produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 é mais adequada para ser adicionada na alimentação de aves e suínos, pois apresentou-se ativa em uma faixa de pH ácido a básico, fato esse, requerido para a manutenção das propriedades catalíticas durante a passagem no trato gastro-intestinal dos animais.

5.0 Agradecimentos

Os autores agradecem a FACEPE, CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro e ao Centro de Apoio à Pesquisa (CENAPESQ/UFRPE), Laboratório de Fermentações e Laboratório de Química Biológica (UMINHO, Braga, Portugal) pela infra-estrutura para a realização deste trabalho.

6.0 Referências Bibliográficas

BANIK, R.M., SANTHIAGU, A., KANARI, B., SABARINATH, C., UPADHYAY, S.N. Technological aspects of extractive fermentation using aqueous two phases systems. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 337-348, 2003.

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

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

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.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Bioch.** 1976;72:248-254.

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

GREINER, R., KONIETZNY, U. Phytases: Biochemistry, enzymology and characteristics relevant to animal feed use. In: Bedford, M., Partridge, G. (Eds.), *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. **CABI**, Publishing, pp. 96-128, 2011.

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

HEINONEN, J.K., LATHI, R.J. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. **Anal. Biochem.** 113(2):313-317, 1981.

IGBASAN, F.A., K. MANNER, G. MIKSCH, R. BORRISS, A. FAROUK, O. SIMON. Comparative studies on the *in vitro* properties of phytases from various microbial origins. **Arch. Anim. Nutr.** 53:353-373, 2000.

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.

LEI, X.G., WEAVER, J.D., MULLANEY, E., ULLAH, A.H., AZAIN, M. J. Phytase, a New Life for an “Old” Enzyme. **Annual Review of Animal Biosciences** Vol. 1: 283-309, 2012. DOI: 10.1146/annurev-animal-031412-103717.

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.

MONTEIRO-FILHO, E.S. Sistemas aquosos bifásicos: uma alternativa para purificação de biomoléculas e simulação de sistemas líquidos complexos. **Revista Ciência & Tecnologia: FATEC-JB** (ISSN 2178-9436), v. 1, n. 1, p. 33-41, 2010.

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

PANDEY, S.K., BANIK, R.M. Extractive fermentation for enhanced production of alkaline phosphatase from *Bacillus licheniformis* MTCC 1483 using aqueous two-phase systems. **Bioresour. Technol.** 102 (5):4226-31, 2011.

PANDEY, C.R.A. Thermostable phytase production by *Thermoascus aurantiacus* in submerged fermentation. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 118: 205-214, 2004.

PERICIN, D.M., MADAREV-POPOVIC, S.V., RADULOVIC-POPOVIC, L.M. Optimization of conditions for acid protease partitioning and purification in aqueous

two-phase systems using response surface methodology. **Biotechnology Letters**, v. 31, p. 43-47, 2009.

RAO, D.E., RAO, K.V., REDDY, T.P., REDDY, V.D. Molecular characterization, physicochemical properties, known and potential applications of phytases: An overview. **Crit. Rev. Biotechnol.**, 29 (2): 182-198, 2009.

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 β -xilosidase produced by a thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** (26):156-160, 2001.

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.

SHAW, A.L., BLAKE, J.P., MORAN, E.T. Effects of flesh attachment on bone breaking and of phosphorus concentration on performance of broilers hatched from young and old flocks. **Poult. Sci.** 89, 295-302, 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.

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.

ZUO, R., CHANG, J., YIN, Q. Phytase gene expression in *Lactobacillus* and analysis of its biochemical characteristics. **Res Microbiol** 165: 329-335, 2010.

CAPÍTULO IV

Avaliação do Perfil Hidrolítico *in vitro* e Atividade anti-proteolítica da Fitase Produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 em Rações Comerciais de Aves e Suínos



Artigo a ser submetido à revista Pesquisa Agropecuária Brasileira

Avaliação do Perfil Hidrolítico *in vitro* e Atividade anti-proteolítica da Fitase Produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 em Rações Comerciais de Aves e Suínos

Júlio C.S. Nascimento^a, Fabiana A.S.D. Souza^a, Rúben A. Gomes de Oliveira^c,

José A. Couto Teixeira^b, Ana Lúcia F. Porto^{a*}

^a Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife, PE, Brazil.

^b Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Campus Gualtar, 4710-057, Braga, Portugal.

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

* Autor correspondente. Tel.: +55 81 3320 6345

E-mail: analuporto@yahoo.com.br (Ana Lúcia Figueiredo Porto).

Resumo

Ácido fítico é a maior forma de armazenamento de fósforo em sementes de plantas e está presente como grande parte do fósforo orgânico encontrado no solo. Contudo, o fitato não pode ser diretamente usado por vegetais e alguns animais não-ruminantes, tais como suínos, aves e peixes. Fitases formam uma classe de enzimas fosfatases que possui atividade de hidrolizar o fitato e liberar os íons ortofosfatos ligados à estrutura do fitato. Sistema de duas fases aquosas é um método de extração e purificação, o qual está sendo considerado uma alternativa eficaz na redução de etapas dos processos de purificação. O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito do extrato enzimático pré-purificado e extrato pós-purificado em SDFA PEG/citrato na hidrólise do ácido fítico em rações comerciais para aves e para suínos, bem como estudar a atividade anti-proteolítica da enzima frente à ação da pepsina e tripsina. Observa-se que a enzima pré-purificada foi inibida em concentrações de fósforo de 6 $\mu\text{moles de PO}_4^{-2}$, entretanto a fitase pós-purificada em SDFA PEG/citrato foi inibida em concentração de fósforo menor do que a pré-purificada. O tratamento enzimático das rações comerciais de aves e suínos utilizando a fitase de *A. niger var. phoenicis* URM 4924 foi bastante promissor, pois se mostrou-se eficiente na hidrólise do fitato, liberando aproximadamente 6 $\mu\text{moles de PO}_4^{-2}$, entretanto com 4 U/mL de enzima em 8 minutos de incubação. A fitase produzida por *A. niger var. phoenicis* URM 4924 mostrou-se com bom desempenho na resistência proteolítica, bem como na hidrólise do fitato em rações comerciais de aves e suínos, características bioquímicas essenciais para uma enzima com potencial aplicação industrial.

Palavras-chaves: Fitase, *Aspergillus niger*, fitato, perfil hidrolítico, resistência proteolítica.

Abstract

Phytic acid is the major storage form of phosphorus in plant seeds and is present as a major part of the organic phosphorus found in soil. However, phytate can not be directly used by plants and some non- ruminant animals such as pigs, poultry and fish. Phytases form a class of phosphatase enzymes having the activity to hydrolyze phytate and liberate the estrutura orthophosphate ions bound to phytate. Aqueous two-phase system is a method of extraction and purification, which is being considered as an effective alternative in reducing steps of the purification proces. The aim of this paper was to analyze the effect of pre-purified enzyme extract and post-purified extract in ATPS PEG/citrate in the hydrolysis of phytic acid in commercial poultry feed and pigs, as well as study the anti- proteolytic activity of the enzyme front action of pepsin and trypsin. It is observed that the pre- purified enzyme was inhibited by concentrations of phosphorus ie mmoles of 6 μmols of PO_4^{-2} , however post- purified phytase in ATPS PEG / citrate inhibited by low phosphorus concentration of the pre-purified. The enzymatic treatment of commercial diets of broilers and pigs using the phytase of *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 was quite promising because it proved effective in phytate hydrolysis , releasing approximately 6 μmols of PO_4^{-2} , however with 4 U/mL of enzyme in 8 minute incubation. The phytase produced by *A. niger* var. *phoenicis* showed up with good performance in the proteolytic resistance, as well as phytate hydrolysis in commercial diets of poultry and pigs, essential biochemical characteristics for an enzyme with potential industrial application.

Keywords: phytase, *Aspergillus niger*, phytate, hydrolytic profile, proteolytic resistance.

1.0 Introdução

Ácido fítico é a maior forma de armazenamento de fósforo em sementes de plantas e está presente como grande parte do fósforo orgânico encontrado no solo (Ma et al., 2012). Contudo, o fitato não pode ser diretamente usado por vegetais e alguns animais não-ruminantes, tais como suínos, aves e peixes, e inclusive também o ser humano, fósforo este que se acumula no solo causando uma contaminação ambiental (Johnson et al., 2010; Fan et al., 2013).

Fitases formam uma classe de enzimas fosfatases que possui atividade de hidrolizar o fitato e liberar os íons ortofosfatos ligados à estrutura do ácido fítico, fosfatídeos de inositol e inositol (Fan et al., 2013). Além disso, fitase tem sido utilizada como suplemento alimentar de aves e suínos com o objetivo de melhorar a qualidade nutricional dos alimentos ricos em fitato e eventualmente redução da poluição ambiental (Jorquera et al., 2011). Fitases são principalmente encontrada em plantas, micro-organismos, e bem como em alguns animais (Dai et al., 2011).

Estudos têm sido conduzidos a cerca da utilização de enzimas exógenas na alimentação de animais não-ruminantes, com o intuito de melhorar a digestão e absorção. Há um destaque para o uso de fitases, que tem se destacado para aplicação, principalmente, em rações de aves e suínos (Abioye et al., 2010; Ramos et al., 2012).

Em escala industrial utilizam-se micro-organismos para a produção das fitases a partir de diferentes processos fermentativos (Fan et al., 2013). Os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* são os micro-organismos mais utilizados para a produção industrial de fitases comerciais, de acordo com Vats e Banerjee (2004). Para que enzimas sejam utilizadas industrialmente uma das características bioquímicas mais

apreciada é a estabilidade quanto às condições de reação, sem que ocorram perdas significativas em sua atividade catalítica (Shah & Madamwar, 2005).

O custo do processo produtivo e purificação de uma enzima é o principal entrave para a aplicação dos produtos enzimáticos às indústrias. Com o objetivo de aumentar o rendimento da produção enzimática é necessário otimizar os processos e aumentar o escalonamento de produção das enzimas (Raj et al., 2012).

Entretanto, para que um bioproduto seja comercializado, é necessário que ele esteja puro ou parcialmente purificado. Diante do exposto, diversos métodos de extração e purificação vêm sendo estudados. Dentre estes, tem-se a bioconversão ou fermentação extrativa utilizando sistema de duas fases aquosas (SDFA), o qual está sendo considerado uma alternativa eficaz na redução de etapas dos processos de purificação, reduzindo desta maneira o custo para obtenção do produto final (Nalinanon et al., 2009).

A fermentação extrativa é um processo de produção e recuperação integrada e simultânea de bioprodutos. O SDFA é formado pela mistura de duas soluções aquosas de (polímeros-polímero ou polímero-sal) acima de certa concentração crítica, indicada por um diagrama de fases em que a formação de duas fases aquosas imiscíveis é observada. Em um comportamento desejável, espera-se que os componentes do meio devam se concentrar em uma das fases do sistema, enquanto que a biomolécula-alvo deva preferir a fase oposta. Esse comportamento facilita a extração do produto, levando-o a uma purificação parcial e eliminando a influência de inibidores presentes no processo (Ng et al., 2013).

O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito do extrato bruto enzimático (pré-purificado) e extrato pós-purificado em SDFA PEG/citrato na hidrólise do ácido fítico em rações comerciais para aves e para suínos, bem como estudar a atividade anti-

proteolítica do extrato bruto enzimático (pré-purificado) e extrato pós- purificado em SDFA PEG/citrato frente à ação da pepsina e tripsina.

2.0 Material e Método

2.1 Micro-organismo

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.

2.2 Produção do extrato bruto enzimático pré-purificado

A produção do extrato bruto enzimático (pré-purificado) foi realizada em erlenmeyers (250 mL) contendo 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, diluídos em tampão acetato 0.2 M pH 4.0. Os meios de culturas foram esterelizados em autoclave a 121°C por 20 minutos. Em seguida, procedeu-se o inóculo com concentração final de esporos em 10⁶ esporos/mL. Os fracos foram incubados em agitador orbital a 30°C, 100 rpm por 96 horas de cultivo.

2.3 Produção do extrato bruto pós-purificado em SDFA

A produção do extrato enzimático pós-purificado foi preparado utilizando Erlenmeyers (250 mL), solução de citrato e solução de PEG e acrescido de meio de cultura descrito no item anterior. A composição do sistema foi a seguinte: massa molar do PEG (M_{PEG} , 8000 g/mol), concentração do PEG (C_{PEG} , 20 m/m), concentração de citrato (C_{CIT} , 20,0% m/m), pH (6,0) e agitação (100 rpm). Água ultra-pura foi adicionada para um sistema com volume final de 50 mL, e inóculo com concentração de 10^6 esporos/mL. Após a pesagem das soluções que formam os sistemas, agitou-se em vortex por 1 minuto e foram autoclavados a 121°C por 20 minutos. Os sistemas foram incubados em agitador orbital a 30°C. 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 da fase superior (rica em PEG) e as fases foram submetidas às determinações analíticas.

2.4 Determinação da atividade fitásica

A atividade fitásica foi determinada pela utilização do método do molibdato de amônio modificado, de acordo com Heinonen and Lathi, 1981. Tampão acetato de sódio (350 μ L at 0.2 M, pH 4.8) diluído em fitato de sódio (875 nmol), utilizado como substrato. Após uma pré-incubação a 37 °C por 10 min, a reação enzimática foi iniciada pela adição de 50 μ L do extrato bruto enzimático. A solução foi incubada por 30 min a 37°C. Com o objetivo de estimar a quantidade de fosfato inorgânico liberado em catálise, 1.5 mL de uma solução de acetona: 2.5 M H₂SO₄: 10 mM molibdato de amônio (2:1:1 v/v/v) previamente preparada, e acrescido de 100 μ L de ácido cítrico ao

volume final. A absorbância foi medida a 355 nm após 10 min de reação. Uma unidade de foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de fósforo inorgânico por minutos sob as condições padrão de ensaio. A atividade enzimática foi expressa em unidades por mL (U/mL). A curva-padrão foi realizada utilizando solução de fosfato de potássio dibásico de 10 to 600 μM de fosfato por mL. O conteúdo de fosfato inorgânico presente no meio de cultura antes do inóculo do micro-organismo foi determinado com o objetivo de diminuir as interferências que os resíduos de Pi podem causar nas análises de atividade enzimática.

2.5 Determinação quantitativa do fósforo inorgânico

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.

2.6 Determinação da atividade anti-proteolítica

A resistência da fitase pré-purificada e pós-purificada em SDFa frente à pepsina gástrica e tripsina foi realizada de acordo com Zhang et al., (2010) com algumas modificações. As amostras foram liofilizadas e foram diluídas na seguinte forma: 0,2 $\mu\text{g/mL}$, pepsina/enzima na proporção 1:1 v/v em tampão glicina-HCl 0,1 M (pH 2,5) e 0,2 $\mu\text{g/mL}$ na proporção 1:1 (v/v) em tampão TRIS-HCl 0,1 M (pH 8,0). As amostras

foram incubadas por até 60 minutos a 37°C. Como controle, os extratos enzimáticos foram incubados nas mesmas condições, entretanto sem adição das enzimas pepsina e tripsina. A pepsina e tripsina utilizados foram da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). A atividade residual da fitase foi realizada de acordo com o ensaio descrito anteriormente.

2.7 Hidrólise in vitro em rações comerciais de aves e suínos

Com o objetivo de avaliar o efeito das propriedades catalíticas da fitase pré-purificada e após a purificação em SDFa, rações comerciais de aves e suínos foram utilizadas. Após pesar 1,0 grama de amostra das rações, as mesmas foram autoclavadas (121°C por 15 minutos) e posteriormente foram diluídas em 5,0 mL de tampão glicina-HCl 0,1 M (pH 2,5) em frascos shot de 50 mL e adicionada à mistura extratos pré e pós purificados da enzima (5 U/mL). Para manter o controle experimental, amostras de ração autoclavadas foram incubadas com água ultra-pura (sem o extrato enzimático). Os frascos shot foram incubados em agitador orbital (50°C a 200 rpm). Alíquotas foram retiradas até 8h de incubação, sendo armazenadas a 4°C e posteriormente centrifugadas (5000 x g, 15 minutos, a 4°C). Coletou-se o sobrenadante após a centrifugação, o qual foi utilizado para quantificação do fósforo inorgânico através da reação colorimétrica, de acordo com a metodologia de determinação anteriormente descrita.

3.0 Resultados e Discussão

3.1 Atividade anti-proteolítica

A Figura 01 representa a atividade residual (%) da fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 após ser submetida a ação proteolítica da pepsina gástrica e tripsina entérica. A atividade residual é definida como a porcentagem de atividade catalítica que uma enzima apresentam após ser submetida a um tratamento experimental ao longo do tempo. A atividade catalítica da enzima no tempo inicial é considerada como 100%, e a partir deste ponto se calcula a atividade remanescente.

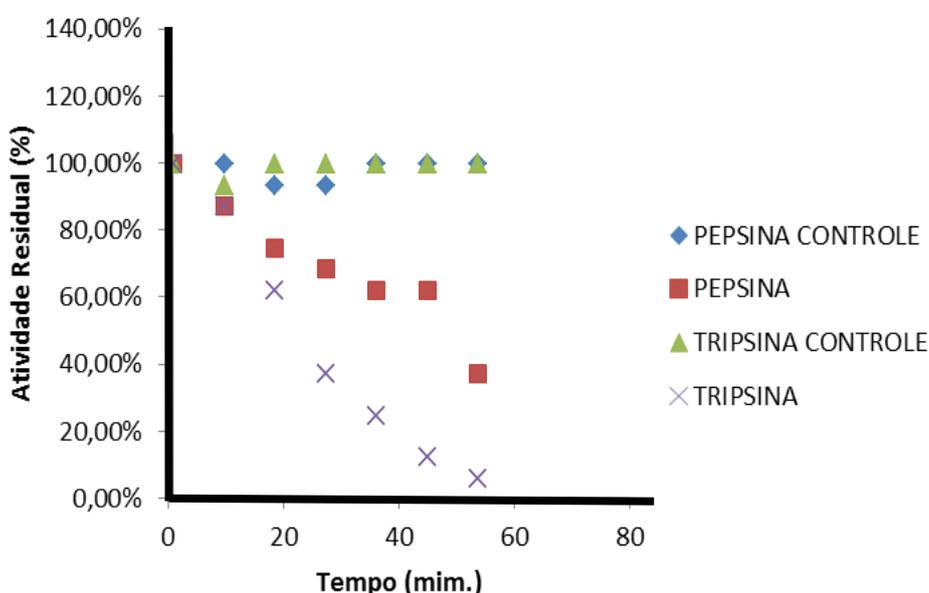


Figura 01. Atividade da fitase (U/mL) produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 tratada com enzimas proteolíticas (pepsina e tripsina).

Em comparação com os tratamentos controle, a fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 manteve 60,0% da sua atividade residual por 40 minutos. No entanto, quando exposta a atividade proteolítica da tripsina entérica, a fitase manteve aproximadamente 20,0% da atividade residual.

Zang e colaboradores (2010) estudaram sobre a resistência à proteólise da fitase de *Aspergillus niger*. Os mesmos autores relataram que a fitase estudada apresentou 90,0% da atividade residual quando expostas a atividade proteolítica da pepsina e tripsina por 20 minutos. Neste trabalho a fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 apresentou aproximadamente 70,0% da atividade residual quando submetida ao tratamento com pepsina.

Fugthong e colaboradores (2010) estudaram a resistência proteolítica da fitase extracelular e recombinante produzida por *Eupenicillium parvum* BCC 17694. Os autores concluíram que esta enzima apresentou-se como pouco resistente em relação a resistência à proteólise da pepsina e tripsina, mantendo cerca de 30,0% da atividade residual após 2 horas de exposição à tripsina entérica. No presente a estudo a fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 apresentou 40,0% da atividade residual após 2 horas de exposição a pepsina gástrica suína.

Estes resultados corroboram como Whang e colaboradores (2007), os quais investigaram sobre a resistência proteolítica da fitase produzida por *Aspergillus fumigatus* WY-2, enzima esta que se mostrou sensível a ação proteolítica da tripsina, apresentando 30,0% da atividade residual após 2 h de incubação com extratos purificados de tripsina.

De acordo com Cao e colaboradores (2007), a termoestabilidade e a resistência à proteólise estão entre as características bioquímicas mais importantes em relação à utilização comercial das fitases, devido as elevadas temperaturas adotadas nos processamento das rações para aves e suínos, e também por causa da ação catalítica das enzimas digestivas durante à passagem pelo trato gastro-intestinal dos animais. Estes resultados mostram que a fitase em estudo possui características de resistência

proteolítica compatíveis com outras fitases microbianas em estudo, e apresenta-se como uma enzima com uso potencial em ração animal.

3.2 Hidrólise *in vitro* do fitato em ração comercial de aves e suínos

A Figura 2A e 2B representam o perfil hidrolítico da fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 em ração comercial de aves, utilizando a enzima pré-purificada e a pós-purificada utilizando SDFA PEG/citrato, respectivamente.

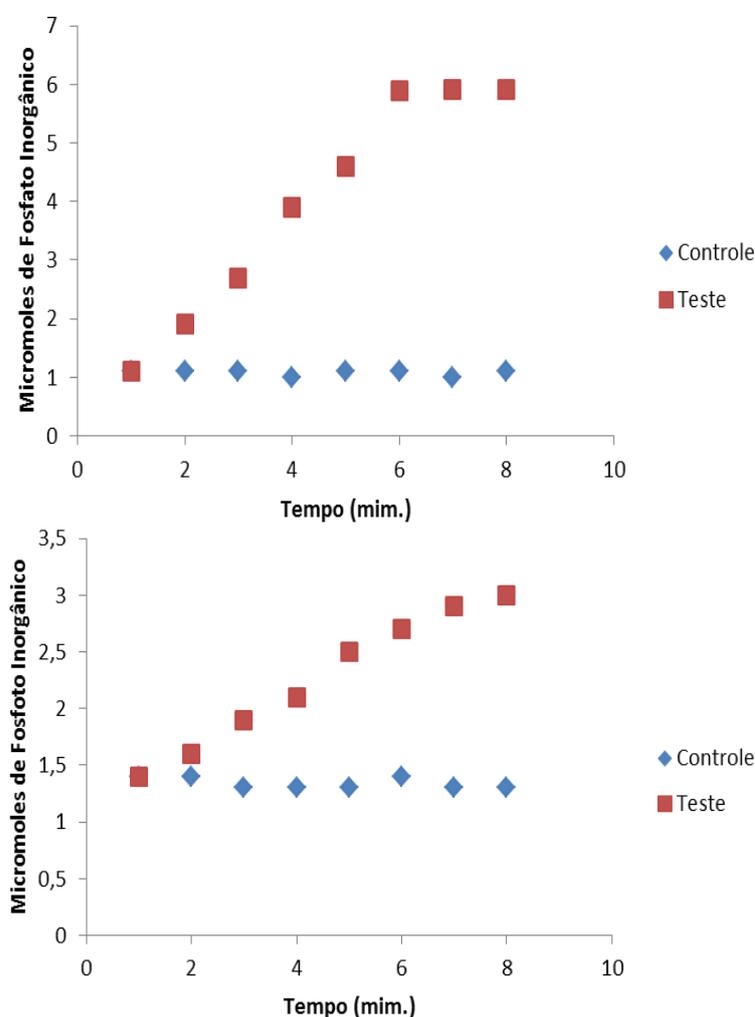


Figura 02. A) Perfil hidrolítico da fitase pré-purificada produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 em ração comercial de aves ($\mu\text{moles de PO}_4^{-2}/\text{mim}$); B) Perfil

hidrolítico da fitase pós-purificada em SDFa PEG/citrato produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 em ração comercial de aves ($\mu\text{moles PO}_4^{-2}/\text{min}$).

A enzima fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 apresentou-se eficaz na liberação do fósforo fítico em rações de aves comerciais, tanto na forma pré-purificada, quanto após a extração e purificação utilizando sistemas de duas fases aquosas PEG/citrato. Através da Figura 2A e 2B nota-se que a hidrólise da enzima pré-purificada foi mais efetiva, pois aos 6 minutos de hidrólise a enzima liberou aproximadamente 6 $\mu\text{moles de PO}_4^{-2}$, enquanto a enzima pré-purificada liberou 3 $\mu\text{moles de PO}_4^{-2}$ do fitato da ração em 8 minutos de reação enzimática. Observa-se também que a enzima pré-purificada foi inibida em concentrações de fósforo de 6 $\mu\text{moles de PO}_4^{-2}$ (após minutos de reação), entretanto a fitase pós-purificada em SDFa PEG/citrato foi inibida em concentração de fósforo menor do que a pré-purificada (3 $\mu\text{moles de PO}_4^{-2}$ após 8 minutos de reação enzimática).

Monteiro (2011) estudou a produção e caracterização parcial de uma fitase produzida por *Aspergillus niger*. Este autor concluiu que a enzima fitase estudada liberou 5,14 $\mu\text{moles de PO}_4^{-2}$ após 5 minutos de reação em ração comercial de aves. Estes resultados são compatíveis com os encontrados neste trabalho, onde obteve-se 6 a liberação de aproximadamente 6 $\mu\text{moles de PO}_4^{-2}$ por 8 minutos de reação.

De acordo com Vats e colaboradores (2009) que estudaram sobre a utilização de fitase produzida por *Aspergillus niger* van Teighem na hidrólise do fitato em rações comerciais, conseguindo uma liberação de 48 nm de PO_4^{-2} a 55°C. Estes dados são diferentes aos encontrados neste trabalho. Entretanto, os resultados obtidos neste trabalho mostram o potencial hidrolítico da fitase em estudo. Na Figura 3A e 3B está representado o perfil hidrolítico da fitase pré-purificada e pós-purificada em

S DFA/PEG citrato produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 em ração comercial de suínos ($\mu\text{moles de PO}_4^{-2}/\text{mim}$).

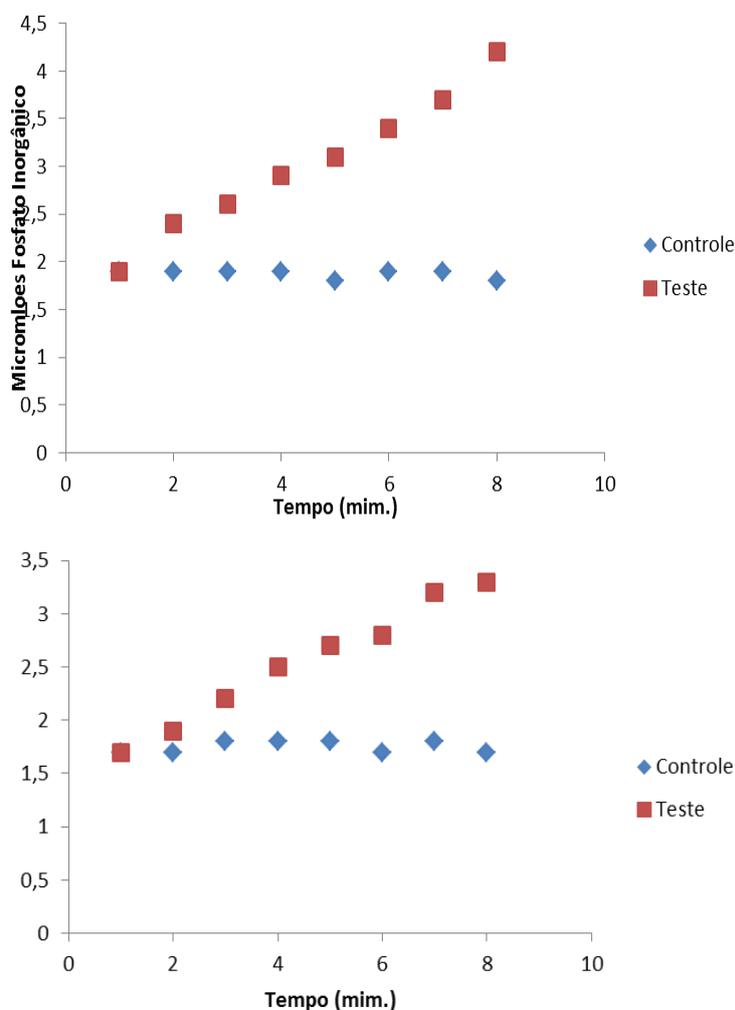


Figura 03. A) Perfil hidrolítico da fitase pré-purificada produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 em ração comercial de suínos ($\mu\text{moles de PO}_4^{-2}/\text{mim}$); B) Perfil hidrolítico da fitase pós-purificada em S DFA PEG/citrato produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 em ração comercial de suínos ($\mu\text{moles PO}_4^{-2}/\text{mim}$).

A fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 mostrou-se eficiente na liberação do fósforo fítico em ração comercial de suínos, tanto na forma pré-purificada, quanto após a extração e purificação utilizando sistemas de duas fases aquosas PEG/citrato (4,5 $\mu\text{moles PO}_4^{-2}$ para a fitase pré-purificada e 3,4 $\mu\text{moles PO}_4^{-2}$ para a fitase pós-purificada em SDFa PEG/citrato). No entanto, a hidrólise em ração comercial de aves foi mais efetiva quando comparada a hidrólise em ração comercial de suínos.

Ramos e colaboradores (2012) investigaram o potencial de hidrólise da fitase produzida por *A. niger* 11T53A9 em farinha de sorgo. O tratamento enzimático da farinha de sorgo com 400 e 800U/kg da fitase de *A. niger* 11T53A9 foi capaz de hidrolisar 88 e 93% do ácido fítico presente na farinha de sorgo, reduzindo-o drasticamente nos tempos de 4 e 3 horas, respectivamente, enquanto o efeito da enzima comercial, nas mesmas concentrações, foi de 57,6 e 59,4% em 6 horas de hidrólise.

Costa e colaboradores (2007) ressaltaram que diversas pesquisas tem sido realizadas adicionando-se fitase à matéria-prima ou à ração, principalmente quando se trata de nutrição animal, para que tenha ação hidrolítica no trato gastrointestinal. Porém, outra estratégia pode ser utilizada, trata-se da incubação *in vitro* da matéria-prima contendo fitase exógena para obtenção de produtos de origem vegetal com baixo teor de fitato.

Silva (2003) realizou hidrólise do fitato presente na farinha de lupino com uso de fitase de *A. niger*, conseguindo uma redução do teor de fitato. Verificou que 40 min de incubação foi suficiente para hidrolisar todo ácido fítico na farinha de lupino, utilizando uma concentração enzimática de 500U/kg. No presente trabalho, obteve-se 6 $\mu\text{moles de PO}_4^{-2}$, entretanto utilizou-se 4 U/mL de enzima em 8 minutos de incubação.

4.0 Conclusão

O tratamento enzimático das rações comerciais de aves e suínos utilizando a fitase de *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 foi bastante promissor, pois se mostrou-se eficiente na hidrólise do fitato, liberando aproximadamente 6 μmoles de PO_4^{2-} , entretanto com 4 U/mL de enzima em 8 minutos de incubação. A fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* mostrou-se com bom desempenho na resistência proteolítica, bem como na hidrólise do fitato em rações comerciais de aves e suínos, características bioquímicas essenciais para uma enzima com potencial aplicação industrial.

5.0 Agradecimentos

Os autores agradecem a FACEPE, CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro e ao Centro de Apoio à Pesquisa (CENAPESQ/UFRPE), Laboratório de Fermentações e Laboratório de Química Biológica (UMINHO, Braga, Portugal) pela infra-estrutura para a realização deste trabalho.

6.0 Referências Bibliográficas

ABIOYE, S., IGE, D., AKINREMI, O. Characterizing fecal and manure phosphorus from pigs fed phytase supplemented diets. **Journal of Agricultural Science**, v.2, p.3-12, 2010.

CAL, L., WANG, W., YANG, C., YANG, Y., DIANA, J., YAKAPITIYAGE, A., LUO, Z., LI, D. Application of microbial phytase in fish feed. **Enzyme and Microbial Technology**, 40, 497-507, 2007.

COSTA, F.G.P., BRANDÃO, P.A., BRANDÃO, J.S. Efeito da enzima fitase nas rações de frangos de corte, durante as fases pré-inicial e inicial. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.3, p.865-870, 2007.

DAI, F., QIU, L., YE, L., WU, D., ZHOU, M., ZHANG, G. Identification of a phytase gene in barley (*Hordeum vulgare* L.). *PLoS One* 6:e18829, 2011.

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

FAN, C.M., WANG, Y.H., ZHENG, C.Y., YONG, F.F. Fingerprint motifs of phytases. **African Journal of Biotechnology** Vol. 12(10), pp. 1138-1147, 2013. DOI: 10.5897/AJB12.1279

FUGTHONG, A., BOONYAPAKRON, K., SORNLEK, W. TANAPONGIPAT, S., EURWILAICHITR, L., POOTANAKIT, K. Biochemical characterization and *in vitro* digestibility assay os *Eupenicillium parvum* BCC 17694 phytase expressed in *Pichia pastoris*. **Protein Expres Purif.**, 70, 60-77, 2010.

HEINONEN, J.K., LAHTI, R.J. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its applications to the assay of inorganic pyrophosphate. **Anal. Biochem.**, v.113, p.313-317, 1981.

JOHNSON, S.C., YANG, M., MURTHY, P.P. Heterologous expression and functional characterization of a plant alkaline phytase in *Pichia pastoris*. **Protein. Expr. Purif.** 71(2):196-203, 2010.

MONTEIRO, P.S. Produção e caracterização bioquímica de fitases de *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus niger* UFV-1 e suas aplicações em ração animal. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa, p. 79, 2011.

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**, v. 44, p. 471-476, 2009.

NG, H. S., OOI, C.W., MOKHTAR, M.N., SHOW, P.L., ARIFF, A., TAN, J.S., NG, E-P., LING, T.C. Extractive bioconversion of cyclodextrins by *Bacillus cereus*

cyclodextrin glycosyltransferase in aqueous two-phase system. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 723-726, 2013.

ORQUERA, M.A., CROWLEY, D.E., MARSCHNER, P., GREINER, R., FERNANDEZ, M.T., ROMERO, D., MENEZES-BLACKBURN, D., DE LA LUZ, M. M. Identification of β -propeller phytase-encoding genes in culturable *Paenibacillus* and *Bacillus* spp. from the rhizosphere of pasture plants on volcanic soils. **FEMS Microbiol. Ecol.** 75:163-172, 2011.

RAJ, A., KHESS, N., PUJARI, N., BHATTACHARYA, S., DAS, A., RAJAN, S. S. Enhancement of protease production by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from dairy effluent sludge and determination of its fibrinolytic potential. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. p. 1845-1851, 2012.

RAMOS, G.D.M., ASCHER, J.R., SILVA, L.G., TRICHES, M.C., SOUSA, G. F., COURI, S. Estabilidade da fitase de *Aspergillus niger* 11T53A9 ao armazenamento e sua aplicação na hidrólise do ácido fítico na farinha de sorgo. **R. Bras. Agrocência**, Pelotas, v.18 n. 2-4, p.95-106, 2012.

SHAH, A.R., MADAMWAR, D. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. **Process Biochemistry**, v.40, p.1763-1771, 2005.

NASCIMENTO, J.C.S. Produção, Purificação e Caracterização Parcial da Fitase...

SILVA, L.G. Processos enzimáticos para degradação de ácido fítico em formulações a base de lupino (*Lupinus albus*), 114p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2003.

VATS, P., BUSHAN, B., BANERJEE, U.C. Studies on the dephosphorylation of phytic acid in livestock feed using phytase from *Aspergillus niger* van Teighem. *Bioresource Technology*, 100, 287-291, 2009.

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

WHANG, Y., GAO, X., SU, Q., WN, W., AN, L. Cloning, expression and enzyme characterization of an acid heat-stable phytase from *Aspergillus fumigatus* WY-2, **Curr. Microbiol.**, 55, 65-70, 2007.

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

• **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

- I. Temperatura e pH mostraram ser importantes parâmetros na produção da fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924;
- II. A produção da fitase foi otimizada a 30 °C e pH 4,0;
- III. A produção de fitase demonstrou-se correlacionada com a produção de biomassa e conteúdo de ergosterol;
- IV. O conteúdo de ergosterol mostrou-se como um bom indicador para estimar a produção da biomassa em fermentação submersa por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924;
- V. O ácido fítico contido na milhocina apresentou-se como um indutor para a produção de fitase através da fermentação submersa;
- VI. A recuperação em atividade da fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 em fermentação extrativa PEG/citrato é maximizada (150,38%) utilizando M_{PEG} (8000 g/mol), C_{PEG} , (20,0% m/m), C_{CIT} (20,0% m/m), pH (6,0) e agitação (100 rpm);
- VII. A técnica de fermentação extrativa utilizando SDFa 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;

- VIII. A fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 apresentou temperatura ótima da fitase foi de 60°C e pH ótimo 5,0.
- IX. Através dos resultados obtidos verifica-se que após o processo de extração e purificação utilizando fermentação extrativa por SDFa PEG/citrato, a termoestabilidade da fitase diminuiu consideravelmente (38,4% da AR em 90°C por 120 minutos para 50,0% da AR em 70°C por 25 minutos);
- X. Conclui-se que a fitase pré-purificada produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 é mais adequada para ser adicionada na alimentação de aves e suínos, pois apresentou-se ativa em uma faixa de pH ácido a básico, fato esse, requerido para a manutenção das propriedades catalíticas durante a passagem no trato gastro-intestinal dos animais.
- XI. Observa-se que a enzima pré-purificada foi inibida em concentrações de fósforo de 6 $\mu\text{moles de PO}_4^{-2}$, entretanto a fitase pós-purificada em SDFa PEG/citrato foi inibida em concentração de fósforo menor do que a pré-purificada.
- XII. Em comparação com os tratamentos controle, a fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 manteve 60,0% da sua atividade residual por

40 minutos. No entanto, quando exposta a atividade proteolítica da tripsina entérica, a fitase manteve aproximadamente 20,0% da atividade residual.

XIII. A fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* mostrou-se com bom desempenho na resistência proteolítica, bem como na hidrólise do fitato em rações comerciais de aves e suínos, características bioquímicas essenciais para uma enzima com potencial aplicação industrial.