

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-PROTEOLÍTICA DA FITASE MICROBIANA PRODUZIDA POR *Aspergillus niger*

Vanessa Maranhão Soares <sup>1</sup>, Tomás Guilherme Pereira da Silva <sup>2</sup>, Rosa Carolina da Silva Bezerra Rodrigues <sup>1</sup>, Thiago José de Barros Campos, Julio César dos Santos Nascimento <sup>3</sup>, Lucilo Bioni da Fonseca Filho <sup>4</sup>, Ana Lúcia Figueiredo Porto <sup>5</sup>

<sup>1</sup> Discente do curso de Medicina Veterinária da Uninassau, <sup>2</sup> Aluno do Programa de Doutorado Integrado em Zootecnia da UFRPE, <sup>3</sup> Docente do curso de Medicina Veterinária da Uninassau, <sup>4</sup> Mestrando no Programa de Pós Graduação em Ciência Animal Tropical da UFRPE, <sup>5</sup> Professora titular do departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE.

### 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 possuem 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 estudar a atividade anti-proteolítica do extrato bruto enzimático pré-purificado e extrato pós purificado em S DFA PEG/citrato frente à ação da pepsina e tripsina. A fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 mostrou-se com bom desempenho na resistência proteolítica característica bioquímica essencial para uma enzima com potencial aplicação industrial.

**PALAVRAS-CHAVE:** fósforo, fitato, 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 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 process. The aim of this paper was to study the anti-proteolytic activity of the pre-purified enzyme extract and post-purified extract in ATPS PEG/citrate front action of pepsin and trypsin. The phytase produced by *A. niger* var. *phoenicis* showed up with good performance in the proteolytic resistance, essential biochemical characteristic for an enzyme with potential industrial application.

**KEY-WORDS:** phosphorus, phytate, proteolytic resistance

### 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. Contudo, o fitato não pode ser diretamente usado por vegetais e alguns animais não-ruminantes, tais como suínos, aves e peixes, e inclusive o ser humano (Fan et al, 2013).

Fitases formam uma classe de enzimas fosfatases que possuem atividade de hidrolizar o fitato e liberar os íons ortofosfatos ligados à estrutura do ácido fítico (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 (Jorquera et al, 2011). Fitases são principalmente encontradas em plantas, micro-organismos, e bem como em alguns animais (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 & Banerjee (2004). Para que enzimas sejam utilizadas industrialmente uma das características bioquímicas mais apreciadas é a estabilidade quanto às condições de reação, sem que ocorram perdas significativas em sua atividade catalítica (Shah & Madamwar, 2005).

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 (S DFA), 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).

O objetivo deste trabalho foi estudar a atividade anti-proteolítica do extrato bruto enzimático (pré-purificado) e extrato pós-purificado em S DFA PEG/citrato frente à ação da pepsina e tripsina.

## MATERIAL E MÉTODOS

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.

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), milhocina 3.0% (v/v), 0.5 g/L KCl, 1.5 g/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 2.0 g/L CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 1.5 g/L Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, diluídos em tampão acetato 0.2 M pH 4.0. Os meios de culturas foram esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos. Em seguida, procedeu-se o inóculo com concentração final de esporos em 106 esporos/mL. Os frascos foram incubados em agitador orbital a 30°C, 100 rpm por 96 horas de cultivo.

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 anteriormente. A composição do sistema foi a seguinte: massa molar do PEG (MPEG, 8000 g/mol), concentração do PEG (CPEG, 20 m/m), concentração de citrato (CCIT, 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 106 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).

A atividade fitásica foi determinada pela utilização do método do molibdato de amônio modificado, de acordo com Heinonen & 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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 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. A curva-padrão foi realizada utilizando solução de fosfato de potássio dibásico de 10 to 600 µM de fosfato por mL.

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.

A resistência da fitase pré-purificada e pós-purificada em S DFA 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 µg/mL, pepsina/enzima na proporção 1:1 v/v em tampão glicina-HCl 0,1 M (pH 2,5) e 0,2 µg/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.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 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 apresenta após ser submetida a um tratamento experimental ao longo do tempo.

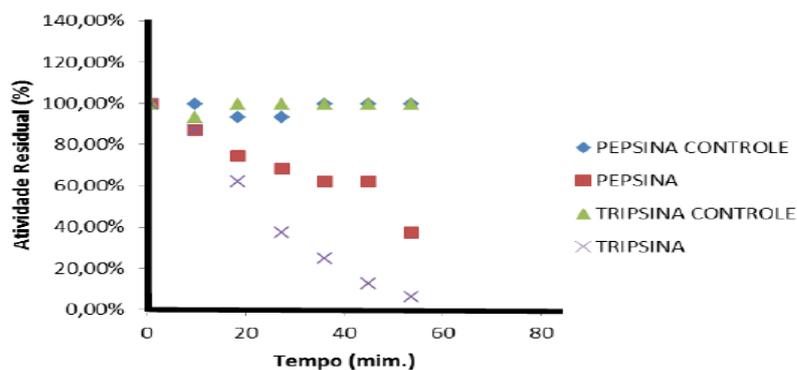


Figura 1

A atividade catalítica da enzima no tempo inicial é considerada como 100%, e a partir deste ponto se calcula a atividade remanescente. 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 et al (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 et al (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 et al (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 et al (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 gastrointestinal 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.

### CONCLUSÕES

A fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* mostrou-se com bom desempenho na resistência proteolítica característica bioquímica essencial para uma enzima com potencial aplicação industrial.

### LITERATURA CITADA

- CAO, 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.
- 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.
- 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.
- JORQUERA, M.A., CROWLEY, D.E., MARSCHNER, P., GREINER, R, FERNANDEZ, M.T., ROMERO, D., MENEZES-BLACKBURN, D., DE LA LUZ, M.M. **Identification of  $\beta$ -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.
- 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.
- 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.
- 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.