

## OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA FITASE DE *Rhizopus stolonifer* NA HIDRÓLISE DE FITATO EM RAÇÃO ANIMAL.

### PRODUCTION OPTIMIZATION, CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF *Rhizopus stolonifer* PHYTASE IN THE HYDROLYSIS OF PHYTATE IN ANIMAL FEED.

Paulo Sérgio Monteiro<sup>1</sup>; Ricardo Rodrigues de Melo<sup>2</sup>; Murillo Peterlini Tavares<sup>3</sup>; Daniel Luciano Falkoski<sup>4</sup>;

Valéria Monteze Guimarães<sup>5</sup>; Olinto Liparini Pereira<sup>6</sup>; Sebastião Tavares de Rezende<sup>7\*</sup>.

#### RESUMO

Neste estudo, a metodologia de superfície de resposta (MSR) foi utilizada para a otimização da produção de fitase de um isolado de *Rhizopus stolonifer*, que resultou em aumento de 9 vezes na atividade enzimática inicial. A fitase apresentou pH ótimo variando de 5,0-5,5, temperatura ótima de 65 °C e  $t_{1/2}$  de 2,8 h a 40 °C. A enzima seguiu a cinética de *Michaelis-Menten*, resultando em  $K_{M\ app}$  e  $V_{max\ app}$  de 0,692 mM e 0,780  $\mu\text{mol min}^{-1}$ , respectivamente. A fitase também mostrou ser eficiente na hidrólise de fitato em ração animal, liberando 5,14  $\mu\text{mol PO}_4^{3-}\ \text{mL}^{-1}$  após 5 h de tratamento, indicando grande potencial para aplicação industrial.

**Palavras-chave:** Fosfatase, Ácido Fítico, Fitato

#### ABSTRACT

In this study, response surface methodology (RSM) was utilized for optimization of phytase production of an isolate of *Rhizopus stolonifer*, which resulted in a 9-times increase in the initial enzymatic activity. Phytase presented optimum pH ranging from 5.0-5.5, optimum temperature of 65 °C and  $t_{1/2}$  of 2.8 h at 40 °C. It followed Michaelis-Menten kinetics, resulting in  $K_{M\ app}$  and  $V_{max\ app}$  of 0.692 mM and 0.780  $\mu\text{mol min}^{-1}$ , respectively. Phytase also showed to be efficient for phytate hydrolysis in animal feed, liberating 5.14  $\mu\text{mol PO}_4^{3-}\ \text{mL}^{-1}$  after 5 h of treatment, indicating great potential for industrial application.

**Key words:** Phosphatase; Phytic acid; Phytate.

<sup>1</sup>Bacharel em Ciência e Tecnologia de Laticínios, DSc Bioquímica Agrícola, Prof. Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Viçosa, Rio Paranaíba, MG, 38840-000;

<sup>2</sup>Bioquímico, Estudante de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 13083-862;

<sup>3</sup>Estudante de Bioquímica, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 36570-000;

<sup>4</sup>Agrônomo, DSc Bioquímica Agrícola, Bolsista Pós-Doutorado, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 36570-000;

<sup>5</sup>Farmacêutica, DSc Biologia Molecular, Prof. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 36570-000;

<sup>6</sup>Agrônomo, DSc Fitopatologia, Prof. Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 36570-000;

<sup>7</sup>Farmacêutico, DSc Biologia Molecular, Prof. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências Biológicas, Laboratório de Análises Bioquímicas, BIOAGRO, Campus universitário, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 36570-000, e-mail: srezende@ufv.br

## INTRODUÇÃO

O ácido fítico representa entre 60 e 90 % do conteúdo total de fósforo em cereais, leguminosas, nozes e sementes oleaginosas. A maior parte do ácido fítico das sementes se encontra na forma de fitatos, sais resultantes da complexação do ácido fítico com cátions, os quais atuam como fonte de reserva de fósforo (BOHN et al., 2008). No entanto, o ácido fítico atua como um fator antinutricional em animais monogástricos, incluindo o homem, devido a sua capacidade de complexar minerais tais como cálcio, magnésio, ferro e zinco, e de interagir com proteínas, diminuindo a biodisponibilidade de minerais e de proteínas nutricionalmente importantes (AZEKE et al., 2011; ESCOBIN-MOPERA et al., 2012).

Além do seu caráter antinutricional, o fósforo fítico não é absorvido por animais monogástricos, tais como aves, suínos e peixes, uma vez que estes não apresentam, ou apresentam em quantidades insuficientes, as enzimas que catalisam a hidrólise do ácido fítico (VATS et al., 2009). Assim, fósforo inorgânico, um mineral não renovável e de alto custo, é, geralmente, suplementado nas dietas de animais monogástricos, visando atender suas necessidades de fósforo. Dessa forma, o fitato não hidrolisado e excretado pelos animais, contribui para a poluição ambiental, principalmente nas áreas de intensiva criação de animais (CHERYAN, 1980, WANG et al., 2007).

As fitases ou *mio*-inositol hexaquisfosfato fosfohidrolases (EC 3.1.3.8, EC 3.1.3.26 e EC 3.1.3.72) são fosfatases que catalisam a hidrólise de fitato, resultando na formação de isômeros *mio*-inositol pentaquis-, tetraquis-, tris-, bis- e monofosfato, bem como na liberação de fósforo e possíveis minerais complexados (BOHN et al., 2008; AZEKE et al., 2011).

As fitases podem ser produzidas industrialmente por processos biotecnológicos a partir de fontes de origem animal e vegetal. No entanto, a biossíntese microbiana é a forma mais promissora de produção da enzima. Apesar da capacidade de produção dessas enzimas por bactérias e leveduras, os fungos são mais utilizados porque suas fitases apresentam maior estabilidade térmica e maior estabilidade em uma maior faixa de pH, quando comparadas com as fitases de origem vegetal (BOHN et al., 2008).

Embora as fitases apresentem elevado potencial para bioconversão de fitato, para sua utilização industrial é necessária a obtenção de elevadas atividades enzimáticas e aumento dos rendimentos de produção. Portanto, além de estudos para obtenção de enzimas com características desejáveis, existe a necessidade do desenvolvimento de processos que proporcionem maiores rendimentos industriais (ZHANG et al., 2010). De um modo geral os microrganismos apresentam baixa produção de fitases, sendo que a utilização de processos otimizados pode contribuir para uma maior eficiência dos processos (BHAVSAR et al., 2012).

A utilização de ferramentas estatísticas apresenta-se como uma alternativa econômica e eficaz, as quais possibilitam o estudo das interações entre os fatores avaliados, resultando na previsão das condições ótimas de processo. Neste contexto, a metodologia de superfície de resposta (MSR) é a ferramenta estatística mais utilizada para otimização de bioprocessos e tem-se tornado uma ferramenta de grande importância para a produção de enzimas (MITTAL et al., 2011).

A produção de fitases pode ser influenciada pelos componentes do meio de cultivo, tais como, fonte de carbono, nitrogênio, íons metálicos, surfactantes, além

de variáveis físicas como pH, temperatura, concentração de inóculo e tempo de incubação (GUNASHREE & VENKATESWARAN, 2008; BHAVSAR et al., 2011).

Esse trabalho descreve o isolamento de fungos produtores de fitases, a otimização da produção de fitase por *Rhizopus stolonifer* e sua caracterização quanto às suas propriedades cinéticas e capacidade de hidrólise de fitato em ração animal.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Isolamento de fungos

Os fungos foram isolados a partir de amostras de milho (*Zea mays* L.), arroz (*Oriza sativa* L.), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), amendoim (*Arachis hypogea* L.) e noz macadâmia (*Macadamia integrifolia*), utilizando o método do papel de filtro (*Blotter test*), conforme descrito pela INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (1976). Foram utilizadas caixas plásticas do tipo *gerbox*, de tamanho de 11 x 11 x 3,5 cm, previamente higienizadas com solução de etanol 70 %. No fundo das caixas, foram colocadas duas folhas de papel de filtro esterilizadas e umedecidas com água destilada estéril. Posteriormente, as amostras foram introduzidas sobre as folhas de papel, sendo as caixas incubadas em estufa tipo BOD, a 28 °C, durante 5 dias. Após o período de incubação, para a obtenção de culturas puras, as colônias desenvolvidas foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura ágar batata dextrose (BDA) (Difco, Detroit, MI, USA), previamente esterilizado a 121 °C durante 20 min. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa, a 28 °C, durante 7 dias. Os fungos obtidos foram identificados pelo Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.

A indução da produção de fitases foi realizada em meio de cultura líquido, de acordo com GUNASHREE & VENKATESWARAN (2008), com modificações. Para obtenção do extrato enzimático, cada isolado foi repicado em meio BDA e incubado, a 28 °C, durante 7 dias. Em seguida, a superfície das placas foi lavada com água deionizada estéril, contendo 0,25 % (v/v) de Tween 20. A suspensão de esporos obtida foi filtrada em filtro com gaze estéril e uma alíquota da suspensão foi diluída ( $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$  vezes) para contagem dos esporos em câmara de *Neubauer*.

Após a determinação da concentração de esporos, um volume pré-determinado da suspensão foi transferido para frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio líquido estéril [infusão de batata ( $200 \text{ g L}^{-1}$ ); sacarose ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ); peptona ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ); Tween 20 ( $2,5 \text{ mL L}^{-1}$ ) e  $\text{CaCl}_2$  ( $0,10 \text{ g L}^{-1}$ ), em pH 5,5]. Os frascos de meio líquido com uma concentração de  $10^5$  esporos  $\text{mL}^{-1}$  foram incubados em agitador, a 28 °C, sob agitação de 180 rpm. Em intervalos de 24 h, alíquotas do meio foram coletadas, centrifugadas ( $10.000 \times g$ , 5 min, a 4 °C) e o sobrenadante resultante foi utilizado para o ensaio de atividade enzimática.

### Determinação da atividade enzimática

A atividade de fitase foi determinada medindo-se o fosfato inorgânico liberado a partir do substrato fitato de sódio da Sigma Chemical Company (St Louis, MO, USA). Para o ensaio foram utilizados 0,6 mL de fitato de sódio 1,5 mM, em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) e 0,15 mL de extrato enzimático. A reação foi conduzida em banho-maria a 50 °C e após 30 min foi paralisada pela adição de 0,25 mL da solução de ácido tricloroacético 10 % (v/v). Na

sequência foi adicionado, aos tubos de ensaio, 1 mL de reativo colorimétrico (TAUSSKY & SHORR, 1953), e realizadas as leituras espectrofotométricas a 700 nm. Os valores de absorvância obtidos foram correlacionados com uma curva padrão construída na faixa de 0 a 1  $\mu\text{mol}$  de fosfato. Todas as análises de atividade enzimática foram realizadas em triplicata. Uma unidade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para a liberação de 1  $\mu\text{mol}$  de fosfato inorgânico por min, sob as condições de ensaio.

### Otimização das condições de cultivo

A otimização da produção de fitase foi realizada por meio da MSR. A avaliação das condições de cultivo visou verificar, simultaneamente, o efeito de cada variável na produção de fitase, e, posteriormente, estabelecer uma condição ótima de cultivo. No primeiro experimento foi realizado um delineamento fatorial completo  $2^5$ , com cinco variáveis [sacarose (A), peptona (B), Tween 20 (C), pH inicial (D) e tempo de cultivo (E)] em dois níveis (mínimo e máximo), codificados como “-1” e “+1”, respectivamente, e três repetições no ponto central, o qual foi codificado como “0” (Tabela 1).

**Tabela 1** – Variáveis e níveis utilizados no experimento fatorial  $2^5$  para otimização da produção de fitase por *R. stolonifer*.

Fator	Mín	PC	Máx
	-1	0	+1
Sacarose ( $\text{g L}^{-1}$ )	5	12,5	20
Peptona ( $\text{g L}^{-1}$ )	2	6	10
Tween 20 ( $\text{mL L}^{-1}$ )	1	3	5
pH	4	5	6
Tempo de cultivo (h)	24	48	72

Mín: valor mínimo, PC: ponto central, Max: valor máximo.

Com base nos resultados do delineamento fatorial completo, foi realizado um delineamento composto central (DCC), onde cada variável foi avaliada em cinco níveis, codificados como “- $\alpha$ ”, “-1”, “0”, “+1” e “+ $\alpha$ ”, e cinco repetições no ponto central.

Em todos os ensaios do delineamento fatorial completo e no DCC foram mantidos constantes a infusão de batata ( $200 \text{ g batata L}^{-1}$ ) e a concentração de  $\text{CaCl}_2$  ( $0,10 \text{ g L}^{-1}$ ). Todos os ensaios foram realizados em agitador, a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ , sob agitação de 180 rpm, sendo os delineamentos e a superfície de resposta dos dados realizados

por meio do programa Minitab 14.

### Efeito do pH e temperatura na atividade enzimática

O efeito do pH na atividade enzimática foi determinado utilizando-se as seguintes soluções tampão: glicina-HCl  $0,2 \text{ M}$  (pH 2,0-3,5), acetato de sódio  $0,2 \text{ M}$  (pH 4,0-5,5), ácido 2-morfolinoetanosulfônico (MES)  $0,2 \text{ M}$  (pH 6,0-6,5) e Tris-HCl  $0,2 \text{ M}$  (pH 7,0-8,0). A atividade enzimática foi determinada conforme ensaio padrão e todos os ensaios foram realizados em triplicata.

O efeito da temperatura na atividade enzimática foi determinado na faixa de temperatura de 20 a 80 °C, conforme o ensaio padrão de atividade enzimática. Para avaliação da termoestabilidade, o extrato enzimático bruto foi pré-incubado a 40 e 50 °C durante 6 e 3,3 h, respectivamente. Em intervalos pré-determinados, alíquotas dos extratos foram coletadas e resfriadas a 4 °C. Na sequência foi determinada a atividade enzimática relativa de cada alíquota, por meio da correlação com a atividade enzimática da enzima não submetida aos tratamentos. Os valores de  $t_{1/2}$  da enzima, para cada temperatura, foram calculados pelas curvas de velocidade em função do tempo de incubação, utilizando o programa Curve Expert 1.3. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos,  $K_M$  aparente ( $K_{M,app}$ ) e  $V_{max}$  aparente ( $V_{max,app}$ ), foram obtidos por meio de ensaios de atividade enzimática realizados conforme ensaio padrão, utilizando-se concentrações crescentes (0,1 a 2,0 mM) de fitato de sódio. O gráfico de *Lineweaver-Burk* foi construído utilizando o programa Curve Expert 1.3.

### Avaliação da hidrólise de fitato em ração animal

O efeito da fitase na hidrólise do ácido fítico foi avaliado em uma ração comercial para suínos, composta por calcário calcítico, cloreto de sódio, farelo de glúten de milho 21, farelo de soja, farelo de trigo, farinha de carne e ossos de bovino, fosfato bicálcico, milho integral moído, premix mineral e premix vitamínico. Amostras de 1 g de ração foram esterilizadas (121 °C durante 20 min) e suspendidas em 5 mL de tampão acetato de sódio (0,2 M, pH 5,0) em frascos do tipo Falcon com capacidade de 50 mL. As

suspensões foram adicionadas de um volume pré-determinado de extrato enzimático bruto para se obter 4 U mL<sup>-1</sup> de atividade enzimática no meio. Como controle foi utilizado a mesma suspensão da ração animal, contendo o extrato enzimático fervido a 100 °C durante 15 min.

Os frascos foram incubados em agitador a 40 °C e 200 rpm, sendo as amostras de teste e controle coletadas em intervalos pré-determinados em um tempo total de 6 h. As amostras foram imediatamente resfriadas a 4 °C, centrifugadas (10000 x g, 10 min, a 4 °C) e o sobrenadante foi utilizado para a quantificação de fósforo liberado, de acordo com o ensaio padrão de atividade enzimática. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Isolamento de fungos

Foram obtidos oito isolados de fungos a partir dos grãos e sementes avaliados, sendo seis isolados de *R. stolonifer*, obtidos a partir das amostras de amendoim; um isolado de *A. niger*, obtido a partir de uma amostra de feijão e um isolado de *R. stolonifer*, obtido a partir da macadâmia. Nas demais amostras de arroz, milho e feijão não foi observado o crescimento de fungos, sugerindo que as amostras possam ter sido tratadas com algum antifúngico. O isolado de *R. stolonifer* obtido da macadâmia apresentou maior atividade de fitase (0,07 U mL<sup>-1</sup>) em apenas 36 h de cultivo e então foi selecionado para a etapa de otimização da produção de fitase. Além disso, dentre os isolados obtidos, esse produziu a fitase com maior termoestabilidade (dados não mostrados).

### Otimização das condições de cultivo

A Tabela 2 apresenta a matriz do

delineamento fatorial completo  $2^5$  com os valores reais e codificados, bem como, as respostas para a atividade enzimática. A máxima atividade enzimática de  $0,14 \text{ U mL}^{-1}$  foi observada no ensaio número 5. A produção de fitase foi influenciada significativamente pelos fatores sacarose, peptona, Tween 20 e tempo de cultivo, enquanto o pH não apresentou efeito significativo, em nível de 5 % de significância (Tabela 3). A produção de fitase foi influenciada positivamente, em função do aumento da concentração de Tween 20, do aumento simultâneo das concentrações de sacarose e peptona e com a redução do tempo de cultivo. No entanto, a produção enzimática também foi influenciada, positivamente, pelas menores concentrações individuais de sacarose e peptona. De acordo com os resultados obtidos por SINGH &

SATYANARAYANA (2008b) na otimização da produção de fitase por *Sporotrichum thermophile* em meio líquido, o aumento da atividade foi observado somente em função das baixas concentrações de peptona no meio de cultivo.

A sacarose, como fonte de carbono em meios de cultivo, é considerada um bom indutor para a produção de fitases fúngicas, enquanto monossacarídeos como glicose e frutose exercem ação repressora na síntese da enzima (BOGAR et al., 2003; GUNASHREE & VENKATESWARAN, 2008). VATS & BANERJEE (2002) avaliaram o efeito de diferentes fontes de carbono na produção de fitases de *A. niger* van Teighem e concluíram que sacarose foi a fonte mais significativa para o aumento da produção da enzima.

**Tabela 2** - Matriz do experimento fatorial completo 2<sup>5</sup> para otimização da produção de fitase por *R. stolonifer*.

Ensaios	Sacarose (g L <sup>-1</sup> )	Peptona (g L <sup>-1</sup> )	Tween 20 (mL L <sup>-1</sup> )	pH	Tempo de cultivo (h)	Atividade enzimática (U mL <sup>-1</sup> )
1	5,0 (-1)	2,0 (-1)	1,0 (-1)	4,0 (-1)	24 (-1)	0,105
2	20,0 (1)	2,0 (-1)	1,0 (-1)	4,0 (-1)	24 (-1)	0,005
3	5,0 (-1)	10,0 (1)	1,0 (-1)	4,0 (-1)	24 (-1)	0,057
4	20,0 (1)	10,0 (1)	1,0 (-1)	4,0 (-1)	24 (-1)	0,005
5	5,0 (-1)	2,0 (-1)	5,0 (1)	4,0 (-1)	24 (-1)	0,140
6	20,0 (1)	2,0 (-1)	5,0 (1)	4,0 (-1)	24 (-1)	0,018
7	5,0 (-1)	10,0 (1)	5,0 (1)	4,0 (-1)	24 (-1)	0,031
8	20,0 (1)	10,0 (1)	5,0 (1)	4,0 (-1)	24 (-1)	0,027
9	5,0 (-1)	2,0 (-1)	1,0 (-1)	6,0 (1)	24 (-1)	0,066
10	20,0 (1)	2,0 (-1)	1,0 (-1)	6,0 (1)	24 (-1)	0,013
11	5,0 (-1)	10,0 (1)	1,0 (-1)	6,0 (1)	24 (-1)	0,012
12	20,0 (1)	10,0 (1)	1,0 (-1)	6,0 (1)	24 (-1)	0,015
13	5,0 (-1)	2,0 (-1)	5,0 (1)	6,0 (1)	24 (-1)	0,120
14	20,0 (1)	2,0 (-1)	5,0 (1)	6,0 (1)	24 (-1)	0,091
15	5,0 (-1)	10,0 (1)	5,0 (1)	6,0 (1)	24 (-1)	0,034
16	20,0 (1)	10,0 (1)	5,0 (1)	6,0 (1)	24 (-1)	0,042
17	5,0 (-1)	2,0 (-1)	1,0 (-1)	4,0 (-1)	72 (1)	0,005
18	20,0 (1)	2,0 (-1)	1,0 (-1)	4,0 (-1)	72 (1)	0,005
19	5,0 (-1)	10,0 (1)	1,0 (-1)	4,0 (-1)	72 (1)	0,005
20	20,0 (1)	10,0 (1)	1,0 (-1)	4,0 (-1)	72 (1)	0,005
21	5,0 (-1)	2,0 (-1)	5,0 (1)	4,0 (-1)	72 (1)	0,088
22	20,0 (1)	2,0 (-1)	5,0 (1)	4,0 (-1)	72 (1)	0,023
23	5,0 (-1)	10,0 (1)	5,0 (1)	4,0 (-1)	72 (1)	0,022
24	20,0 (1)	10,0 (1)	5,0 (1)	4,0 (-1)	72 (1)	0,061
25	5,0 (-1)	2,0 (-1)	1,0 (-1)	6,0 (1)	72 (1)	0,005
26	20,0 (1)	2,0 (-1)	1,0 (-1)	6,0 (1)	72 (1)	0,005
27	5,0 (-1)	10,0 (1)	1,0 (-1)	6,0 (1)	72 (1)	0,005
28	20,0 (1)	10,0 (1)	1,0 (-1)	6,0 (1)	72 (1)	0,005
29	5,0 (-1)	2,0 (-1)	5,0 (1)	6,0 (1)	72 (1)	0,005
30	20,0 (1)	2,0 (-1)	5,0 (1)	6,0 (1)	72 (1)	0,005
31	5,0 (-1)	10,0 (1)	5,0 (1)	6,0 (1)	72 (1)	0,005
32	20,0 (1)	10,0 (1)	5,0 (1)	6,0 (1)	72 (1)	0,005
33 (C)	12,5 (0)	6,0 (0)	3,0 (0)	5,0 (0)	48 (0)	0,085
34 (C)	12,5 (0)	6,0 (0)	3,0 (0)	5,0 (0)	48 (0)	0,075
35 (C)	12,5 (0)	6,0 (0)	3,0 (0)	5,0 (0)	48 (0)	0,074

**Tabela 3** – Efeitos das variáveis sacarose (A), peptona (B), Tween 20 (C), pH (D) e tempo (E) na produção fitase por *R. stolonifer*.

Termos	Efeito	p-valor
A	-24,03	0,027*
B	-22,64	0,036*
C	26,89	0,015*
D	-11,34	0,273
E	-36,07	0,002*
A*B	22,79	0,035*
A*C	2,51	0,805
A*D	15,04	0,151
A*E	20,78	0,053
B*C	-10,15	0,325
B*D	-0,65	0,949
B*E	19,14	0,072
C*D	-4,28	0,675
C*E	-2,64	0,796
D*E	-12,91	0,214
R <sup>2</sup>	0,73	

\*Fatores e interações significativas em nível de 5 % de significância.

A adição de agentes surfactantes aos meios de cultivo líquido tem resultado em aumento na produção de fitases, provavelmente em função da formação de *pellets* menores durante o desenvolvimento dos microrganismos, além da possível alteração da permeabilidade celular, o que pode facilitar a liberação das enzimas pelas células (AL-ASHEH & DUVNJAK, 1994; NAMPOOTHIRI et al., 2004). GUNASHREE & VENKATESWARAN (2008) demonstraram que o uso de Tween 20 em meio líquido

influenciou na formação de *pellets* menores durante o desenvolvimento de *A. niger* CFR 335, resultando em aumento da produção de fitase. Em um trabalho similar, SINGH & SATYANARAYANA (2008a), utilizaram Tween 20 e Tween 80 em meio líquido e também obtiveram aumento significativo da produção de fitase por *S. thermophile*.

As variáveis sacarose ( $x_1$ ), peptona ( $x_2$ ), Tween 20 ( $x_3$ ) e tempo de cultivo ( $x_4$ ) foram então avaliadas por meio de um DCC (Tabela 4).

**Tabela 4** – Variáveis e níveis utilizados no delineamento composto central para otimização da produção de fitase por *R. stolonifer*.

Fator	Níveis				
	- $\alpha$	-1	0	+1	+ $\alpha$
Sacarose (g L <sup>-1</sup> )	0,0	2,5	5,0	7,5	10,0
Peptona (g L <sup>-1</sup> )	0,0	1,0	2,0	3,0	4,0
Tween 20 (mL L <sup>-1</sup> )	2,5	3,75	5,0	6,25	7,5
Tempo de cultivo (h)	10,0	17,5	25,0	32,5	40,0

A tabela 5 apresenta a matriz do delineamento experimental das quatro variáveis, com os valores reais e codificados, bem como, as respostas para a atividade enzimática. De acordo com a análise de regressão (Tabela 6), a produção de fitase foi influenciada, significativamente, pelos fatores sacarose, tempo de cultivo e pelas interações entre sacarose e peptona e, entre sacarose e

tempo de cultivo, ao nível de 5 % de significância. Os coeficientes da regressão para a equação polinomial e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foram calculados (Tabela 6). O modelo apresentado foi adequado, mostrando regressão significativa e baixos valores residuais com falta de ajuste não significativo.

**Tabela 5** - Matriz do delineamento composto central para otimização da produção de fitase por *R. stolonifer*.

Ensaios	Sacarose (g L <sup>-1</sup> )	Peptona (g L <sup>-1</sup> )	Tween 20 (mL L <sup>-1</sup> )	Tempo de cultivo (h)	Atividade enzimática (U mL <sup>-1</sup> )
1	2,5 (-1)	1,0 (-1)	3,75 (-1)	17,5 (-1)	0,093
2	7,5 (+1)	1,0 (-1)	3,75 (-1)	17,5 (-1)	0,026
3	2,5 (-1)	3,0 (+1)	3,75 (-1)	17,5 (-1)	0,120
4	7,5 (+1)	3,0 (+1)	3,75 (-1)	17,5 (-1)	0,037
5	2,5 (-1)	1,0 (-1)	6,25 (+1)	17,5 (-1)	0,094
6	7,5 (+1)	1,0 (-1)	6,25 (+1)	17,5 (-1)	0,020
7	2,5 (-1)	3,0 (+1)	6,25 (+1)	17,5 (-1)	0,089
8	7,5 (+1)	3,0 (+1)	6,25 (+1)	17,5 (-1)	0,019
9	2,5 (-1)	1,0 (-1)	3,75 (-1)	32,5 (+1)	0,530
10	7,5 (+1)	1,0 (-1)	3,75 (-1)	32,5 (+1)	0,140
11	2,5 (-1)	3,0 (+1)	3,75 (-1)	32,5 (+1)	0,260
12	7,5 (+1)	3,0 (+1)	3,75 (-1)	32,5 (+1)	0,140
13	2,5 (-1)	1,0 (-1)	6,25 (+1)	32,5 (+1)	0,650
14	7,5 (+1)	1,0 (-1)	6,25 (+1)	32,5 (+1)	0,070
15	2,5 (-1)	3,0 (+1)	6,25 (+1)	32,5 (+1)	0,330
16	7,5 (0,5)	3,0 (+1)	6,25 (+1)	32,5 (+1)	0,290
17	0,0 (-α)	2,0 (0)	5,00 (0)	25,0 (0)	0,220
18	10,0 (+α)	2,0 (0)	5,00 (0)	25,0 (0)	0,130
19	5,0 (0)	0,0 (-α)	5,00 (0)	25,0 (0)	0,100
20	5,0 (0)	4,0 (+α)	5,00 (0)	25,0 (0)	0,260
21	5,0 (0)	2,0 (0)	2,50 (-α)	25,0 (0)	0,100
22	5,0 (0)	2,0 (0)	7,50 (+α)	25,0 (0)	0,098
23	5,0 (0)	2,0 (0)	5,00 (0)	10,0 (-α)	0,065
24	5,0 (0)	2,0 (0)	5,00 (0)	40,0 (+α)	0,460
25 (C)	5,0 (0)	2,0 (0)	5,00 (0)	25,0 (0)	0,140
26 (C)	5,0 (0)	2,0 (0)	5,00 (0)	25,0 (0)	0,140
27 (C)	5,0 (0)	2,0 (0)	5,00 (0)	25,0 (0)	0,130
28 (C)	5,0 (0)	2,0 (0)	5,00 (0)	25,0 (0)	0,130
29 (C)	5,0 (0)	2,0 (0)	5,00 (0)	25,0 (0)	0,130

A produção de fitase foi influenciada, positivamente, pelo tempo de cultivo e pela interação entre sacarose e peptona, e, negativamente, pela sacarose e pela interação entre sacarose e tempo de cultivo.

Com base nesses resultados, pode ser sugerido que um aumento na concentração de sacarose no meio levou a menores valores de atividade enzimática, enquanto um maior tempo de cultivo proporcionou maiores

valores. Verifica-se também que a variável tempo de cultivo apresentou efeito mais pronunciado na variável resposta, quando comparado com o efeito da concentração de sacarose no meio.

A maior atividade enzimática foi obtida nas condições do ensaio número 13, na qual obteve-se um aumento de 9,3 vezes em relação à atividade de 0,07 U mL<sup>-1</sup>, obtida nas condições iniciais de cultivo. BHAVSAR et al. (2011) realizaram a otimização da produção de fitase por *A. niger* NCIM 563 em meio sólido contendo resíduos de torta de

algodão e de amendoim e obtiveram aumento de quatro vezes em relação à produção enzimática inicial. Resultado similar foi obtido por SINGH & SATYANARAYANA (2008b) na otimização da produção de fitase por *S. thermophile* em meio líquido, a qual resultou em aumento de 3,7 vezes na produção enzimática. BOGAR et al. (2003) avaliaram o efeito de diferentes fontes de carbono (farelo de canola, milho moído, farelo de trigo e farelo de soja) na produção de fitase por *A. ficcum* NRRL 3135 e obtiveram aumento de 1,6 vezes após otimização da produção.

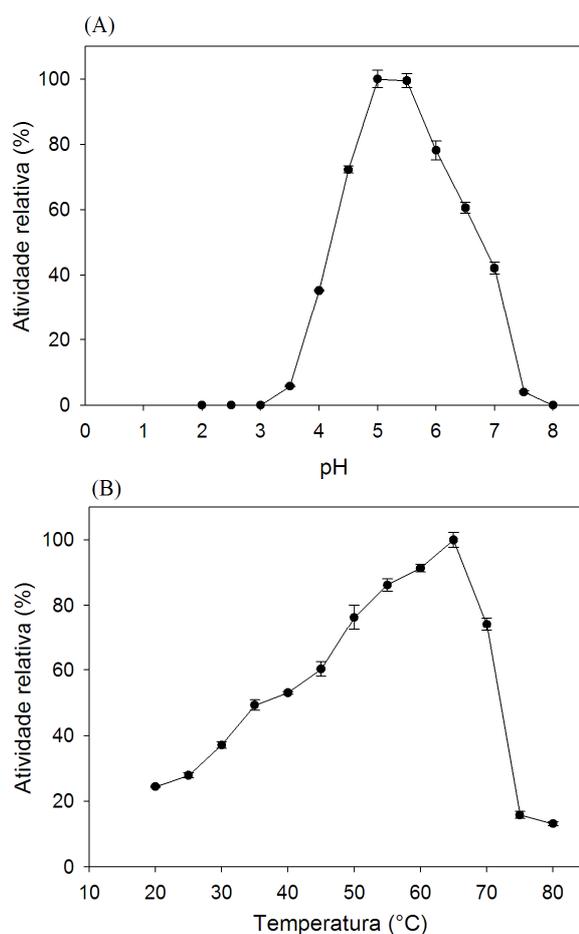
**Tabela 6** – Coeficientes de regressão para otimização da produção fitase por *R. stolonifer*.

Coeficiente	Atividade enzimática (U mL <sup>-1</sup> )	p-valor
$\beta_0$	0,134000	0,003
$\beta_1$	-0,066833	0,002*
$\beta_2$	-0,000750	0,966
$\beta_3$	0,008833	0,620
$\beta_4$	0,112583	0,000*
$\beta_{11}$	0,010687	0,534
$\beta_{22}$	0,011937	0,488
$\beta_{33}$	-0,008312	0,628
$\beta_{44}$	0,032562	0,073
$\beta_{12}$	0,049875	0,035*
$\beta_{13}$	-0,006500	0,765
$\beta_{14}$	-0,052250	0,028*
$\beta_{23}$	0,007875	0,718
$\beta_{24}$	-0,025125	0,259
$\beta_{34}$	0,020250	0,359
R <sup>2</sup>	0,84	

#### Efeito do pH e temperatura na atividade enzimática

A fitase de *R. stolonifer* apresentou pH ótimo na faixa de 5,0 a 5,5, com redução significativa da atividade enzimática em pH abaixo de 4,0 e acima de 7,0 (Figura 1A). Esses valores estão de acordo com os resultados encontrados para um grande número de fitases fúngicas. BOYCE &

WALSH (2007) caracterizaram uma fitase de *Mucor hiemalis* Wehmer, a qual apresentou pH ótimo na faixa de 5,0 a 5,5 e redução significativa da atividade enzimática a partir de pH 7,0. Resultado similar foi encontrado por FUGTHONG et al. (2010) na caracterização da fitase recombinante de *Eupenicillium parvum* (BCC 17694), a qual apresentou pH ótimo igual 5,5 e ausência de atividade em pH 7,0.



**Figura 1.** Efeito do pH (A) e temperatura (B) na atividade enzimática da fitase de *R. stolonifer*. A atividade enzimática foi expressa como a média  $\pm$  SD (n = 3).

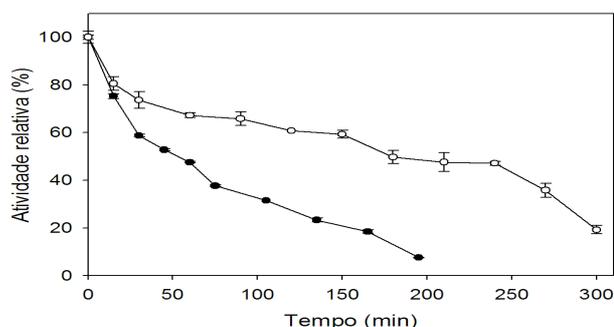
A fitase de *R. stolonifer* apresentou temperatura ótima de 65 °C (Figura 1B), resultado semelhante aos encontrados para outras fitases fúngicas (CASEY & WASLSH, 2003; WANG et al., 2007). As fitases geralmente apresentam elevada atividade enzimática na faixa de temperatura de 50 a 70 °C e temperatura ótima na faixa de 45 a 60 °C (VATS & BANERJEE, 2004). Em relação à termoestabilidade enzimática, a fitase de *R. stolonifer* manteve mais de 60 % da atividade inicial após 2 h a 40 °C, com  $t_{1/2}$  de 2,8 h. Na temperatura de 50 °C, a enzima manteve mais de 40 % da atividade inicial após 1 h, com  $t_{1/2}$  de 50 min (Figura 2).

A elevada termoestabilidade é uma

das características mais importantes em relação ao uso industrial de fitases, em função das elevadas temperaturas adotadas nos processos industriais de fabricação de rações animais (Lei et al., 2007). No entanto, as fitases podem ser incorporadas às dietas animais em uma etapa anterior ao processo de peletização ou de extrusão das rações, evitando a perda da atividade enzimática em função de elevadas temperaturas (CAIN & GARLING, 1995; CAO et al., 2007). NWANNA et al. (2008) obtiveram significativa redução da concentração de fitato em dietas para peixes, tratadas com fitase comercial antes do processo de secagem. Na avaliação do efeito do pré-tratamento de dietas animais

com fitase de *A. niger* van Teighem, VATS et al. (2009) obtiveram aumento significativo da concentração de fósforo no meio. Em um trabalho semelhante, HUGHES et al. (1998) concluíram que o tratamento de dietas para peixes com fitase comercial, nas proporções

de 1000 e 2300 U de fitase  $\text{kg}^{-1}$  de ração, foi suficiente para manter a concentração de fósforo vertebral semelhante à concentração encontrada nos peixes tratados com dietas controle, as quais foram adicionadas de fósforo inorgânico.

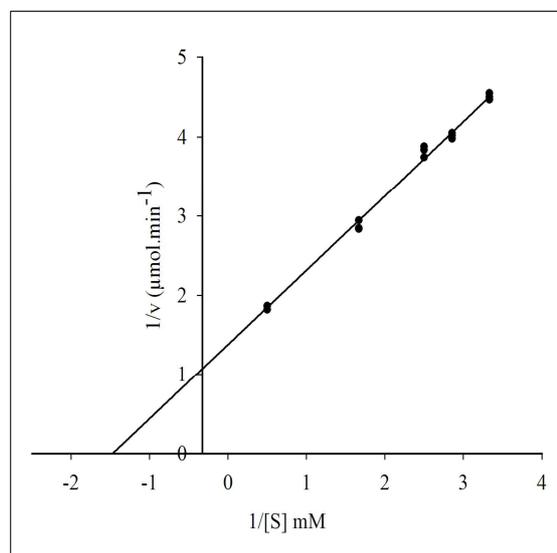


**Figura 2.** Termostabilidade da fitase de *R. stolonifer* a 40 °C (o) e 50 °C (●). A atividade enzimática foi expressa como a média  $\pm$  SD (n = 3).

### Determinação dos parâmetros cinéticos

As reações de hidrólise do fitato pela fitase de *R. stolonifer* seguiram a cinética de *Michaelis-Menten*, resultando em valores de  $K_{M,app}$  e  $V_{max,app}$  de 0,692 mM e 0,780  $\mu\text{mol}$

$\text{min}^{-1}$ , respectivamente, calculados por meio do gráfico de *Lineweaver-Burk* (Figura 3). Esses valores estão de acordo com os encontrados para outras fitases fúngicas (BOYCE & WALSH, 2007, FUGTHONG et al., 2010, ZHANG et al., 2010).

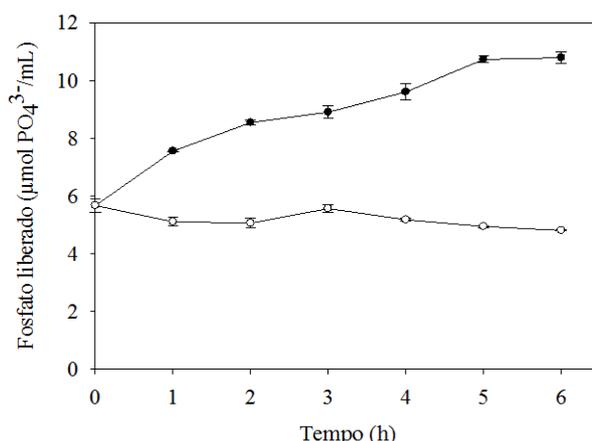


**Figura 3.** Gráfico de *Lineweaver-Burk* para fitase de *R. stolonifer*.

### Avaliação da hidrólise de fitato em ração animal

A fitase de *R. stolonifer* foi efetiva na hidrólise de fitato e outros compostos fosfatados presentes nas amostras de ração animal. Após 5 h de tratamento das amostras com a fitase, foram liberados 5,14  $\mu\text{mol}$  de  $\text{PO}_4^{3-}$   $\text{mL}^{-1}$ . Em um trabalho semelhante, VATS et al. (2009) utilizaram uma fitase de *A. niger* van Teighem para a desfosforilação do ácido fítico em ração animal e obtiveram a liberação máxima de 0,048  $\mu\text{mol}$   $\text{PO}_4^{3-}$   $\text{mL}^{-1}$ , após 48 h à 55 °C. Na catálise enzimática da fitase de *R. stolonifer*, considerando a concentração inicial de fosfato nas amostras controle, a concentração final de fosfato no meio, após 5 h, foi de 10,02  $\mu\text{mol}$  de  $\text{PO}_4^{3-}$   $\text{mL}^{-1}$ . A partir dessa concentração, a liberação

de fosfato nas amostras foi estabilizada, possivelmente, devido à inibição da enzima pela elevada concentração de fosfato no meio (Figura 4). Vários pesquisadores têm mostrado que as fitases são inibidas por elevadas concentrações de fosfato. SINGH & SATYANARAYANA (2009) avaliaram o efeito da concentração de fosfato inorgânico na atividade enzimática da fitase de *S. thermophile* e observaram que a enzima foi parcialmente inibida na concentração de 5 mM de fosfato no meio de reação. De acordo com os resultados obtidos, a fitase de *R. stolonifer* apresenta potencial para ser utilizada em rações animais, possibilitando a eficiente liberação de fósforo e de possíveis minerais complexados.



**Figura 4.** Liberação de fosfato *in vitro* em ração animal a 40 °C. Hidrólise enzimática (●) e controle (○). A atividade enzimática foi expressa como a média  $\pm$  SD (n = 3).

## CONCLUSÕES

O uso da metodologia de superfície de resposta apresentou-se como uma ferramenta eficaz para a otimização da produção de fitase por *Rhizopus stolonifer*, resultando em aumento de nove vezes na produção enzimática. A caracterização cinética e bioquímica mostrou que a fitase é semelhante a outras fitases fúngicas. No entanto, a enzima mostrou-se eficiente na liberação de fósforo em ração animal,

apresentando elevado potencial para aplicação industrial.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo auxílio financeiro e ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-ASHEH, S.; DUVNJAK, Z. Effect of glucose concentration on the biomass and phytase productions and the reduction of phytic acid content in canola meal by *Aspergillus carbonarius* during a solid-state fermentation process. **Biotechnology Progress**, v.10, p.353-359, 1994.
- AZEKE, M.A.; GREINER, R.; JANY, K. Purification and characterization of two intracellular phytases from the tempeh fungus *Rhizopus oligosporus*. **Journal of Food Biochemistry**, v.35, n.1, p.213-227, 2011.
- BHAVSAR, K.; GUJAR, P.; SHAH, P. et al. Combinatorial approach of statistical optimization and mutagenesis for improved production of acidic phytase by *Aspergillus niger* NCIM 563 under submerged fermentation condition. **Applied Microbiology and Biotechnology** (2012), doi:10.1007/s00253-012-3965-8.
- BHAVSAR, K.; KUMAR, V. R.; KHIRE, J. M. High level phytase production by *Aspergillus niger* NCIM 563 in solid state culture: response surface optimization, up-scaling, and its partial characterization. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.38, p.1407-1417, 2011.
- BOGAR, B.; SZAKACS, G.; LINDEN, J.C.; PANDEY, A. et al. Optimization of phytase production by solid substrate fermentation. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.30, p.183-189, 2003.
- BOHN, L.; MEYER, A. S.; RASMUSSEN, S. K. Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. **Journal of Zhejiang University-Science B**, v.9, n.3, p.165-191, 2008.
- BOYCE, A.; WALSH, G. Purification and characterization of an acid phosphatase with phytase activity from *Mucor hiemalis* Wehmer. **Journal of Biotechnology**, v.132, p.82-87, 2007.
- CAIN, K. D.; GARLING, D.L. Pretreatment of soybean meal with phytase for salmonid diets to reduce phosphorus concentrations in hatchery effluents. **Progressive Fish-Culturist**, v.57, p.114-119, 1995.
- CAO, L.; WANG, W.; YANG, C.; YANG, Y.; DIANA, J. et al. Application of microbial phytase in fish feed. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.497-507, 2007.
- CASEY, A.; WALSH, G. Purification and characterization of extracellular phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142. **Bioresource Technology**, v.86, p.183-188, 2003.
- CHERYAN, M. Phytic acid interactions in food systems. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.13, n.4, p.297-335, 1980.
- ESCOBIN-MOPERA, L.; OHTANI, M.; SEKIGUCHI, S. et al. Purification and characterization of phytase from *Klebsiella pneumoniae* 9-3B. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.113, n.5, p.562-567, 2012.
- FUGTHONG, A.; BOONYAPAKRON, K.; SORNLEK, W. et al. Biochemical characterization and in vitro digestibility assay of *Eupenicillium parvum* (BCC17694) phytase expressed in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v.70, p.60-67, 2010.
- GUNASHREE, B.S.; VENKATESWARAN, G. Effect of different cultural conditions for phytase production by *Aspergillus niger* CFR 335 in submerged and solid-state fermentations. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.35, p.1587-1596, 2008.

HUGHES, K.P.; SOARES JR., J.H. Efficacy of phytase on phosphorus utilization in practical diets fed to striped bass *Morone saxatilis*. **Aquaculture Nutrition**, v.4, p.133-140, 1998.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. Seed health testing. **Seed Science and Technology**, v.4, p.3-49, 1976.

LEI, X.G., PORRES, J.M., MULLANEY, E.J. et al. Phytase: Source, Structure and Application. In: POALAINA, J., MACCABE, A. P. (Eds.) **Industrial enzyme - Structure, function and applications**. Dordrecht: Springer, 2007. cap. 29. p.505-529.

MITTAL, A.; SINGH, G.; GOYAL, V. et al. Optimization of medium components for phytase production on orange peel flour by *klebsiella* sp. Db3 using response surface methodology. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v.9, p.35-44, 2011.

NAMPOOTHIRI, K.M.; TOMES, G.J.; ROOPESH, K. et al. Thermostable phytase production by *Thermoascus aurantiacus* in submerged fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.118, p.205-214, 2004.

NWANNA, L.C.; KOLAHSA, M.; EISENREICH, R. et al. Pre-treatment of dietary plant feedstuffs with phytase and its effect on growth and mineral concentration in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.92, p.677-682, 2008.

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

SINGH, B.; SATYANARAYANA, T. Phytase production by *Sporotrichum thermophile* in a

cost-effective cane molasses medium in submerged fermentation and its application in bread. **Journal of Applied Microbiology**, v.105, p.1858-1865, 2008a.

SINGH, B.; SATYANARAYANA, T. Improved phytase production by a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* in submerged fermentation due to statistical optimization. **Bioresource Technology**, v.99, n.4, p.824-830, 2008b.

TAUSSKY, H.H.; SHORR, E. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 202, p.675- 685, 1953.

VATS, P.; BANERJEE, U. C. Studies on the production of phytase by a newly isolated strain of *Aspergillus niger* var teigham obtained from rotten wood-logs. **Process Biochemistry**, v.38, n.2, p.211-217, 2002.

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.

VATS, P.; BHUSHAN, B.; BANERJEE, U.C. Studies on the dephosphorylation of phytic acid in livestock feed using phytase from *Aspergillus niger* van Teigham. **Bioresource Technology**, v.100, n.1, p.287-291, 2009.

WANG, Y.; GAO, X.; SU, Q. et al. Cloning, expression, and enzyme characterization of an acid heat-stable phytase from *Aspergillus fumigatus* WY-2. **Current Microbiology**, v.55, n.1, p.65-70, 2007.

ZHANG, G.Q.; DONG, X.F.; WANG, Z.H et al. Purification, characterization, and cloning of a

MONTEIRO et al. Otimização da produção, caracterização e avaliação da fitase se *Rhizopus stolonifer* na hidrólise...

novel phytase with low pH optimum and strong proteolysis resistance from *Aspergillus*

*ficuum* NTG-23. **Bioresource Technology**, v.101, n.11, p.4125-4131, 2010.