



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

ANA LUIZA FANCHINI MESSAS

**“PRODUÇÃO, OTIMIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE FITASE
PRODUZIDA POR *Burkholderia* sp.”**

Profa. Dra. GABRIELA ALVES MACEDO

Orientadora

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Unicamp para obtenção do título de
Mestre em Ciência de Alimentos.

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação
defendida por Ana Luiza Fanchini Messas aprovada pela
comissão julgadora em ___/___/___ e orientada pelo Profa.
Dra. Gabriela Alves Macedo.

Assinatura do Orientador

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

M562p Messas, Ana Luiza Fanchini, 1983-
Produção, otimização e caracterização bioquímica
de fitase produzida por *Burkholderia* sp. / Ana Luiza
Fanchini Messas. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Gabriela Alves Macedo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Fitases. 2. *Burkholderia* sp. 3. Meios de
cultura (Biologia). 4. Otimização. 5. Bioquímica. I.
Macedo, Gabriela Alves. II. Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Production, optimization and biochemical characterization of
phytase produced by *Burkholderia* sp.

Palavras-chave em inglês (Keywords):

Phytases

Burkholderia sp.

Culture media (Biology)

Optimization

Biochemical

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Gabriela Alves Macedo [Orientador]

Helia Harumi Sato

Vania Battestin Wiendl

Data da defesa: 28/07/2011

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação defendida em ____/____/____ por Ana Luiza Fanchini Messas aprovada pela comissão julgadora em ____/____/____.

Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo
Orientadora - DCA/FEA/UNICAMP

Profa. Dra. Hélia Harumi Sato
Membro Titular – DCA/FEA/UNICAMP

Profa. Dra. Vania Battestin Wiendl
Membro Titular – CEFET/RJ

Profa. Dra. Edi Franciele Ries
Membro Suplente – Unipampa/RS

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho
Membro Suplente – DEA/FEA/UNICAMP

Aos meus pais Eduardo e Maria Aparecida,
Meu irmão Yuri,
Com amor e carinho,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A toda minha família (Fanchini e Messas) pelos ensinamentos, sabedoria, força e amor que me foram dados para enfrentar os desafios da vida.

À Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo pela oportunidade, confiança e ensinamentos.

À professora Hélia, por todo suporte e ensinamentos.

Aos membros da banca examinadora pelas correções e sugestões que muito contribuíram para este trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica de Alimentos (Camilo, Cristiano, Fabiano, Haroldo, Joelise, Juliana, Marcela, Márcio, Patrícia, Roberta, Ruann, Priscila Becker) pela amizade e por tornarem o ambiente de trabalho mais agradável durante esses anos.

À Beatriz, Priscila e Val por todo suporte e ajuda no laboratório.

Agradecimento especial aos amigos Danielle, Joyce, Júnior, Carina, Paula, Viviane, Fran, Evandro, Fabíola e Marisa por toda amizade, apoio e alegria, fundamentais em minha vida.

Aos meus amigos Ana Cláudia, Bonaldo, Carolina, Isabel, Juliana, Karla, Mila, Pietro, Talita e Vinícius, que apesar da distância, estão sempre no meu coração.

Ao Wagner por todo amor, carinho e incentivo.

À Carolina Bedani pela amizade e incentivo, à Vanina, à equipe do COQL e à Emulzint pela confiança, incentivo e por me proporcionarem condições para finalizar este trabalho.

A todos aqueles que, apesar de não serem citados, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e para minha formação.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro.

“O futuro pertence àqueles que acreditam na
beleza de seus sonhos.”

Eleanor Roosevelt (1884 – 1962)

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein (1879 – 1955)

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL	vii
ÍNDICE DE TABELAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
RESUMO GERAL	xv
SUMMARY	xvii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Fitase	3
2.2 Propriedades Gerais	3
2.3 Produção e caracterização de fitases	6
2.4 Aplicações e interesse comercial de fitases	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. Estudo do Meio de Cultivo e Parâmetros de Fermentação para a Produção de Fitase Bacteriana.....	11
3.1.1 Manutenção do micro-organismo	11
3.1.2. Produção do inóculo	12
3.1.3. Estudo do meio de cultivo para produção de fitase bacteriana	12
3.1.4. Determinação da atividade de fitase.....	13
3.1.5. Avaliação do efeito de diferentes fontes de carbono, nitrogênio e sais minerais na produção de fitase por <i>Burkholderia sp.</i>	14
3.1.6. Otimização da composição do meio de cultivo para produção de fitase em frascos agitados através da técnica de Desenho Experimental.	15
3.1.7. Estudo da preparação do pré-inóculo para a fermentação de <i>Burkholderia sp.</i> e produção de fitase	16

3.1.8. Otimização das condições de cultivo de <i>Burkholderia</i> sp. para produção de fitase em frascos agitados através da técnica de Desenho Experimental.....	17
3.2. Caracterização Bioquímica da Fitase Produzida por <i>Burkholderia</i> sp.	18
3.2.1. Produção do extrato enzimático.....	18
3.2.2. Determinação de proteínas totais	19
3.2.3. Determinação do pH ótimo de atividade e de estabilidade da fitase.....	19
3.2.4 Determinação da temperatura ótima de atividade e de estabilidade da fitase.....	20
3.2.5. Efeito de sais e inibidores na atividade da fitase	21
3.2.6 Parâmetros cinéticos	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1. Estudo dos Componentes do Meio de Cultivo e Parâmetros de Fermentação para a Otimização da Produção de Fitase por <i>Burkholderia</i> sp.....	22
4.1.1. Avaliação do efeito de diferentes fontes de carbono, nitrogênio e sais minerais para produção de fitase	22
4.1.2. Otimização da composição do meio de cultivo para produção de fitase em frascos agitados através da técnica de Desenho Experimental.	29
4.1.3. Estudo da preparação do pré-inóculo para a fermentação de <i>Burkholderia</i> sp. e produção de fitase	44
4.1.4. Otimização das condições de cultivo para produção de fitase em frascos agitados através da técnica de Desenho Experimental.....	49
4.2. Caracterização Bioquímica da Fitase Produzida por <i>Burkholderia</i> sp.	54
4.2.1. Temperatura ótima e de estabilidade	54
4.2.2. pH ótimo e pH de estabilidade.....	59
4.2.3. Efeito de sais na atividade enzimática de fitase de <i>Burkholderia</i> sp.	63
4.2.4. Cinética enzimática	66
5. CONCLUSÕES.....	69
6. BIBLIOGRAFIA.....	71

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Algumas características gerais de fitases bacterianas.	6
Tabela 2. Estudo do efeito de diferentes fontes de carbono, nitrogênio e sais minerais como componentes de meio de cultivo.	25
Tabela 3. Variáveis e níveis do planejamento fracionado.	26
Tabela 4. Matriz do planejamento fracionado 2^{7-3}	27
Tabela 5. Resultado da atividade de fitase (U/mL) dos ensaios do planejamento fracionado 2^{7-3} para estudo do efeito de fontes de carbono, nitrogênio e sais na fermentação de <i>Burkholderia</i> sp. e produção da enzima.	28
Tabela 6. Níveis e variáveis do primeiro planejamento fatorial 2^3 para estudo dos efeitos do farelo de trigo, fitato de sódio e peptona bacteriológica no meio de cultivo para fermentação de <i>Burkholderia</i> sp e produção de fitase.	30
Tabela 7. Matriz do primeiro planejamento fatorial 2^3 para estudo dos efeitos do farelo de trigo, fitato de sódio e peptona bacteriológica no meio de cultivo para fermentação de <i>Burkholderia</i> sp e produção de fitase.	30
Tabela 8. Atividades enzimáticas (U/mL) obtidas nos ensaios do planejamento fatorial 2^3 para estudo dos efeitos do farelo de trigo, fitato de sódio e peptona bacteriológica no meio de cultivo, após 24h e 48h de fermentação da <i>Burkholderia</i> sp.	31
Tabela 9. ANOVA para atividade de fitase após 24 horas de fermentação de <i>Burkholderia</i> sp. em planejamento fatorial 2^3 para estudo dos efeitos do farelo de trigo, fitato de sódio e peptona bacteriológica no meio de cultivo.	32

Tabela 10. ANOVA para atividade de fitase após 48 horas de fermentação de <i>Burkholderia</i> sp. em planejamento fatorial 2^3 para estudo dos efeitos do farelo de trigo, fitato de sódio e peptona bacteriológica no meio de cultivo.	34
Tabela 11. Níveis e variáveis do planejamento fatorial 2^3 para estudo dos efeitos da sacarose, fitato de sódio e peptona bacteriológica no meio de cultivo para fermentação de <i>Burkholderia</i> sp. e produção de fitase.	37
Tabela 12. Matriz do planejamento fatorial 2^3 para estudo dos efeitos da sacarose, fitato de sódio e peptona bacteriológica no meio de cultivo para fermentação de <i>Burkholderia</i> sp. e produção de fitase.	38
Tabela 13. Atividades enzimáticas (U/mL) obtidas nos ensaios do planejamento fatorial 2^3 para estudo dos efeitos da sacarose, fitato de sódio e peptona bacteriológica no meio de cultivo, após 24h, 48h e 72h de fermentação de <i>Burkholderia</i> sp.	39
Tabela 14. ANOVA para atividade de fitase após 24 horas de fermentação de <i>Burkholderia</i> sp. em planejamento fatorial 2^3 para estudo dos efeitos da sacarose, fitato de sódio e peptona bacteriológica no meio de cultivo.	40
Tabela 15. Composição do meio de cultivo líquido (Meio 15) e concentração de seus componentes.	42
Tabela 16. Composição do meio de cultivo líquido (Meio 16) e concentração de seus componentes.	43
Tabela 17. Atividade de fitase (U/mL), após 24, 48 e 72 horas de fermentação de <i>Burkholderia</i> sp. nos meios 15 e 16.	43
Tabela 18. Níveis e variáveis utilizados no DCCR 2^2 para estudo do efeito da agitação e temperatura na produção de fitase por <i>Burkholderia</i> sp.	49

Tabela 19. Matriz do planejamento fatorial 2^2 para estudo do efeito da agitação e da temperatura na produção de fitase e atividades de fitase após 24, 48 e 72 horas de fermentação da bactéria <i>Burkholderia</i> sp. ..	50
Tabela 20. ANOVA para atividade de fitase, após 24h de fermentação de <i>Burkholderia</i> sp, em planejamento fatorial 2^2	50
Tabela 21. ANOVA para atividade de fitase, após 48h de fermentação de <i>Burkholderia</i> sp., em planejamento fatorial 2^2	51
Tabela 22. ANOVA para atividade de fitase, após 72 horas de fermentação de <i>Burkholderia</i> sp., em planejamento fatorial 2^2	53
Tabela 23. Efeito de diferentes sais na atividade de <i>Burkholderia</i> sp. ..	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ação da enzima fitase em moléculas de mio-inositol hexafosfato, promovendo a liberação de mio-inositol e mineirais nutricionalmente importantes.....	4
Figura 2. <i>Burkholderia</i> sp mantida em meio ágar nutriente.	11
Figura 3. Resultados das atividades enzimáticas relativas (%) referentes aos 14 meios de cultivo líquido testados, após 8, 24 e 32 horas de fermentação de <i>Burkholderia</i> sp. em <i>shaker</i>	23
Figura 4. Superfície de resposta do primeiro planejamento 2^3 para estudo do efeito da concentração de peptona bacteriológica e farelo de trigo no meio de cultivo na produção de fitase, após 24h de fermentação de <i>Burkholderia</i> sp.....	33
Figura 5. Superfície de resposta do primeiro planejamento 2^3 para estudo do efeito da concentração de fitato de sódio e farelo de trigo no meio de cultivo na produção de fitase, após 24h de fermentação de <i>Burkholderia</i> sp.	33
Figura 6. Superfície de resposta do primeiro planejamento 2^3 para estudo do efeito da concentração de fitato de sódio e peptona bacteriológica no meio de cultivo na produção de fitase, após 24h de fermentação de <i>Burkholderia</i> sp.	34
Figura 7. Superfície de resposta do primeiro planejamento 2^3 para estudo do efeito da concentração de fitato de sódio e farelo de trigo no meio de cultivo na produção de fitase, após 48h de fermentação de <i>Burkholderia</i> sp.	35
Figura 8. Superfície de resposta do primeiro planejamento 2^3 para estudo do efeito da concentração de farelo de trigo e peptona	

bacteriológica no meio de cultivo na produção de fitase, após 48h de fermentação de <i>Burkholderia</i> sp.	35
Figura 9. Superfície de resposta do primeiro planejamento 2 ³ para estudo do efeito da concentração de fitato de sódio e peptona bacteriológica no meio de cultivo na produção de fitase, após 48h de fermentação de <i>Burkholderia</i> sp.	36
Figura 10. Superfície de resposta do segundo planejamento 2 ³ para estudo do efeito da concentração de sacarose e peptona bacteriológica no meio de cultivo na produção de fitase, após 24h de fermentação de <i>Burkholderia</i> sp.	41
Figura 11. Superfície de resposta do segundo planejamento 2 ³ para estudo do efeito da concentração de sacarose e fitato de sódio no meio de cultivo na produção de fitase, após 24h de fermentação de <i>Burkholderia</i> sp.	41
Figura 12. Perfil de crescimento bacteriano (absorbância a 600nm) no meio líquido de pré-inóculo e medida do pH de acordo com o tempo de agitação em <i>shaker</i> a 30°C, 150rpm.	45
Figura 13. Perfil de consumo de glicose (mg/dL) no meio líquido de pré-inóculo e medida do pH de acordo com o tempo de agitação em <i>shaker</i> a 30°C, 150rpm.	46
Figura 14. Atividade enzimática (U/mL) dos meios 7, 9 e 14 e número de células bacterianas determinadas em Câmara de Neubauer, adicionando-se 3mL de pré-inóculo, mantido previamente em <i>shaker</i> por 16 horas, a 150 rpm, 30°C, versus tempo (h).	48
Figura 15. Superfície de resposta do efeito da temperatura e da agitação na produção de fitase por <i>Burkholderia</i> sp, após 24 horas de fermentação em frascos agitados à 150 rpm, 30°C.	51

Figura 16. Superfície de resposta do efeito da temperatura e da agitação na produção de fitase por <i>Burkholderia sp</i> , após 48 horas de fermentação em frascos agitados à 150 rpm, 30°C.....	52
Figura 17. Temperatura ótima de extrato enzimático de <i>Burkholderia sp</i>	54
Figura 18. Temperaturas ótimas de fitases de diferentes fontes.....	55
Figura 19. Temperatura de estabilidade de extrato enzimático de <i>Burkholderia sp</i>	56
Figura 20. Temperaturas de estabilidade de fitases de diferentes fontes.	57
Figura 21. pH ótimo de atividade de fitase produzida por <i>Burkholderia sp</i>	59
Figura 22. pH ótimo da atividade de fitases de diferentes fontes.....	60
Figura 23. pH de estabilidade de fitase produzida por <i>Burkholderia sp</i> .	61
Figura 24. pH de estabilidade de atividade de fitases de diferentes fontes.	62
Figura 25. Método gráfico de Michaelis-Menten.	67
Figura 26. Gráfico duplo recíproco para hidrólise catalisada por fitase de <i>Burkholderia sp</i>	67

RESUMO GERAL

O ácido fítico é a principal fonte de armazenamento de fósforo em cereais e legumes, sendo que sua forma sal é denominada fitato. O fitato não é digerido pelo trato gastrointestinal de animais monogástricos e, na alimentação humana, o fitato é considerado um fator antinutricional devido à sua capacidade quelante para vários metais e por ligar-se às proteínas, conseqüentemente diminuindo a biodisponibilidade de proteínas e de minerais nutricionalmente importantes, como o zinco, ferro, cálcio, entre outros.

Uma das estratégias mais efetivas para a redução do conteúdo de fitato em rações animais e alimentos tem sido a utilização de enzimas exógenas degradadoras de fitato, as fitases. Sendo assim, durante os últimos 20 anos intensificaram-se os estudos em busca de novas fontes desta enzima. A fitase está amplamente distribuída na natureza, sendo encontrada em animais, plantas e micro-organismos. A enzima presente em plantas é menos resistente ao tratamento térmico e é menos estável às condições fisiológicas do trato gastrointestinal, já a de micro-organismos pode resistir a altas temperaturas, dependendo da linhagem.

Neste estudo, realizou-se a produção, otimização do meio e das condições de cultivo e caracterização de fitase produzida pela bactéria *Burkholderia* sp. Foi definido como o meio de cultivo otimizado para a produção de fitase de *Burkholderia* sp. em frascos agitados em 72 horas de fermentação: fitato de sódio 0,075%, sacarose 0,16%, peptona bacteriológica 0,2%, MgSO₄.7H₂O 0,05%, KCl 0,05%, FeSO₄.7H₂O 0,0001%, MnSO₄.H₂O 0,00075% e CaCl₂ 0,01%. Foi possível aumentar a produção de fitase em 110% (1,01 U/mL para 2,12 U/mL). As condições de cultivo (agitação e temperatura) otimizadas para produção de fitase

em frascos agitados foram 37°C e 250 rpm, após 48 horas de fermentação.

Na caracterização bioquímica, a fitase apresentou pH ótimo em 5,5 e pH de estabilidade na faixa de 3 a 7, após 1 hora de incubação à 50°C. Apresentou temperatura ótima à 60°C e mostrou-se estável após 1 hora de tratamento em temperaturas entre 25 e 50°C, demonstrando 40% de redução da atividade após 1 hora de tratamento à 60°C.

No estudo do efeito de íons, utilizando a concentração de 10 mM para os sais testados, os resultados mais expressivos foram o aumento da atividade de fitase em 41% com a adição de íons Ba^{2+} e a redução da atividade de fitase em 98% e 96%, respectivamente, com a adição de íons Fe^{2+} e Zn^{2+} , inibindo quase totalmente a enzima. Para a concentração de 1 mM dos sais, a adição dos íons Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{3+} causou reduções significativas de atividade de fitase, em 61%, 45%, 45%, 31% e 30%, respectivamente.

A fitase produzida por *Burkholderia* sp. apresentou valores de K_m e V_{max} de 0,02 mM e 6,20 $\mu\text{mol Pi/min/mg}$, respectivamente.

SUMMARY

Phytic acid is the main source of phosphorus storage in cereals and legumes, and its salt is known as phytate. Phytate is not digested by the gastrointestinal tract of monogastric animals and, in food for human consumption, phytate is considered an antinutritional factor because of its ability in chelating various metals and binding to proteins, thereby reducing the bioavailability of proteins and nutritionally important minerals as zinc, iron, calcium, and others.

One of the most effective strategies for reducing phytate content in animal feed and food for human consumption has been the use of exogenous enzymes that degrade phytate, the phytases. Thus, during the last 20 years, the studies to discover new sources of this enzyme have been intensified. Phytase is widely distributed in nature, being found in animals, plants and microorganisms. The enzyme present in plants is less resistant to heat treatment and is less stable under physiological conditions of the gastrointestinal tract, since the microorganisms can withstand high temperatures, depending on the strain.

In this study, it was made the production, the optimization of the medium of culture and growing conditions and characterization of phytase produced by the bacteria *Burkholderia* sp. It was defined as the culture medium optimized for the production of phytase of *Burkholderia* sp. in shaken flasks, in 72 hours of fermentation: sodium phytate 0.075%, sucrose 0.16%, bacteriological peptone 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, KCl 0.05%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0001%, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.00075% e CaCl_2 0.01%. It was possible to increase the production of phytase in 110% (1.01 U/mL to 2.12 U/mL). The growing conditions (rotation and temperature) optimized for production of phytase in shaken flasks were 250 rpm and 37°C, after 48 hours of fermentation in shaker.

In biochemical characterization, phytase showed pH optimum at 5.5 and stability in the pH range of 3 to 7, after 1 hour of incubation at 50°C. Phytase showed optimum temperature at 60°C and remained stable after 1 hour of treatment at temperatures between 25°C and 50°C, showing 40% of reduction of the activity after 1 hour of treatment at 60°C.

In the study of the effect of ions, using the concentration of 10 mM for the salts tested, the most important results were the increase of the activity of phytase in 41% with the addition of Ba^{2+} and the decrease of the activity of phytase in 98% and 96%, respectively, with the addition of Fe^{2+} and Zn^{2+} , almost completely inhibiting the enzyme. For the concentration of 1 mM of the salts, the addition of Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} and Fe^{3+} caused significant reductions in activity of phytase, in 61%, 45%, 45%, 31% and 30%, respectively.

Phytase produced by *Burkholderia* sp. presented values of K_m and V_{max} of 0.02 mM and 6.20 $\mu\text{mol Pi/min/mg}$, respectively.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A hidrólise do ácido fítico é um processo metabólico muito importante em muitos sistemas biológicos, que se acredita ser principalmente efetuada pela fitase [1].

A degradação do fitato tem importância nutricional porque a força de ligação do fitato aos minerais diminui quando grupos fosfatos são removidos do anel inositol resultando em um aumento da biodisponibilidade de minerais essenciais na dieta [2]. Assim, fitases têm um importante papel em nutrição humana devido à degradação do fitato durante o processamento do alimento e no trato gastrointestinal. Grandes esforços têm sido feitos para reduzir a quantidade de fitato em alimentos por diferentes processos e adição de enzimas. Em contraste com as propriedades antinutricionais, foi sugerido que o fitato da dieta tem efeitos benéficos, como proteção contra o câncer de cólon [3], arteriosclerose e doenças coronarianas [4].

O fitato age como um antinutriente ligando-se a proteínas, aminoácidos e lipídios e quelando minerais como cálcio, ferro, zinco e magnésio formando sais insolúveis [1]. Além disso, interage com enzimas digestivas reduzindo suas atividades, influenciando na digestão e prejudicando o aproveitamento de vitaminas.

Durante os últimos 20 anos cientistas da área de nutrição animal e biotecnologia dedicaram muita atenção ao estudo das fitases. A intensificação dos estudos deve-se principalmente ao interesse crescente em tais enzimas para aplicação em rações animais e na alimentação humana [5].

Algumas bactérias têm se mostrado capazes de expressar atividade de fitase. Temos como exemplo *E. coli*, *Klebsiella terrigena*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* sp., entre outras. Algumas destas

bactérias podem degradar o fitato durante o crescimento e consequentemente produzir fitases extracelulares [6,7,8,9].

Este estudo teve como objetivo estudar uma nova fonte explorável de fitase bacteriana produzida por *Burkholderia* sp, que foi isolada anteriormente por Ries e Macedo (2009) [10], visando sua produção, otimização dos componentes do meio de cultivo e das condições de fermentação e caracterizar bioquimicamente o extrato enzimático bruto.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fitase

A fitase está amplamente distribuída na natureza, é encontrada em animais, plantas e micro-organismos [5]. Nos animais, esta enzima existe no sangue de várias espécies de vertebrados e no intestino de mamíferos. Embora plantas como trigo e cevada sejam ricas em fitases intrínsecas, estas possuem atividade em uma estreita faixa de pH, sendo menos eficazes que as microbianas [11].

A enzima presente em plantas pode não resistir ao tratamento térmico e ser menos estável às condições fisiológicas do trato gastrointestinal, já a de micro-organismos (bactérias, fungos e leveduras) podem resistir a altas temperaturas, dependendo do micro-organismo produtor e da linhagem [12].

A maioria dos estudos existentes está relacionada à enzima originada de fungos filamentosos, como de espécies de *Aspergillus*, *Mucor* e de *Cladosporium* [11]. Normalmente, as fitases produzidas por fungos são extracelulares, ao contrário das enzimas bacterianas, exceto por *Bacillus subtilis* e *Enterobacter*, no entanto os procedimentos completos utilizados na produção de fitase dependem da fonte de origem e da pureza requerida [5,13].

2.2 Propriedades Gerais

Fitase é uma enzima éster hidrolase com massa molecular estimada de 35 – 700 kDa dependendo da fonte de origem. No geral, grande parte das enzimas pertence à família da histidina ácido fosfatase [5,14]. A maioria das enzimas comporta-se como uma

proteína monomérica de massa molecular de aproximadamente 40 – 70 kDa, mas algumas podem apresentar múltiplas subunidades [5].

O ácido fítico (principal forma de armazenamento de fósforo em cereais e legumes) age como um antinutriente devido ao seu poder quelante para vários metais e por se ligar a proteínas e minerais nutricionalmente importantes como cálcio, ferro, zinco, entre outros.

A fitase catalisa a hidrólise do ácido fítico, também denominado mio-inositol hexafosfato, promovendo a biodisponibilização de minerais nutricionalmente importantes (Figura 1) [13].

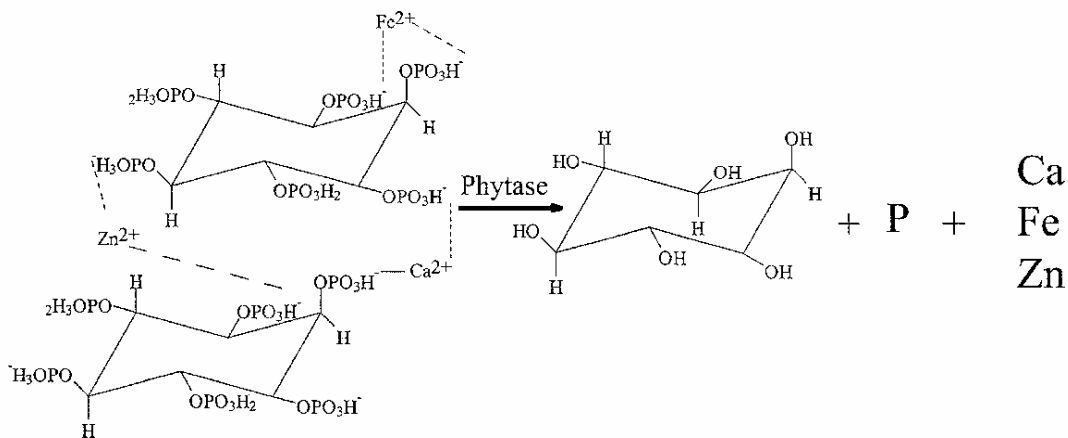


Figura 1. Ação da enzima fitase em moléculas de mio-inositol hexafosfato, promovendo a liberação de mio-inositol e minerais nutricionalmente importantes.

De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada e União Internacional de Bioquímica (IUPAC-IUB), duas categorias de fitases são reconhecidas conforme a posição onde a hidrólise do fitato é iniciada: 3-fitase (EC 3.1.3.8) que inicia removendo um grupo ortofosfato da posição C3, enquanto a 6-fitase (EC 3.1.3.26) realiza a remoção na posição C6 da molécula de mio-inositol hexafosfato [5,15].

As fitases também podem ser classificadas de acordo com o pH ótimo de atividade, podendo agir em pH em torno de pH 5,0 (ácidas) ou ainda em torno de pH 8,0 (alcalinas). A estabilidade de enzimas de

plantas decresce drasticamente em valores de pH abaixo de 4 ou maiores que 7,5, enquanto que a maioria das fitases de origem microbiana, conserva atividade em valores de pH abaixo de 3,0 e acima de 8,0 [5].

As fitases microbianas geralmente mostram alta atividade na faixa de 50 – 70°C, sendo a temperatura ótima para atividade da enzima de 45 – 60°C. A maioria das enzimas de plantas são inativadas irreversivelmente em temperaturas superiores à 70°C, enquanto que microbianas retêm atividade significativa após períodos prolongados de incubação [5]. As fitases relatadas como mais resistentes às altas temperaturas foram isoladas de *Aspergillus fumigatus*, em que a fitase foi capaz de suportar temperaturas maiores que 100°C, por um período de 20 minutos, com perda de apenas 10% da atividade enzimática inicial [16] e *Schwanniomyces castellii*, em que a fitase apresentou atividade ótima à 77°C e termoestabilidade à 74°C [17].

A fitase é capaz de reconhecer fitato como substrato e coincide com as propriedades não-hidrolisantes de fosfatases não específicas. Durante a germinação de sementes, o ácido fítico é enzimaticamente desfosforilado. Esta reação de desfosforilação converte o ácido fítico (mio-inositol hexafosfato) produzindo ácido fosfórico, inositol livre, e/ou compostos intermediários incluindo ésteres de inositol mono, bi, tri, tetra, e penta fosfato (IP₁-IP₅) dependendo do grau de desfosforilação. O caminho da reação para a degradação do ácido fítico é: IP₆ → IP₅ → IP₄ → IP₃ → IP₂ → IP₁ → inositol [15,18].

A atividade da fitase normalmente é medida pela quantidade de fosfato inorgânico (Pi) liberado pela ação da enzima por métodos colorimétricos [19,20]. Uma unidade de atividade da enzima pode ser definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol Pi por minuto de reação, nas condições de pH, temperatura e concentração de fitato em que foram realizados os testes, sendo que

não existe uma unidade internacional padrão para medida da atividade de fitase, o que dificulta a comparação da eficácia de fitases de diferentes fontes [15].

2.3 Produção e caracterização de fitases

Têm sido empregadas técnicas de produção de fitase em fermentação sólida e submersa. A condição da cultura, tipo de cepa, natureza do substrato e disponibilidade de nutrientes devem ser considerados para seleção de uma técnica particular de produção [21].

Alguns micro-organismos produtores de fitase estão sendo estudados. A maior parte deles são bactérias como *Bacillus subtilis* [21,22], *Escherichia coli* [6], *Pseudomonas* [23] e *Klebsiella* [24].

A Tabela 1 mostra algumas características gerais de diferentes fitases bacterianas.

Tabela 1. Algumas características gerais de fitases bacterianas.

Bactérias	Massa molecular (kDa)	Temperatura ótima (°C)	pH ótimo [pI]	Referências
<i>B. subtilis</i>	36-38	60	6,0-6,5 [6,25]	[21,22]
<i>E. coli</i>	42	55	4,5	[6]
<i>Enterobacter</i>	-	50	7,0-7,5	[25]
<i>K. aerogenes</i>	700	60-70	4,5; 5,2 [3,7]	[24]
<i>Pseudomonas</i>	-	-	5,5	[23]

O processo fermentativo é significativamente influenciado por vários parâmetros físicos e químicos. Diversos grupos de pesquisa

[26,27] têm realizado estudos de otimização de parâmetros para a produção de fitase buscando menor custo e maior rentabilidade no processo. A primeira etapa na otimização do processo é a identificação dos fatores que afetam a produção, seguindo o estudo e estimativa dos níveis ótimos dessas variáveis [26].

As condições de cultivo, tipo de linhagem, natureza do substrato e disponibilidade de nutrientes são fatores críticos que afetam a produção de fitases [2].

2.4 Aplicações e interesse comercial de fitases

A fitase foi descoberta por Suzuki et al. em 1908 [28], começou a ser pesquisada em 1960, mas só recentemente começou a ser amplamente utilizada. A primeira fitase comercial derivada de *Aspergillus niger* com capacidade de liberar fósforo ligado ao fitato e reduzir sua excreção no ambiente foi introduzida no mercado em 1991 [15,29] e está sendo intensamente usada na Europa como suplemento comercial à alimentação animal [5]. Esta enzima é conhecida como Natuphos, produzida e comercializada pela BASF. Natuphos mostra uma ótima atividade nas condições presentes no trato digestivo de frangos e porcos [29] e pode manter 75% da atividade em temperaturas inferiores à 75°C por 15 minutos [11].

Fitases têm sido estudadas intensivamente nos últimos anos devido ao grande interesse na utilização dessas enzimas para a redução do conteúdo de fitato nas rações animais e para alimentos de consumo humano. Devido às várias características biológicas, como especificidade ao substrato, resistência à proteólise e eficiência catalítica, fitases bacterianas apresentam potencial considerável para aplicações comerciais [30].

Hoje, preparações de fitases microbianas são comercialmente disponíveis e utilizadas em alimentação animal, e poderão no futuro ser utilizadas no processamento de alimentos [12].

As fitases produzidas em escala comercial são derivadas de linhagens mutantes de fungos ou são obtidas por tecnologia de DNA recombinante. As três fitases comumente utilizadas são derivadas de *Aspergillus niger*, que é uma 3-fitase e de *Peniophora lycci* e *Escherichia coli*, que são 6-fitases [11,15]. A Quantum Fitase XT, lançada no mercado em 2007 pela Syngenta e comercializada atualmente pela AB Vista Feed Ingredients, é uma 6-fitase modificada, produzida pela bactéria *E. coli*. Ela é uma enzima de 3º geração, que tem ação em uma ampla faixa de pH e é intrinsecamente termo-resistente, ou seja, não é peletizada, agindo mais rapidamente [31].

Em bactérias, fitase é uma enzima indutível e sua expressão está sujeita a uma regulação complexa, mas a formação da fitase não é uniformemente controlada entre diferentes bactérias. Foi sugerido que a fitase não é requisito para um crescimento balanceado das células bacterianas, mas pode ser sintetizada em resposta a uma limitação de nutrientes [30].

Conforme relatado em uma revisão realizada por Cao et al., (2007) [11], em 2007, fitases comerciais produzidas na Europa e na América do Norte eram mais competitivas que aquelas produzidas na Ásia, apresentando vantagens como maior atividade por unidade, atividade em ampla faixa de pH e tolerância à temperatura. As fitases em pó oriundas da Europa e América do Norte apresentavam atividades de 40.000 à 4.000.000 U/g enquanto que fitases de companhias asiáticas apresentavam atividade em torno de 500 à 5.000 U/g, e os preços variavam em torno de \$12,5 - 15/Kg e \$3-10/Kg, respectivamente. No final do século XX, as vendas anuais de fitase

como aditivo para alimentação animal foram estimadas em U\$ 500 milhões [32].

Segundo a empresa dinamarquesa Danisco, pioneira em uso de enzimas em rações animais, as fitases bacterianas de nova geração têm demonstrado maior eficiência na liberação de fósforo do fitato presente nas plantas em comparação às fitases fúngicas tradicionais. Usando uma taxa padrão de inclusão de 500 FTUs/kg de ração, a fitase bacteriana da Danisco (Phyzyme XP[®]) é capaz de substituir 1,3 kg adicionais de fosfato bicálcio nas formulações das rações de suínos e frangos de corte, em comparação às fitases fúngicas tradicionais. Em 2008, os preços do fosfato bicálcio giravam em torno de €550/tonelada e 1000 FTUs/kg de ração reduziria os custos das rações de frangos de corte em aproximadamente €4,60/tonelada, permitindo uma redução adicional de 17% no fosfato dibásico de cálcio, resultando em uma economia extra de custo de €0,60/tonelada em comparação à taxa padrão de inclusão de 500 FTUs/kg de ração. Ao aumentar a dose de fitase para 600 FTUs/kg de ração, os produtores de poedeiras reduziram ainda mais os custos de formulação da ração em aproximadamente €0,53/tonelada, reduzindo a inclusão de fosfato bicálcio em aproximadamente 30% [33].

As fitases também podem desempenhar importante papel na nutrição humana, tanto pela degradação do fitato durante processamento de alimentos quanto no trato gastrintestinal. Técnicas normalmente utilizadas no processamento de alimentos como cozimento, maltagem e fermentação podem aumentar a ação de fitases naturalmente presentes em cereais e legumes, sendo ainda a adição de enzimas produzidas por micro-organismos uma alternativa para aumentar a degradação do fitato e conseqüentemente a biodisponibilidade de ferro, zinco e fósforo, principalmente em crianças [12].

Atualmente na literatura não há estudos de produção, otimização e caracterização de fitase produzida pela bactéria *Burkholderia* sp. Este foi um estudo pioneiro e ressalta-se a importância de novos estudos, a fim de verificar a aplicação desta enzima em rações animais e/ou em alimentos infantis à base de cereais.

Por não ser um micro-organismo "Generally Recognized As Safe" (GRAS), técnicas de recombinação genética e expressão de genes heterólogos podem ser alternativas para utilização do potencial produtor de fitase desta bactéria.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Estudo do Meio de Cultivo e Parâmetros de Fermentação para a Produção de Fitase Bacteriana.

3.1.1 Manutenção do micro-organismo

Foi utilizada neste estudo uma linhagem de bactéria previamente selecionada como potencialmente produtora de fitase, denominada como cepa 119, por Ries e Macedo, 2009 [10].

Durante o estudo aqui relatado, a bactéria foi identificada como *Burkholderia* sp., através de taxonomia molecular.

As colônias bacterianas possuem formato arredondado, são pastosas e apresentam coloração amarelo-esverdeado e fluorescente (Figura 2). O odor é forte e característico.



Figura 2. *Burkholderia* sp mantida em meio ágar nutriente.

O crescimento celular bacteriano foi realizado em tubos contendo meio ágar nutriente inclinado, mantidos em estufa à 30°C, por 48 horas.

A bactéria foi mantida em tubos contendo meio ágar nutriente inclinado preenchidos com glicerina esterilizada. Foram realizados repiques antes de cada ensaio.

3.1.2. Produção do inóculo

Para a realização dos ensaios foi inoculada uma alçada da cultura de bactéria em cada frasco Erlenmeyer de 50mL contendo 15 mL do meio de cultivo líquido previamente autoclavado.

3.1.3. Estudo do meio de cultivo para produção de fitase bacteriana

3.1.3.1. Meio de cultivo líquido padrão

Para o estudo inicial da produção de fitase por *Burkholderia* sp. em frascos agitados foi utilizado o meio de cultivo líquido descrito por Ries e Macedo (2009) composto de 10 g/L sacarose; 0,5 g/L de fitato de sódio; 3 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,5 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g/L de KCl; 0,001 g/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,0075 g/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 0,1 g/L de CaCl_2 , sendo os 5 últimos componentes definidos como a solução padrão de sais.

3.1.4. Determinação da atividade de fitase

3.1.4.1. Determinação da atividade de fitase utilizando fitato de sódio como substrato

De acordo com o método proposto por Shimizu (1992) [22], a mistura de reação foi composta por 600µL de solução 2mM de fitato de sódio em tampão Tris-HCl 0,1M (pH 7,0) suplementado com 2mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, acrescidos de 150µL de sobrenadante (resultante de centrifugação prévia do meio de cultivo líquido, à 7100 x g, 10°C, por 15 minutos). Esta mistura foi incubada em banho-maria termostatizado à 37°C, por 30 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 750 µL de solução 5% de ácido tricloroacético (TCA). À mistura de reação foi adicionado 1,5mL do reagente de cor, para formação de fosfomolibdato. O reagente de cor foi composto por: 4 volumes de 1,5% molibdato de amônio em solução 5,5% de H_2SO_4 e 1 volume de solução 2,7% de sulfato ferroso. A liberação de P_i foi quantificada a 700 nm em espectrofotômetro.

Uma unidade de atividade da enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um µmol de P_i por mL de enzima por minuto de reação nas condições do teste.

O curso da reação foi acompanhado por meio de uma curva padrão de K_2HPO_4 , na faixa de concentração de 0,0078 à 1,25 mg/mL.

3.1.4.2. Determinação da atividade de fitase em 4-nitrofenilfosfato dissódico hexahidratado (substrato sintético para fosfatases ou 4-npp)

De acordo com o método proposto por Stockmann et al. (2003) [34], foi utilizado o substrato sintético para fosfatases para a medida da atividade de fitase. Em tubos de ensaio, foram adicionados 1000 µL de solução 5 mM 4-nitrofenilfosfato dissódico hexahidratado, 500 µl de

tampão acetato de sódio-ácido acético 0,8 M, pH 5,0 e 500 µl de sobrenadante resultante de centrifugação prévia (7100 x g, 10°C, por 15 minutos) do meio de cultivo líquido após fermentação. Após 10 minutos de reação em banho-maria termostaticado à 37°C, a reação foi paralisada com a adição de 2mL de NaOH 0,1M. A liberação de p-nitrofenol foi quantificada a 410 nm em espectrofotômetro.

O curso da reação foi acompanhado através de uma curva padrão de p-nitrofenol puro, na faixa de concentração de 0,05 à 2 mg/mL.

Uma unidade de atividade da enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um µmol de P_i por mL de enzima por minuto de reação nas condições do teste.

3.1.5. Avaliação do efeito de diferentes fontes de carbono, nitrogênio e sais minerais na produção de fitase por *Burkholderia sp.*

3.1.5.1. Estudo univariável

Foi realizado um estudo univariável, onde foram testados diversos meios de cultivo líquido. Nesses meios, foram utilizadas diferentes fontes de carbono (sacarose, fitato, farelo de trigo, farelo de arroz, óleo de soja e glicerol), de nitrogênio (peptona bacteriológica, (NH₄)₂SO₄, KNO₃, extrato de levedura, uréia e caseína) e de sais minerais (MgSO₄.7H₂O, KCl, FeSO₄. 7H₂O, MnSO₄.H₂O, CaCl₂, K₂HPO₄, KH₂PO₄ e ZnSO₄.2H₂O).

Foi inoculada uma alçada da cultura bacteriana diretamente nos meios a serem testados, em triplicata. A fermentação líquida foi realizada em *shaker* a 150 rpm e 30°C, e a determinação da atividade enzimática foi realizada após variados períodos de fermentação, compreendidos entre 4 e 120 horas. A atividade de fitase foi determinada de acordo com o item 3.1.4.1. e 3.1.4.2.

As variáveis mais significativas foram selecionadas para realização de um estudo posterior sobre os efeitos de diferentes fontes de carbono e nitrogênio no meio de cultivo líquido.

3.1.5.2. Planejamento fracionado 2^{7-3}

Do estudo univariável foram selecionadas 7 variáveis consideradas mais importantes, sendo estas utilizadas como componentes do meio de cultivo líquido. Dessa forma, realizou-se um planejamento fracionado 2^{7-3} , compreendendo 16 ensaios + 4 pontos centrais (PC), totalizando 20 ensaios.

Foi inoculada uma alçada da cultura bacteriana diretamente no meio a ser testado, de acordo com o item 3.1.2, em triplicata. Foram determinadas as atividades de fitase produzidas pela bactéria através dos métodos propostos nos itens 3.1.4.1 e 3.1.4.2, após 12, 24 e 48 horas de fermentação em *shaker* a 150 rpm, 30°C.

Os efeitos das variáveis estudadas na produção de fitase foram obtidos utilizando *Statistica* versão 8.0.

3.1.6. Otimização da composição do meio de cultivo para produção de fitase em frascos agitados através da técnica de Desenho Experimental.

A Metodologia de Superfície de Resposta foi empregada para otimizar a concentração dos componentes do meio de cultivo líquido, selecionados a partir dos estudos anteriores, para produção de fitase.

Foram realizados dois planejamentos fatoriais completos 2^3 , incluindo 6 pontos axiais e 3 replicatas no ponto central, totalizando 17 experimentos em cada fatorial completo. Cada variável selecionada foi avaliada em 5 níveis diferentes ($-\alpha$, -1, 0, +1, $+\alpha$). Foi inoculada uma alçada da cultura de bactéria diretamente no meio a ser testado, de acordo com o item 3.1.2, em triplicata, e a atividade enzimática foi a

resposta avaliada, utilizando os métodos descritos em 3.1.4.1 e 3.1.4.2, após 24 e 48 horas de fermentação em *shaker* a 30°C, 150 rpm, no primeiro estudo fatorial e após 24, 48 e 72 horas de fermentação em *shaker* a 30°C, 150rpm, no segundo estudo.

As superfícies de resposta foram obtidas utilizando *Statistica* versão 8.0 para determinar os níveis ótimos das variáveis para máxima produção de fitase.

Após análise dos resultados do segundo fatorial realizado, foram selecionados dois meios de cultivo (15 e 16) para serem testados quanto à produção de fitase por *Burkholderia* sp.. Foi inoculada uma alçada de bactéria nos frascos Erlenmeyers de 50 mL, como descrito no item 3.1.2, em triplicata, e a atividade foi determinada de acordo com o método descrito no item 3.1.4.2, após 24, 48 e 72 horas de agitação em *shaker* a 30°C, 150 rpm. A solução de sais utilizada nos testes foi a padrão, descrita em 3.1.3.1.

3.1.7. Estudo da preparação do pré-inóculo para a fermentação de *Burkholderia* sp. e produção de fitase

No estudo preliminar o pré-inóculo foi preparado inoculando-se uma alçada da cultura de bactéria em Erlenmeyers de 50 mL contendo 15 mL em meio de cultivo autoclavado composto de 5 g/L de glicose, 7,5 g/L de peptona bacteriológica e solução de sais padrão do item 3.1.3.1. Os frascos foram incubados em *shaker* à 30°C, 150rpm. Foram realizadas medidas de pH, consumo de glicose (através de kit glicose oxidase) e das absorbâncias a 600nm a fim de verificar o crescimento celular do pré-inóculo, nos tempos 0, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas.

Foi realizada a determinação da quantidade de pré-inóculo a ser transferido para o meio líquido de cultivo. Para a preparação do meio de pré-inóculo uma alçada da cultura de bactéria foi inoculada em

frascos Erlenmeyers de 50 mL contendo 15 mL de meio de cultivo e os frascos foram incubados em *shaker* a 30°C e 150 rpm, sendo que o crescimento celular foi estimado após 24 e 48 horas.

Foram transferidas alíquotas de 1 e 3mL de pré-inóculo, após 24 horas de agitação a 30°C, 150 rpm, para frascos de Erlenmeyers de 50mL contendo 15mL de meio de cultivo líquido autoclavado composto de 7g/L de fitato de sódio, 2g/L de peptona bacteriológica e solução de sais padrão, em triplicata. A atividade de fitase foi determinada após 24 e 48 horas de agitação em *shaker* à 150 rpm, 30°C, como descrito em 3.1.4.2. e o crescimento celular foi estimado como descrito anteriormente.

Foi realizado também estudo transferindo-se 3mL de meio de pré-inóculo composto de 5g/L de glicose, 7,5 g/L de peptona bacteriológica e solução de sais padrão do item 3.1.3.1 previamente incubado em *shaker* por 16 horas a 30°C, 150 rpm, para os meios de cultivo 7, 9 e 14 do estudo univariável. Os frascos foram incubados em *shaker* por 96 horas. Foram medidas as atividades de fitase, através do método descrito em 3.1.4.2 e estimado o número de células bacterianas do meio 9, em Câmara de Neubauer, nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96 horas.

3.1.8. Otimização das condições de cultivo de *Burkholderia sp.* para produção de fitase em frascos agitados através da técnica de Desenho Experimental

Foi realizado um estudo fatorial completo 2² incluindo 4 pontos axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios, para avaliar os efeitos e interações de 2 parâmetros no processo fermentativo e otimizar suas condições para máxima produção de

fitase. As duas variáveis independentes temperatura e agitação foram avaliadas em 5 níveis diferentes ($-\alpha$, -1, 0, +1, $+\alpha$).

Para a preparação do pré-inóculo uma alçada da cultura de bactéria foi inoculada em frascos Erlenmeyers aletados de 500 mL, contendo 150mL meio líquido composto de 5 g/L glicose, 7,5 g/L de peptona bacteriológica e solução de sais padrão), incubados em *shaker* a 150rpm, 30°C, por 16 horas para obtenção de crescimento celular estimado em medida de absorbância à 600nm igual a 1,6. Foram transferidos 3mL de pré-inóculo para cada Erlenmeyer de 50mL contendo 15mL de meio de cultivo otimizado (meio 16) autoclavado e em triplicata.

As atividades enzimáticas de fitase foram determinadas após 24, 48 e 72 horas de fermentação em *shaker* a 30°C, 150 rpm, por meio do método proposto no item 3.1.4.2.

3.2. Caracterização Bioquímica da Fitase Produzida por *Burkholderia* sp.

3.2.1. Produção do extrato enzimático

Para a preparação do pré-inóculo uma alçada da cultura de *Burkholderia* sp. foi inoculada em frascos Erlenmeyer aletados de 500 mL, contendo 150 mL de meio composto por 5,0g de glicose, 7,5g de peptona bacteriana, 0,5g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,g de KCl, 0,001 de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,0075 de $MnSO_4 \cdot H_2O$ e 0,1g de $CaCl_2$ por litro, sendo incubados em *shaker* (TECNAL TE 421) a 30°C, 150 rpm, por 16 horas. Após desenvolvimento da cultura, os meios foram centrifugados à 7100 x g à temperatura de 10°C, por 20 minutos. A fração sobrenadante foi denominada extrato enzimático extracelular bruto.

Os testes de caracterização bioquímica foram realizados diretamente no extrato enzimático extracelular bruto produzido pela bactéria *Burkholderia* sp. Alguns testes foram comparados às atividades de fitases comerciais Quantum[®] e Natuphos[®], preparadas na concentração de 1 mg/mL. A primeira é uma fitase produzida por bactéria (*Escherichia coli*) e a segunda por um fungo (*Aspergillus niger*). Uma unidade de atividade de fitase foi definida como μmol de Pi liberado por minuto de reação nas condições testadas por mg de proteína. As enzimas Natuphos[®] e Quantum[®] foram doadas pelos fabricantes BASF e Syngenta, respectivamente.

Foram realizados testes na tentativa de concentrar ou pré-purificar o extrato enzimático bruto, utilizando diálise após precipitação com sulfato de amônio 80%, secagem após precipitação com etanol 1:1 (v:v) e acetona 1:2 (v:v). Porém não foi possível utilizar esses métodos, pois a quantidade obtida após diálise ou secagem foi muito pequena, resultando em rendimentos muito baixos. Quando utilizados etanol e acetona houve perda total da atividade enzimática.

3.2.2. Determinação de proteínas totais

A determinação de proteínas totais foi realizada pelo método de Lowry (Lowry, 1971) [35], utilizando albumina bovina como padrão. Esses resultados foram utilizados para determinação da atividade específica (U/mg).

3.2.3. Determinação do pH ótimo de atividade e de estabilidade da fitase

Para determinação do pH ótimo de atividade da fitase foram preparadas as seguintes soluções tampão: glicina-HCl 0,1M (pH 3,0), citrato 0,1M (pH 4,0; 5,0; 5,5; 6,0 e 6,5), Tris-HCl 0,1M pH (pH 7,0;

8,0 e 9,0), glicina-NaOH 0,1M (pH 10 e 11). A atividade de fitase foi determinada utilizando-se as soluções tampão acima descritas em substituição ao tampão normalmente utilizado (tampão acetato 0,8M). Paralelamente foram determinados o pH ótimo de atividade das enzimas comerciais Quantum[®] e Natuphos[®], na concentração de 1 mg/mL, de acordo com a metodologia descrita em 3.1.4.2.

Para determinação da faixa de pH de estabilidade da fitase o sistema de reação foi obtido adicionando 1,5 mL do extrato enzimático ou das soluções de enzimas comerciais com 1,5 mL das soluções tampão citadas em diferentes valores de pH permanecendo a 50°C por 1 hora. Após o tratamento, os diferentes valores de pH foram ajustados para o valor correspondente à metodologia de análise (pH=5,0). Em paralelo foram preparados tubos brancos e a atividade enzimática residual foi determinada de acordo com a metodologia descrita em 3.1.4.2.

3.2.4 Determinação da temperatura ótima de atividade e de estabilidade da fitase

O efeito da temperatura na atividade da fitase foi determinado de acordo com o método descrito no item 3.1.4.2., utilizando-se as temperaturas de incubação de 25°C, 30°C, 40 °C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C e ebulição, o pH da reação foi mantido em 5.

Para determinação da temperatura de estabilidade da fitase, o extrato enzimático e as soluções de enzimas comerciais foram incubados nas temperaturas descritas acima por 1 hora. Após o tratamento térmico, a atividade de fitase residual foi determinada de acordo com o item 3.1.4.2. à 37°C, por 10 minutos.

3.2.5. Efeito de sais e inibidores na atividade da fitase

A influência de sais e inibidores minerais na atividade enzimática foi verificada pela adição dos sais $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, KCl , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Na_2SO_4 , CuSO_4 , $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, BaSO_4 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , HgCl_2 e EDTA à solução de substrato na concentração de 1 e 10 mM. As reações foram realizadas conforme o método descrito no item 3.1.4.2., utilizando como substrato o 4-npp, com a adição de soluções teste no substrato. O controle corresponde ao procedimento padrão de reação enzimática sem adição de sais, considerado como 100% de atividade de fitase.

3.2.6 Parâmetros cinéticos

O efeito da concentração de substrato na atividade de fitase foi determinado pelo método descrito em 3.1.4.2, utilizando-se 4-npp nas concentrações de 0,01 mM, 0,1 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM e 5 mM. A velocidade de reação foi definida como μmol de Pi liberado por minuto de reação (U) por mg de proteína. Os valores das constantes de Michaelis-Menten (K_m) foram determinados por interpolação pelo método gráfico de Lineweaver-Burk.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudo dos Componentes do Meio de Cultivo e Parâmetros de Fermentação para a Otimização da Produção de Fitase por *Burkholderia sp.*

4.1.1. Avaliação do efeito de diferentes fontes de carbono, nitrogênio e sais minerais para produção de fitase

4.1.1.1. Estudo univariável

As composições dos 14 meios de cultivo líquidos testados podem ser visualizadas na Tabela 2.

Dentro da faixa de tempo de fermentação estudada (4 até 120 horas), os resultados de atividade de fitase mais significativos ocorreram após 8, 24 e 32 horas de fermentação em *shaker*, a 30°C, 150 rpm, sendo demonstradas na Figura 2. Foi obtida a maior atividade de fitase (1,24 U/mL) utilizando-se o meio de cultivo 7, após 32 horas de fermentação.

De acordo com a Figura 3, podemos perceber que as maiores atividades de fitase ocorreram nos meios 7, 9, 14 e 4, sendo estas correspondentes, respectivamente, à 100, 86,29 e 84,68 e 69,52% quando comparadas à maior atividade obtida neste estudo univariável, após 32 horas de fermentação em *shaker*, a 30°C, 150 rpm.

Assim, as fontes de carbono, componentes dos meios 4, 7, 9 e 14, selecionadas para serem avaliadas em estudo posterior foram fitato de sódio, farelo de trigo, sacarose e óleo de soja e as fontes de nitrogênio foram peptona bacteriológica, nitrato de potássio e o sulfato de amônio. A solução de sais padrão foi mantida.

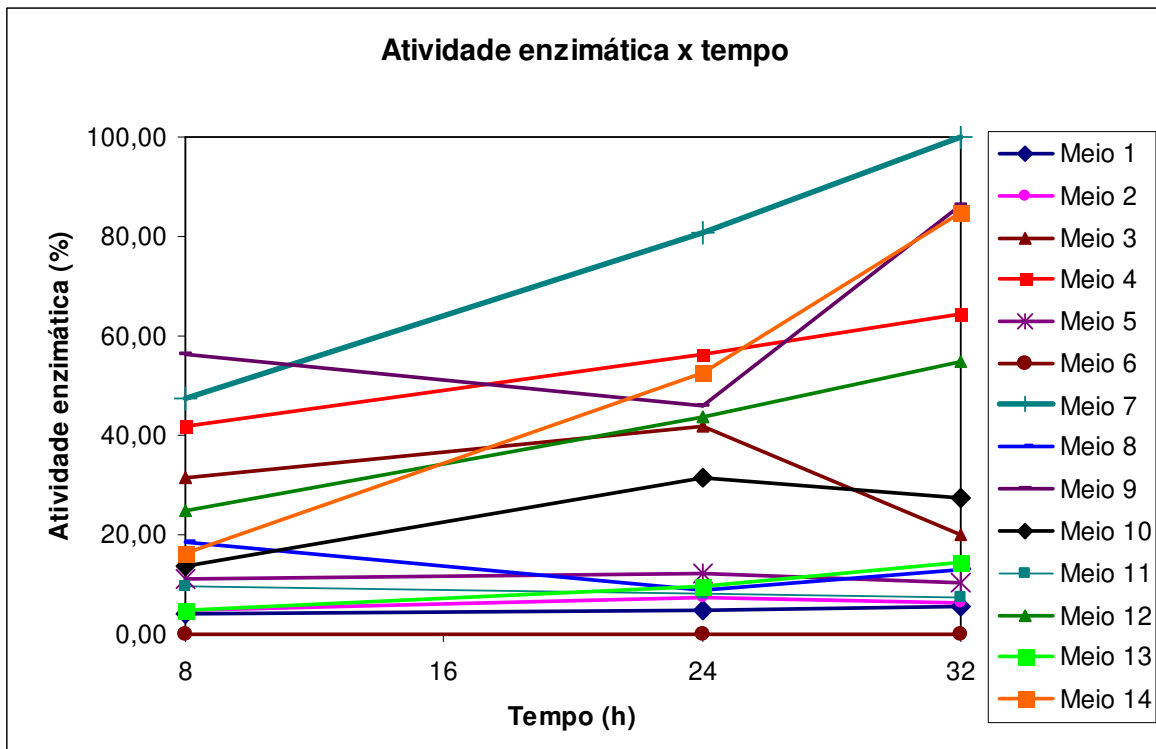


Figura 3. Resultados das atividades enzimáticas relativas (%) referentes aos 14 meios de cultivo líquido testados, após 8, 24 e 32 horas de fermentação de *Burkholderia sp.* em *shaker*.

Foram determinadas as atividades enzimáticas através dos dois métodos propostos no item 3.1.4.1 e 3.1.4.2, porém os resultados das atividades determinadas através do método proposto no item 3.1.4.1 foram muito baixos ou nulos, não sendo considerados.

O tipo e a concentração de fontes de carbono são um dos fatores nutricionais conhecidos que regulam a síntese de fitases bacterianas [36]. Para avaliar o efeito da composição do meio de cultivo para produção de fitase por *Bifidobacterium*, foram estudadas diferentes concentrações de lactose (5,10 e 20 g/L) e diferentes fontes de carbono como glicose, rafinose e FOS a 10g/L, além de estudar o efeito da presença de fosfato inorgânico (KH_2PO_4 2g/L). A concentração de lactose teve um importante efeito na produção de fitase, sendo a maior

atividade específica de fitase quando utilizada a concentração de 1% de lactose [37].

A síntese de fitase é geralmente induzida em bactérias quando concentrações limitantes de fósforo estão presentes no meio de cultivo [36]. A incorporação de diferentes tipos de fontes de carbono ou de fosfato inorgânico ao meio de cultivo parece modular a síntese de fitato em *Bifidobacterium infantis* [37].

Para a fermentação de meio contendo *B. subtilis*, farelo de trigo e caseína foram boas fontes de carbono e nitrogênio para a produção de fitase, sendo que o meio de cultivo utilizado foi composto por 6% de farelo de trigo, 0,04% nitrato de amônio, 0,02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1% caseína hidrolisada, 0,05% KH_2PO_4 e 0,04% KH_2PO_4 , sendo adicionada uma solução de $CaCl_2$ 0,2% antes da inoculação da bactéria. A atividade de fitase atingiu seu máximo após 5 dias de fermentação à 37°C [22].

Greiner et al [7] obtiveram aproximadamente 7,5 U/mg de fitase na fermentação aeróbica de *Klebsiella terrigena*, o meio de cultivo utilizado para o crescimento da bactéria foi composto de 50 mg de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 4 mg de $ZnSO_4 \cdot 2H_2O$, 0,1 mg de $MnSO_4$, 3g de K_2HPO_4 , 2g de peptona e 15 g de fitato de sódio por litro, incubado à 37°C.

Tabela 2. Estudo do efeito de diferentes fontes de carbono, nitrogênio e sais minerais como componentes de meio de cultivo.

Componentes	Meio 1	Meio 2	Meio 3	Meio 4	Meio 5	Meio 6	Meio 7	Meio 8	Meio 9	Meio 10	Meio 11	Meio 12	Meio 13	Meio 14
Sacarose (1,0%)	X	X								X	X	X	X	X
Fitato de Sódio (0,05%)	X	X				X	X	X	X	X	X	X	X	X
Fitato de sódio (0,1%)			X		X									
Farelo de trigo (6%)				X			X							
Farelo de arroz (6%)						X								
Óleo de soja (1%)									X					
Glicerol (1%)								X						
KNO₃ (0,04%)				X							X			
(NH₄)₂SO₄ (0,3%)	X	X			X	X	X	X	X					
Peptona bact. (0,2%)			X											X
Caseína (1%)				X									X	
Uréia (0,3%)										X				
Extrato de levedura (0,2%)												X		
K₂HPO₄ (0,04%)				X										
K₂HPO₄ (0,3%)			X											
KH₂PO₄ (0,05%)				X										
ZnSO₄. 2H₂O 0,0004%			X											
MgSO₄. 7H₂O (0,005%)			X											
MgSO₄.7H₂O (0,05%)	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
MgSO₄.7H₂O (0,02%)				X										
KCl (0,05%)	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
FeSO₄.7H₂O (0,0001%)	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
MnSO₄.H₂O (0,00075%)	X	X			X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
CaCl₂ (0,01%)	X				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
CaCl₂ (0,2%)				X										

4.1.1.2. Planejamento fracionado 2⁷⁻³ para estudo do efeito de fontes de carbono e nitrogênio e sais na fermentação da *Burkholderia sp* e produção de fitase

Foram selecionadas 7 variáveis, que se mostraram importantes no estudo anterior, para serem avaliadas quanto ao seu efeito na produção de fitase no meio de cultivo líquido. A solução de sais utilizada nos ensaios foi a padrão, descrita em 3.1.3.1.

As variáveis escolhidas e os seus níveis (-1, 0, +1) estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3. Variáveis e níveis do planejamento fracionado.

Variáveis \ Níveis	-1	0	+1
Fitato de sódio	0,025%	0,05%	0,075%
Sacarose	1%	2%	3%
Óleo de soja	1%	2%	3%
Farelo de Trigo	1%	2%	3%
KNO₃	0,02%	0,04%	0,06%
Peptona bacteriológica	0,25%	0,50%	0,75%
Sulfato de amônio	0,25%	0,50%	0,75%

A matriz do planejamento está descrita na Tabela 4.

Tabela 4. Matriz do planejamento fracionado 2^{7-3} .

Variáveis Ensaio	Fitato de sódio	Sacarose	Óleo de soja	Farelo de trigo	KNO₃	Peptona bacte- riológica	Sulfato de Amônio
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1	1	-1	1
3	-1	1	-1	-1	1	1	-1
4	1	1	-1	-1	-1	1	1
5	-1	-1	1	-1	1	1	1
6	1	-1	1	-1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1	-1	-1	1
8	1	1	1	-1	1	-1	-1
9	-1	-1	-1	1	-1	1	1
10	1	-1	-1	1	1	1	-1
11	-1	1	-1	1	1	-1	1
12	1	1	-1	1	-1	-1	-1
13	-1	-1	1	1	1	-1	-1
14	1	-1	1	1	-1	-1	1
15	-1	1	1	1	-1	1	-1
16	1	1	1	1	1	1	1
17 (PC)	0	0	0	0	0	0	0
18 (PC)	0	0	0	0	0	0	0
19 (PC)	0	0	0	0	0	0	0
20 (PC)	0	0	0	0	0	0	0

Os resultados das atividades enzimáticas de fitase de cada ensaio, após 12, 24 e 48 horas de fermentação em *shaker* a 30°C, 150 rpm, utilizando o método descrito no item 3.1.4.2, estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Resultado da atividade de fitase (U/mL) dos ensaios do planejamento fracionado 2⁷⁻³ para estudo do efeito de fontes de carbono, nitrogênio e sais na fermentação de *Burkholderia* sp. e produção da enzima.

Ensaio	Atividade enzimática (U/mL) 12h fermentação	Atividade enzimática (U/mL) 24h fermentação	Atividade enzimática (U/mL) 48h fermentação
1	0,15	1,03	0,44
2	0,05	0,00	0,00
3	0,99	0,82	5,04
4	0,83	0,75	0,06
5	0,83	1,38	3,95
6	1,31	0,92	2,51
7	0,65	0,18	3,57
8	0,42	0,00	0,11
9	0,17	0,00	1,03
10	0,39	0,28	0,28
11	0,52	0,06	0,00
12	0,09	0,97	0,00
13	0,37	0,00	3,96
14	0,00	0,00	0,00
15	1,08	0,35	0,25
16	0,00	0,00	0,76
17 (PC)	0,00	2,32	1,46
18 (PC)	0,00	0,93	0,00
19 (PC)	0,00	0,13	0,00
20 (PC)	0,15	0,06	0,75

Os valores de atividade de fitase determinados através do método 3.1.4.1 foram nulos, sendo que apenas o método do para-nitrofenilfosfato (3.1.4.2) demonstrou resultados positivos. De acordo com a análise estatística através do software Statistica 8.0, verificou-se

os efeitos e as variáveis significativas, utilizando um limite de confiança de 90%.

Após 12h de fermentação a peptona bacteriológica apresentou um efeito positivo, indicando que o aumento da quantidade desta reflete em um aumento da atividade enzimática e o farelo de trigo apresentou um efeito negativo, indicando que a diminuição da quantidade deste reflete em um aumento da atividade enzimática.

Após 24 horas de fermentação, não houve variável significativa.

Após 48 horas de fermentação, o fitato de sódio mostrou-se significativo, apresentando efeito negativo, indicando que a diminuição da quantidade deste reflete em um aumento da atividade enzimática.

Deste modo, as variáveis mais significativas para a composição do meio de cultivo líquido foram a peptona bacteriológica, o farelo de trigo e o fitato de sódio.

4.1.2. Otimização da composição do meio de cultivo para produção de fitase em frascos agitados através da técnica de Desenho Experimental.

Foi realizado um fatorial completo 2^3 , utilizando as variáveis selecionadas no planejamento fracionado. De acordo com os resultados do estudo anterior, foi reduzida a quantidade de farelo de trigo e fitato de sódio e aumentada a quantidade de peptona bacteriológica.

As variáveis escolhidas e os seus níveis ($-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$) estão demonstrados na Tabela 6 do texto. A solução de sais padrão (item 3.1.3.1) foi mantida.

Tabela 6. Níveis e variáveis do primeiro planejamento fatorial 2^3 para estudo dos efeitos do farelo de trigo, fitato de sódio e peptona bacteriológica no meio de cultivo para fermentação de *Burkholderia sp* e produção de fitase.

Variáveis \ Níveis	-α	-1	0	+1	+α
Peptona bacteriológica	0	0,40%	1,0%	1,6%	2,0%
Farelo de Trigo	0	0,20%	0,5%	0,8%	1,0%
Fitato de sódio	0	0,01%	0,025%	0,04%	0,05%

A matriz do delineamento está apresentada na Tabela 7.

Tabela 7. Matriz do primeiro planejamento fatorial 2^3 para estudo dos efeitos do farelo de trigo, fitato de sódio e peptona bacteriológica no meio de cultivo para fermentação de *Burkholderia sp* e produção de fitase.

Ensaio	Farelo de Trigo	Fitato de sódio	Peptona bacteriológica
1	-1,00	-1,00	-1,00
2	1,00	-1,00	-1,00
3	-1,00	1,00	-1,00
4	1,00	1,00	-1,00
5	-1,00	-1,00	1,00
6	1,00	-1,00	1,00
7	-1,00	1,00	1,00
8	1,00	1,00	1,00
9	-1,68	0,00	0,00
10	1,68	0,00	0,00
11	0,00	-1,68	0,00
12	0,00	1,68	0,00
13	0,00	0,00	-1,68
14	0,00	0,00	1,68
15 (PC)	0,00	0,00	0,00
16 (PC)	0,00	0,00	0,00
17 (PC)	0,00	0,00	0,00

Os resultados das atividades de fitase (U/mL) após 24 e 48 horas de fermentação em *shaker* a 30°C, 150rpm, estão expressos na Tabela 8. Apesar de terem sido utilizados os dois métodos (3.1.4.1 e 3.1.4.2) para determinação de fitase, somente o método 3.1.4.2, utilizando substrato p-nitrofenilfosfato apresentou resultados de atividade de fitase maiores que zero. Deste modo, optou-se por não mais utilizar o método descrito em 3.1.4.1, que utiliza fitato de sódio como substrato, para determinação da atividade de fitase.

Tabela 8. Atividades enzimáticas (U/mL) obtidas nos ensaios do planejamento fatorial 2³ para estudo dos efeitos do farelo de trigo, fitato de sódio e peptona bacteriológica no meio de cultivo, após 24h e 48h de fermentação da *Burkholderia* sp.

Ensaio	Atividade fitase (U/mL) após 24h de fermentação	Atividade fitase (U/mL) após 48h de fermentação
1	0,29	0,26
2	0,35	0,47
3	0,33	0,31
4	0,46	0,41
5	0,68	0,69
6	0,42	0,54
7	0,66	0,67
8	0,45	0,39
9	0,70	0,56
10	0,43	0,46
11	0,46	0,50
12	0,39	0,39
13	0,36	0,44
14	0,61	0,72
15	0,62	0,62
16	0,47	0,57
17	0,51	0,53

A ANOVA da atividade de fitase após 24 horas de fermentação ($R^2 = 83,86\%$), apresentada na Tabela 9, foi significativa.

Tabela 9. ANOVA para atividade de fitase após 24 horas de fermentação de *Burkholderia* sp. em planejamento fatorial 2^3 para estudo dos efeitos do farelo de trigo, fitato de sódio e peptona bacteriológica no meio de cultivo.

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	GL	QM	F-calc	p-valor
Regressão	0,222129	5	0,044425704	11,4298655	0,00046519
Resíduo	0,042755	11	0,003886809		
Falta de ajuste	0,030874	9	0,003430399	0,57744476	0,76895011
Erro puro	0,011881	2	0,005940653		
Total	0,264883	16	0,016555214		

As superfícies de resposta estão apresentadas nas Figuras 4, 5 e 6.

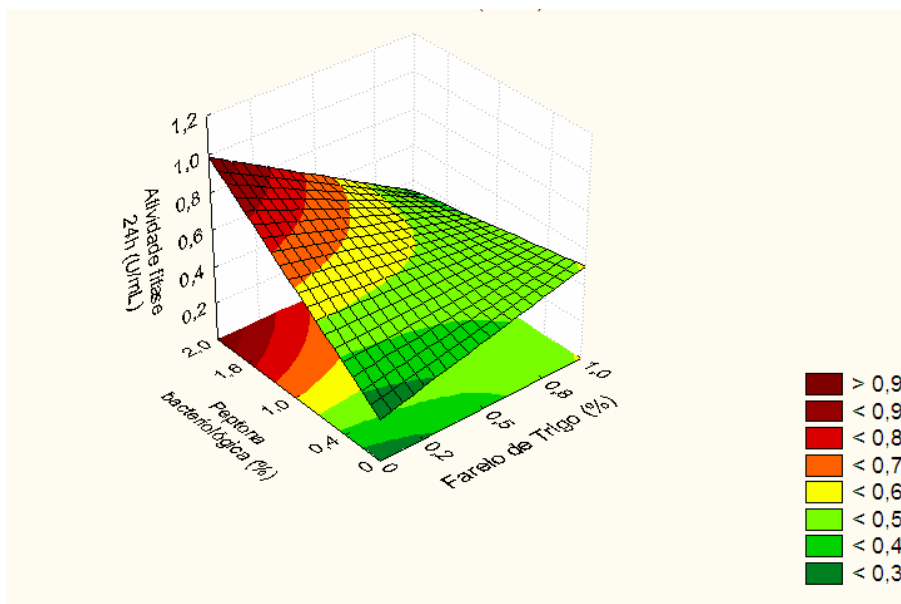


Figura 4. Superfície de resposta do primeiro planejamento 2^3 para estudo do efeito da concentração de peptona bacteriológica e farelo de trigo no meio de cultivo na produção de fitase, após 24h de fermentação de *Burkholderia* sp.

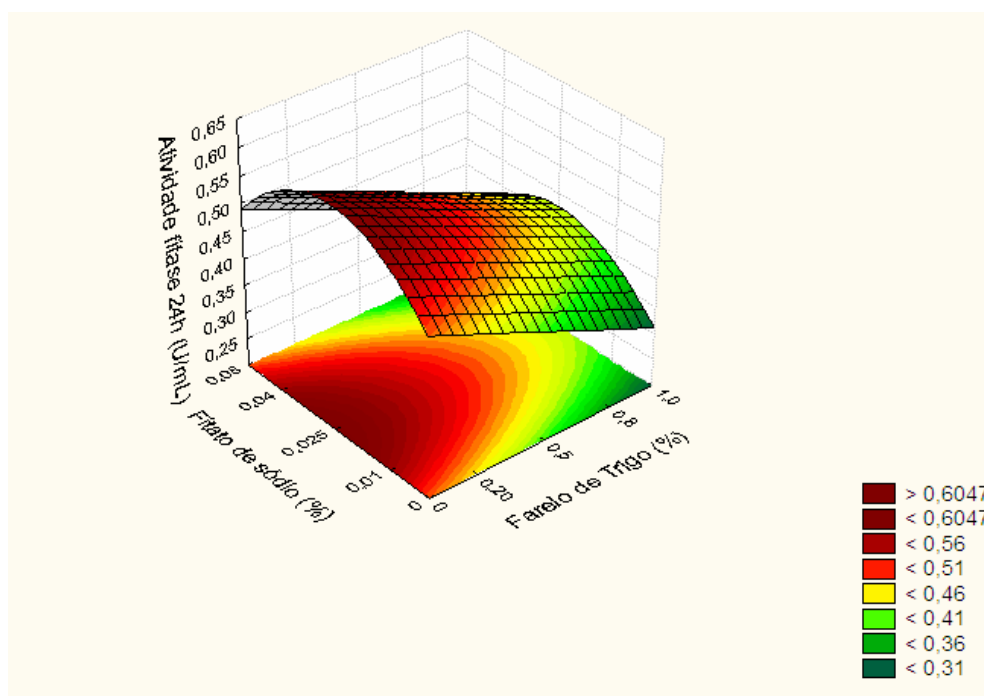


Figura 5. Superfície de resposta do primeiro planejamento 2^3 para estudo do efeito da concentração de fitato de sódio e farelo de trigo no meio de cultivo na produção de fitase, após 24h de fermentação de *Burkholderia* sp.

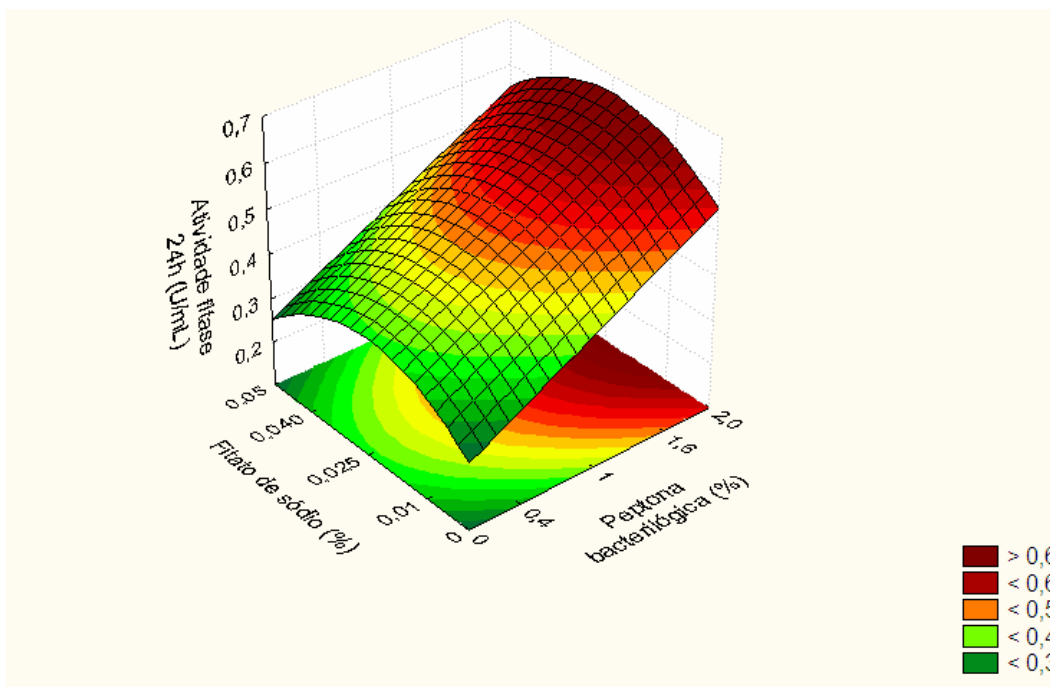


Figura 6. Superfície de resposta do primeiro planejamento 2^3 para estudo do efeito da concentração de fitato de sódio e peptona bacteriológica no meio de cultivo na produção de fitase, após 24h de fermentação de *Burkholderia* sp.

A ANOVA da atividade de fitase após 48 horas de fermentação ($R^2=91,90\%$), apresentada na Tabela 10 também foi significativa. As superfícies de resposta estão apresentadas nas Figuras 7, 8 e 9.

Tabela 10. ANOVA para atividade de fitase após 48 horas de fermentação de *Burkholderia* sp. em planejamento fatorial 2^3 para estudo dos efeitos do farelo de trigo, fitato de sódio e peptona bacteriológica no meio de cultivo.

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	GL	QM	F-calc	p-valor
Regressão	0,248303	5	0,04966062	24,9535573	$1,1765 \cdot 10^{-5}$
Resíduo	0,021891	11	0,00199012		
Falta de ajuste	0,017380	9	0,00193116	0,8562131	0,64596603
Erro puro	0,004511	2	0,00225546		
Total	0,270194	16	0,01688715		

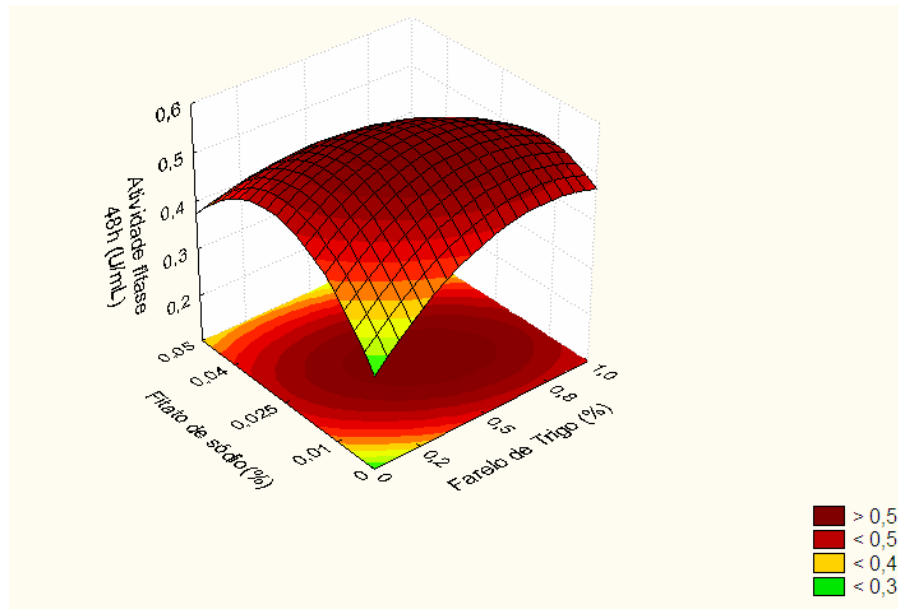


Figura 7. Superfície de resposta do primeiro planejamento 2^3 para estudo do efeito da concentração de fitato de sódio e farelo de trigo no meio de cultivo na produção de fitase, após 48h de fermentação de *Burkholderia* sp.

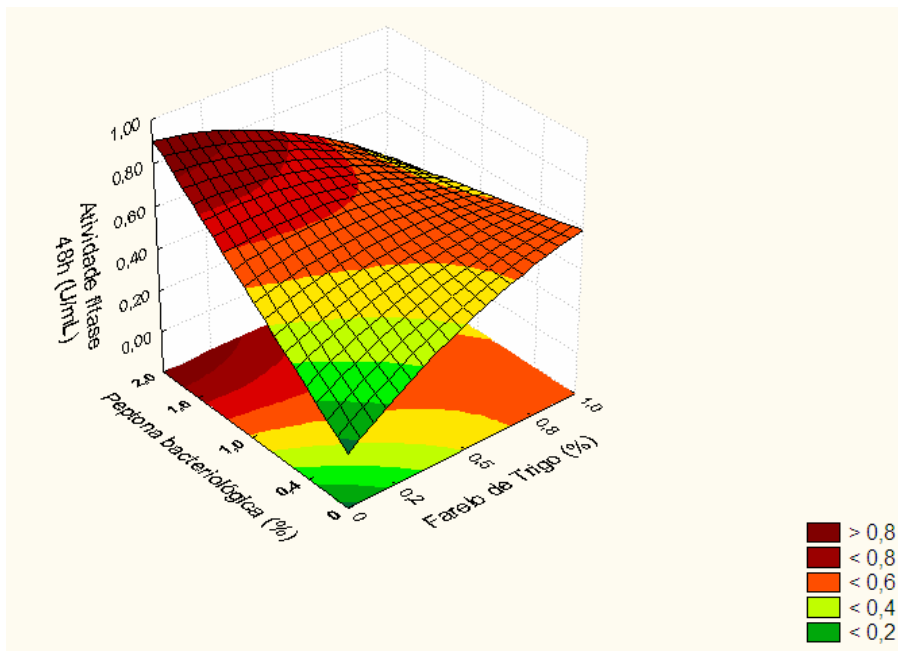


Figura 8. Superfície de resposta do primeiro planejamento 2^3 para estudo do efeito da concentração de farelo de trigo e peptona bacteriológica no meio de cultivo na produção de fitase, após 48h de fermentação de *Burkholderia* sp.

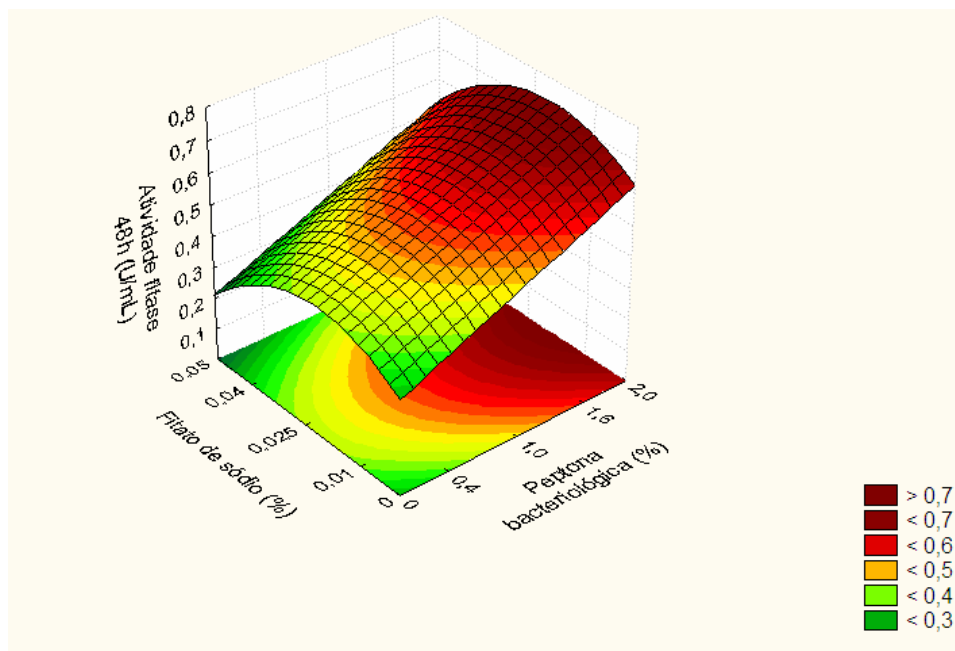


Figura 9. Superfície de resposta do primeiro planejamento 2^3 para estudo do efeito da concentração de fitato de sódio e peptona bacteriológica no meio de cultivo na produção de fitase, após 48h de fermentação de *Burkholderia* sp.

Através das superfícies de resposta, pode-se observar que após 48 horas de fermentação, a ANOVA foi mais significativa que a de 24 horas, apresentando valores de R^2 de 91,9% e 83,86%, respectivamente. Os valores próximos do nível 0 para fitato de sódio (0,025%) e farelo de trigo (0,5%), e do nível $-\alpha$ para peptona (0) foram os pontos de maior atividade enzimática. Assim os valores dos níveis de fitato de sódio e peptona bacteriológica foram ajustados para o próximo planejamento.

Apesar dos resultados deste estudo terem sido estatisticamente significativos, eles não se mostraram maiores que os resultados do estudo univariável.

Assim foi realizado mais um estudo fatorial completo 2^3 utilizando como variáveis a sacarose, a peptona bacteriológica e o fitato de sódio, sendo que os níveis destas duas últimas variáveis foram ajustadas de acordo com os melhores resultados do planejamento fatorial anterior. O farelo de trigo foi substituído pela sacarose por ser uma fonte de

carbono mais barata. A solução padrão de sais (item 3.1.3.1) foi mantida.

As variáveis e seus níveis estão expressos na Tabela 11.

Tabela 11. Níveis e variáveis do planejamento fatorial 2^3 para estudo dos efeitos da sacarose, fitato de sódio e peptona bacteriológica no meio de cultivo para fermentação de *Burkholderia* sp. e produção de fitase.

Níveis Variáveis	-α	-1	0	+1	+α
Peptona bacteriológica	0,116%	0,15%	0,2%	0,25%	0,284%
Sacarose	0,16%	0,50%	1,0 %	1,5%	1,84%
Fitato de sódio	0,025%	0,035%	0,05%	0,065%	0,075%

A matriz do planejamento fatorial está apresentada na Tabela 12.

Tabela 12. Matriz do planejamento fatorial 2^3 para estudo dos efeitos da sacarose, fitato de sódio e peptona bacteriológica no meio de cultivo para fermentação de *Burkholderia* sp. e produção de fitase.

Ensaio	Peptona Bacteriológica	Sacarose	Fitato de sódio
1	-1,00	-1,00	-1,00
2	1,00	-1,00	-1,00
3	-1,00	1,00	-1,00
4	1,00	1,00	-1,00
5	-1,00	-1,00	1,00
6	1,00	-1,00	1,00
7	-1,00	1,00	1,00
8	1,00	1,00	1,00
9	-1,68	0,00	0,00
10	1,68	0,00	0,00
11	0,00	-1,68	0,00
12	0,00	1,68	0,00
13	0,00	0,00	-1,68
14	0,00	0,00	1,68
15 (PC)	0,00	0,00	0,00
16 (PC)	0,00	0,00	0,00
17 (PC)	0,00	0,00	0,00

Os resultados de atividade de fitase determinadas através do método proposto no item 3.1.4.2, após 24, 48 e 72 horas de fermentação em *shaker* a 30°C, 150 rpm, estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Atividades enzimáticas (U/mL) obtidas nos ensaios do planejamento fatorial 2³ para estudo dos efeitos da sacarose, fitato de sódio e peptona bacteriológica no meio de cultivo, após 24h, 48h e 72h de fermentação de *Burkholderia* sp.

Ensaio	Atividade fitase (U/mL) após 24h de fermentação	Atividade fitase (U/mL) após 48h de fermentação	Atividade fitase (U/mL) após 72h de fermentação
1	1,59	1,7	2,1
2	1,37	2,59	1,37
3	0,73	0,88	0,89
4	0,65	0,8	0,93
5	1,47	1,89	1,96
6	1,20	1,18	1,33
7	0,57	0,78	0,69
8	0,48	0,59	0,98
9	0,60	0,83	0,78
10	0,64	1,86	1,74
11	1,27	1,33	1,38
12	0,30	0,49	0,44
13	0,95	1,55	2,8
14	0,38	0,72	1,22
15 (C)	0,59	0,64	0,83
16 (C)	0,54	0,75	1,32
17 (C)	0,38	0,54	1,41

Para os tempos de fermentação avaliados (24h, 48h e 72h), o tempo de 24h de fermentação foi o que apresentou maior R² (67,99%) quando comparado aos tempos de 48h (61,81%) e 72h (51,02%). Sendo assim, consideramos apenas os resultados após 24 horas de fermentação para análise estatística. A ANOVA está apresentada na Tabela 14.

Tabela 14. ANOVA para atividade de fitase após 24 horas de fermentação de *Burkholderia* sp. em planejamento fatorial 2^3 para estudo dos efeitos da sacarose, fitato de sódio e peptona bacteriológica no meio de cultivo.

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	GL	QM	F-calc	p-valor
Regressão	1,878829	3	0,626276	9,20413	0,001572
Resíduo	0,884559	13	0,068043		
Falta de ajuste	0,860492	9	0,09561	7,945449	0,116735
Erro puro	0,024067	2	0,012033		
Total	2,763388	16	0,172712		

Apesar deste segundo planejamento fatorial 2^3 ter apresentado um valor de R^2 (67,99%) menor do que os apresentados no primeiro planejamento fatorial 2^3 , foram obtidos valores de atividade de fitase maiores ($>1,24$ U/mL) do que os valores obtidos no primeiro planejamento fatorial 2^3 e do estudo univariável.

As superfícies de resposta para atividade de fitase após 24 horas de fermentação estão demonstradas nas Figuras 10 e 11.

Verificou-se que o efeito da adição de peptona bacteriológica no meio de cultivo e na produção de fitase foi significativa em toda faixa estudada (0,116% à 0,284%), a adição de sacarose foi significativa em valores próximos à $-\alpha$ (0,16%) e o fitato de sódio em valores próximos à $+\alpha$ (0,075%) e $-\alpha$ (0,025%).

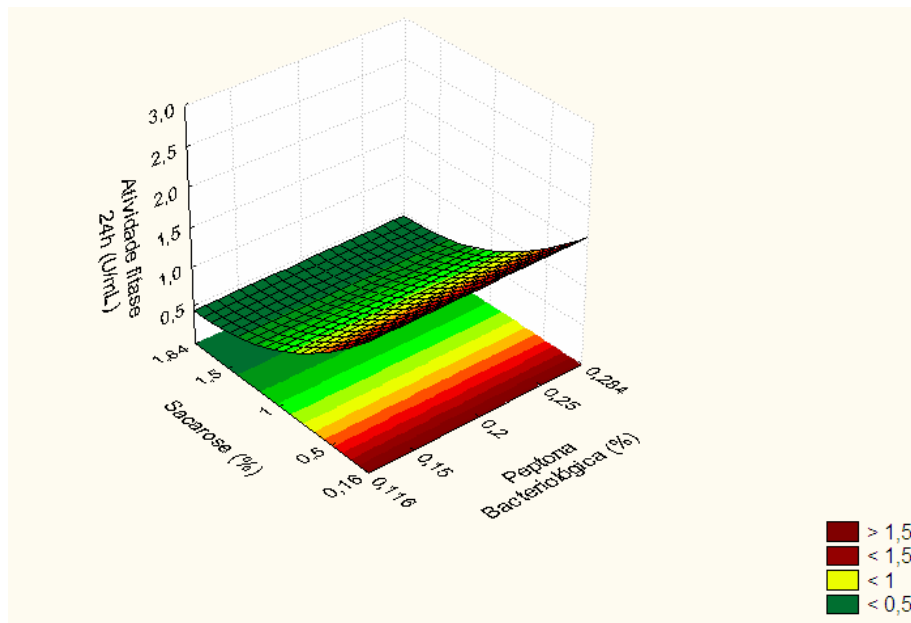


Figura 10. Superfície de resposta do segundo planejamento 2^3 para estudo do efeito da concentração de sacarose e peptona bacteriológica no meio de cultivo na produção de fitase, após 24h de fermentação de *Burkholderia* sp.

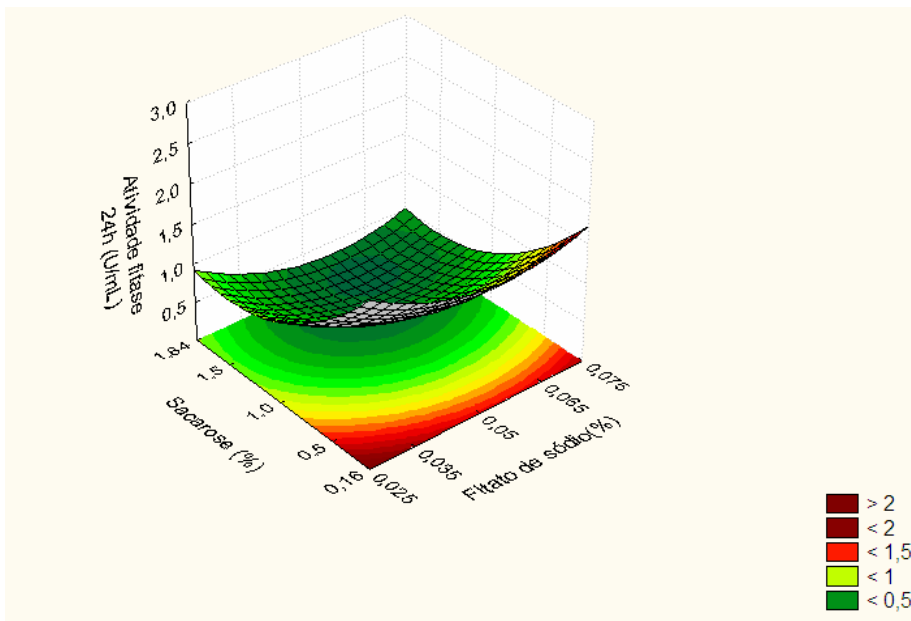


Figura 11. Superfície de resposta do segundo planejamento 2^3 para estudo do efeito da concentração de sacarose e fitato de sódio no meio de cultivo na produção de fitase, após 24h de fermentação de *Burkholderia* sp.

Deste modo, a concentração de peptona bacteriológica foi fixada em 0,2%, a sacarose em $-α$ (0,16%) e, pelo fato da adição de fitato de sódio no meio de cultivo ter resultado em atividades maiores tanto no nível $-α$ (0,025%) quanto no nível $+α$ (0,075%), foi realizado mais um teste, para determinar qual meio de cultivo apresentaria maiores valores de atividade enzimática.

De acordo com as superfícies de resposta do planejamento anterior, a adição de fitato de sódio no meio de cultivo produziu maiores atividades tanto no nível $-α$ (0,025%) quanto no nível $+α$ (0,075%).

Assim, foram selecionados dois meios de cultivo (meios 15 e 16, Tabelas 15 e 16, respectivamente) a serem testados.

Os resultados das atividades de fitase (U/mL), dos meios 15 e 16, após 24, 48 e 72 horas de fermentação de *Burkholderia* sp. em *shaker* a 30°C, 150rpm, determinadas através do método descrito em 3.1.4.2., estão descritos na Tabela 17.

Tabela 15. Composição do meio de cultivo líquido (Meio 15) e concentração de seus componentes.

MEIO 15	Concentração
Fitato de sódio	0,025%
Sacarose	0,16%
Peptona bacteriológica	0,20%
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05%
KCl	0,05%
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,0001%
MnSO ₄ .H ₂ O	0,00075%
CaCl ₂	0,01%

Tabela 16. Composição do meio de cultivo líquido (Meio 16) e concentração de seus componentes.

MEIO 16	Concentração
Fitato de sódio	0,075%
Sacarose	0,16%
Peptona bacteriológica	0,20%
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,05%
KCl	0,05%
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,0001%
MnSO ₄ .H ₂ O	0,00075%
CaCl ₂	0,01%

Tabela 17. Atividade de fitase (U/mL), após 24, 48 e 72 horas de fermentação de *Burkholderia* sp. nos meios 15 e 16.

Meios	Atividade de fitase (U/mL) após 24h de fermentação	Atividade de fitase (U/mL) após 48h de fermentação	Atividade de fitase (U/mL) após 72h de fermentação
Meio 15	1,43	1,07	1,01
Meio 16	1,73	2,00	2,12

Foi obtida maior atividade de fitase (2,12 U/mL) no meio de cultivo 16, após 72 horas de fermentação de *Burkholderia* sp., em que foi utilizado o fitato de sódio na concentração do nível + α (0,075%), resultando em um aumento de 110% em relação ao resultado obtido utilizando-se o meio 15.

Deste modo, o meio 16 composto de fitato de sódio 0,075%, sacarose 0,16% e peptona bacteriológica 0,2%, MgSO₄.7H₂O 0,05%, KCl 0,05%, FeSO₄.7H₂O 0,0001%, MnSO₄.H₂O 0,00075% e CaCl₂ 0,01% foi determinado como o meio de cultivo líquido otimizado, utilizando as condições de 150 rpm, 30°C e 72 horas de fermentação.

4.1.3. Estudo da preparação do pré-inóculo para a fermentação de *Burkholderia* sp. e produção de fitase

A quantidade de biomassa obtida nos experimentos sempre foi muito pequena, motivo pelo qual não foram realizadas medidas de biomassa. Na tentativa de aumentar a massa celular bacteriana (biomassa) e otimizar a preparação do pré-inóculo foi realizado um estudo do pré-inóculo.

De acordo com Vohra e Satyahanana (2003), a glicose tem sido o substrato preferido para a produção de fitase, sendo 1% a concentração ótima para *Lactobacillus amylovorus* e *Enterobacter* sp 4. [36]

O pré-inóculo foi produzido de acordo com o item 3.1.7. utilizando-se o meio de cultivo composto por 5 g/L de glicose, 7,5 g/L de peptona bacteriológica e solução padrão de sais. Esse meio líquido é rico em fonte de carbono (glicose) e nitrogênio (peptona bacteriológica), sendo que o fitato está ausente. Este pré-inóculo foi assim composto para prover suprimento suficiente para que a bactéria se fortalecesse, para então ser transportada para um meio mais pobre em fontes de carbono, o que causaria uma situação de estresse, e mais rico em fitato, para que a fitase produzida pudesse utilizá-lo como substrato, visto que a fitase geralmente é um produto do metabolismo secundário, produzido em situações de estresse.

Foram realizadas determinações das medidas das absorvâncias a 600nm para estimar o crescimento celular, pH e consumo de glicose do pré-inóculo, nos tempos 0, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas.

Foi construída uma curva de crescimento bacteriano e de pH do pré-inóculo, de acordo com o tempo de fermentação em *shaker* (Figura 12) e também do consumo de glicose e valores de pH de acordo com o tempo de agitação em *shaker* (Figura 13).

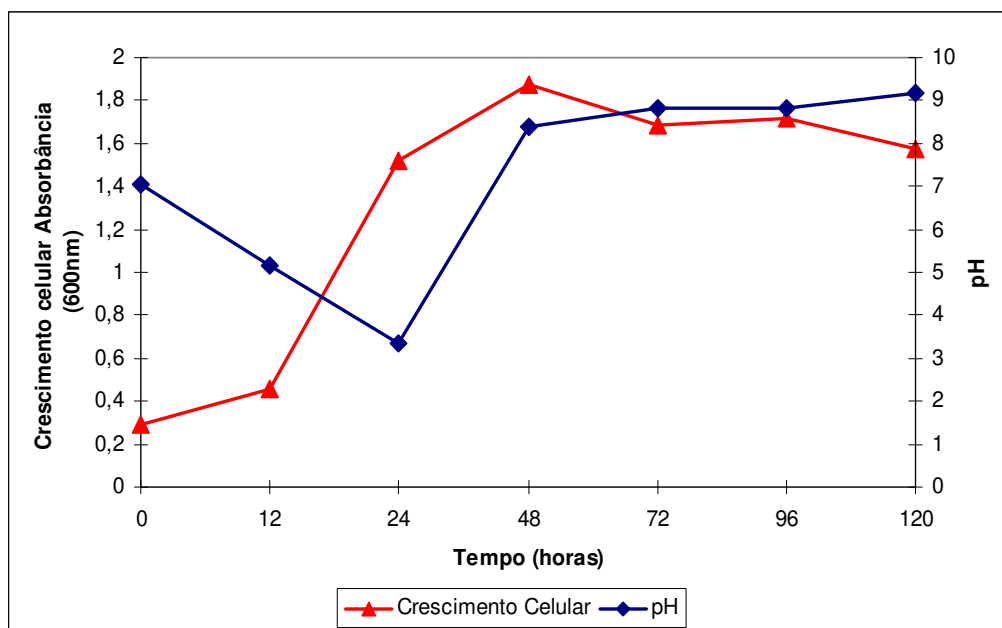


Figura 12. Perfil de crescimento bacteriano (absorbância a 600nm) no meio líquido de pré-inóculo e medida do pH de acordo com o tempo de agitação em *shaker* a 30°C, 150rpm.

Foi verificado que no final da fase log, a medida de absorbância à 600nm corresponde à 1,6, após 24 horas de fermentação de *Burkholderia* sp. Assim, determinou-se que quando o crescimento bacteriano estivesse próximo do final da fase log, deveria-se transferir o pré-inóculo para o meio de cultivo líquido a ser testado. Portanto, foi estabelecido que o pré-inóculo seria incubado à 30°C, sob agitação de 150rpm, por aproximadamente 24 horas, ou até atingir absorbância à 600nm igual a 1,6.

De acordo com a Figura 13, a glicose foi completamente consumida após 24 horas de fermentação, apresentando também o menor pH entre os tempos testados, devido à utilização da glicose, resultando em produção de H_2CO_3 .

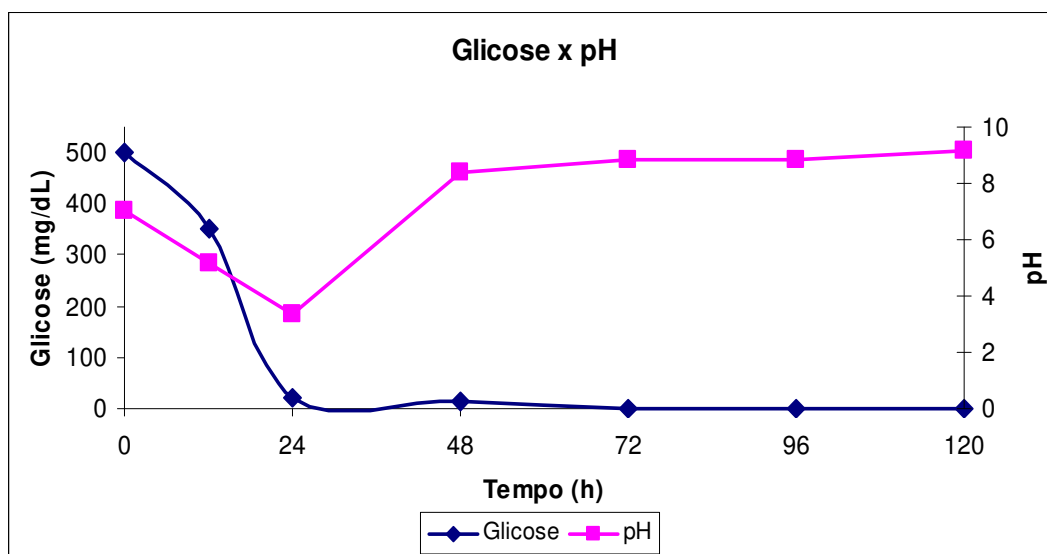


Figura 13. Perfil de consumo de glicose (mg/dL) no meio líquido de pré-inóculo e medida do pH de acordo com o tempo de agitação em *shaker* a 30°C, 150rpm.

Estudos utilizaram medidas de densidade ótica a 600nm para estimar o crescimento celular de *Bifidobacterium* [37], bem como medidas a 578nm, para crescimento celular de *E. coli* [6] e *K. terrigena* [7].

Haros et al. (2007) demonstraram que fontes de carbono alternativas à glicose são mais adequadas tanto em termos de crescimento celular quanto em atividade específica de fitase para *Bifidobacterium*, porém a substituição de lactose por glicose no meio de cultivo, resultou na redução da atividade de fitase em aproximadamente 45%, enquanto que o crescimento celular não apresentou diferença significativa ($2,97 \times 10^9$ CFU/mL). [37]

Estudos demonstraram que a atividade de fitase de *Bifidobacterium infantis* foi dependente da fase de crescimento bacteriana, mostrando seu máximo durante a fase estacionária do crescimento (18-20 horas de incubação) em diferentes meios testados [37]. Por outro lado, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* apresentou maior atividade enzimática na fase exponencial (log) da curva de

crescimento [38]. Os maiores valores de atividade de fitase alcançados por *Bifidobacterium infantis* foram 1,84 (em 18h), 1,68 (em 18h) e 1,75 U/mg proteína (em 21h) em meio padrão, em meio contendo fosfato inorgânico e meio contendo FOS ao invés de lactose, respectivamente [37].

Para a linhagem de *Bacillus subtilis* (natto) 77 foi detectada atividade de fitase no final da fase log, atingindo seu máximo de atividade após 5 dias de fermentação em meio de cultivo composto de 500mL de meio *heart infusion* (HI) suplementado com $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 mM, 1% de glicose, 1 % D-manose e 0,5% de extrato de levedura. O meio HI foi utilizado simplesmente por conter baixo conteúdo de fosfato que era conveniente para o ensaio de fitase e não por ser o melhor meio para produção de fitase [22].

Foi determinada a quantidade de pré-inóculo a ser transferida para o meio líquido de cultivo. Após 24 horas de agitação do pré-inóculo em *shaker* a 30°C, 150 rpm, a absorbância a 600nm resultava em 1,9. Foram então transferidas alíquotas de 1 e 3mL de pré-inóculo, para Erlenmeyers de 50mL contendo 15mL de meio de cultivo líquido autoclavado, em triplicata, rico em fitato e mais pobre em peptona bacteriológica (7g/L de fitato de sódio, 2g/L peptona bacteriológica e solução de sais padrão). Os frascos foram incubados em shaker a 30°C, 150 rpm.

Adicionando 1 e 3 mL de pré-inóculo nos frascos Erlenmeyer de 50 mL, contendo 15 mL de meio de cultivo, foram obtidos respectivamente 0,17 e 0,20 U/mL de fitase, após 24 horas de fermentação e 0,19 e 0,24 U/mL, após 48 horas de fermentação à 30°C.

O crescimento celular estimado pela medida de absorbância a 600nm, nos ensaios utilizando 1 e 3 mL de pré-inóculo foram respectivamente 1,11 e 1,20, após 24 horas de fermentação e 1,13 e 1,42 após 48 horas de fermentação, à 30°C. Durante o estudo, foi

possível atingir a absorbância 1,6 após 16 horas de fermentação em shaker.

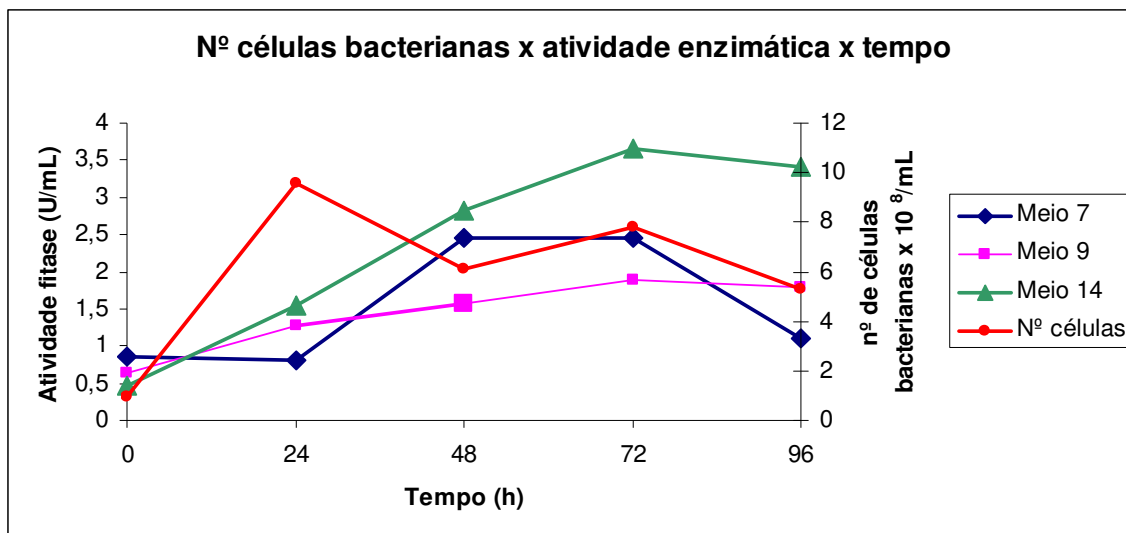


Figura 14. Atividade enzimática (U/mL) dos meios 7, 9 e 14 e número de células bacterianas determinadas em Câmara de Newbauer, adicionando-se 3mL de pré-inóculo, mantido previamente em *shaker* por 16 horas, a 150 rpm, 30°C, versus tempo (h).

A figura 14 ilustra os resultados de atividade de fitase e número de células bacterianas $\times 10^8/\text{mL}$ obtidos nos ensaios em que foram adicionados 3mL de pré-inóculo, preparados com o meio de cultivo composto de 5g/L glicose, 7,5 g/L peptona bacteriológica e solução de sais padrão do item 3.1.3.1, previamente fermentados em *shaker* a 30°C, 150 rpm, por 16 horas em frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 15 mL dos meios 7, 9 e 14, descritos no estudo univariável do item 4.1.1.1.

Os resultados das medidas das atividades de fitase, através do método descrito em 3.1.4.2 e o número de células do meio 9, estimado em Câmara de Newbauer, nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96 horas, estão demonstrados na Figura 14. Foi verificado que o aumento do número de células de *Burkholderia* sp. no meio de cultivo 9 ocorreu até 24 horas de

fermentação, decaindo após esse tempo. Foi observado um aumento expressivo da atividade enzimática em 72 horas de fermentação. Os resultados de atividade de fitase em 72h de fermentação dos meios 7, 9 e 14, foram respectivamente, 2,45 U/mL, 1,88 U/mL e 3,66 U/mL, sendo maiores do que os resultados no estudo univariável.

Assim, a adição de 3 mL de pré-inóculo ao meios que demonstraram maior atividade no estudo univariável, refletiu em aumento da atividade de fitase.

4.1.4. Otimização das condições de cultivo para produção de fitase em frascos agitados através da técnica de Desenho Experimental

Foi realizado um fatorial completo 2^2 , onde foram estudadas as variáveis agitação e temperatura. Esse estudo foi realizado utilizando a composição do meio de cultivo líquido otimizado (Tabela 16).

Os níveis utilizados e as variáveis deste planejamento estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18. Níveis e variáveis utilizados no DCCR 2^2 para estudo do efeito da agitação e temperatura na produção de fitase por *Burkholderia* sp.

Níveis Variáveis	-α	-1	0	+1	+α
Agitação (rpm)	50	79	150	221	250
Temperatura (°C)	23	25	30	35	37

A matriz e os resultados de atividade de fitase após 24, 48 e 72 horas de fermentação em *shaker* estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19. Matriz do planejamento fatorial 2² para estudo do efeito da agitação e da temperatura na produção de fitase e atividades de fitase após 24, 48 e 72 horas de fermentação da bactéria *Burkholderia* sp.

Ensaio	Agitação	Temperatura	Atividade fitase 24h (U/mL)	Atividade fitase 48h (U/mL)	Atividade fitase 72h (U/mL)
1	-1,00	-1,00	1,07	0,97	1,02
2	1,00	-1,00	1,10	1,22	1,31
3	-1,00	1,00	0,31	0,65	0,79
4	1,00	1,00	1,46	2,30	2,37
5	-1,41	0,00	0,45	0,92	1,01
6	1,41	0,00	1,41	1,60	1,59
7	0,00	-1,41	1,11	1,15	1,07
8	0,00	1,41	1,21	1,35	1,30
9 (PC)	0,00	0,00	1,45	1,53	1,88
10 (PC)	0,00	0,00	1,22	1,29	1,30
11 (PC)	0,00	0,00	1,29	1,37	1,26

A ANOVA para a atividade de fitase, após 24 horas de fermentação ($R^2=90,75\%$) foi significativa e está apresentada na Tabela 20.

Tabela 20. ANOVA para atividade de fitase, após 24h de fermentação de *Burkholderia* sp, em planejamento fatorial 2².

Fatores	SQ	GL	QM	Fcal	p-valor
Agitação(L)	0,804955	1	0,804955	57,91045	0,016833
Agitação(Q)	0,204899	1	0,204899	14,74093	0,061633
Agitação x Temperatura	0,313600	1	0,313600	22,56115	0,041579
Falta de ajuste	0,107109	5	0,021422	1,54114	0,438353
Erro puro	0,027800	2	0,013900		
Total	1,458364	10			

A análise da superfície de resposta (Figura 15) demonstrou que a agitação próxima a 150 rpm e 30°C foi a que mais contribuiu para as melhores atividades de fitase.

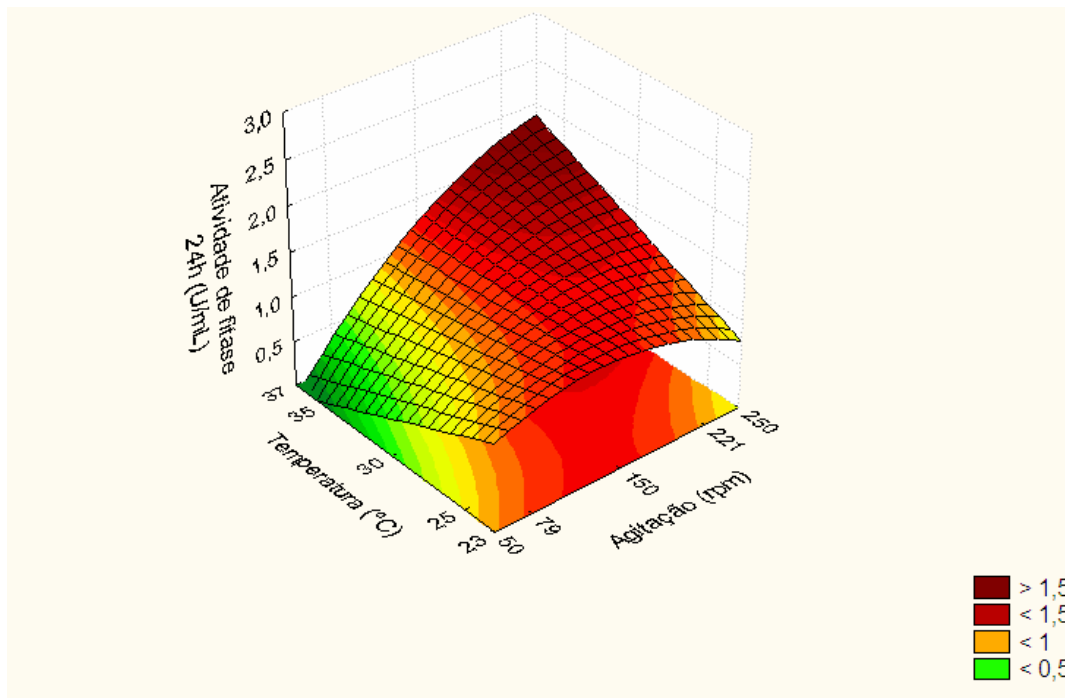


Figura 15. Superfície de resposta do efeito da temperatura e da agitação na produção de fitase por *Burkholderia sp*, após 24 horas de fermentação em frascos agitados à 150 rpm, 30°C.

Após 48 horas de fermentação, a ANOVA (Tabela 21) apresentou um R^2 menor (81,60%), porém significativo.

Tabela 21. ANOVA para atividade de fitase, após 48h de fermentação de *Burkholderia sp.*, em planejamento fatorial 2^2 .

Fatores	SQ	GL	QM	Fcal	p-valor
Agitação	1,023641	1	1,023641	68,54739	0,014277
Agitação x Temperatura	0,490000	1	0,490000	32,81250	0,029150
Falta de ajuste	0,311365	6	0,051894	3,47506	0,240266
Erro puro	0,029867	2	0,014933		
Total	1,854873	10			

Através da análise da superfície de resposta (Figura 16) pode-se concluir que, após 48 de fermentação de *Burkholderia* sp., as temperaturas entre 35-37°C e agitações entre 221 e 250 rpm foram as melhores condições para a produção de fitase, dentro da faixa estudada.

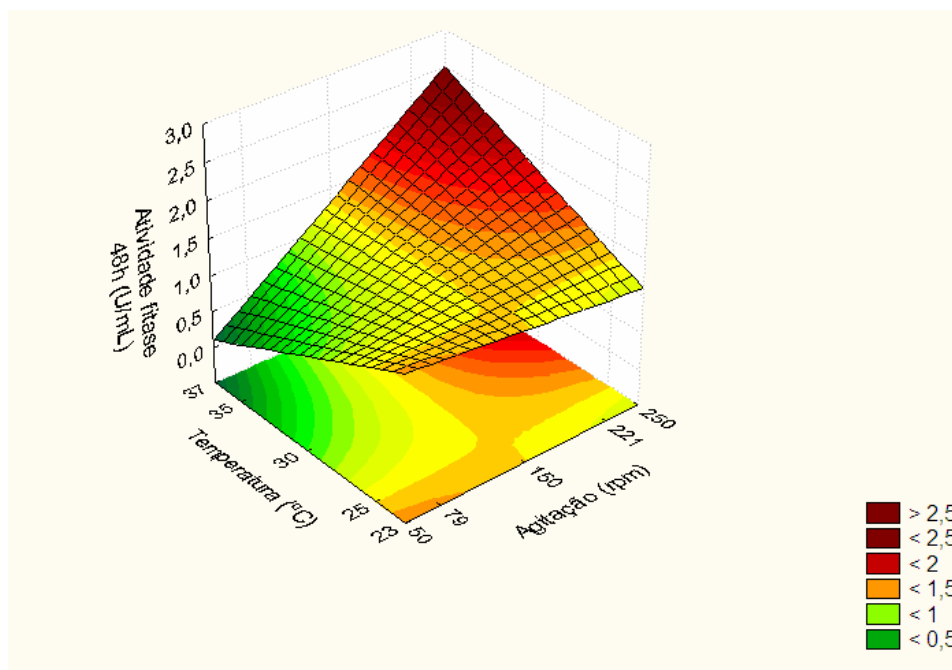


Figura 16. Superfície de resposta do efeito da temperatura e da agitação na produção de fitase por *Burkholderia* sp, após 48 horas de fermentação em frascos agitados à 150 rpm, 30°C.

Após 72 horas de fermentação, a ANOVA para a atividade de fitase (Tabela 22) não foi estatisticamente significativa ($R^2 = 65,71\%$), sendo assim, não foi possível definir as superfícies de resposta.

Tabela 22. ANOVA para atividade de fitase, após 72 horas de fermentação de *Burkholderia sp.*, em planejamento fatorial 2².

Fatores	SQ	GL	QM	Fcal	p-valor
Agitação(L)	0,904677	1	0,904677	7,513924	0,111303
Agitação x Temperatura	0,416025	1	0,416025	3,455357	0,204143
Falta de ajuste	0,448371	6	0,074729	0,620669	0,724620
Erro puro	0,240800	2	0,120400		
Total	2,009873	10			

Após 48 de fermentação de *Burkholderia sp.*, a 37°C e 250 rpm, foi obtida maior atividade de fitase (2,30 U/mL), porém optou-se por utilizar as condições de 150 rpm e 30°C por 24 horas de fermentação em *shaker*, em que foi obtida atividade de fitase 1,46 U/mL, a fim de tornar o processo mais ágil para as etapas subsequentes do estudo.

4.2. Caracterização Bioquímica da Fitase Produzida por *Burkholderia sp.*

4.2.1. Temperatura ótima e de estabilidade

A Figura 17 apresenta a temperatura ótima de atividade para o extrato enzimático de fitase produzida por *Burkholderia sp.*

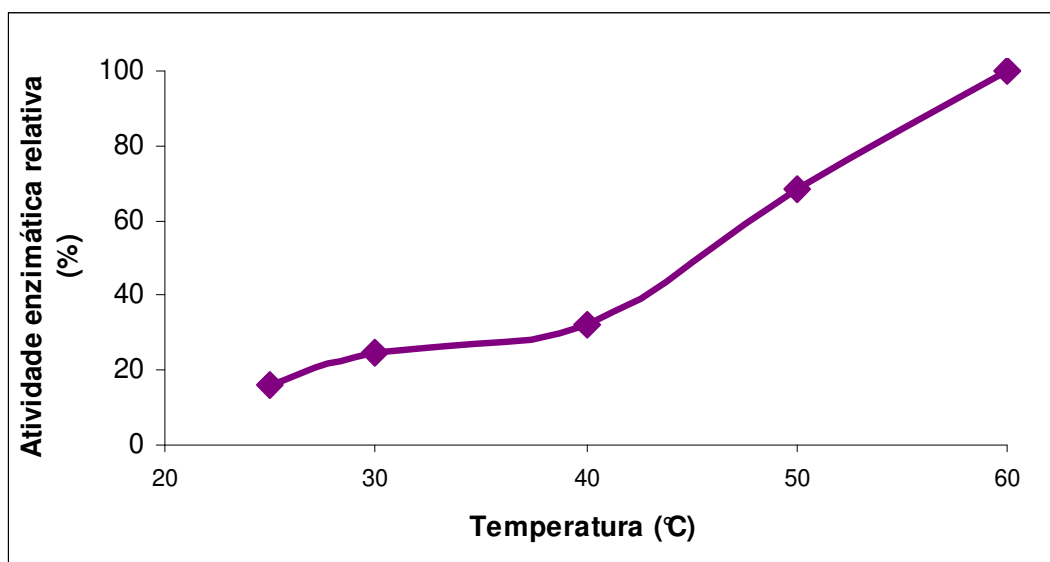


Figura 17. Temperatura ótima de extrato enzimático de *Burkholderia sp.*

No extrato enzimático de *Burkholderia sp.*, pode-se observar o aumento de atividade de fitase com o aumento de temperatura, verificando-se o pico em 60°C, dentro da faixa testada.

Na Figura 18 pode-se fazer um comparativo entre os perfis de temperatura ótima das fitases de *Burkholderia sp.*, Natuphos® e Quantum®.

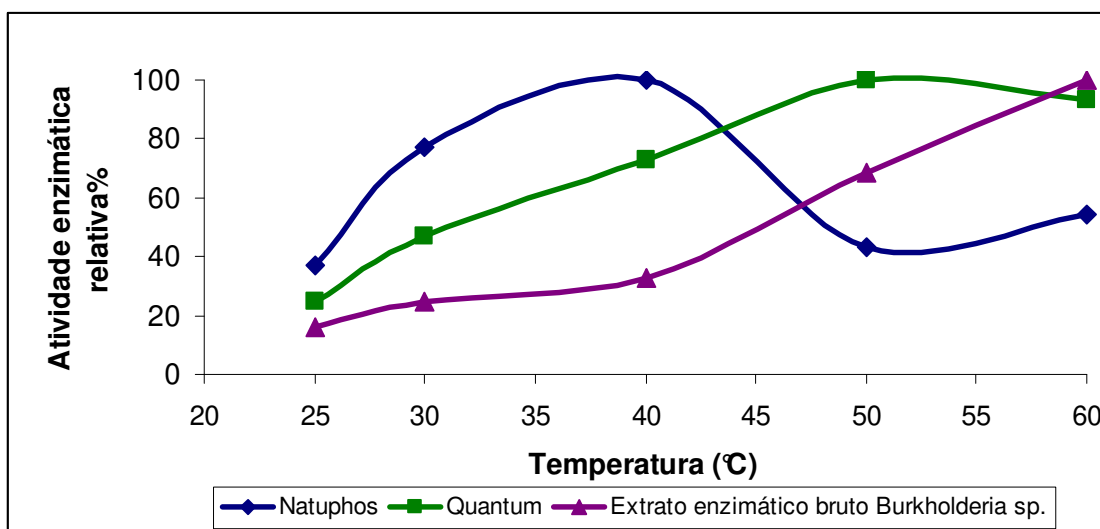


Figura 18. Temperaturas ótimas de fitases de diferentes fontes.

A enzima Natuphos[®] apresentou temperatura ótima de atividade em 40°C e a Quantum[®] em 50°C, dentro da faixa e das condições testadas.

As fitases bacterianas apresentam temperaturas ótimas na faixa de 50-70°C, segundo Greiner e Konietzny, 2006 [40]; Vohra e Satyanarayana, 2003 [36]. As enzimas de origem vegetal geralmente não resistem ao tratamento térmico, sendo a maioria inativada irreversivelmente em temperaturas superiores à 70°C. Já as microbianas retêm atividade significativa após períodos prolongados de incubação (Konietzny e Greiner, 2002) [5], dependendo do micro-organismo produtor e da linhagem (Sandberg e Andlid; 2002) [12]. Algumas fitases relatadas como mais resistentes às altas temperaturas foram isoladas de *Rhizopus oligosporus* (Casey e Walsh, 2004) [39], *S. castellii* (Segueilha et al., 1992) [17] e *A. fumigatus* (Pasamontes et al., 1997).[16]

Fitases originadas de *Bacillus subtilis*, *Enterobacter sp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella terrigena*, *Pseudomonas syringae*, *Lactobacillus*

sanfrancesis e *Citrobacter braaaki*, demonstraram temperatura ótima em 60, 50, 60, 58, 40, 45 e 50°C, respectivamente [41].

Haros et al. (2007) [37] determinou o efeito da temperatura na atividade de fitase de *Bifidobacterium infantis*. Atividade enzimática foi ótima à 50°C, por 15 minutos. A bactéria estudada também apresentou alta atividade (51,2%) à 37°C, que é a temperatura normal do corpo humano, havendo possibilidade da cepa ser parcialmente ativa no intestino humano.

A temperatura de estabilidade do extrato enzimático de *Burkholderia* sp. pode ser observado na Figura 19.

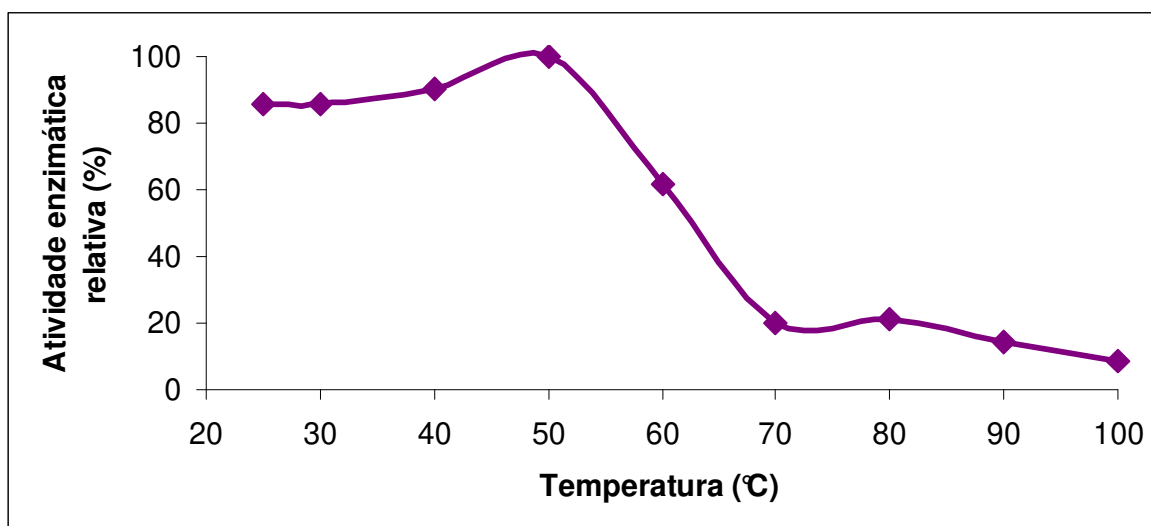


Figura 19. Temperatura de estabilidade de extrato enzimático de *Burkholderia* sp.

Verificou-se que a fitase de *Burkholderia* sp. manteve estabilidade em temperaturas menores que 50°C, dentro da faixa e condições testadas, preservando até 80% da atividade enzimática.

Na Figura 20 pode-se fazer um comparativo entre os perfis de temperatura de estabilidade das fitases de *Burkholderia* sp., Natuphos® e Quantum®.

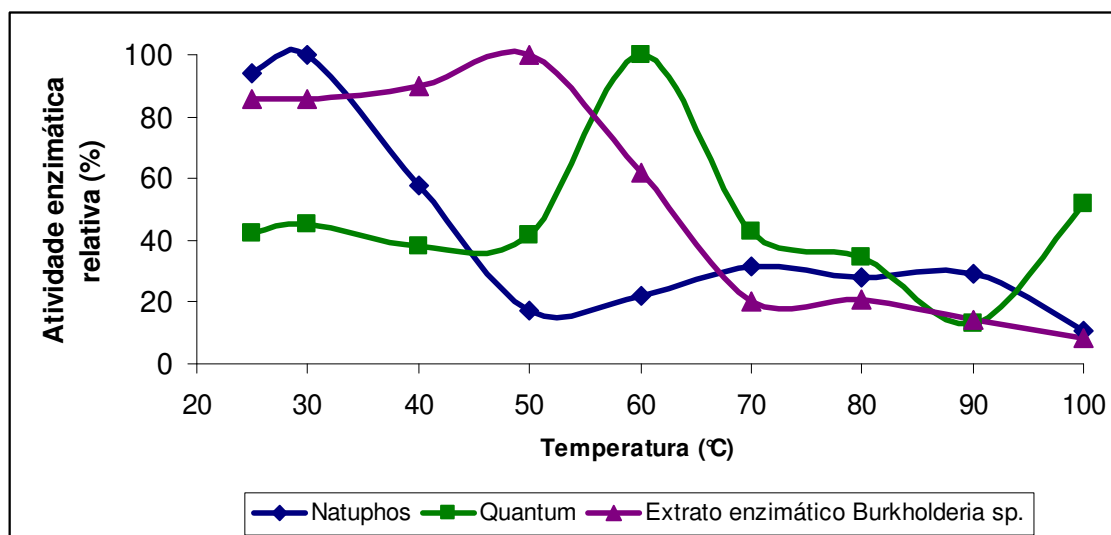


Figura 20. Temperaturas de estabilidade de fitases de diferentes fontes.

A fitase Natuphos, após 1 hora de tratamento térmico, mostrou estabilidade em temperaturas entre 25 e 35°C, mantendo 80% de atividade enzimática. Segundo Cao et al., (2007) [11] a Natuphos manteve 75% da atividade em temperaturas inferiores à 75°C, por 15 minutos.

Natuphos[®] foi a primeira fitase comercial e continua sendo uma das mais conhecidas para se utilizar em rações animais. A maior parte das enzimas derivadas de micro-organismos geralmente é estável em temperaturas altas e baixos pHs, importantes no contexto do tratamento térmico das rações e estabilidade no trato digestivo superior, respectivamente, segundo Casey e Walsh, 2004. [39]

A fitase Quantum[®] apresenta termoestabilidade [31]. No presente estudo, manteve estabilidade entre 55 e 65°C, mantendo até 80% da atividade.

O efeito da temperatura na estabilidade de uma enzima depende de um número de fatores que incluem pH e a força iônica e a presença ou ausência de ligantes. A tolerância superior observada para a fitase de *Burkholderia* sp. até aproximadamente 55°C, comparada às demais

enzimas comerciais estudadas, pode ser devida a maior resistência apresentada pela bactéria, considerando o fato desta linhagem ter sido selecionada com aumento gradual de temperatura (Ries e Macedo, 2009) [10], bem como por fatores relacionados ao extrato enzimático total. Kim et al., (1998) [14] relatou que a presença de íons cálcio no meio pode ajudar a estabilizar a enzima, tornando-a mais resistente ao aumento de temperatura para fitase de *Bacillus* sp. DS11.

4.2.2. pH ótimo e pH de estabilidade

A Figura 21 demonstra o pH ótimo do extrato enzimático produzido por *Burkholderia* sp.

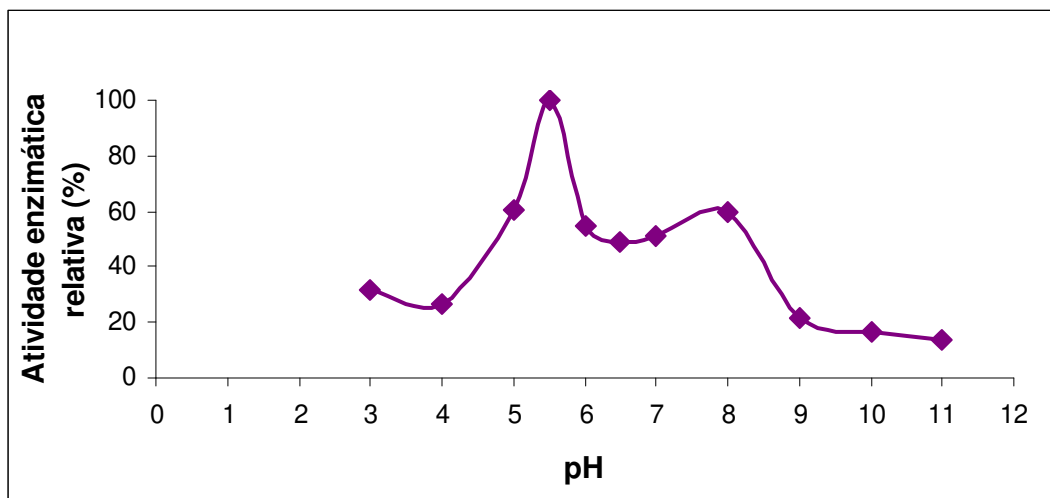


Figura 21. pH ótimo de atividade de fitase produzida por *Burkholderia* sp.

A ação do extrato enzimático de *Burkholderia* sp. em substrato 4-npp resultou em ótimo de atividade em pH 5,5. Pode-se observar um segundo pico de atividade em pH 8,0, em que a enzima manteve 60% da atividade enzimática, quando comparado ao pico verificado no pH 5,5.

Analisando a Figura 22, pode-se fazer um comparativo entre os perfis de atividade enzimática em diferentes pHs para as três fitases testadas (extrato enzimático de *Burkholderia* sp., Natuphos[®] e Quantum[®]).

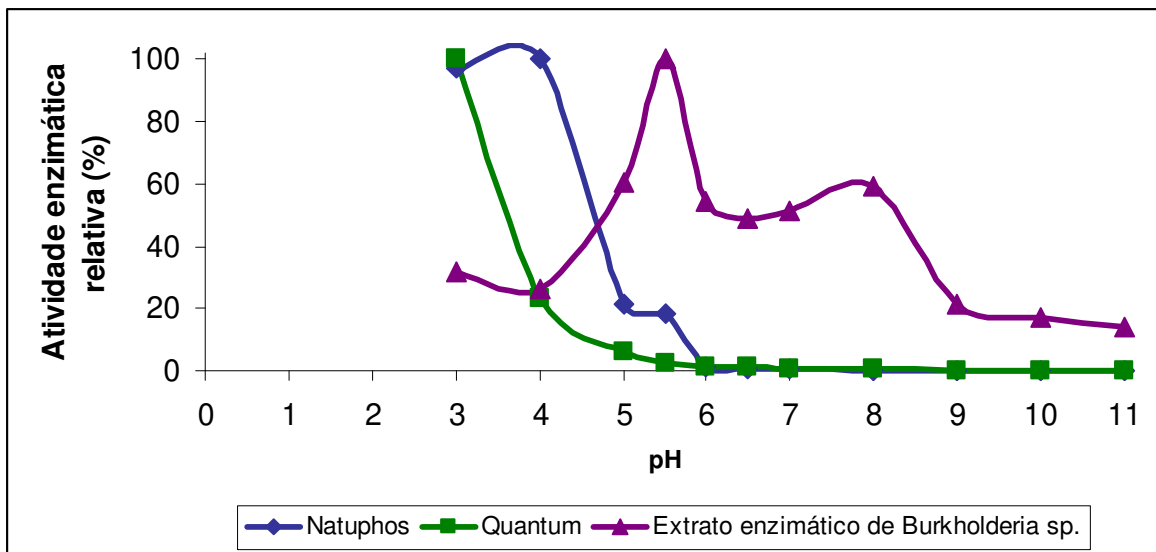


Figura 22. pH ótimo da atividade de fitases de diferentes fontes.

Para a fitase Natuphos[®] as maiores atividades enzimáticas, utilizando substrato 4-npp, ocorreram em pH 3,0 e 4,0 e para a fitase Quantum[®] em pH 3,0. Observou-se que acima de pH 4,0 as atividades das fitases caíram drasticamente, nas condições testadas.

Segundo Liu et al., (1998) [13] a maioria das fitases apresenta atividade ótima em pH 4,5 - 6,0, podendo ser identificados dois picos de atividades, um maior em pH 5,0 - 5,6, e outro menor em pH 2,5. Segundo Casey e Walsh, 2004, algumas fitases apresentam dois picos de atividade em valores diferentes de pH provavelmente causados por diferenças na distribuição de cargas no sítio de ligação do substrato, influenciando diretamente na interação do substrato [39].

Segundo Vats e Banerjee (2004) [41] fitases originadas de *Bacillus subtilis*, *Enterobacter sp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella terrigena*, *Pseudomonas syringae*, *Lactobacillus sanfrancesis* e *Citrobacter braaaki*, demonstraram pH ótimo em 6,0-6,5; 7,0-7,5; 4,5; 5,0; 5,5; 4,0 e 4,0 respectivamente.

Shieh e Ware (1968) [42] separaram 2 picos de atividade de fitase por cromatografia, atribuindo a atividade em pH 2,0 à fração de

fosfatase ácida não específica e a atividade em pH 5,5 à fração de fitase. Esses 2 picos podem representar 2 enzimas diferentes que exibem marcadas propriedades e estabilidades térmicas diferentes. No entanto, não é possível distinguir enquanto não se separam os 2 centros ativos por eletroforese de gel ou outro método de visualização (Irving e Cosgrove, 1974 [23]; Howson e Davis, 1983 [1]).

A Figura 23 demonstra o pH de estabilidade da atividade de fitase produzida por *Burkholderia* sp.

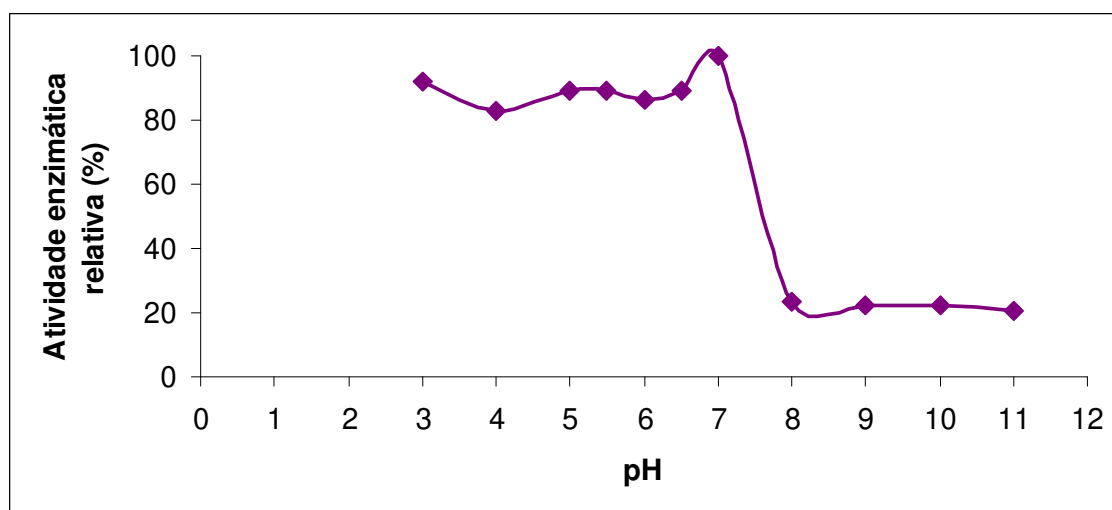


Figura 23. pH de estabilidade de fitase produzida por *Burkholderia* sp.

A fitase de *Burkholderia* sp. manteve de 80 à 100% de atividade na faixa de pH 3,0 à 7,0, apresentando apenas 20% de atividade em pHs igual ou maiores que 8. Huang et al., (2006) [43] encontraram faixa de estabilidade em pH entre 3,5 à 10,0 para atividade de fitase extracelular de *Yersinia intermedia* expressa em *Pichia pastoris*.

A Figura 24 demonstra o pH de estabilidade do extrato enzimático bruto de fitase de *Burkholderia* sp. e de duas preparações comerciais de fitase. Observou-se que as fitases Natuphos[®] e Quantum[®] apresentaram estabilidade em pH 4,5 - 5,0 e pH 5,5 e 7,0, respectivamente, e

também um pico máximo de atividade em pH 3,0 para Natuphos®. Chantasartrasamee et al., (2005) [44] verificaram que a preparação de fitase de *Aspergillus oryzae* AK9 apresentou estabilidade em duas faixas de pH (2,0 à 3,6 e 5,0 à 7,0) e sugeriram a presença de duas fitases distintas.

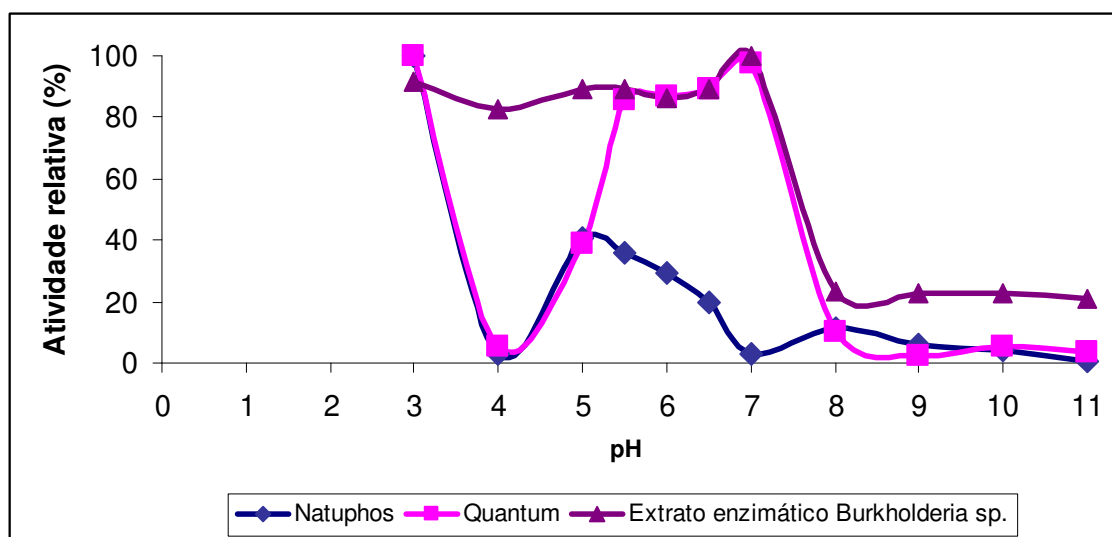


Figura 24. pH de estabilidade de atividade de fitases de diferentes fontes.

Verificou-se que os resultados encontrados para fitase de *Burkholderia* sp. são fisiologicamente relevantes por apresentar estabilidade em valores de pH menores que 7,0, considerando principalmente os diferentes pHs encontrados no sistema digestivo de animais, segundo Casey e Walsh (2004) [39]: glândula salivar (pH 5,0 e 7,0), estômago (alimentado pH 6,5 e sob estímulo de secreção de ácido pH 3,5 - 4,5) e parte superior do duodeno (pH 4,0 ~ 6,0).

4.2.3. Efeito de sais na atividade enzimática de fitase de *Burkholderia sp.*

Os efeitos de diferentes sais, nas concentrações de 1 mM e 10 mM, na atividade de fitase de *Burkholderia sp.* foram verificados, sendo apresentados na Tabela 23. O controle corresponde ao procedimento padrão de reação enzimática sem adição de sais, considerado como 100% de atividade de fitase.

Tabela 23. Efeito de diferentes sais na atividade de *Burkholderia sp.*

Sal/ Molaridade	Atividade relativa de fitase (%) de <i>Burkholderia sp.</i>	
	1 mM	10 mM
Controle	100 ^{ab}	100 ^b
MnSO ₄ .H ₂ O	39 ^f	50 ^{ef}
KCl	102 ^a	89 ^b
FeSO ₄ .7H ₂ O	55 ^e	2 ^g
Fe ₂ (SO ₄) ₃ .H ₂ O	70 ^d	60 ^{de}
CaCl ₂	103 ^a	93 ^b
MgSO ₄ .7H ₂ O	103 ^a	92 ^b
Na ₂ SO ₄	102 ^a	96 ^b
CuSO ₄	55 ^e	14 ^g
Li ₂ SO ₄ .H ₂ O	101 ^{ab}	90 ^b
BaSO ₄	103 ^a	141 ^a
ZnSO ₄ .7H ₂ O	69 ^d	4 ^g
CoCl ₂ .6H ₂ O	98 ^b	77 ^c
K ₂ HPO ₄	97 ^b	68 ^{cd}
HgCl ₂	93 ^c	48 ^f
EDTA	101 ^{ab}	89 ^b

Médias com a mesma letra na mesma coluna não apresentam diferença estatisticamente significativa entre si ($p < 0,05$) pelo Teste de Tuckey.

Para a fitase produzida por *Burkholderia sp.*, a adição dos íons K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, Li⁺, Ba²⁺ e EDTA, na concentração de 1 mM no sistema

reacional, não apresentou efeitos significativos na atividade enzimática. O mesmo foi constatado por Huang et al., (2006) [43] para fitase de *Yersinia intermedia* expressa em *Pichia pastoris*. Porém a adição dos íons Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{3+} , causaram maiores reduções na atividade de fitase, em 61%, 45%, 45%, 31% e 30%, respectivamente. Dentre os sais testados, na concentração de 1 mM, nenhum provocou o aumento significativo da atividade enzimática.

A adição dos íons Ba^{2+} , na concentração de 10 mM no sistema reacional, resultou em um aumento de 41% na atividade da fitase de *Burkholderia* sp., indicando que o Ba^{2+} pode atuar como um cofator para a enzima. A adição de íons K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , Li^+ e EDTA, na concentração de 10 mM no sistema reacional, não apresentou efeito significativo na atividade de fitase. A adição dos demais sais (Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Co^{2+} , K_2HPO_4 e Fe^{3+}), causou a redução da atividade de fitase, sendo que os íons Fe^{2+} e Zn^{2+} causaram praticamente a inibição da enzima, reduzindo a atividade em 98 e 96%.

Os efeitos dos sais na atividade de fitase de *Burkholderia* sp. foram comparados aos efeitos dos sais na atividade das enzimas comerciais Natuphos[®] e Quantum[®], que foram apresentadas por Ries, 2010 [45].

Ries (2010) observou um aumento da atividade de fitase Natuphos[®] e Quantum[®] em presença de íons Fe^{3+} e Fe^{2+} . A adição de íons Fe^{3+} na concentração de 1 mM resultou em aumento da atividade das fitases, enquanto que a concentração de 10 mM reduziu as atividades enzimáticas. Greiner et al., (1997) [7] atribuíram a redução da atividade de fitase em presença de Fe^{2+} e Zn^{2+} devido a menores concentrações do substrato pela formação de complexos pouco solúveis íons - fitato. Para fitase de *Aspergillus niger* a presença de íons Fe^{2+} e Fe^{3+} não apresentou efeitos apreciáveis (Casey e Walsh, 2003) [27].

Segundo Ries (2010), a adição de K_2HPO_4 teve um efeito fortemente inibitório sobre a atividade enzimática da fitase de Natuphos[®] e Quantum[®]. Este efeito era esperado devido à inibição da atividade de fitase em presença de concentrações elevadas de fosfato (Shieh e Ware, 1968 [42]; Howson e Davis, 1983 [1]; Kim et al., 1998 [14]; Casey e Walsh, 2004 [39]) como as testadas por Ries, 2010 [45]. A partir do momento em que a fitase é produzida, quando as concentrações de fosfato inorgânico são limitadas, os organismos estão supridos com meios de obter o fosfato inorgânico de fosfatos orgânicos quando necessário (Shieh e Ware, 1968) [42].

Íons Mn^{2+} aumentaram a atividade das fitases comerciais Natuphos[®] e Quantum[®], na concentração 1 mM, e em contrapartida, a adição de íons Hg^{2+} reduziu as atividades. Para fitase de *Burkholderia* sp. a adição de Hg^{2+} , na concentração de 10 mM no meio reacional, resultou em redução significativa de atividade (52% de redução). Porém, aumento de atividade foi verificado para fitase de *Aspergillus niger* na presença de íons Hg^{2+} na concentração de 200 mM (Casey e Walsh, 2003) [27].

O efeito inibitório dos íons metálicos é bem documentado na literatura. É sabido que os íons de mercúrio e Zn^{2+} reagem com o grupo tiol (grupo sulfidrila). A inibição pode ser resultado da reação de um grupo sulfidrila essencial do sítio ativo ou uma reação geral com grupos sulfidrilas que causam efeitos estéricos ou desnaturação enzimática [46]. Isso sugere que a fitase de *Burkholderia* sp. possa ter grupo tiol em seu sítio ativo.

4.2.4. Cinética enzimática

O valor da constante de Michaelis-Menten (K_m) para o extrato enzimático bruto de *Burkholderia* sp. foi de 0,02 mM, utilizando o substrato p-nitrofenilfosfato, e a velocidade máxima (V_{max}) de 6,20 $\mu\text{mol Pi}/\text{min}/\text{mg}$. O método gráfico de Michalis-Menten está representado na Figura 25 e o gráfico duplo recíproco para hidrólise catalisada pela fitase está demonstrado na Figura 26.

Foi verificado por Ries (2010) [45] que as fitases comerciais Natuphos[®] e Quantum[®] seguem a cinética de Michaelis-Menten e apresentam valores de K_m de 1,35mM e 3,08mM, respectivamente, utilizando o substrato p-nitrofenilfosfato. Como V_{max} , foram obtidos os valores de 0,17 $\mu\text{molP}/\text{min}/\text{mg}$ e 0,75 $\mu\text{molP}/\text{min}/\text{mg}$, respectivamente. Os resultados desse estudo foram utilizados para efeito comparativo no estudo dos parâmetros cinéticos de fitase de *Burkholderia* sp., determinados pelo método de Lineweaver-Burk.

Valores de K_m de 7,78mM e 18,16mM foram relatados para fitases de *Escherichia coli* (Greiner et al., 1993) [6] e *Aspergillus niger* expressa em *Pichia pastoris* GS 115 [47], respectivamente.

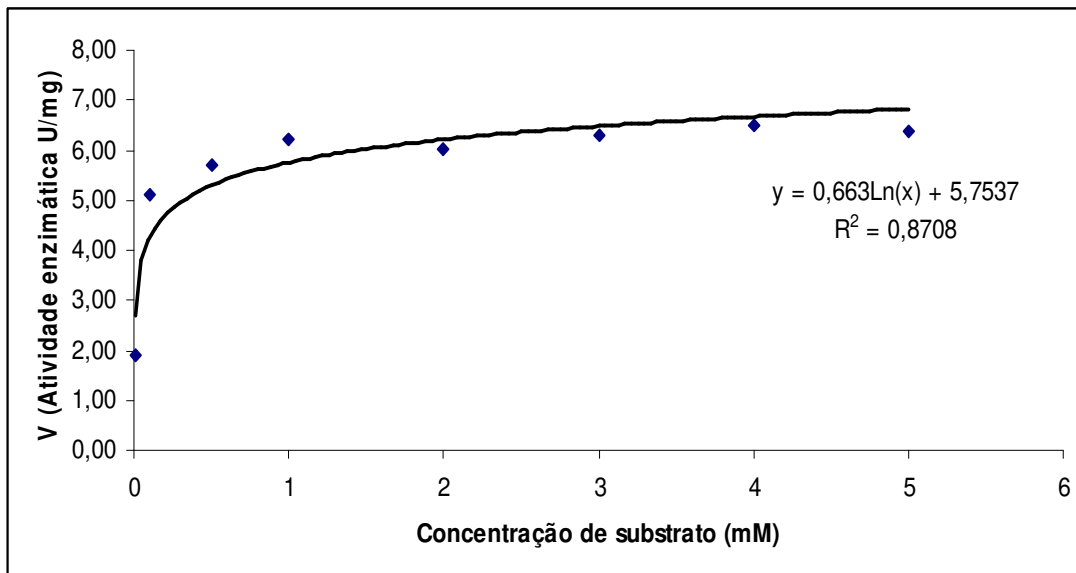


Figura 25. Método gráfico de Michaelis-Menten.

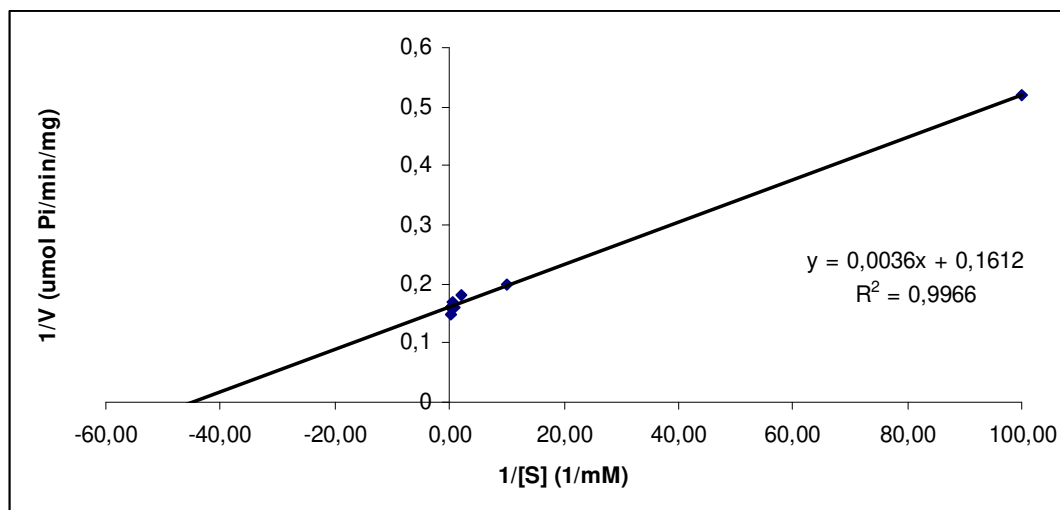


Figura 26. Gráfico duplo recíproco para hidrólise catalisada por fitase de *Burkholderia* sp.

A maioria das enzimas apresenta cinética do tipo Michaelis-Menten. À medida que a concentração de substrato aumenta, a atividade catalítica de uma concentração fixa de uma enzima aumentará de forma hiperbólica, aproximando-se da velocidade máxima, V_{max} , característica na qual toda a enzima está na forma de complexo ES

(enzima-substrato). A concentração de substrato que produz a metade da velocidade máxima é a constante de Michaelis-Menten ou K_m , que é característica para cada enzima, agindo sobre um dado substrato. Todas essas enzimas que exibem uma dependência hiperbólica de V_o em relação a $[S]$ seguem a cinética de Michaelis-Menten. A equação de Michaelis-Menten relaciona a velocidade inicial de uma reação enzimática com a concentração do substrato e a V_{max} através da constante K_m e pode ser transformada algebricamente em formas que são mais úteis na determinação prática de K_m e V_{max} , como equação de Lineweaver-Burk. Para enzimas que obedecem a equação de Michaelis-Menten, obtemos uma linha reta quando $1/V_o \times 1/[S]$ são lançados no gráfico de Lineweaver-Burk. A linha reta obtida tem inclinação igual a K_m/V_{max} , o intercepto no eixo $1/V_o$ é igual a $1/V_{max}$ e o intercepto no eixo $1/[S]$ é igual a $-1/K_m$. O gráfico de Lineweaver-Burk tem a vantagem de permitir a determinação de V_{max} e K_m , o que pode ser feito apenas aproximadamente em gráficos de $V_o \times [S]$ (Lehninger et al., 1995) [48].

5. CONCLUSÕES

- Utilizando metodologia de superfície de resposta, as melhores condições para a produção de fitase de *Burkholderia* sp. em frascos agitados em 72 horas de fermentação foram: fitato de sódio 0,075%, sacarose 0,16% e peptona bacteriológica 0,2%, mantendo-se a solução de sais padrão com $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%, KCl 0,05%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,0001%, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,00075% e CaCl_2 0,01%. Utilizando essa metodologia foi possível aumentar a produção de fitase em 110% (1,01 U/mL para 2,12 U/mL).
- Na etapa de otimização das condições de cultivo, após 48 de fermentação de *Burkholderia* sp., a 37°C e 250 rpm, foi obtida maior atividade de fitase (2,30 U/mL), porém optou-se por utilizar as condições mais amenas de fermentação (150 rpm e 30°C) por 24 horas de fermentação em *shaker*, em que foi obtida atividade de fitase 1,46 U/mL, a fim de tornar o processo mais ágil para as etapas subsequentes do estudo.
- Na etapa de caracterização bioquímica, o extrato enzimático bruto de fitase de *Burkholderia* sp. apresentou pH ótimo em 5,5 e pH de estabilidade na faixa de 3 a 7, após 1 hora de incubação à 50°C. Apresentou temperatura ótima à 60°C e mostrou-se estável após 1 hora de tratamento em temperaturas entre 25 e 50°C, demonstrando 40% de redução da atividade após 1h de tratamento à 60°C.

- No estudo do efeito de íons sobre a atividade da fitase, foi verificado aumento de 41% na atividade da fitase produzida por *Burkholderia* sp., quando adicionados íons Ba^{2+} , na concentração de 10 mM, indicando que o Ba^{2+} pode atuar como um cofator para a enzima. Os demais sais, na mesma concentração reduziram a atividade da enzima, dentre eles, Fe^{2+} e Zn^{2+} causaram, praticamente, a inibição da enzima. Através deste estudo sugere-se a presença de grupo tiol no sítio ativo da enzima. Para a concentração de 1 mM, a adição dos íons Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{3+} , causou reduções significativas de atividade de fitase, em 61%, 45%, 45%, 31% e 30%, respectivamente.
- A fitase produzida por *Burkholderia* sp. apresentou valores de K_m e V_{max} de 0,02 mM e 6,20 $\mu\text{mol Pi/min/mg}$, respectivamente.

6. BIBLIOGRAFIA

1. HOWSON, S. J., DAVIS, R. P. Production of phytate-hydrolysing enzyme by some fungi. *Enzyme Microb. Technol.* 5, 377-343, 1983.
2. LÖNNERDAL, B.; SANDBERG, A. S.; SANDSTRÖM, B. & KUNZ, C. Inhibitory effects of phytic acid and other inositol phosphates on zinc and calcium absorption in suckling rats. *Journal of nutrition*, 119, 211-214, 1989.
3. GRAF, E.; EATON, J. W. Dietary suppression of colonic cancer. Fiber or phytate? *Cancer*, 56, 717-718, 1985.
4. JARIWALLA, R. J.; SABIN, R.; LAWSON, S.; HEMAN, Z. S. Lowering of serum cholesterol and triglycerides and modulation of divalent cations by dietary phytase. *Journal of Applied Nutrition*, 42, 18-28, 1990.
5. KONIETZNY, U., GREINER, R. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). *Int. Jou. Food and Technology*, 37, 791-812, 2002.
6. GREINER, R.; KONIETZNY, U.; JANY, K. D. Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. *Arquives of Biochemistry and Biophysics*, 303, 107-113, 1993.
7. GREINER, R.; HALLER, E.; KONIETZNY, U.; JANY, K. D. Purification and characterization of a phytase from *Klebsiella terrigena*. *Arquives of Biochemistry and Biophysics*, 341, 201-206, 1997.

8. KEROVUO, J.; LAURAEUS, M.; NURMINEN, P. KALKKINEN, M.; APAJALAHTI, J. Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequency of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 2079-2085, 1998.
9. RICHARDSON, A.E.; HADOBAS, P.A. Soil isolates of *Pseudomonas* spp. that utilize inositol phosphates. *Canadian Journal of Microbiology*, 43, 509-516, 1997.
10. RIES, E.F.; MACEDO, G.A. Progressive screening of thermostabie yeasts for phytase production. *Food Sci. Biotechnol.*, v.18, p.655-660, 2009.
11. CAO, L.; WANG, W.; YANG, C.; YANG, Y.; DIANA, J.; YAKUPITIYAGE, A.; LUO, Z.; LI, D. Application of microbial phytase in fish feed. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 497-507, 2007.
12. SANDBERG, A. S. E ANDLID, T. Phytogenic and microbial phytases in human nutrition. *Int.l Jour. Food and Technology*, 37, 823-833, 2002.
13. LIU, B.-L., RAFIQ, A., TZENG, Y.-M., ROB, A. The induction and characterization of phytase and beyond. *Enz. Microb. Technol.* 22, 415-424, 1998.
14. 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.* 22, 2-7, 1998.
15. SELLE, P.H.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. *Anim. Feed Sci. Technology.*, 135, 1-41, 2006.

16. 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*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 1696-1700, 1997.
17. SEGUEILHA, L.; LAMBRECHTS, C.; BOZE, H.; MOULIN, G.; GALZY, P. Purification and properties of the phytase from *Schwanniomyces castellii*. *J. Ferment. Bioeng.*, v.74, p.7-11, 1992.
18. DASGUPTA, S., DASGUPTA, D., SEM, M., BISWAS, B. B. Interaction of myoinositoltriphosphate-phytase complex with the intracellular Ca^{2+} mobilization in plants. *Biochemistry*. 35, 4994-5001, 1996.
19. FISKE, C. H.; SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 66, 375-410, 1925.
20. 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.*, 113, 313-317, 1981.
21. POWAR, V.K.; JAGANNATHAN, V. Purification and properties of phytase-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 151, 1102-1108, 1982.
22. SHIMIZU, M. Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis(natto)* N-77. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56, 1266-1269, 1992.
23. IRVING, G.C.J.; COSGROVE, D. J. Inositol phosphate phosphatase of microbiological origin. Some properties of a partially purified bacterial (*Pseudomonas* sp.) phytase. *Aust. J. Biol. Sci.*, 24, 547-557, 1974.

24. TAMBE, S.M.; KAKLIJ, G. S.; KELKAR, S. M.; PAREKH, L.J. Two distinct molecular forms of phytase from *Klebsiella aerogenes*: Evidence for unusually small active enzyme peptide. *J. Ferment. Bioeng.*, 77, 23-27, 1994.
25. YOON, S. J.; CHOI, Y. J.; MIN, H.K.; CHO, K.K., KIM, J. W.; LEE, S. C.; JUNG, Y. H. Isolation and identification of phytase-producing bacterium, *Enterobacter* sp 4, and enzymatic properties of phytase enzyme. *Enzyme Microb. Technol.*, 18,449-454, 1996.
26. KAUR, P.; SATYANARAYANA, T. Production of cell-bound phytase by *Picchia anomala* in an economical cane molasses medium: Optimization using statistical tools. *Process Biochemistry*, 40, 3095-3102, 2005.
27. CASEY, A., WALSH, G. Purification and characterization of extracellular phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142. *Bioresource Technol.*, v.86, p.183-188, 2003.
28. SUZUKI, U.; YOSHIMURA, K.; TAKAISHI, M. Ube rein "Enzym Phytase" das Anhydro-oxy-methylendiphosphosaure spaltet. *Coll. Agric. Bull. Tokyo Imp Univ.*, 7, 503-505, 1907.
29. ENGELEN, A. J.; HEEFT, VAN DER.; RANSDORP, H. G. P.; SMIT, L. C. E. Simple and rapid determination of phytase activity. *J. AOAC Int.*, 77, n3, 760-764, 1994.
30. KONIETZNY, U., GREINER, R. Bacterial Phytase: Potencial application, in vivo function and regulation of its synthesis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, 11-18, 2004.
31. <http://www.abvista.com/products/enzymes/phytase/quantum/quantum-phytase-xt/>, acessado em julho/2011.

32. ABELSON, P. H. A potential phosphate crisis. *Science*, 283:2015, 1999.
33. http://aveworld.com.br/artigos/post/nutricao-fitase-ajuda-reduzir-custo-com-alta-de-preco-do-fosforo-_4666, acessado em julho/2011.
34. STOCKMANN, C.; LOSEN, M.; DAHLEMS, U.; KNOCKE, C.; GELLISSEN, G.; BUCHS, J. Effect of oxygen supply on passaging, stabilizing and screening of recombinant *Hansenula polymorpha* production strains in test tube cultures. *FEMS Yeast Res*, 4, 195-205, 2003.
35. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FAN, A. L.; RANDALL, R. J. *J. Biological Chemistry*, 193, 265-275, 1971.
36. VOHRA, A.; SATYANARAYANA, T. Phytases: microbial sources, production, purification and potencial biotechnological applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 23, 29-60, 2003.
37. HAROS, M., BIELECKA, M., HONKE, J. SANZ, Y. Myo-inositol hexakisphosphate degradation by *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697. *International Journal of Food Microbiology*, 117, 76-84, 2007.
38. HAROS, M., BIELECKA, M., SANZ, Y. Phytase activity as a novel metabolic feature of *Bifidobacterium*, *FEMS Microbiology Letters* 247, 231-239, 2005.
39. CASEY, A.; WALSH, G. Identification and characterization of a phytase of potential commercial interest. *Journal of Biotechnology*, 110, 313-322, 2004.

40. GREINER, R., KONIETZNY, U. Phytase for food application. *Food Technology and Biotechnology*, 44, 125-140, 2006.
41. VATS, P.; BANERJEE, U. C. Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inosilhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 3-14, 2004.
42. SHIEH, T. R.; WARE, J. H. Survey of microorganisms for the production of extracellular phytase. *Appl. Microbiol.*, p.1348-1351, 1968.
43. 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*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 350, 884-889, 2006.
44. CHANTASARTRASAMEE, K.; NA-AYUTHAYA, D. I.; INTARAREUGSORN, S.; DHARMSTHITI, S. Phytase activity from *Aspergillus oryzae* AK9 cultivated on solid state soybean meal medium. *Process Biochem.*, v.40, p.2285-2289, 2005.
45. RIES, E. F. Estudo da produção, caracterização e aplicação de nova fitase de *Saccharomyces cerevisiae*. 130p. Tese (Doutorado em Bioquímica de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp, São Paulo, 2010.
46. WHITAKER, J.R. *Principles of Enzymology for Food Sciences*. In: *Enzyme Inhibitors*. New York, Marcel Dekker Ltd., p. 255-282, 1972.

47. ZHAO, D.-M., WANG M., MU, X.-J., SUN M.-L., WANG, X.-Y. Screening, cloning and overexpression of *Aspergillus niger* phytase (phyA) in *Pichia pastoris* with favourable characteristics. *Letters in Applied Microbiology*, 45 , 522–528, 2007.
48. LEHNINGER, A. L., NELSON, D. I., COX, M. *Princípios de Bioquímica*, 2a ed., Editora Sarvier, Rio de Janeiro, 1995.