

## MELHORIA NAS PROPRIEDADES DA FITASE APÓS SUA IMOBILIZAÇÃO EM HIDROXIAPATITA PARA APLICAÇÃO EM RAÇÃO ANIMAL

Coutinho, T. C.<sup>1,2,\*</sup>, Tardioli, P. W.<sup>2</sup>, Farinas, C. S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Embrapa Instrumentação, Rua XV de Novembro, 1452, 13560970, São Carlos, SP

<sup>2</sup> Universidade Federal de São Carlos, Rod. Washington Luiz, 13565-905, São Carlos, SP

\* Autor correspondente, e-mail: [thamaraccoutinho@gmail.com](mailto:thamaraccoutinho@gmail.com)

**Resumo:** A fitase é uma enzima utilizada em ração animal pois degrada o fitato, fator antinutricional encontrado nos ingredientes da ração. Neste trabalho, avaliou-se a melhora nas propriedades da fitase após sua imobilização em nanopartículas de hidroxiapatita (HA). Os resultados mostraram que a fitase imobilizada em HA apresentou um perfil de atividade mais amplo para diferentes pHs e temperaturas, e maior resistência térmica a 80 e 90 °C após três horas de incubação. Isto indica que a atividade catalítica da fitase imobilizada pode ser mantida estável ao passar pela etapa de fabricação da ração chamada de peletização, que ocorre sob condições de altas temperaturas. A fitase imobilizada em HA ainda demonstrou boa resistência sob condições ácidas (similar às condições gastrointestinais) e resistência à proteólise. Os resultados sugerem que a fitase imobilizada em nanopartículas de hidroxiapatita apresenta aplicações promissoras na ração animal.

**Palavras-chave:** fitase, imobilização enzimática, hidroxiapatita, ração animal.

### **IMPROVEMENT ON PHYTASE PROPERTIES AFTER ITS IMMOBILIZATION ON HYDROXYAPATITE FOR USE IN ANIMAL FEED**

**Abstract:** Phytase is an enzyme inserted in animal feed because it degrades the antinutritional factor phytate, which is found in the feed ingredients. In this work, we evaluated the improvement in phytase properties after its immobilization in hydroxyapatite (HA) nanoparticles. The results showed that the immobilized phytase presented a broader activity profile for pH and temperature, and higher resistance at 80 and 90 °C after three hours of incubation, indicating that the derivative can maintain its catalytic activity after the pelletizing step, which is carried out under high temperatures during the manufacture of feed. Besides, phytase immobilized on HA showed good resistance under acidic conditions (similar to gastrointestinal conditions) and resistance to proteolysis. The results suggest that phytase immobilized on hydroxyapatite nanoparticles has promising applications in animal feed.

**Keywords:** phytase, enzymatic immobilization, hydroxyapatite, animal feed.

### **1. Introdução**

A enzima fitase é especializada na liberação de resíduos de fosfato e mio-inositol a partir do fitato (hexosfosfato de inositol). As proteínas vegetais utilizadas como ingredientes de ração animal, como os derivadas de soja, trigo, milho e arroz, são ricas em fitato, o qual é considerado um fator antinutricional (Polaina e Maccabe, 2007). Por este motivo, a principal aplicação da fitase é como suplemento em ração animal, uma vez que animais como aves, porcos e peixes apresentam baixíssimos níveis de fitase em seus tratos gastrointestinais (Jain *et al.*, 2016). Entretanto, para uso em ração animal, a fitase deve apresentar alta atividade específica, estabilidade na faixa de pH do trato digestivo, resistência à proteólise e boa estabilidade durante a formulação da ração e o armazenamento. A instabilidade térmica da fitase é particularmente importante durante o processo de peletização da ração, o qual ocorre sob altas temperaturas, reduzindo consequentemente a atividade da fitase. (Cian *et al.*, 2018)

A técnica de imobilização enzimática pode fornecer maior resistência à desnaturação quando

a enzima é exposta à altas temperaturas, à ambientes ácidos e sob presença de proteases (Harati *et al.*, 2017). A hidroxiapatita (HA) é um material sólido inorgânico com excelentes propriedades físico-químicas para imobilização enzimática, pois além de não ser tóxica, apresenta elevada área superficial, insolubilidade e pode ser sintetizada como nanopartículas. A adsorção de proteínas nas nanopartículas de HA tem sido investigada em diferentes áreas, sendo que pesquisas recentes mostraram que interações de quelação entre os íons cálcio presentes na HA e os ácidos carboxílicos presentes nas enzimas podem ocorrer rapidamente, resultando em interações altamente estáveis e promissoras para a imobilização enzimática (Ivic *et al.*, 2016; Coutinho *et al.*, 2018).

Atrelada às excelentes características da HA para atuar como suporte para imobilização da fitase, ela também pode atuar como fonte de Ca e P para a nutrição animal, pois apresenta a composição química  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . Portanto, o objetivo do presente trabalho foi investigar se houve melhorias nas propriedades da fitase após sua imobilização em nanopartículas de HA, a fim de ser potencialmente aplicada em ração animal, mais especificamente na melhora da atuação em pHs ácidos e no ganho de termoestabilidade.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Materiais

A enzima fitase (Nathufos<sup>®</sup>) utilizada neste trabalho foi produzida comercialmente pela Basf S/A (Mount Olive, EUA), obtida por uma cepa geneticamente modificada de *Aspergillus niger*, enquanto o suporte hidroxiapatita apresenta grau analítico e foi comprado da Sigma-Aldrich (101304727). Todos os outros reagentes apresentavam grau analítico.

### 2.2 Processo de imobilização

O processo de imobilização ocorreu com uma concentração de HA de 0,05 g/mL e carga enzimática de 5 mg proteína/g suporte. A interação enzima-suporte foi realizada em eppendorf de 2 mL, utilizando como tampão acetato de sódio, pH 5, 20 mM. Enzima e HA ficaram sob agitação suave por duas horas a 25 °C. O derivado obtido foi lavado duas vezes com o mesmo tampão de imobilização (centrifugando o derivado durante 2 min a 8000 rpm). Então, a concentração de proteína do sobrenadante das lavagens foi quantificada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) para calcular o rendimento de imobilização (RI). A atividade enzimática do derivado final ( $A_{DE}$ ) foi medida em duplicata (pH 5, 37 °C), segundo método descrito por (Harland e Harland, 1980), com modificações, medindo a concentração de fósforo liberada do substrato fitato por método colorimétrico (utilizando espectrofotômetro,  $\lambda=660$  nm).

### 2.3 Perfil de atividade em diferentes pHs e temperaturas

O efeito do pH sobre a atividade da enzima (livre e imobilizada) foi avaliado na faixa de pH 2-8, fixando-se a temperatura de 37 °C. O efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas (livre e imobilizada) foi investigado a 20, 30, 40, 50 e 60 °C, fixando-se o pH ótimo obtido. A maior atividade obtida nas faixas de temperatura ou pH empregados foi designada como 100%, enquanto as atividades em todas as temperaturas e pHs remanescentes foram calculadas como a Atividade Relativa (%) àquela mais alta.

### 2.4 Termoestabilidade da enzima imobilizada

A termoestabilidade da fitase livre e imobilizada foi determinada por incubação da enzima durante 3 horas nas temperaturas de 60, 70, 80 e 90 °C, no tampão de imobilização. Em intervalos de 15 min as amostras foram retiradas para realizar as medidas de atividade enzimática. A atividade obtida no tempo zero foi designada como 100% e as atividades em todos os tempos remanescentes foram calculadas como a atividade relativa (em %) à do tempo zero.

### 2.5 Simulação *in vitro* das condições gastrointestinais de animais e degradação por proteases

O efeito do ambiente ácido sobre a atividade da fitase livre e imobilizada foi avaliado em testes de simulação *in vitro* das condições gastrointestinais dos animais. Ambas as formas de fitase foram mantidas por 1 h em pH 2, 2,5 e 3 (tampão glicina-HCL), simulando o microambiente do estômago, e seguida, por 1 h em pH alcalino (tampão Tris-HCl, pH 7), simulando o microambiente do intestino. Em seguida, a atividade da enzima foi medida.

A fim de investigar a resistência à proteólise das duas formas de fitase, avaliou-se a degradação da fitase por pepsina e tripsina. A fitase foi colocada em contato com as proteases nas seguintes proporções: 2:1 e 10:1. A hidrólise da pepsina ocorreu sob condições estomacais simuladas, utilizando tampão glicina-HCl no pH 2,5 e 28 ° C; enquanto a hidrólise da tripsina ocorreu sob condições intestinais simuladas, utilizando tampão Tris-HCl no pH 7 e 28 ° C. Por fim, a atividade da enzima foi medida.

### 3. Resultados e Discussão

Toda a fitase oferecida ao suporte foi adsorvida em apenas 10 minutos do processo de imobilização, gerando um derivado com Atividade Recuperada superior a 100%, o que indica que a enzima tornou-se mais ativa após a ancoragem ao suporte. O efeito do pH e da temperatura na atividade da fitase livre e imobilizada foram avaliados a fim de compreender o comportamento da enzima em diferentes condições físico-químicas. Os resultados mostraram perfis de atuação mais amplos para a fitase imobilizada do que para a fitase livre, indicando maior faixa de atuação catalítica da enzima na forma imobilizada em condições adversas de pH e temperatura.

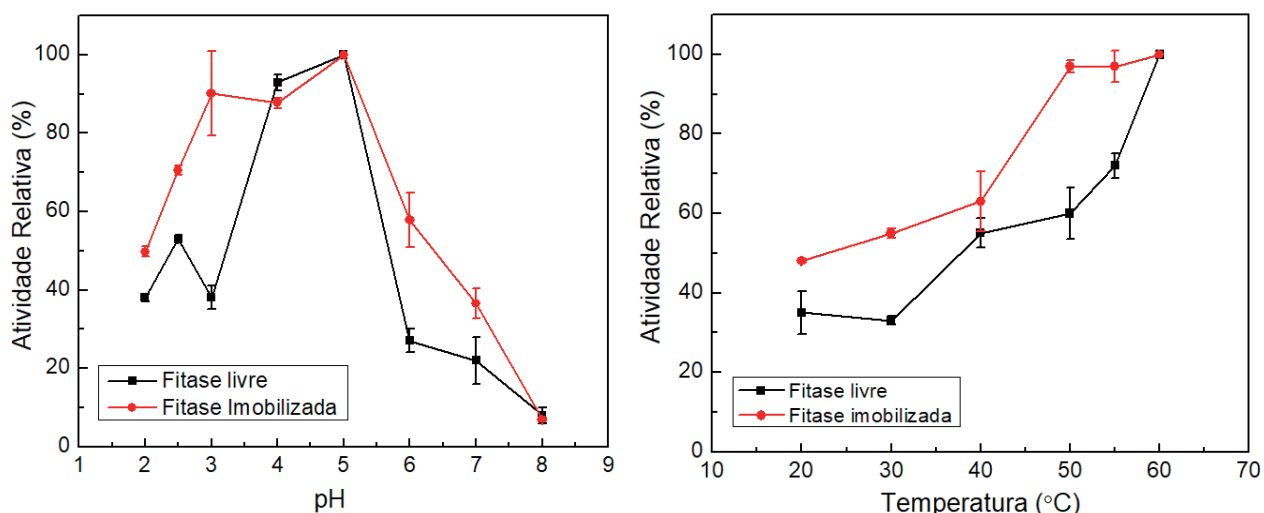


Figura 1. Perfis de atividade em diferentes (a) pHs e (b) temperaturas para a fitase livre e imobilizada em HA. As atividades relativas foram calculadas a partir das médias de duplicatas. A enzima foi imobilizada por 1 h a 25 ° C e pH 5 (tampão acetato de sódio, 20 mM).

O pH ótimo de atividade da fitase coincidiu com o pH 5 de imobilização (Fig. 1a), representando uma grande vantagem para o procedimento de imobilização empregado, uma vez que a enzima pode se ligar ao suporte em sua melhor conformação para atuar como biocatalisador. É interessante notar que a enzima imobilizada apresentou aumento na atividade relativa de 40 para 90% em pH 3 e de 23 para 38% em pH 7, sendo ambas condições possivelmente encontradas pela enzima nos tratos gastrointestinais de animais (Dersjant-Li *et al.*, 2015). A melhoria na atividade da enzima imobilizada em diferentes valores de pH da reação pode ser explicada pelo método de imobilização empregado. O potencial eletrostático do microambiente de enzimas imobilizadas na HA (a qual contém os grupos funcionais ionizados  $Ca^{2+}$  e  $PO_4^{3-}$ ) pode afetar a concentração local de  $H^+$ , influenciando o comportamento da enzima sob diferentes condições de pH.

Os perfis de atividade em diferentes temperaturas mostraram que a fitase imobilizada apresentou maior atuação em toda a faixa de temperatura testada em comparação com a fitase livre

(Fig. 1b). O aumento da atividade relativa em diferentes temperaturas para a enzima imobilizada tornou-se mais evidente a partir da diminuição da energia de ativação ( $E_a$ ) de 21 kJ/mol (para a enzima livre) para 16 kJ/mol para a fitase imobilizada. Esses resultados indicam que a energia necessária para atingir o estado de transição do fitato no sítio ativo da fitase tornou-se menor para a enzima imobilizada, sugerindo que alterações no estado conformacional da enzima após sua imobilização facilitaram o caminho da reação.

Os resultados de termoestabilidade mostraram que tanto a fitase livre quanto a imobilizada mostraram-se estáveis a 60 e 70 °C, embora a enzima livre tenha mostrado uma pequena diminuição da atividade relativa a 70 °C. Diferentemente, a 80 e 90 °C, o processo de desnaturação foi irreversível para a enzima solúvel, uma vez que a enzima livre perdeu completamente a atividade em 20 minutos. Por outro lado, a fitase imobilizada reteve quase 60% de sua atividade após 3 horas a 80 °C, enquanto cerca de 40% de atividade foi retida após 20 minutos a 90 °C. Provavelmente, a reação de coordenação entre os grupos de ácido carboxílico da enzima e os metais de  $Ca^{2+}$  da superfície do suporte resultaram em maior rigidez da estrutura tridimensional da fitase. Pode ter ocorrido uma preservação nas pontes dissulfeto que desempenham papel crucial no dobramento da fitase de *A. niger*, impactando num aumento considerável na estabilidade operacional em temperaturas elevadas (Ullah *et al.*, 2005).

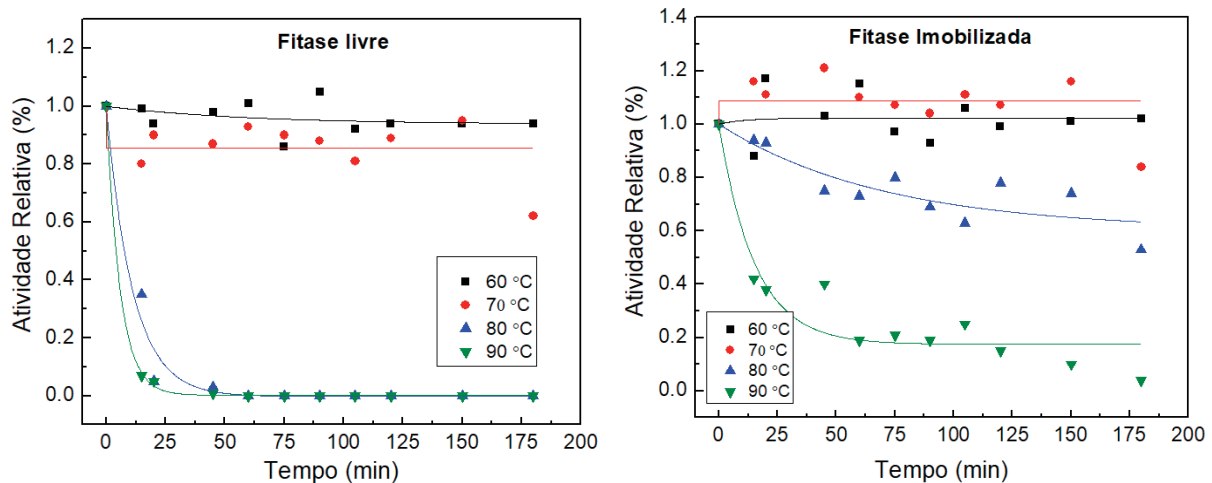


Figura 2. Resultados de termoestabilidades da fitase livre (a) e imobilizada (b).

A aplicação da fitase como aditivo para ração animal depende criticamente de sua estabilidade sob condições ácidas do estômago e à degradação por proteases digestivas. Em relação aos experimentos de simulação *in vitro* das condições gastrointestinais, foi observado que as formas livre e imobilizada da fitase mantiveram cerca de 77% de atividade após serem sujeitas às condições severas estomacais. Este experimento foi importante para confirmar que a enzima estaria ativa ao atingir o intestino do animal.

Em relação aos experimentos de degradação por proteases os dados obtidos mostraram que, para as duas razões de fitase: protease avaliadas, não houve redução na atividade de qualquer forma da enzima após 2 h de incubação. Sendo assim, os resultados indicaram que a imobilização da fitase não afetou sua resistência à proteólise e a enzima não foi degradada sob condições gastrointestinais simuladas, em ambas formas livre e imobilizada.

#### 4. Conclusões

A enzima fitase foi rapidamente e eficientemente imobilizada em nanopartículas de hidroxiapatita, resultando em um derivado com propriedades melhoradas para aplicação em ração animal. A fitase imobilizada apresentou maior perfil de atividade quanto ao pH e temperatura, e maior estabilidade a altas temperaturas do que a enzima livre. O derivado obtido demonstrou boa resistência a condições ácidas e resistência à proteólise. Os resultados sugerem que a fitase

imobilizada em nanopartículas de hidroxiapatita apresenta aplicações promissoras na indústria de ração animal.

#### Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer à Embrapa, ao CNPq, à CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro.

#### Referências

- BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. ISSN 0003-2697.
- CIAN, R. E. et al. Extruded fish feed with high residual phytase activity and low mineral leaching increased P-mesopotamicus mineral retention. **Animal Feed Science and Technology**, v. 240, p. 78-87, Jun 2018. ISSN 0377-8401.
- COUTINHO, T. C. et al. Nanoimmobilization of beta-glucosidase onto hydroxyapatite. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 1042-1051, Nov 2018. ISSN 0141-8130.
- DERSJANT-LI, Y. et al. Phytase in non-ruminant animal nutrition: a critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 5, p. 878-896, Mar 2015. ISSN 0022-5142.
- HARATI, J. et al. Improvement in biochemical characteristics of glycosylated phytase through immobilization on nanofibers. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 12, p. 96-103, Oct 2017. ISSN 1878-8181.
- HARLAND, B. F.; HARLAND, J. Fermentative reduction of phytate in rye, white, and whole wheat breads. **Cereal Chemistry**, v. 57, n. 3, p. 226-229, 1980. ISSN 0009-0352.
- IVIC, J. et al. Assessment of the interacting mechanism between *Candida rugosa* lipases and hydroxyapatite and identification of the hydroxyapatite-binding sequence through proteomics and molecular modelling. **Rsc Advances**, v. 6, n. 41, p. 34818-34824, 2016. ISSN 2046-2069.
- JAIN, J.; SAPNA; SINGH, B. Characteristics and biotechnological applications of bacterial phytases. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 2, p. 159-169, Feb 2016. ISSN 1359-5113.
- POLAINA, J.; MACCABE, A. P. **Industrial enzymes: Structure, function and application**. First. Dordrecht: Springer, 2007.
- ULLAH, A. H. J.; SETHUMADHAVAN, K.; MULLANEY, E. J. Monitoring of unfolding and refolding in fungal phytase (phyA) by dynamic light scattering. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 327, n. 4, p. 993-998, Feb 2005. ISSN 0006-291X.