

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DOUTORADO EM BIOLOGIA DE FUNGOS**



**ASPECTOS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DO
ACÚMULO DE POLIFOSFATO INORGÂNICO POR
*CUNNINGHAMELLA ELEGANS***

LUCIANA DE OLIVEIRA FRANCO

**Recife
Fevereiro/2005**

LUCIANA DE OLIVEIRA FRANCO

**ASPECTOS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS DO
ACÚMULO DE POLIFOSFATO INORGÂNICO POR
*CUNNINGHAMELLA ELEGANS***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos, para obtenção do título de Doutor em Ciências, na área de Biologia de Fungos.

Orientadora: Prof^a. Dra. Galba Maria de Campos Takaki

**Recife
Fevereiro/2005**

Franco, Luciana de Oliveira

Aspectos bioquímicos e fisiológicos do acúmulo de polifosfato inorgânico por *Cunninghamella elegans* / Luciana de Oliveira Franco. – Recife : O Autor, 2005.

108 folhas : il., fig., tab., gráf.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biologia de Fungos, 2005.

Inclui bibliografia.

1. Biologia e bioquímica de fungos. 2. Zygomycetes – Mucorales – *Cunninghamella elegans* – Metabolismo de fósforo. 3. *Cunninghamella elegans* – Acúmulo de polifosfato inorgânico – Atividade de fosfatase. I. Título.

**579.222
579.1**

**CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)**

**UFPE
BC2005-114**

COMISSÃO EXAMINADORA

Galba Maria de Campos Takaki

Prof^a. Dra. Galba Maria de Campos Takaki (Orientadora)
Departamento de Química (UNICAP), Recife - PE

Carlos Alberto Alves da Silva

Prof^o. Dr. Carlos Alberto Alves da Silva
Departamento de Química (UNICAP), Recife - PE

Tânia Lúcia Montenegro Stamford

Prof^a. Dra. Tânia Lúcia Montenegro Stamford
Departamento de Nutrição (UFPE), Recife - PE

Maria Aparecida de Resende

Prof^a. Dra. Maria Aparecida Resende
Departamento de Microbiologia (UFMG), Belo Horizonte - MG

Maria Auxiliadora de Queiroz Cavalcanti

Prof^a. Dra. Maria Auxiliadora de Queiroz Cavalcanti
Departamento de Micologia (UFPE), Recife - PE

(Leonardo da Vinci)

“Aprender é a única coisa
de que a mente nunca se
cansa, nunca tem medo e
nunca se arrepende.”

(Leonardo da Vinci)

AGRADECIMENTOS

“A faculdade de recordar é uma grande aliada no cultivo de sentimento de gratidão, recordar é fazer retornar ao coração o que nele já esteve.”

Primeiramente agradeço a Deus, pela realização de mais um objetivo.

À toda minha família, em especial a Patrícia, Renata, Danielle, Alexandre e Musa, minha mãe, por compartilharem meus dias e por torcerem sempre pela minha realização.

À Prof^a. Dra. Galba Maria de Campos Takaki, pela fundamental contribuição para minha formação profissional.

À equipe de pesquisa da Prof^a. Galba Takaki, pelo companheirismo e excelente convívio, que tornou esta caminhada muito mais agradável para a busca de ideais comuns. Para mim vocês são muito mais que colegas, são amigos que guardarei para sempre: Mabel Calina, Marquinhos, Kenji, Mariluce, Clarissa, Daniele, Vânia, Petruski, Raquel, Patrícia, Norma, Juliana, Leonie, André, Marta, Charles, Thayse e Fabíola.

À Marcos, pelo carinho e incentivo.

Aos meus irmãos de vida Severino, Rita de Cássia e Thayza, pela amizade de todos os momentos.

Aos professores do Curso de pós-graduação em Biologia de Fungos pela atenção e conhecimentos transmitidos.

Aos meus colegas de turma de doutorado Livramento e Mizael.

À Luiz Carlos, secretário da pós-graduação em Biologia de Fungos pela atenção dispensada ao longo de nosso convívio.

A Sônia, secretária do Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais da UNICAP, pela atenção e amizade dispensadas ao longo de nosso convívio.

Aos técnicos Salatiel e Sr. Humberto pela colaboração e amizade durante a fase experimental desta pesquisa.

Ao Magnífico Reitor da Universidade Católica de Pernambuco, Pe. Theodoro Paulo Peters S. J., pelo acesso aos laboratórios do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais para realização deste trabalho.

À CAPES, CNPq e ao PRONEX pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

Finalmente, a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABELAS.....	III
RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VI
1. INTRODUÇÃO.....	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1 POLIFOSFATO INORGÂNICO.....	10
2.1.1 Considerações Gerais.....	10
2.1.2 Funções.....	13
2.1.2.1 Como Substituto de ATP e fonte de energia.....	13
2.1.2.2 Como Reserva de Pi.....	14
2.1.2.3 Como Quelante de Íons Metálicos.....	14
2.1.2.4 Na Formação e Função da Parede Celular.....	15
2.1.2.5 Na formação de Canais de Membrana.....	15
2.1.2.6 Na Regulação de estresse sobrevivência.....	16
2.1.2.7 Na Regulação do desenvolvimento celular.....	17
2.1.3 Aplicações Biotecnológicas.....	17
2.1.3.1 Remediação ambiental de Fosfato.....	17
2.1.3.2 Ação antioxidante.....	18
2.1.3.3 Ação antimicrobiana.....	18
2.1.3.4 Fabricação de Fibras isolantes.....	19
2.2 ZYGOMYCETES.....	20
2.3 GÊNERO <i>Cunninghamella</i>.....	21
2.4 <i>Cunninghamella elegans</i> Lendner 1907.....	23
2.4.1 Metabolização de Compostos Recalcitrantes.....	23
2.4.2 Modelo Biológico para Metabolização de Fármacos.....	24
2.4.3 Extração de DNA em larga escala.....	24
2.4.4 Produção de Quitina e Quitosana.....	25
3.0 REFERÊNCIAS.....	26

PRIMEIRO ARTIGO

TÍTULO - Efeitos da concentração de glicose e da temperatura de cultivo no crescimento e acúmulo de polifosfato inorgânico por amostras <i>Cunninghamella elegans</i> usando modelo fatorial.....	34
RESUMO.....	36
INTRODUÇÃO.....	37
MÉTODOS.....	39
Microrganismos.....	39
Métodos Microbiológicos.....	39
Condições de Cultivo.....	39
Procedimento Analítico.....	40
Determinação do consumo de glicose, nitrogênio e fosfato.....	40
Extração e determinação de polifosfato inorgânico.....	41
Modelo fatorial.....	41
Análise estatística.....	42
RESULTADOS.....	42
DISCUSSÃO.....	54
AGRADECIMENTOS.....	58
REFERÊNCIAS.....	58

SEGUNDO ARTIGO

TÍTULO - Acumulação e caracterização bioquímica de polifosfato inorgânico durante o crescimento de <i>Cunninghamella elegans</i> UCP 542.	66
RESUMO.....	68
INTRODUÇÃO.....	69
MÉTODOS.....	70
Microrganismo.....	70
Métodos Microbiológicos.....	70
Condições de Cultivo.....	70
Procedimento Analítico.....	71
Determinação do consumo de glicose, nitrogênio e fosfato.....	71
Extração seqüencial de polifosfato inorgânico.....	71
Análise estatística.....	72
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
AGRADECIMENTOS.....	78
REFERÊNCIAS.....	79

TERCEIRO ARTIGO

TÍTULO - Atividade das fosfatases ácida e alcalina em amostras de <i>Cunninghamella elegans</i> segundo modelo fatorial.....	84
RESUMO.....	86
INTRODUÇÃO.....	87
MATERIAIS E MÉTODOS.....	88
Microrganismos.....	88
Métodos Microbiológicos.....	88
Condições de Cultivo.....	88
Procedimento Analítico.....	89
Determinação do consumo de glicose, nitrogênio e fosfato.....	89
Extração de fosfatases ácida e alcalina	90
Atividade enzimática	90
Extração e determinação de polifosfato inorgânico.....	90

Modelo Fatorial.....	90
Análise estatística.....	91
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	91
AGRADECIMENTOS.....	103
REFERÊNCIAS.....	103
CONCLUSÕES GERAIS.....	107

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Estrutura química do PoliPi.....	11
---	----

PRIMEIRO ARTIGO

Figura 1. Produção de biomassa (□) e acúmulo PoliPi (♦) intracelular nas diferentes condições estabelecidas pelo planejamento fatorial 2^2 par as amostras: 1- <i>C. elegans</i> UCP 54; 2 - <i>C. elegans</i> UCP 48; 3 - <i>C. elegans</i> UCP 47; 4 - <i>C. elegans</i> UCP 542; 5 - <i>C. elegans</i> UCP 61; 6 - <i>C. elegans</i> UCP 57; 7- <i>C. elegans</i> UCP 53; 8 - <i>C. elegans</i> UCP 56; 9 - <i>C. elegans</i> UCP 62 e 10 - <i>C. elegans</i> UCP 72.....	43
Figura 2. Superfície de resposta para o acúmulo de polifosfato por <i>C.elegans</i> (UCP 54).....	51
Figura 3. Superfície de resposta para o acúmulo de polifosfato por <i>C.elegans</i> (UCP 48).....	51
Figura 4. Superfície de resposta para o acúmulo de polifosfato por <i>C.elegans</i> (UCP 47).....	51
Figura 5. Superfície de resposta para o acúmulo de polifosfato por <i>C.elegans</i> (UCP 542).....	52
Figura 6. Superfície de resposta para o acúmulo de polifosfato por <i>C.elegans</i> (UCP 61).....	52
Figura 7. Superfície de resposta para o acúmulo de polifosfato por <i>C.elegans</i> (UCP 57).....	52
Figura 8. Superfície de resposta para o acúmulo de polifosfato por <i>C.elegans</i> (UCP 53).....	53
Figura 9. Superfície de resposta para o acúmulo de polifosfato por <i>C.elegans</i> (UCP 56).....	53
Figura 10. Superfície de resposta para o acúmulo de polifosfato por <i>C.elegans</i> (UCP 62).....	53
Figura 11. Superfície de resposta para o acúmulo de polifosfato por <i>C.elegans</i> (UCP 72).....	54

SEGUNDO ARTIGO

Figura 1. Perfil de crescimento de <i>C. elegans</i> UCP 542 durante 168 horas de cultivo em meio sintético para Mucorales.....	74
Figura 2. Frações de PoliPi durante os intervalos de crescimento de <i>C. elegans</i>	77

TERCEIRO ARTIGO

Figura 1. Superfície de resposta para a atividade de Fosfatase ácida em <i>C.elegans</i> (UCP 542).....	98
Figura 2. Superfície de resposta para a atividade de Fosfatase alcalina em <i>C.elegans</i> (UCP 542).....	99
Figura 3. Atividade das fosfatases e acumulação de PoliPi em meio com glicose 40 g/L e temperatura de cultivo de 28°C pelas amostras: 1 - <i>C. elegans</i> UCP 54; 2 - <i>C. elegans</i> UCP 48; 3 - <i>C. elegans</i> UCP 47; 4 - <i>C. elegans</i> UCP 542; 5 - <i>C. elegans</i> UCP 61; 6 - <i>C. elegans</i> UCP 57; 7- <i>C. elegans</i> UCP 53; 8 - <i>C. elegans</i> UCP 56; 9 - <i>C. elegans</i> UCP 62 e 10 - <i>C. elegans</i> UCP 72.....	100
Figura 4. Atividade das fosfatases e acumulação de PoliPi em meio com glicose 40 g/L e temperatura de cultivo de 22°C pelas amostras: 1 - <i>C. elegans</i> UCP 54; 2 - <i>C. elegans</i> UCP 48; 3 - <i>C. elegans</i> UCP 47; 4 - <i>C. elegans</i> UCP 542; 5 - <i>C. elegans</i> UCP 61; 6 - <i>C. elegans</i> UCP 57; 7- <i>C. elegans</i> UCP 53; 8 - <i>C. elegans</i> UCP 56; 9 - <i>C. elegans</i> UCP 62 e 10 - <i>C. elegans</i> UCP 72.....	101
Figura 5. Atividade das fosfatases e acumulação de PoliPi em meio com glicose 4 g/L e temperatura de cultivo de 28°C pelas amostras: 1 - <i>C. elegans</i> UCP 54; 2 - <i>C. elegans</i> UCP 48; 3 - <i>C. elegans</i> UCP 47; 4 - <i>C. elegans</i> UCP 542; 5 - <i>C. elegans</i> UCP 61; 6 - <i>C. elegans</i> UCP 57; 7- <i>C. elegans</i> UCP 53; 8 - <i>C. elegans</i> UCP 56; 9 - <i>C. elegans</i> UCP 62 e 10 - <i>C. elegans</i> UCP 72.....	101
Figura 6. Atividade das fosfatases e acumulação de PoliPi em meio com glicose 4 g/L e temperatura de cultivo de 22°C pelas amostras: 1 - <i>C. elegans</i> UCP 54; 2 - <i>C. elegans</i> UCP 48; 3 - <i>C. elegans</i> UCP 47; 4 - <i>C. elegans</i> UCP 542; 5 - <i>C. elegans</i> UCP 61; 6 - <i>C. elegans</i> UCP 57; 7- <i>C. elegans</i> UCP 53; 8 - <i>C. elegans</i> UCP 56; 9 - <i>C. elegans</i> UCP 62 e 10 - <i>C. elegans</i> UCP 72.....	102

LISTA DE TABELAS

PRIMEIRO ARTIGO

Tabela 1. Matriz do modelo fatorial (2^2) sem ponto central.....	42
Tabela 2. Planejamento fatorial para amostra <i>C.elegans</i> (UCP 54).....	45
Tabela 3. Planejamento fatorial para amostra <i>C.elegans</i> (UCP 48).....	45
Tabela 4. Planejamento fatorial para amostra <i>C.elegans</i> (UCP 47).....	45
Tabela 5. Planejamento fatorial para amostra <i>C.elegans</i> (UCP 542).....	46
Tabela 6. Planejamento fatorial para amostra <i>C.elegans</i> (UCP 61).....	46
Tabela 7. Planejamento fatorial para amostra <i>C.elegans</i> (UCP 57).....	46
Tabela 8. Planejamento fatorial para amostra <i>C.elegans</i> (UCP 53).....	47
Tabela 9. Planejamento fatorial para amostra <i>C.elegans</i> (UCP 56).....	47
Tabela 10. Planejamento fatorial para amostra <i>C.elegans</i> (UCP 00062).....	47
Tabela 11. Planejamento fatorial para amostra <i>C.elegans</i> (UCP 72).....	48
Tabela 12 - Efeitos principais e de interação das variáveis independentes sobre a variável resposta acúmulo de PoliPi para as dez amostras analisadas.....	48
Tabela 13 – Modelos de produção de polifosfato inorgânico (z) em função da concentração (x) e da temperatura (y).....	50

TERCEIRO ARTIGO

Tabela 1. Matriz do modelo fatorial (2^2) sem ponto central.....	90
Tabela 2. Planejamento fatorial para amostra <i>C.elegans</i> (UCP 54).....	94
Tabela 3. Planejamento fatorial para amostra <i>C.elegans</i> (UCP48).....	94
Tabela 4. Planejamento fatorial para amostra <i>C.elegans</i> (UCP47).....	95
Tabela 5. Planejamento fatorial para amostra <i>C.elegans</i> (UCP542).....	95
Tabela 6. Planejamento fatorial para amostra <i>C.elegans</i> (UCP61).....	95
Tabela 7. Planejamento fatorial para amostra <i>C.elegans</i> (UCP57).....	96
Tabela 8. Planejamento fatorial para amostra <i>C.elegans</i> (UCP53).....	96
Tabela 9. Planejamento fatorial para amostra <i>C.elegans</i> (UCP56).....	96
Tabela 10. Planejamento fatorial para amostra <i>C.elegans</i> (UCP62).....	97
Tabela 11. Planejamento fatorial para amostra <i>C.elegans</i> (UCP72).....	97

RESUMO

O polifosfato inorgânico (PoliPi) é um homopolímero formado por unidades repetitivas de fosfato, unidas através de ligações fosfoanidrídicas, descoberto há mais de cem anos. Esta molécula é ubiqüitária na natureza, sugerindo o envolvimento do PoliPi em importantes processos metabólicos celulares. Os fungos são organismos de grande interesse prático e científico, por apresentarem grande potencial de aplicação em várias áreas da biotecnologia. Apesar da grande importância do PoliPi a via fisiológica de produção, assim como sua função não estão totalmente esclarecidas, principalmente em seres eucariotos. Neste trabalho foram avaliados os aspectos bioquímicos e fisiológicos da acumulação de PoliPi em dez amostras de *Cunninghamella elegans*. Os experimentos foram realizados de acordo com um planejamento fatorial de dois níveis (2^2) sem ponto central. Os resultados obtidos demonstraram que a concentração de glicose no meio de cultura e a temperatura de cultivo influenciam significativamente o processo de acumulação de PoliPi. O planejamento fatorial permitiu a modelagem matemática do acúmulo de PoliPi para cada amostra testada. *C. elegans* UCP 542 apresentou o maior rendimento na acumulação de PoliPi, correspondendo a 5.77 µg de Pi/mg. Observou-se que o PoliPi é acumulado durante todas as fases de crescimento de *C. elegans*, sendo a fração álcali-solúvel produzida em maior quantidade. A atividade das fosfatases ácida e alcalina foi detectada em todas as amostras, contudo não observou-se uma correlação com o processo de acumulação de PoliPi. Todas as amostras de *C. elegans* testadas demonstraram habilidade em acumular PoliPi, destacando-se *C. elegans* 542, que demonstrou grande potencial de utilização em processos biotecnológicos.

ABSTRACT

Inorganic polyphosphate (PolyP) is a homopolymer of phosphate linked by phosphoanhydride bonds, first indentified a hundred years ago. This molecule is ubiquitous in nature, suggesting the PolyP involvement in important metabolics process. The fungi are a very important group of organism showing a large application for various biotechnology areas. Despite of the great importace of PolyP, they metabolic role of production, as well as, they functions are still unclear, mainly in eucariotcs organisms. In this work was investigated the biochemistry and physiological aspects of PolyP accumulation by ten *Cunninghamella elegans* strains. The experiments were carried out acoording to a two-level factorial design (2^2), without central point. The results obtained showed the significative influence of glucose concentration in the culture medium and temperature on the growth and PolyP accumulation. The factorial arrangement alowed the construction of mathematics models for PolyP acumulation for each tested strain. *C. elegans* UCP 542 showed the highest yield of 5.77 $\mu\text{g de Pi/mg}$ of dried biomass. The PolyP accumulation by *C. elegans* occurs during all phases of growth. The alkali-soluble is the mainly fraction produced. Activities enzymatic of phosphatases acid and alkaline were detected for all strains, however don't show correlation with PolyP accumulation. All strains did not show ability for PolyP accumulation, mainly *C. elegans* 542 that showed excellent yield, showing a great potential for application in biotechnological process.

1. INTRODUÇÃO

Como todos os seres, os microrganismos demonstram ser altamente dependentes de fatores ambientais para a sua viabilidade e bom desempenho de seu metabolismo, assim, como resposta a esta necessidade, ao longo do tempo, estes seres desenvolveram a habilidade de estocar razoáveis quantidades de metabólitos importantes para sua sobrevivência, sob a forma de polímeros osmoticamente inertes (Mullan *et al.*, 2002). O Polifosfato inorgânico (PoliPi) tem sido considerado um destes metabólitos, o qual é estocado na célula sob a forma de um homopolímero formado por unidades repetidas de ortofosfato (PoliPi_n, onde n é o número aproximado de resíduos de fosfato presentes na molécula). Este composto foi identificado a mais de cem anos atrás, sendo um homopolímero linear que pode conter poucas dezenas ou várias centenas de unidades de ortofosfatos unidas através de ligações fosfo-anidrido que apresentam alta energia (Pestov *et al.*, 2004).

O fosfato (Pi) é um nutriente essencial para todos os organismos, visto que é constituinte integrante das mais importantes biomoléculas, incluindo ácidos nucleicos, proteínas, fosfolípidios e açúcares, tendo sido recentemente

referido como “a molécula de muitas razões” para as células vivas (Nesmeyanova, 2000).

O PoliPi foi primeiramente isolado em leveduras e mais tarde foi visualizado sob a forma de grânulos metacromáticos em outros microrganismos na forma de partículas, as quais adquiriam coloração avermelhada quando se utilizavam corantes básicos (Harold, 1966). Com o advento da microscopia eletrônica, estas partículas quando observadas sob o feixe de elétrons, apresentavam-se altamente refratárias e rapidamente desapareciam do campo de visão. Este fato fez com que estes grânulos fossem considerados como uma nova molécula. O PoliPi, assim como outros poliânions, aumentam a absorção de corantes básicos como o azul de toluidina em comprimentos de ondas em torno de 530 a 630 *nm*. (Kornberg *et al.*, 1999).

Estudos realizados em vários grupos de organismos revelaram a ubiquidade do PoliPi e sugeriram uma grande importância para esta molécula nos processos metabólicos celulares. No entanto, apesar desta grande importância, a sua via fisiológica de produção, assim como sua função não estão totalmente esclarecidas, principalmente, em seres eucariotos (Thomas, 2001).

Os fungos, são organismos eucarióticos, quimiorganotróficos que constituem um grupo de organismos de grande interesse prático e científico. Dentre os fungos destacam-se os da Ordem Mucorales (Zygomycetes), por apresentarem grande potencial de aplicação em várias áreas da biotecnologia (Shari'a *et al.*, 2000).

Diante da grande importância apresentada pelos fungos pertencentes à Ordem Mucorales, e considerando os poucos relatos que esclareçam o

potencial de acumulação de polifosfato inorgânico nestes organismos, assim como o valor agregado deste polímero, a pesquisa realizada visou ampliar o conhecimento fisiológico e bioquímico do processo de acumulação de polifosfato inorgânico em amostras de *Cunninghamella elegans*, com os seguintes objetivos:

- Realizar seleção de amostra com maior potencial de acúmulo de PoliPi segundo planejamento fatorial;
- Avaliar a produção de PoliPi pela amostra selecionada durante as fases de crescimento;
- Avaliar qualitativamente as frações de PoliPi extraídas durante o crescimento;
- Avaliar a atividade das fosfatases ácida e alcalina nas amostras de *C. elegans* segundo planejamento fatorial.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 POLIFOSFATO INORGÂNICO

2.1.1 Considerações Gerais

Na década de quarenta, ocorreram os primeiros relatos ao meio científico do isolamento e identificação de Polifosfato inorgânico (PoliPi). No entanto, o primeiro isolamento de PoliPi originado de microrganismos ocorreu muito antes, ainda no século dezoito, na década de oitenta, quando Libermann obteve, a partir de biomassa de leveduras uma substância que se assemelha à forma de grânulos de volutina ou metacromáticos, por isso, denominou-os equivocadamente de “metafosfatos” (Harold, 1966).

Nas décadas que se seguiram, numerosas pesquisas foram realizadas, descrevendo a ocorrência de PoliPi em uma grande variedade de microrganismos e o acúmulo desta substância, principalmente sob condições desfavoráveis de crescimento (Kornberg *et al.*, 1999).

Estruturalmente, o PoliPi foi descrito como um homopolímero de ortofosfatos unidos através de ligações fosfoanidrido que termodinamicamente são consideradas de alta energia (Figura 1). Cada átomo de fósforo é ligado ao vizinho através de dois átomos de oxigênio, formando uma cadeia linear. O

grau de polimerização pode apresentar valores de duas a milhares de unidades de fosfato (Kulaev *et al.*, 2004).

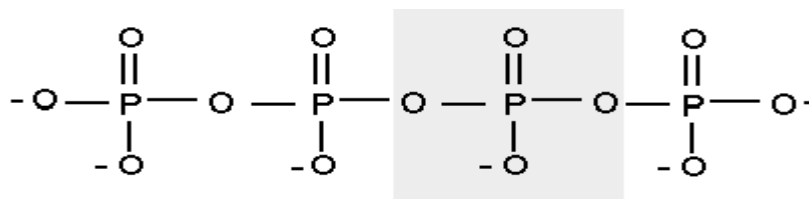


Figura 1. Estrutura química do PoliPi

Depois de estabelecida a estrutura de PoliPi, a principal dúvida em relação a esta molécula, era a de como ocorria a ligação anidrido ao ADP na fosforilação oxidativa, em condições aeróbicas. Foram realizadas investigações para identificação da fonte de Pi e como estes resíduos eram reunidos através de ligações fosfoanidrido fora da membrana mitocondrial em células eucarióticas. Em 1956, Kornberg demonstrou a existência em procariotos, de uma enzima responsável por esta função, a qual catalisa a transferência reversível de fosfato entre PoliPi e o grupo terminal do ATP, a polifosfatocinase (PPK).



Posteriormente, estudos realizados por Harold, 1966; Kulaev, 1979 e Kulaev *et al.*, 1987, dentre outros, revelaram a ubiquidade do PoliPi, estando esta molécula presente em uma grande diversidade de organismos. Em organismos eucariotos a presença da polifosfatocinase é ainda muito questionada, tendo como único relato da presença de sequência gênica

correspondente, no microrganismo eucarioto *Dictyostelium discoideum* (Kornberg, 1999; Gomes-Garcia & Kornberg, 2004).

Em organismos eucariotos, o metabolismo do polifosfato inorgânico é provavelmente mantido por diferentes grupos de enzimas (Brown & Kornberg, 2004). O equilíbrio bioquímico entre síntese e degradação desta molécula, é mediado por cinases específicas, exopolifosfatases e endopolifosfatases. Para o processo de síntese, as cinases conhecidas são as polifosfatofrutocinase e a polifosfatoglicocinase, sendo a última considerada a mais estudada e distribuída entre os microrganismos. Estando envolvida com a reação de fosforilação da glicose usando o polifosfato como fonte de fósforo e produção de glicose-6-fosfato. Dentre as enzimas que participam do processo de degradação, as mais conhecidas são as dos grupos das exopolifosfatases e endopolifosfatases, as quais são capazes de catalisar a hidrólise de ligações fosfoanidrídicas terminais e internas, respectivamente (Kuroda e Kornberg, 1997).

Em eucariotos, o PoliPi ocorre principalmente no citoplasma, superfície celular, no periplasma e na membrana plasmática (Kulaev, 1979). A diferença básica entre as células eucarióticas e procarióticas é o melhor desenvolvimento da compartimentalização de processos bioquímicos que ocorre em eucariotos, nos quais estes processos ocorrem em organelas especializadas. Assim como nas bactérias, em eucariotos, o PoliPi está localizado em todos os compartimentos celulares estudados (Kulaev & Kulakovskaya, 2000).

Uma grande quantidade de relatos científicos, confirmam a idéia de que o PoliPi possui uma origem evolucionária muito antiga, tendo sido encontrado em condensados vulcânicos e em vapor de fendas oceânicas. Um significativo

número de enzimas pertencentes ao metabolismo de PoliPi tem sido reveladas em procariotos, mas não em eucariotos superiores, concordando com o fluxo da evolução dos seres (Nelson, 1992). Ao longo da evolução a significância das funções regulatórias do PoliPi foram incrementadas em eucariotos e estas funções aparecem principalmente em células animais, nas quais os PoliPi participam do transporte através das membranas e da regulação da expressão gênica (Margullis, 1993).

O acúmulo de PoliPi também é proeminente em Archaea, e de acordo com a concepção moderna da evolução, estes organismos representam a via chave na formação das células eucarióticas, pois estes seres seriam provavelmente, seus precursores na cadeia evolutiva. Portanto, futuras investigações comparativas do metabolismo de PoliPi em Archaea e em bactérias irão fornecer ferramentas para um melhor entendimento da evolução funcional de PoliPi (Kornberg *et al.*, 1999)

Confirmadamente, o PoliPi está presente em todos os tipos de células, o que sugere uma função biológica fundamental à vida, estando a sua função dependente da sua quantidade, localização celular, tamanho da cadeia e fonte biológica (Kornberg, et al., 1999).

2.1.2 Funções

2.1.2.1 Como Substituto de ATP e Fonte de Energia

o PoliPi pode ser considerado um fosfagêno nas células, podendo ser mobilizado através da ação de enzimas específicas, quando o nível desta molécula for superior ao nível de ATP (Kornberg *et al.*, 1999).

Nas células microbianas, as funções de PoliPi são fortemente associadas com o metabolismo de energia. Em 1958, Belozersky afirmou que em organismos primitivos, o PoliPi pode exercer funções de compostos de alta energia, sendo esta afirmação corroborada por um grande número de investigações (Kulaev & Vagabov, 1983; Bonting *et al.*, 1991; Hsieh *et al.*, 1993).

2.1.2.2 Como Reserva de Pi

O conteúdo de PoliPi nas células microbianas apresenta-se quantitativamente e qualitativamente influenciado pelos níveis de fosfato no meio de crescimento (Kulaev, 1979; Lima *et al.*, 2003).

Um nível estável de fosfato é essencial para o metabolismo e crescimento de quaisquer organismos. O acúmulo de fosfato na forma de PoliPi e seu uso em condições de deficiência nutricional tem sido bem estabelecido, pois o PoliPi pode ser convertido a Pi através da degradação enzimática deste polímero (Kulaev & Vagabov, 1983).

2.1.2.3 Como Quelante de Íons Metálicos

Uma importante função do PoliPi é a habilidade para seqüestrar íons metálicos, sendo esta molécula, capaz de confinar diferentes cátions sob formas osmoticamente inertes (Durr *et al.*, 1979; Cramer *et al.*, 1994).

A capacidade de remoção de vários metais pesados tem sido descrita nos últimos anos por vários autores. Em *Staphylococcus aureus*, o PoliPi está envolvido na remoção de níquel (Gonzalez & Jensen, 1998); células de *Anacystis nidulans*, que possuem altos níveis de PoliPi, mostram uma maior

tolerância ao cádmio que aquelas com pequenas reservas (Keyhani *et al.*, 1996).

Um mecanismo acerca da participação do PoliPi no processo de destoxificação de metais pesados foi proposto por Keasling em 1997, e segundo este autor, o PoliPi presente na membrana celular seqüestra o íon metálico e o transporta para dentro da célula; por outro lado a entrada do metal pesado na célula estimula a atividade de exopolifosfatases, as quais liberam Pi a partir do PoliPi formando um complexo metal-fosfato que é uma molécula inerte podendo permanecer ou ser transportada para fora da célula.

2.1.2.4 Na Formação e Função da Parede Celular

O PoliPi participa da formação e função do envelope celular tanto em microrganismos eucariotos, como em procariotos. Mutantes de *Neisseria* que possuem baixa quantidade de PoliPi capsular apresentam baixa patogenicidade, quando comparados com as amostras não modificadas geneticamente, que podem apresentar até 50% de PoliPi na constituição de sua cápsula celular (Tinsley *et al.*, 1995).

Na superfície celular de fungos, o PoliPi apresenta uma grande importância para a manutenção de sua carga negativa (Ivanov *et al.*, 1996) o que permite utilização de fungos na remoção de várias substâncias recalcitrantes que apresentam natureza catiônica (Vagabov, 1990).

2.1.2.5 Na formação de Canais de Membrana

Um dos principais relatos achados em relação às funções do PoliPi foi a identificação de complexos PoliPi/hidroxibutirato em membranas de

microrganismos tanto eucariotos como procariotos (Reush, 1992; Reush, 1999).

Observa-se ainda que uma maior quantidade destes complexos na membrana celular aumenta a permeabilidade permitindo o transporte de DNA através da membrana com maior facilidade (Castuma *et al.*, 1995).

2.1.2.6 Na Regulação do Estresse e Sobrevivência

A presença de PoliPi em todos os tipos celulares, assim como o fato deste polímero se apresentar em vários tamanhos de cadeia e com diversas localizações, ressaltando ainda, a variação da concentração desta molécula em resposta às condições nutricionais, sugerem o seu envolvimento no sistema de respostas ao estresse e em alguns sinais que governam o desenvolvimento celular (Kornberg *et al.*, 1999).

O envolvimento do PoliPi na regulação da atividade de algumas enzimas e na expressão de grupos de genes é a base de sobrevivência para diferentes bactérias, incluindo alguns patógenos, sob condições de estresse e adaptação à fase estacionária de crescimento (Rao & Kornberg, 1996)

Recentemente foi estabelecida uma grande influência da polifosfatocinase no processo de sobrevivência de *Escherichia coli*, sobre estresse causado por deficiências nutricionais utilizando-se, para o estudo, mutantes deficientes na produção desta enzima (Morohoshi *et al.*, 2002). Um estudo semelhante foi realizado utilizando-se amostras de *Shigella* e *Salmonella* spp. e os mutantes defectivos para a produção de polifosfatocinase também apresentaram dificuldade de adaptação a fase estacionária de crescimento (Kim *et al.*, 2002).

2.1.2.7 Na Regulação do Desenvolvimento Celular

Em resposta ao estresse nutricional, os microrganismos podem apresentar diferentes tipos de desenvolvimento celular como corpos de frutificação, formação de esporos de resistência e heterocistos, entre outros (Kornberg *et al.*, 1999).

Durante a fase estacionária do crescimento de *E. coli*, o PoliPi participa dos ajustes celulares morfológicos ocorridos em resposta a situações de privação nutricional (Morohoshi *et al.*, 2002). Em mutantes de *Dictyostelium discoideum* defectivos para a produção de PoliPi, o crescimento torna-se lento em meio sólido e ocorre a formação de corpos de frutificação, os quais são menores e apresentam distribuição esparsa, quando comparados aos apresentados pelos tipos completos (Gomes-Garcia & Kornberg, 2004).

2.1.3 Aplicações Biotecnológicas

2.1.3.1 Remoção Biológica de Fosfato

A presença de fosfato em águas provenientes da descarga de esgotos industriais e domésticos, assim como na água proveniente da produção agrícola, representa um problema global na atualidade, que resulta em uma grande produção de algas, as quais são altamente prejudiciais aos ecossistemas de rios, lagos e baías. Os métodos químicos e físicos utilizados para o tratamento deste problema geralmente apresentam alto custo e não têm sido considerados eficazes (Keasling *et al.*, 2000).

O acúmulo de PoliPi pelos microrganismos apresenta várias implicações biotecnológicas, médicas e industriais. Um desses processos envolve o acúmulo de polifosfato por microrganismos submetidos a ciclos alternados

anaeróbicos/aeróbicos. Este fenômeno é a base do processo de tratamento de efluentes contaminados com fosfato, designado de “remoção melhorada de fosfato biológico” (Kulaev, 2000).

2.1.3.2 Ação Antioxidante

As propriedades químicas apresentadas pelo PoliPi, o tornam um polímero seguro e biodegradável que tem sido utilizados pela indústria alimentícia e de produtos de higiene pessoal. Como aditivo alimentício o PoliPi aumenta a retenção de água, confere maior resistência a emulsões e retarda a oxidação, mantendo as propriedades organolépticas dos produtos (Kornberg *et al.*, 1999).

2.1.3.3 Ação Antimicrobiana

A presença de PoliPi é essencial para a adaptação e sobrevivência de *Echerichia coli* na fase estacionária de crescimento (Kim *et al.*, 2002), a manifestação dos fatores de virulência ocorrem principalmente nesta fase de crescimento para este e vários outros microrganismos patogênicos (Kulaev & Kulakovskaya, 2000).

A seqüência gênica que codifica a produção de polifosfatocinase (ppK), enzima responsável pela síntese de PoliPi em diversas espécies bacterianas, apresenta alto grau de conservação e pode ser considerado um alvo atrativo para o desenvolvimento de drogas antimicrobianas e antitumorais, pois a homologia da seqüência gênica em células animais não tem sido observada (Kornberg *et al.*, 1999).

A lista de microrganismos patógenos que apresentam a seqüência gênica conservada é ampla, destacando-se: *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp. *Vibrio cholerae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, e *Mycobacterium tuberculosis*, entre outros (Rashid *et al.*, 2000)

2.1.3.4 Fabricação de Fibras isolantes

Quantidades significativas de PoliPi tem sido observadas em tecido ósseo, e segundo Leyhausen *et al.*, 1998 este composto pode estar envolvido na modulação do processo de mineralização neste tecido. Formulações contendo polifosfato inorgânico podem ser utilizadas em enxertos ósseos e dentários (Kornberg *et al.*, 1999).

2.2 ZYGOMYCETES

Os fungos constituem um grupo de organismos de grande interesse prático e científico para a biotecnologia. São eucarióticos, quimiorganotróficos e reproduzem-se naturalmente por meio de esporos, apresentando poucas exceções. Estes microrganismos podem apresentar-se morfológicamente como filamentosos septados ou cenocíticos, ou ainda como leveduras, apresentando como principais constituintes de suas paredes celulares a quitina, quitosana ou ainda ambas (Andrade *et al.*, 2003).

Os Zygomycetes e os Trichomycetes são Classes que constituem o Filo Zygomycota (Alexopoulos, 1996). Os Zygomycetes apresentam espécies sapróbias, simbiontes e parasitas facultativos de animais. As espécies do grupo podem ser isoladas a partir de vários substratos, tais como, solo, excrementos, frutas, flores, grãos estocados, cogumelos e adicionalmente podem ser obtidas de amostras de invertebrados e vertebrados incluindo os seres humanos (Levy *et al.*, 1986; Alexopoulos, 1996).

Estes fungos são caracterizados pela produção de um esporo de resistência, de parede espessa, denominado zigosporo, o qual se desenvolve dentro de um zigosporângio formado depois da fusão completa de dois gametângios que podem ser iguais ou não podendo surgir do mesmo micélio ou de micélios distintos (Cardoso *et al.*, 1992). A reprodução ocorre pela formação de esporos de origem sexuada e assexuada (Alexopoulos, 1996).

O crescimento dos Zygomycetes ocorre na faixa de temperatura que vai de 25° a 48°C variando de acordo com a espécie (Weitzman *et al.*, 1995). Os representantes da ordem Mucorales se caracterizam por apresentarem micélio

bem desenvolvido constituído por hifas cenocíticas. Alguns gêneros da ordem Mucorales são dimórficos, sendo o dimorfismo relacionado a condições ambientais, como anaerobiose, presença de substâncias que bloqueiam a função geradora de energia das mitocôndrias e adição de AMPc - Adenosina Mono Fosfato Cíclico (Orlowski, 1991).

Os Zygomycetes são organismos com grande potencial econômico-industrial, tendo sido freqüentemente citados na literatura devido ao seu potencial na biodeterioração e biodegradação de algumas substâncias recalcitrantes, e ainda destacam-se pela produção de metabólitos secundários de interesse como enzimas, carboidratos, ácidos orgânicos, pigmentos, esteróides e vitaminas apresentando aplicações em processos biotecnológicos (Griffin, 1981; Shari'a *et al.*, 2000).

2.3 GÊNERO *Cunninghamella*

O gênero *Cunninghamella* pertence à Ordem Mucorales e foi primeiramente descrito por Matruchot em 1903 como um fungo filamentoso. As principais espécies representantes do gênero são *Cunninghamella elegans*, *Cunninghamella echinulata* e *Cunninghamella bertholletiae* sendo esta última a única considerada potencialmente patógena, podendo causar infecções em hospedeiros imunologicamente comprometidos (Alexopoulos *et al.*, 1996).

As espécies do gênero são geralmente encontradas no solo e em outros substratos orgânicos. Macroscopicamente são observadas colônias de aspecto cottonoso, com coloração variando de branca à acizentada. Microscopicamente, apresentam micélio bem desenvolvido constituído por hifas cenocíticas que apresentam raros septos localizados na base de estruturas

reprodutivas, esporangióforos eretos ramificados e na extremidade de cada ramificação formam-se vesículas piriformes ou globosas com diversos esporângios. O micélio quando jovem não exibe septo, estando a septação associada à idade da cultura (Baijal & Mehrotra, 1980; Domsch *et al.*, 1980).

A reprodução sexual ocorre por copulação gametangial e a assexual através da produção de esporangiólos. Estes fungos possuem um caráter dimórfico podendo apresentar-se tanto na forma filamentosa como na leveduriforme (Domsch *et al.*, 1980).

Vários autores realizaram estudos relevantes sobre a variabilidade e morfologia de isolados de *Cunninghamella* e espécies intimamente relacionadas, descrevendo, ilustrando, posicionando taxonomicamente e elaborando chaves para a identificação. Atualmente, a separação das espécies também é definida com base na temperatura de crescimento. Dados sobre aspectos que possam contribuir com a identificação das espécies e isolados devem ser analisados com uma estratégia para o posicionamento taxonômico (Baijal & Merhotra, 1980; Domsch, 1980; Shipton & Lunn, 1980; Trufem, 1981).

As espécies de *Cunninghamella* são muito sensíveis a pequenas variações na constituição do meio de cultura, temperatura de crescimento e umidade, podendo um mesmo isolado crescido em diferentes condições, apresentar-se com aspectos macro e microscópicos diferenciados, sendo este comportamento considerado comum em fungos (Alexopoulos *et al.*, 1996).

2.4 *Cunninghamella elegans* Lendner 1907

C. elegans é a principal representante dos Zygomycetes, possuindo caráter ubiquitário por sua ampla distribuição mundial; este fungo tem sido cotado pôr muitos autores, como hábeis em realizar vários processos biotecnológicos, possuindo aplicações em diferentes áreas da biologia celular, genética, fisiologia, farmacologia e bioquímica (Carlile & Watkinson, 1996, Alexopoulos *et al.*, 1996).

O potencial biotecnológico de *C. elegans* tem sido estabelecido pela realização de vários estudos, tendo sido relatadas ao longo do tempo várias habilidades:

2.4.1 Metabolização de Compostos Recalcitrantes

Sistemas microbiológicos têm sido utilizados como modelos para o metabolismo de mamíferos, sendo assim muitos metabólitos formados a partir da degradação de substâncias recalcitrantes são similares às produzidas em mamíferos (Zhang *et al.*, 1996). *C. elegans* possui a habilidade de metabolizar xenobióticos, incluindo os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos - HAPs (Cerniglia *et al.*, 1977; Shiosaki *et al.*, 2001); azocorantes (Ambrósio & Campos-Takaki, 2004); produtos tóxicos resultantes da combustão de óleo diesel (Shiosaki *et al.*, 2001) e remoção de metais pesados (Franco *et al.*, 2004a).

2.4.2 Modelo Biológico

As vias metabólicas para metabolização de vários fármacos por fungos, são similares à aquelas utilizadas por células de mamíferos, e o sistema fúngico tem sido proposto como um modelo *in vitro* adequado para o metabolismo de drogas utilizadas na terapêutica humana e animal. A utilização do modelo microbiológico para a degradação de drogas apresenta várias vantagens como o baixo custo, fácil manuseio e aumento da escala de produção (Yang & Davis, 1992).

Amostras de *C. elegans* têm sido utilizadas em investigações acerca da metabolização de vários fármacos como o antiinflamatório triptofenolide que é metabolizado por este fungo em três produtos: triptoquinona, 5U,14-dihidroxibutenolida e 14P-glucosilriptofenolida (Milanova *et al.*, 1996); como também o corticosteróide cortexolone (Katarzyna & Dlugonski, 2003), dentre outros.

2.4.3 Extração de DNA em larga escala

Amostras de *C. elegans* têm sido utilizadas com sucesso para o desenvolvimento de novas técnicas de obtenção de DNA em fungos (Zhang *et al.*, 1996), pois a grande concentração de polissacarídeos e a atividade de DNase tem tornado necessária a descoberta de técnicas mais eficazes para a obtenção de DNA nestes microrganismos.

2.4.4 Produção Microbiológica de Quitina e Quitosana

O principal componente macromolecular estrutural da parede celular é a quitina, que é um homopolissacarídeo constituído de unidades repetidas de N-acetil-D-glicosamina, unidas através de ligações β 1-4. A produção de quitosana ocorre através da bioconversão da quitina, sendo uma poliglicosamina que possui propriedades peculiares que a tornam útil em uma grande variedade de aplicações (Kafetzopoulos, 1993; Lehninger, 1995).

Em função do amplo campo de aplicação, estes polissacarídeos têm sido extensivamente estudados na atualidade. A fonte tradicional para obtenção de quitina são os exoesqueletos de crustáceos, contudo, existem várias limitações em relação à utilização destes animais, tais como: a adaptação ao clima, os locais de confinamento e o processamento em larga escala associado com a conversão química de quitina em quitosana, que limitam a viabilidade do processo de obtenção para estes polissacarídeos (White *et al.*, 1979; Mathur & Narang, 1990).

Dentre os fungos, a classe que apresenta maior quantidade de quitina e quitosana em suas paredes celulares são os Zygomycetes, inclusive determinando um caráter significativo na sua classificação filogenética e taxonômica (Bartnicki-Garcia, 1968; Campos-Takaki, 1984).

Em recentes estudos, têm se estabelecido métodos de otimização para processos de obtenção de quitina e quitosana a partir de massa micelial de *C. elegans* tendo sido relatados rendimentos iguais ou superiores aos obtidos quando utilizadas suas fontes tradicionais (Andrade *et al.*, 2000; Andrade *et al.*, 2003, Franco *et al.*, 2004 b).

2. REFERÊNCIAS

Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W.; Blackwell, M. (1996). Introductory Mycology. John Wiley & Sons Publishers, New York, p.356-379.

Ambrósio, S. T., Campos-Takaki G. M. (2004). Decolorization of reactive azo dyes by *Cunninghamella elegans* UCP 542 under co-metabolic conditions. *Bioresource Technology* **91**, 69-75.

Andrade, V.S., Neto, B.B., Souza, W., Campos-Takaki. G.M. (2000). A factorial design analysis of chitin production by *Cunninghamella elegans*. *Canadian Journal of Microbiology* **46**, 1042-1045.

Andrade, V.S., Neto, B.B.; Fukushima, K., Campos-Takaki. G.M. (2003). Effect of medium components and time of cultivation on chitin production by *Mucor circinelloides* (*Mucor javanicus* IFO 4570) - A factoryal study. *Revista Iberoamericana de la Micologia*. **20**, 149-153.

Baijal, U. & Mehrotra. (1980). The genus *Cunninghamella* - a reassessment. *Sydowia*, **33**, 1-13.

Bartnicki-Garcia, S. (1968). Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Annuall Review of Microbiology* **22**, 98-108.

- Bonting, C.F., Korstee, G.J., Zehnder A.J. (1991)** Properties of polyphosphate: AMP phosphotransferase of *Acinobacter* strain 210A. *Journal of Bacteriology* 173, 6484-6488.
- Brown, M.R.W., Kornberg, A. (2004)** Inorganic polyphosphate in the origin and survival of species. *Proc Natl Acad Sci*, **46** (101), 16085-16087.
- Campos-Takaki, G. M. (1984).** Aspectos bioquímicos e ultraestruturais de fungos da Ordem Mucorales (Zygomycetes). *Tese de Doutorado*, Escola Paulista de Medicina. São Paulo, 229p.
- Cardoso, E.J.B.N., Tsai, S.M., Neves, M.C.P. (1992).** Microbiologia do solo. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, SP - Brazil, 360p.
- Carlile, M.J, Watkinson, S.C., (1996).** *The Fungi*. Tokyo, Academic press.
- Castuma, C.E., Huang, R., Kornberg, A., Reush, R.N. (1995).** Inorganic polyphosphate in the acquisition of competence in *Escherichia coli*. *Journal of Biology and Chemistry* **270**, 80-83.
- Cerniglia, C.E., Gibson, D.T. (1977).** Metabolism of naphthalene by *Cunninghamella elegans*. *Applied Environmental Microbiology* **34**, 363-370.
- Cramer, C.L. Davis, R.H. (1984)** Polyphosphate-cation interaction in the amino-containing vacuoles of *Neurospora crassa*. *Journal of Biology and Chemistry* **259**, 5452-5157.
- Domsch, K.H., Gams, W., Anderson, T.H. (1980).** *Compendium of soil fungi*. Academic Press, London, 120p.
- Durr, M., Urech, K., Boller, T., Wiemken, A. Schwencke, J., Nagy, M. (1979)** Sequestration of arginine by polyphosphate in vacuoles of *Sacharomyces cerevisiae*. *Archives in Microbiology* **121**, 169-175.

Franco, L.O., Maia, R.C.C., Porto, A.L.F., Messias, A.S., Fukushima, K., Campos Takaki, G.M. (2004a). Heavy metal biosorption by chitin and chitosan from *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). *Brazilian Journal of Microbiology* **35**, 243-247.

Franco, L.O., Stamford, T.C.M., Stamford, N.P., Campos-Takaki, G.M. (2004b). *Cunninghamella elegans* como fonte de quitina e quitosana. *Revista Analytica* **13**, 52-56.

Gómez-Garcia, R.M., Kornberg, A. (2004) Formation of an actin-like filament concurrent with the enzymatic synthesis of inorganic polyphosphate. *Proc Natl Acad Sci* **45 (101)**, 15876-15880.

Gonzalez, H., Jensen, T.E. (1998) Nickel sequestering by polyphosphate bodies in *Staphylococcus aureus*. *Microbios* **93**, 179-185

Griffin, D.M. (1981). Water and microbial stress. *Advances in Microbiology and Ecology* **5**, 91-136.

Harold, F.M. (1966). Inorganic polyphosphate in biology: structure, metabolism, and function. *Bacteriology Review* **16**, 772-794.

Hsieh, P.C., Shenoy, B.C., Jentoft, J.E., Phillips, N.F.B. (1993). Purification of polyphosphate and ATP glucose phosphotransferase from *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra: evidence that PolyP and ATP glucokinase activities are catalyzed by the same enzyme. *Protein Expression and Purification*. **177**, 76-84.

Ivanov, A.J., Vagabov, V.M. Fomchenkov, V.M., Kulaev, I.S. (1996) Study of the influence of polyphosphates of cell envelope on the sensitivity of yeast *Saccharomyces cerevisiae* to the cetyl-3-methylammonium bromide, *Microbiology* **65**, 611-616.

- Kafetzopoulos, D. (1993).** Bioconversion of chitin to chitosan: purification and characterization of chitin deacetylase from *Mucor rouxii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **90**(7),2564-2568.
- Katarzyna, L., Dlugonski, J. (2003)** Concurrent corticosteroid and phenanthrene transformation by filamentous fungus *Cunninghamella elegans*. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* **85**, 63-69.
- Keasling, J.D. (1997)** Regulation of intracellular toxic metals and other cations by hydrolysis of polyphosphate. *Annual New York Academic Science*. **829**, 243-249.
- Keasling, J.D., Van Dien, S.J., Trelstad, P., Renninger, N., McMahon, K. (2000).** Application of polyphosphate metabolism to environmental and biotechnological problems. *Biochemistry (Moscow)* **65**, 385-393.
- Keyhani, S., Lopez, J.L, Clarck, D.S., Keasling, J.D. (1996).** Intracellular polyphosphate content and cadmium tolerance in *Anacystis nidulans* R2. *Microbios* **88**, 105-114.
- Kim, K., Rao, N.N., Fraley, D.C., Kornberg, A. (2002)** Inorganic polyphosphate is essential for long-term survival and virulence factors in *Shigella* and *Salmonella* spp. *Proc Natl Acad Sie* **99** (11) 7675-7680
- Kornberg, A. (1999)** Inorganic Polyphosphate: a molecule of many functions. *Program in Molecular and subcellular Biology* **23**, 1-18.
- Kornberg, A., Kornberg, S., Simms, E. (1956)** Methaphosphates synthesis by enzyme from *Escherichia coli*. *Biochemistry and Biophysics Acta* **20**, 215-257.
- Kornberg, A., Rao, N.N., Ault-Riche, D. (1999).** Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annual Review of Biochemistry* **68**, 89-125.

- Kulaev, I., Kulakovskaya, T. (2000).** Polyphosphate and Phosphate Pump. *Annual Review of Microbiology* **54**,709-734.
- Kulaev, I.S. (1979).** The biochemistry of inorganic polyphosphate, John Wiley & sons, N.Y. pp. 202-206.
- Kulaev, I.S. (2000).** Biochemistry and Biotechnology of Inorganic Polyphosphates. *Biochemistry* (Moscow) **65**,269-270.
- Kulaev, I.S. (2004).** *The Chemical structures and properties of condensed inorganic phosphates.* John Wiley & Sons pp 3-13.
- Kulaev, I.S., Vagabov, V.M. (1983).** Polyphosphate metabolism in micro-organisms. *Advances Microbiology and Physiology* **24**, 83-171.
- Kuroda, A; Kornberg, A. (1997).** Polyphosphate Kinase as a Nucleoside Diphosphate Kinase in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Science*, **94** (2), .439-442.
- Lehninger, A. L.; Nelson, D.L. & Cox, M.M.(1995).** *Princípios de Bioquímica.* 2ª ed. Sarvier, São Paulo. p .229-233.
- Levy, S.A., Schmiff, K.W., Kaufman, L. (1986)** Systematic zygomycosis diagnosed by fine needle aspiration and confirmed with enzyme immunoassay. *Chest* **90**, 146-148.
- Leyhausen, G., Lorenz, B.,Zhu, H., Geurtsen, W., Bohnensack, R., Muller, W.E.G., Schroder, H.C. (1998)** Inorganic polyphosphate in human osteoblast-like cells. *Journal of Bone Mineral Research* **13**, 803-812.
- Lima, M.A.B., Nascimento, A.E., Souza, W., Fukushima, K., Campos-Takaki, G.M. (2003).** Effect of phosphorus on polyphosphate accumulation by *Cunninghamella elegans*. *Brazilian journal of Microbiology* **34**, 363-372.

- Margulis, L. (1993).** *Symbioses in Cell Evolution*. San Francisco. 214p.
- Mathur, N. K. & Narang, C.K. (1990).** Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. *Journal Chemical Education* **67(14)**:938-942. 1990.
- Milanova, R., Stoyanov, N., Moore, M. (1996)** The optimization of triptokinone production by *Cunninghamella elegans* using factorial design. *Enzyme Microbial Technology* **19**, 86-93.
- Morohoshi, T., Maruo, T., Shirai, Y., Kato, J., Ikeda, T., Takiguchi, N., Ohtake, H., Kuroda, A. (2002)** Accumulation of inorganic polyphosphate in phoU mutants of *Escherichia coli* and *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Applied and environmental Microbiology* **68(8)**, 4107-4110.
- Mullan, J.P., Quinn, J.P., McGrath, J.W. (2002).** Enhanced phosphate uptake and polyphosphate accumulation in *Burkholderia cepacia* grown under low-pH conditions. *Microbial Ecology* **44**, 69-77.
- Nelson, N. (1992).** Evolution of organellar proton-ATPases. *Biochemistry and Biophysics. Acta* **1100**, 109-24.
- Nesmeyanova, M.A. (2000).** Polyphosphate and enzymes of polyphosphate metabolism in *Escherichia coli*. *Biochemistry (Moscow)* **3**, 309-314.
- Orlowski, I.M. (1991)** Mucor dimorphism. *Microbiological Review* **55**, 234-258.
- Pelczar, M.J.; Chan, E.C.S. & Krieg, N.R. (1996).** *Microbiologia*. Makron Books do Brasil Ltda, 2^a ed., V. 1, 524p.
- Pestov, N.A., Kulakovskaya, T.V., Kulaev, I.S. (2004).** Inorganic polyphosphate in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* at phosphate limitation and phosphate excess. *FEMS Yeast Research* **4**, 643-348.

- Reush, R.N. (1992).** Biological complexes of poly- β -hidroxybutyrato. *FEMS Microbiology Review* **103**, 661-665.
- Reush, R.N. (1999).** Polyphosphate/poly(R)-3 hydroxybutyrate in channels ion cell membrane. *Progress in Molecular Biology and subcellular Biology* **23**, 317p.
- Rao, N.N; Kornberg, A. (1996).** Inorganic Polyphosphate Supports Resistance and Survival of Stationary-Phase *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **178** (5), 1394-1400.
- Shari'a, A.E.N.; Nascimento, A.E.; Lima, M.A.B.; Takaki, G.M.C.; Souza, W. (2000).** Polyphosphate in Zygomycetes: a cytochemical study. *Brazilian Journal of Microbiology.*, **33**, 119-126.
- Shiosaki, R. K., Okada, K., Gusmão, N.B., Nigam, P., Falcão, P.S., Silva, N.H., Fukushima, K., Miyaji, M., Campos-Takaki, G.M. (2001).** Biochemical markers in taxonomy of the genus *Cunninghamella*. *Revista Iberoamericana de la Micologia* **18**, 123-127.
- Shipton, W.A., Lunn, J.A. (1980).** Sporangiole morphology and species in *Cunninghamella*. *Trans Br Mycol Soc* **74** (3) 483-491.
- Thomas, G.H. (2001).** Cellular functions for inorganic polyphosphate. *TRENDS Microbiology* **9** (10), 468.
- Tinsley, C.R., Gotschlich, E.C. (1995)** Cloning and characterization of the meningococcal polyphosphate kinase gene: production of polyphosphate synthesis mutant. *Infection and Immunology* **63**, 1624-1630.
- Trufem, S. F. B..(1981).** Mucorales do estado de São Paulo. 3. Gêneros *Circinella* van Tieghem & Le Monier e *Cunninghamella* Matruchot. *Rickia* **9**, 113-120.

- Vagabov, V.M., Trilisenko, L.V., Krupianko, V.I., Ilchenko, L.V., Kulaev, I.S. (1990)** Does intracellular arginine stimulate vacuolar polyphosphate lenght during growth of *Sacharomyces cerevisiae*. *Mycrobiology* 67,263-268.
- Weitzman, I; Whittier, S; Mckitrick, J.C; Della-Latta, P. (1995).** Zygosporos: The Last Word in Identification of Rare or Atypical Zygomycetes Isolaed from Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 33, 1995.
- White, S.A.; Farina, P.R.; Fulton, I. (1979).** Production and isolation of chitosan from *Mucor rouxii*. *Applied end Environmental Microbiology* 38, 323-328.
- Yang, W., Davis, P.J. (1992)** Microbial models of mammalian metabolism: biotransformation of N-methyl-carbazole using the fungus *Cunninghamella elegans*. *Drug Metabolism* 20, 38-46.
- Zhang, D.; Freeman, J. P.; Sutherland, J. B.; Walker, A E.; Yang, Y.; Cerniglia, C. E. (1996).** Biotransformation of chlorpromazine and methdilazine by *Cunninghamella elegans*. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 798-803.

PRIMEIRO ARTIGO

**Efeitos da concentração de glicose e da temperatura de cultivo no
crescimento e acúmulo de polifosfato inorgânico por amostras
Cunninghamella elegans usando modelo fatorial**

Trabalho submetido para publicação ao periódico indexado
Mycrobiology - Janeiro de 2005.

Efeitos da concentração de glicose e da temperatura de cultivo no crescimento e no acúmulo de polifosfato inorgânico por amostras de *Cunninghamella elegans* usando modelo fatorial

¹Luciana de Oliveira Franco; ²Thayza C. Montenegro Stamford; ³Clarissa Daisy C. Albuquerque; ⁴Katuzaka Fukushima & ⁵Galba Maria de Campos-Takaki

¹ Doutorado em Biologia de Fungos - Universidade Federal de Pernambuco

² Doutorado em Ciências Biológicas - Universidade Federal de Pernambuco

³ Departamento de estatística e Informática - Universidade Católica de Pernambuco.

⁴ Chiba University - Research Center for Pathogenic Fungi and Microbial Toxins

⁵ Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais - Departamento de Química,
Universidade Católica de Pernambuco.

RESUMO

Cunninghamella elegans é a principal representante dos Zygomycetes, um grupo muito importante de fungos. O polifosfato inorgânico (PoliPi) é um polímero linear formado por unidades repetidas de fosfato unidas através de ligações fosfoanidrido. Neste trabalho foi investigado o potencial de acúmulo de PoliPi por dez amostras de *C. elegans*. Os ensaios foram realizados de acordo com um modelo fatorial de dois níveis (2^2) sem ponto central, tendo como variáveis independentes a concentração de glicose no meio de crescimento e a temperatura de cultivo, e como variável resposta o acúmulo intracelular de PoliPi. Os resultados obtidos demonstraram uma significativa capacidade de acúmulo de PoliPi por todas as amostras investigadas. O maior rendimento de acumulação de PoliPi alcançado foi de 5,77 μg de Pi/mg de biomassa que corresponde a 23.8% do peso seco. Os melhores resultados foram obtidos quando todas as variáveis independentes estavam reguladas no nível máximo (+1). Foram propostos modelos matemáticos de primeira ordem para o acúmulo de PoliPi por cada amostra de *C. elegans* estudada obtendo-se uma excelente correlação com os dados experimentais obtidos.

Palavras-chave: polifosfato inorgânico, *Cunninghamella elegans*, modelo fatorial, modelo de primeira ordem.

INTRODUÇÃO

Os microrganismos são altamente dependentes das condições ambientais para a manutenção da sua viabilidade e metabolismo; neste sentido eles são capazes de produzir e estocar uma série de metabólitos importantes sobre a forma de polímeros osmoticamente inertes (Pestov et al., 2004).

Um grande número de organismos incluindo bactérias, fungos, vegetais e animais estocam energia em forma de um polímero de fosfato que pode conter de três a milhares de unidades repetidas de fosfato, o qual é denominado de polifosfato inorgânico - PoliPi (Keasling et al., 2000).

Esta molécula foi primeiramente identificada a mais de cem anos atrás, como um polímero de fosfatos, unidos através de ligações fosfoanidrílicas de alta energia (Harold, 1966). A ubiquidade deste polímero em organismos indicam uma função fisiológica comum (Van Dien et al., 1997). Ao longo do tempo várias funções no metabolismo microbiano têm sido atribuídas ao PoliPi, incluindo a reserva de fosfato, quelação de metais, substrato para a fosforilação de glicose, material capsular e formação de canais de membrana, entretanto sua exata função fisiológica ainda permanece incerta (Gerlitz & Gerlitz, 1997; Andreeva et al., 2000; Shiba et al., 2000).

A habilidade de acumular PoliPi como resposta a adaptações fisiológicas durante o crescimento e desenvolvimento, têm sido observada em alguns microrganismos, sugerindo que a presença do PoliPi pode significar uma importante via de aumento da resistência celular em condições desfavoráveis de crescimento, onde esta molécula participa da regulação metabólica de

diferentes processos bioquímicos (Campos-Takaki, 2000; Thomas, 2001; Lichko, 2002; Kaway *et al.*, 2003).

A primeira observação da remoção biológica de fosfato por microrganismos foi reportada por Srinath *et al.* (1959); no entanto, o mecanismo básico para este fenômeno foi inferido somente vinte anos mais tarde como o acúmulo de fosfato na forma de polifosfato inorgânico em células vivas (Kulaev *et al.*, 1999; Kornberg *et al.*, 1999; Kulaev, 2000).

Os Zygomycetes são fungos que apresentam grande interesse industrial e econômico devido a sua comprovada utilização em processos de biodegradação e biodeterioração, ressaltando ainda, a produção de vários metabólitos secundários de interesse, como enzimas, carboidratos, ácidos orgânicos, pigmentos, álcoois, esteróides e vitaminas (Shari'a *et al.*, 2002). Entre os Zygomycetes, a ordem Mucorales, em que os representantes podem ser freqüentemente encontrados em solo, grãos e outros substratos orgânicos, incluem organismos com particulares interesses médicos, industriais e ambientais (Alexopoulos & Mims, 1996).

O gênero *Cunninghamella*, em especial a espécie *C. elegans* A. Lendner 1905, um fungo ubiqüitário na natureza, tem sido indicada por muitos autores como capaz de metabolizar uma ampla variedade de compostos tóxicos recalcitrantes utilizando a fase I (oxidativa) e fase II (conjugativa) (Ambrósio & Campos-Takaki, 2004). Esta espécie tem sido extensivamente utilizada como modelo microbiológico para o metabolismo de drogas farmacêuticas para células animais (Zhang, 1996); através do sistema de enzimas citocromo P-450 da *C. elegans* na degradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos - HAPs (Shiosaki *et al.*, 2001), na biodegradação de azocorantes utilizados na

indústria têxtil (Ambrósio & Campos-Takaki, 2004), na biodegradação de produtos tóxicos advindos da combustão de óleo diesel (Shiosaki *et al.*, 2001; Cerniglia & Gibson, 1977), e na biorrecuperação de metais pesados (Franco *et al.*, 2004a). A *C. elegans* pode ainda ser utilizada como fonte alternativa para a produção de quitina e quitosana apresentando rendimentos iguais ou superiores aos obtidos quando são utilizados suas fontes tradicionais de obtenção como as carapaças de crustáceos (Franco *et al.*, 2004b; Andrade *et al.*, 2000).

Neste trabalho foi investigado o efeito da concentração de glicose no meio de cultura e da temperatura de cultivo de crescimento na acumulação de polifosfato inorgânico por dez amostras de *C. elegans* utilizando um planejamento fatorial de dois níveis (2^2).

MÉTODOS

Microrganismos – dez amostras de *Cunninghamella elegans* foram obtidas do banco de culturas da Universidade Católica de Pernambuco (UCP) : *C. elegans* UCP 54; *C. elegans* UCP 48; *C. elegans* UCP 61; *C. elegans* UCP 542; *C. elegans* UCP 47; *C. elegans* UCP 57; *C. elegans* UCP 53; *C. elegans* UCP 56; *C. elegans* UCP 62 e *C. elegans* UCP 72. As amostras foram mantidas em meio de cultivo Batata Dextrose Ágar (BDA) e estocadas sob refrigeração (5°C).

Métodos Microbiológicos

Condições de Cultivo – esporangiólos produzidos por *C. elegans* após sete dias de crescimento em BDA, foram coletados utilizando-se água destilada e contados em hematocitômetro com padronização de inóculo em 10^8

sporângios/mL. As culturas foram crescidas em meio sintético para Mucorales (SMM), constituído por $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ glicose, $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ asparagina, $0.005 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ tiamina, $0.50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ fosfato de potássio e $0,25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sulfato de magnésio (Hesseltine & Anderson, 1957).

Cerca de 1 mL do inóculo foi transferido para frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio; os frascos foram incubados durante sete dias (168 horas) sob agitação orbital de 5000 g. Ao final do crescimento a massa micelial foi coletada em membrana de nylon (120F), lavada duas vezes com água destilada e posteriormete submetida a liofilização para determinação do peso seco da biomassa.

Procedimentos Analíticos

Determinação do consumo de glicose, nitrogênio e fosfato - alíquotas do líquido metabólico foram coletadas ao final do crescimento e utilizadas para a realização dos procedimentos analíticos. O consumo de glicose foi determinado através do método enzimático colorimétrico glicose-oxidase Labtest[®] kit; como padrão foi elaborada uma curva utilizando-se solução de glicose. Para determinação do consumo de proteínas foi utilizado kit Labtest[®] utilizando-se albumina de soro bovino como padrão. O consumo de fosfato no meio de cultivo foi avaliado utilizando-se o método colorimétrico descrito por Fiske & Subbarow (1925). A curva padrão foi elaborada a partir de uma solução de fosfato de potássio com concentração de 0,50 mg/L. O pH foi acompanhado através de potenciometria.

Extração e determinação de polifosfato inorgânico – a extração de PoliPi foi realizada de acordo com o método descrito por Sminorv *et al.* (2002), modificado pelo tempo de exposição da biomassa ao ácido perclórico de trinta minutos para vinte e quatro horas. Uma quantidade padronizada de biomassa (0,5 g) foi lisada pela adição de água destilada a 0°C durante 10 minutos em homogeneizador e submetida à sonicação durante 3 minutos contínuos (16 KHz). O homogenato foi centrifugado a 5000g durante dez minutos, o líquido sobrenadante obtido foi utilizado para a determinação de fosfato. O resíduo obtido foi ressuspensão em 0,5 N HClO₄ à 0 °C por 24 horas e centrifugado nas mesmas condições anteriores, o sobrenadante obtido corresponde a fração ácido solúvel de PoliPi. O novo resíduo foi então ressuspensão em solução de NaOH 0.05 N até pH 12 em temperatura controlada de 0 °C por 1 h, obtendo-se assim a fração alcali-solúvel por centrifugação, sendo em seguida o resíduo remanescente tratado com HClO₄ 0.5 N por 30 minutos a 90 °C, centrifugado, e estimou-se a quantidade de fosfato no sobrenadante para determinação da fração ácido insolúvel. A quantidade de ortofosfato (Pi) e fósforo lábil foram determinadas nas frações ácidas e alcalina de acordo com a metodologia descrita por Fiske & Subbarow (1925). Todos estes ensaios foram realizados em triplicata para extimativa do erro experimental.

Modelo fatorial - foi utilizado um planejamento fatorial de dois níveis sem ponto central, com ensaios realizados em dupplicata. Os valores codificados e reais envolvidos neste modelo estão demonstrados na tabela 1. A concentração de glicose e a temperatura de crescimento foram as variáveis independentes tendo como variável resposta o acúmulo de PoliPi.

Análise estatística: todos os resultados foram analisados utilizando-se o programa STATISTICA, versão 5.5, da Statsoft, USA.

Tabela 1. Matriz do modelo fatorial (2^2) sem ponto central.

Variáveis independentes	Níveis	
	+1	-1
Glicose ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	40	4
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	28	22

RESULTADOS

A relação entre a produção de biomassa e o acúmulo de PoliPi por dez amostras de *C. elegans* crescidas em meio SMM contendo 40 ou 4 g/L de glicose, cultivados à 28 e 22 $^{\circ}\text{C}$, foi estabelecida de acordo com um planejamento fatorial 2^2 sem ponto para cada amostra utilizada (Figura 1).

A análise dos efeitos de um planejamento fatorial se inicia pelo cálculo dos efeitos principais e de interação de todos os fatores investigados no estudo. Todos os fatores foram calculados pela diferença entre duas médias, cada uma contendo a metade da resposta experimental. O efeito principal é simplesmente a diferença entre o valor médio da resposta no nível máximo do fator e a média correspondente no seu nível mínimo.

Todos os parâmetros foram avaliados após 168 horas de cultivo, para a produção de biomassa. O rendimento máximo foi demonstrado pela amostra *C. elegans* UCP 542 que correspondeu a 15,78 g/L, obtido quando todas as variáveis estavam reguladas no nível mais alto (+1); o mesmo comportamento foi observado para todas as amostras utilizadas, contudo a produção de biomassa foi inferior, com valores oscilando entre 14,9 e 11,9 g/L. Quando se

utilizou glicose na concentração de 40 g/L e temperatura de crescimento a 22 °C, a produção de biomassa sofreu uma discreta diminuição mostrando valores que oscilaram entre 7,8 e 13,2 g/L. Com a concentração de glicose no nível inferior (-1) o rendimento de biomassa foi fortemente afetado e os resultados obtidos foram muito inferiores ao alcançados no nível máximo, o que demonstrou uma larga interação negativa, com rendimento variando entre 4,2 e 9,02 g/L.

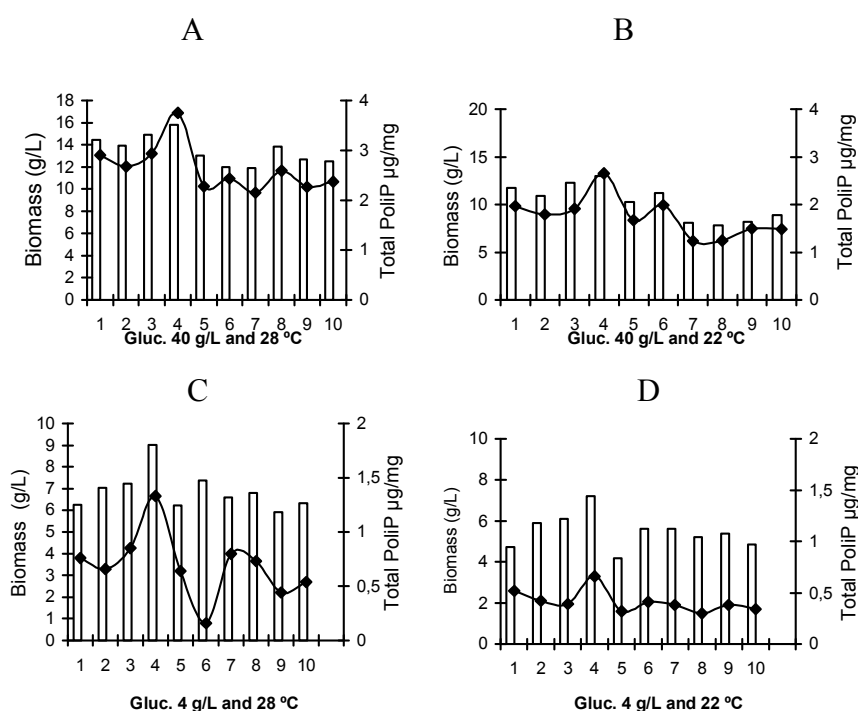


Figura 1. Produção de biomassa (□) e acúmulo PoliPi (◆) intracelular nas diferentes condições estabelecidas pelo planejamento fatorial 2^2 par as amostras: 1- *C. elegans* UCP 54; 2 - *C. elegans* UCP 48; 3 - *C. elegans* UCP 47; 4 - *C. elegans* UCP 542; 5 - *C. elegans* UCP 61; 6 - *C. elegans* UCP 57; 7- *C. elegans* UCP 53; 8 - *C. elegans* UCP 56; 9 - *C. elegans* UCP 62 e 10 - *C. elegans* UCP 72.

Ao final do crescimento de todas as amostras investigadas foram analisados o comportamento em relação ao consumo de glicose, proteínas e fosfato, assim como o pH. As análises foram realizadas utilizando o líquido metabólico coletado no final do crescimento. Quando a concentração de

glicose e a temperatura estavam reguladas no nível máximo (+1), o consumo máximo de glicose foi de 99,32% e no nível mínimo 74,94% respectivamente. A interação das variáveis independentes foi positiva para este parâmetro. O consumo de proteínas totais foi acompanhado, demonstrando valores que variaram de 78,0 a 18,2% no nível de regulação máximo e quando reguladas no nível mínimo os valores variaram entre 90,09 e 73,0%, para este parâmetro a interação entre as variáveis independentes foi negativa. Os maiores valores de consumo de fosfato foram demonstrados quando as variáveis independentes estavam reguladas no nível máximo obtendo-se valores oscilando entre 98 e 58,5%; quando as condições eram passadas para a regulação mínima os valores obtidos oscilaram de 26,9 a 11,25%; neste parâmetro a interação entre as variáveis independentes foi positiva.

No nível máximo das variáveis independentes o pH permaneceu na faixa ácida oscilando entre 5,10 e 3,71, e no nível mínimo de regulação os valores permaneceram na faixa alcalina entre 7,78 e 6,9.

Neste planejamento fatorial o acúmulo de PoliPi foi a variável resposta investigada; as Tabelas 2 a 12 demonstram os níveis do planejamento e os resultados obtidos para a variável resposta em cada combinação de níveis dos planejamentos realizados para cada amostra fúngica utilizada. Em cada um dos planejamentos 2² foram realizadas repetições autênticas para estimação do erro experimental.

Tabela 2. Planejamento fatorial para amostra *C. elegans* (UCP 54).

Repetição	Concentração de glicose	Temperatura de crescimento	µg de Pi/ mg de biomassa seca
1	-1	-1	2,80
1	+1	-1	4,14
1	-1	+1	2,98
1	+1	+1	5,10
2	-1	-1	2,74
2	+1	-1	4,28
2	-1	+1	3,12
2	+1	+1	4,69

Tabela 3. Planejamento fatorial para amostra *C. elegans* (UCP 48)

Repetição	Concentração de glicose	Temperatura de crescimento	µg de Pi/ mg de biomassa seca
1	-1	-1	1,90
1	+1	-1	4,20
1	-1	+1	2,20
1	+1	+1	4,79
2	-1	-1	1,74
2	+1	-1	4,18
2	-1	+1	2,50
2	+1	+1	4,85

Tabela 4. Planejamento fatorial para amostra *C. elegans* (UCP 47)

Repetição	Concentração de glicose	Temperatura de crescimento	µg de Pi/ mg de biomassa seca
1	-1	-1	1,73
1	+1	-1	3,87
1	-1	+1	1,05
1	+1	+1	4,92
2	-1	-1	1,55
2	+1	-1	3,97
2	-1	+1	8,70
2	+1	+1	4,94

Tabela 5. Planejamento fatorial para amostra *C. elegans* (UCP 542).

Repetição	Concentração de glicose	Temperatura de crescimento	µg de Pi/ mg de biomassa seca
1	-1	-1	2,50
1	+1	-1	5,19
1	-1	+1	3,58
1	+1	+1	6,05
2	-1	-1	2,14
2	+1	-1	5,07
2	-1	+1	3,82
2	+1	+1	5,49

Tabela 6. Planejamento fatorial para amostra *C. elegans* (UCP 61)

Repetição	Concentração de glicose	Temperatura de crescimento	µg de Pi/ mg de biomassa seca
1	-1	-1	2,10
1	+1	-1	4,12
1	-1	+1	2,53
1	+1	+1	4,20
2	-1	-1	1,85
2	+1	-1	4,06
2	-1	+1	2,63
2	+1	+1	4,58

Tabela 7. Planejamento fatorial para amostra *C. elegans* (UCP 57)

Repetição	Concentração de glicose	Temperatura de crescimento	µg de Pi/ mg de biomassa seca
1	-1	-1	1,79
1	+1	-1	4,61
1	-1	+1	3,00
1	+1	+1	4,97
2	-1	-1	1,93
2	+1	-1	4,31
2	-1	+1	3,10
2	+1	+1	5,19

Tabela 8. Planejamento fatorial para amostra *C. elegans* (UCP 53)

Repetição	Concentração de glicose	Temperatura de crescimento	µg de Pi/ mg de biomassa seca
1	-1	-1	1,53
1	+1	-1	3,71
1	-1	+1	2,93
1	+1	+1	4,23
2	-1	-1	1,84
2	+1	-1	3,89
2	-1	+1	2,51
2	+1	+1	4,81

Tabela 9. Planejamento fatorial para amostra *C. elegans* (UCP 56)

Repetição	Concentração de glicose	Temperatura de crescimento	µg de Pi/ mg de biomassa seca
1	-1	-1	1,55
1	+1	-1	3,92
1	-1	+1	3,01
1	+1	+1	4,94
2	-1	-1	1,41
2	+1	-1	4,12
2	-1	+1	2,59
2	+1	+1	4,48

Tabela 10. Planejamento fatorial para amostra *C. elegans* (UCP 62)

Repetição	Concentração de glicose	Temperatura de crescimento	µg de Pi/ mg de biomassa seca
1	-1	-1	1,78
1	+1	-1	4,27
1	-1	+1	3,60
1	+1	+1	4,28
2	-1	-1	1,86
2	+1	-1	4,87
2	-1	+1	3,04
2	+1	+1	4,68

Tabela 11. Planejamento fatorial para amostra *C. elegans* (UCP 72)

Repetição	Concentração de glicose	Temperatura de crescimento	µg de Pi/ mg de biomassa seca
1	-1	-1	1,93
1	+1	-1	3,50
1	-1	+1	3,03
1	+1	+1	4,54
2	-1	-1	2,22
2	+1	-1	3,74
2	-1	+1	2,41
2	+1	+1	4,96

Para cada um dos planejamentos realizados, os efeitos principais e de interação das variáveis independentes concentração de glicose e temperatura de crescimento foram analisados em relação variável resposta: acumulação de polifosfato inorgânico. Os resultados são mostrados na Tabela 12.

Tabela 12 - Efeitos principais e de interação das variáveis independentes sobre a variável resposta acúmulo de PoliPi para as dez amostras analisadas.

Amostras	Efeitos			
	Média	(1) Concentração de glicose	(2) Temperatura de crescimento	1 X 2
<i>C. elegans</i> (UCP54)	37,22500	16,15000	4,55000	1,85000
<i>C. elegans</i> (UCP48)	32,72500	23,75000	6,25000	0,95000
<i>C. elegans</i> (UCP47)	31,25000	28,62500	1,65000	8,45000
<i>C. elegans</i> (UCP542)	42,75000	25,30000	11,00000	-2,80000
<i>C. elegans</i> (UCP61)	32,47500	19,85000	4,75000	-1,75000
<i>C. elegans</i> (UCP57)	36,12500	23,15000	9,05000	-2,85000
<i>C. elegans</i> (UCP53)	31,86750	19,46500	8,66500	-1,46500
<i>C. elegans</i> (UCP56)	32,52500	22,25000	10,05000	-3,15000
<i>C. elegans</i> (UCP62)	35,47500	19,55000	7,05000	-7,95000
<i>C. elegans</i> (UCP72)	34,16250	20,37500	11,37500	4,92500

As interações entre as variáveis independentes mostraram efeito positivo significativo nas amostras *C. elegans* (UCP 47) e efeito negativo significativo

para as amostras de *C. elegans* (UCP 57) e *C. elegans* (UCP 62). Para todas as amostras analisadas as variáveis independentes concentração de glicose e temperatura de crescimento apresentaram efeito positivo quando passaram do nível -1 para o +1, significando o favorecimento do acúmulo de PoliPi pela passagem destas variáveis do nível mínimo para o máximo das variáveis independentes.

De acordo com os resultados obtidos a amostra que apresentou o melhor rendimento no acúmulo intracelular de PoliPi foi a *C. elegans* UCP 542, alcançando valor de 5,77 µg/mg de biomassa, o qual corresponde a 23,8% do peso seco da massa micelial.

Um método apropriado para a análise estatística dos resultados de uma análise fatorial é a análise da variância (ANOVA). A tabela 13 apresenta resultados das análises de variância para o acúmulo de PoliPi dos modelos obtidos. Analisando a coluna dos coeficientes de determinação na tabela observa-se que os modelos lineares foram adequados para descrever as relações entre a variável resposta acúmulo de PoliPi e as variáveis independentes, concentração de glicose e temperatura de cultivo para todas as dez amostras. Os coeficientes de determinação (R^2) obtidos, foram todos superiores a 95% para o acúmulo de PoliPi, indicando que todos os modelos estatísticos propostos podem explicar mais que 95% da variabilidade na resposta.

Tabela 13 – Modelos de produção de polifosfato inorgânico (z) em função da concentração (x) e da temperatura (y)

Equação	Modelo	R ²	F _o	F _o / F _{tab}
1	$z = 37,225 + 8,075 \cdot x + 2,275 \cdot y + 0,925 \cdot x \cdot y$	0,98718	102,6838	15,5818
2	$z = 32,725 + 11,875 \cdot x + 3,125 \cdot y + 0,475 \cdot x \cdot y$	0,99404	222,478	33,7599
3	$z = 28,625 + 15,625 \cdot x + 0,825 \cdot y + 4,225 \cdot x \cdot y$	0,99821	745,168	113,076
4	$z = 42,75 + 12,65 \cdot x + 5,5 \cdot y - 1,4 \cdot x \cdot y$	0,99221	169,742	25,7575
5	$z = 32,475 + 9,925 \cdot x + 2,375 \cdot y - 0,875 \cdot x \cdot y$	0,98918	121,902	18,498
6	$z = 36,125 + 11,575 \cdot x + 4,525 \cdot y - 1,425 \cdot x \cdot y$	0,99333	198,713	30,1538
7	$z = 31,8675 + 9,7325 \cdot x + 4,3325 \cdot y - 0,7325 \cdot x \cdot y$	0,96455	36,2797	5,50527
8	$z = 32,525 + 11,125 \cdot x + 5,025 \cdot y - 1,575 \cdot x \cdot y$	0,98187	72,2058	10,9569
9	$z = 35,475 + 9,775 \cdot x + 3,525 \cdot y - 3,975 \cdot x \cdot y$	0,95931	31,4354	4,77017
10	$z = 34,1625 + 10,1875 \cdot x + 5,6875 \cdot y + 2,4625 \cdot x \cdot y$	0,96348	35,1714	5,33708

Através do teste F verificou-se que para cada uma das dez regressões, os valores F calculados para os modelos foram mais que 4 vezes superiores aos valores F tabelados para distribuição de 95% de confiança, podendo-se portanto concluir que as equações são estatisticamente significativas e os modelos preditivos para a capacidade de acúmulo de polifosfato em cada uma das amostras estudadas. Como todos os modelos de 1ª ordem propostos apresentaram ótima correlação com os dados experimentais, não é necessário se completar o planejamento com um planejamento fatorial estrela, para obter um modelo quadrático ou de segunda ordem.

A partir dos modelos obtidos (Tabela 13) foram construídas as análises de superfícies de respostas ilustradas nas Figuras 2 a 11, as quais apresentam para cada amostra estudada, o efeito das variáveis sobre a capacidade de acúmulo de polifosfato inorgânico.

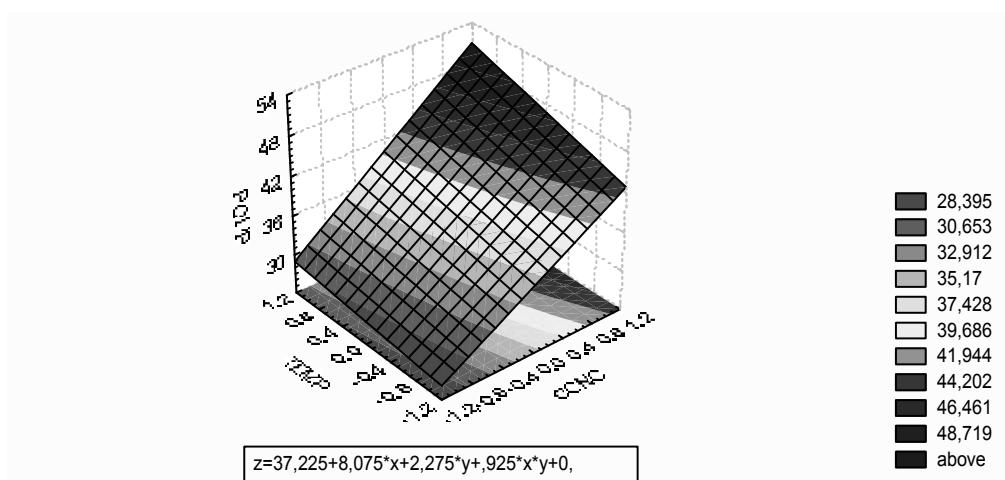


Figura 2. Superfície de resposta para o acúmulo de polifosfato pela *C.elegans* (UCP 54)

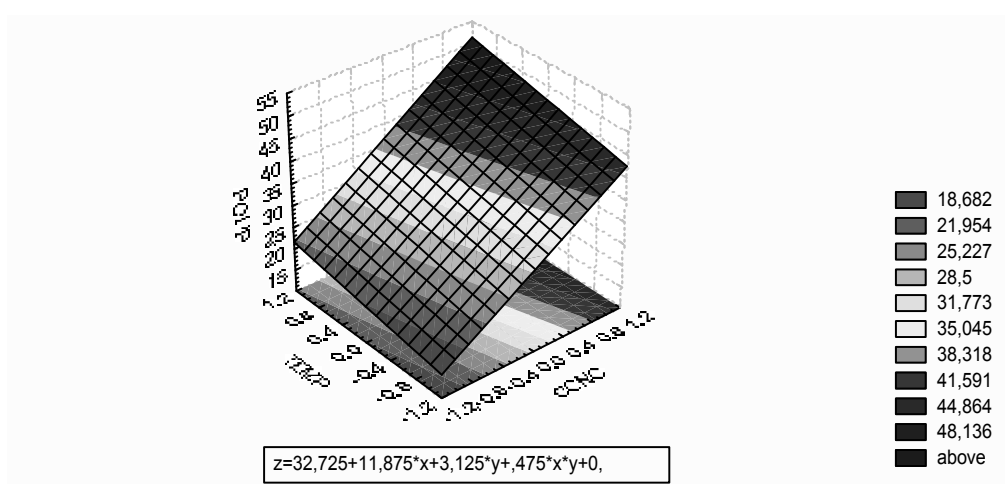


Figura 3. Superfície de resposta para o acúmulo de polifosfato pela *C.elegans* - (UCP 48)

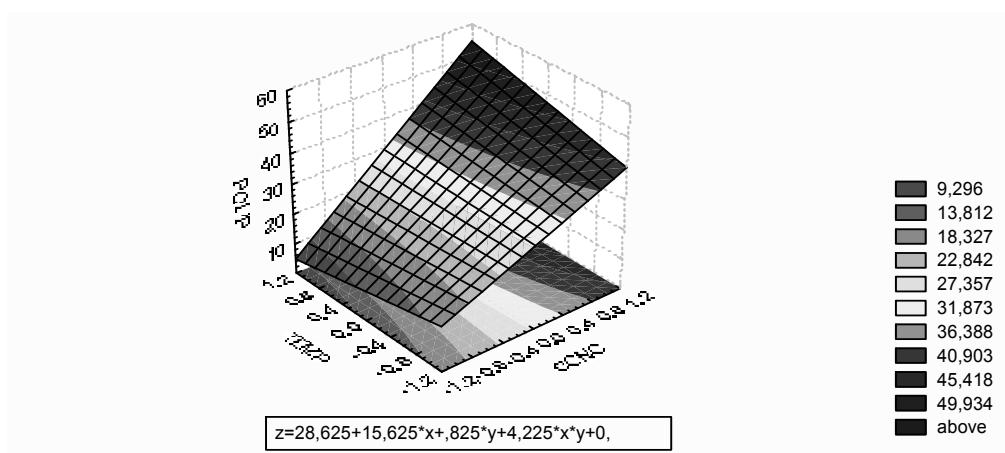


Figura 4. Superfície de resposta para o acúmulo de polifosfato pela *C.elegans* - (UCP 47)

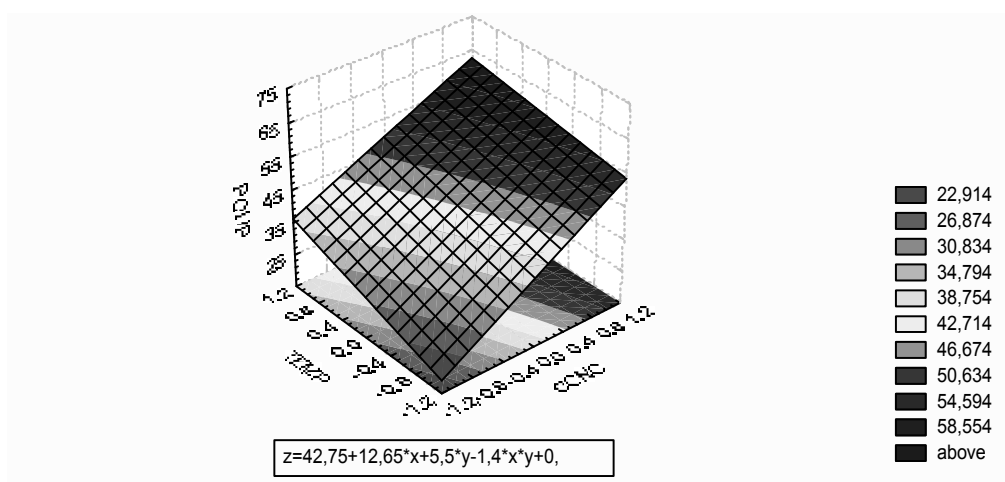


Figura 5. Superfície de resposta para o acúmulo de polifosfato pela *C.elegans* - (UCP 542)

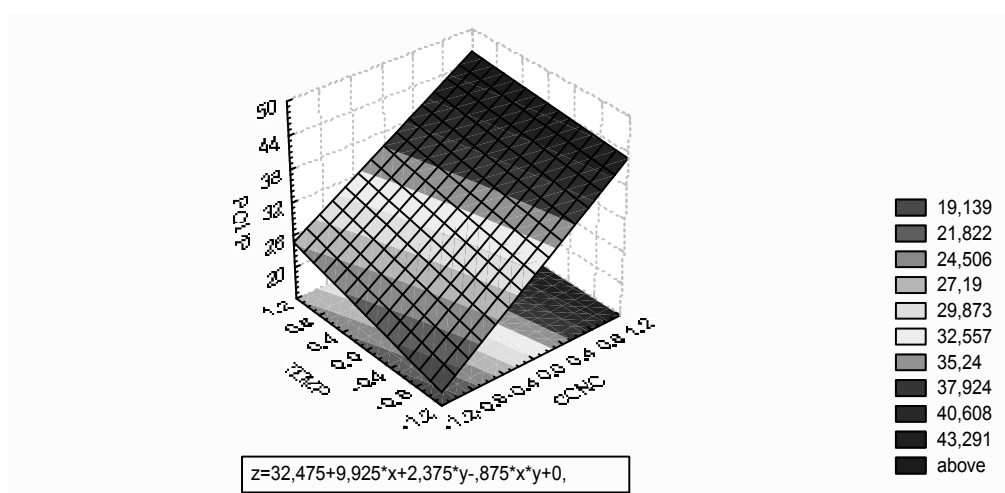


Figura 6. Superfície de resposta para o acúmulo de polifosfato pela *C.elegans* (UCP 61)

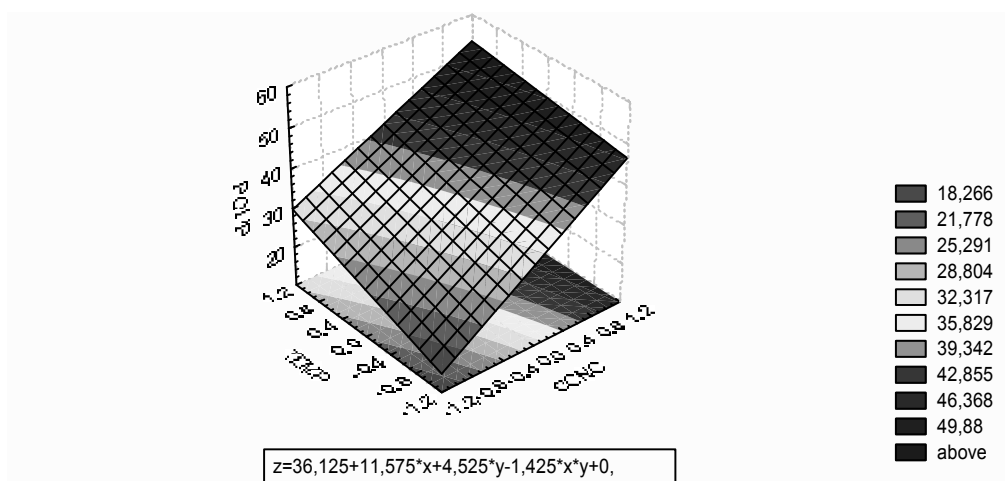


Figura 7. Superfície de resposta para o acúmulo de polifosfato pela *C.elegans* - (UCP 57)

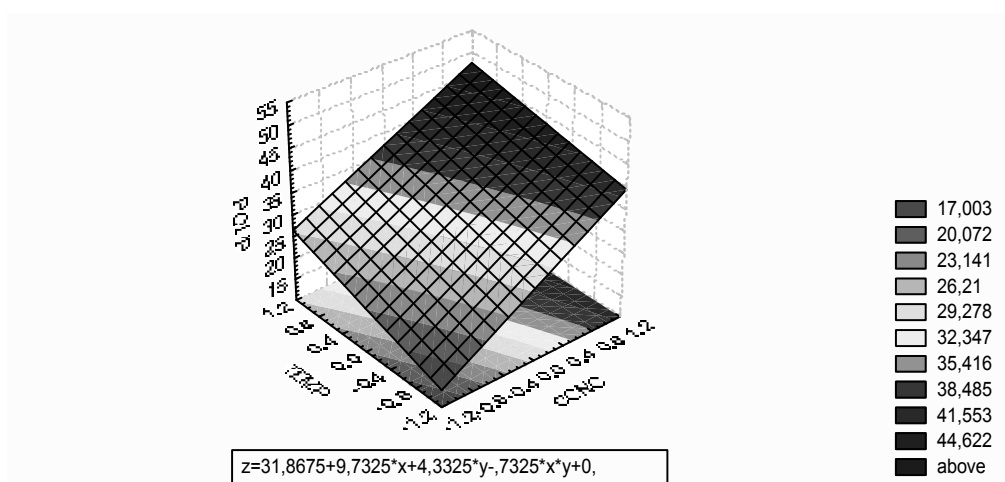


Figura 8. Superfície de resposta para o acúmulo de polifosfato pela *C.elegans* (UCP 53)

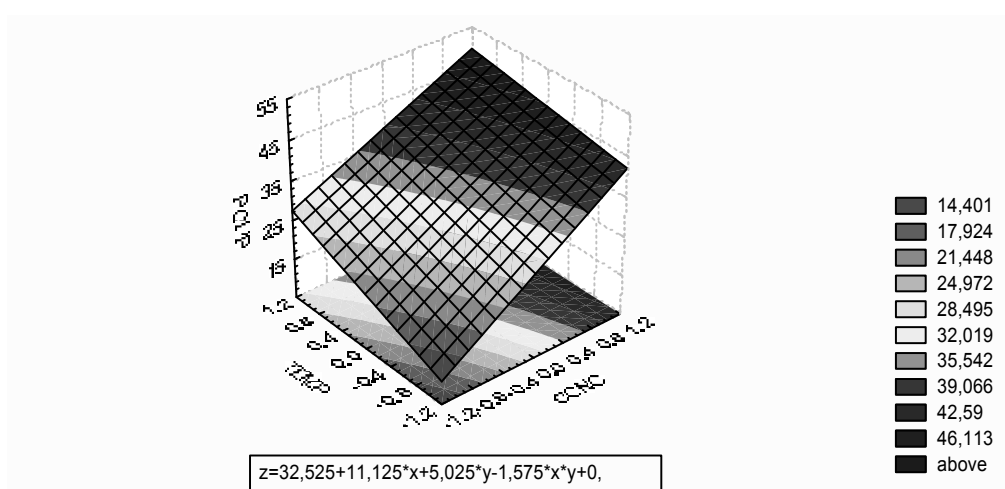


Figura 9. Superfície de resposta para o acúmulo de polifosfato pela *C.elegans* - (UCP 56)

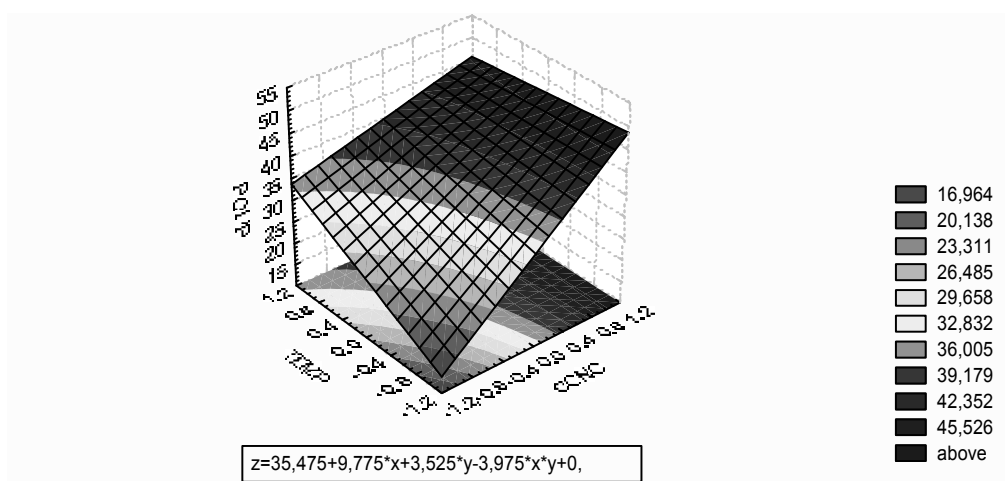


Figura 10. Superfície de resposta para o acúmulo de polifosfato pela *C.elegans* (UCP 62)

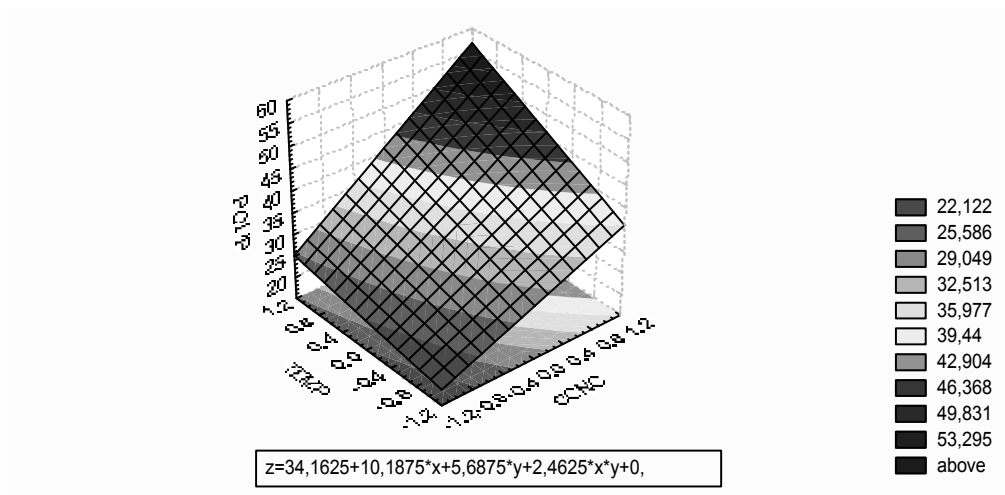


Figura 11. Superfície de resposta para o acúmulo de polifosfato pela *C.elegans* (UCP 72)

DISCUSSÃO

Atualmente os modelos fatoriais significam uma importante ferramenta tanto para a realização de pesquisas como para trabalhos aplicados e numerosos estudos que ilustram este potencial, tem sido reportados (Balasubramanian *et al.*, 2000; Cho *et al.*, 1999; Chen & Yao, 2000; Mondal *et al.*, 1998; Rot *et al.*, 2001; Trezona *et al.*, 2000; Verwater-Lukszo, 1998). Nestes estudos a análise de variância permitiu a identificação de parâmetros significativos para um determinado processo assim como a interação entre eles, e ainda determina os níveis mais efetivos de cada fator significativa, o que permite a otimização dos processos de produção (Bayhan, 2004).

Neste trabalho, foi investigado o crescimento e capacidade de acúmulo de PoliPi por dez amostras de *Cunninghamella elegans*. O modelo fatorial foi utilizado para determinar a melhor concentração de glicose no meio de crescimento e a melhor temperatura de cultivo para o incremento do acúmulo de PoliPi pelas amostras.

A produção de biomassa pelas amostras de *C. elegans* utilizadas neste trabalho mostraram rendimentos entre 11,9 g/L (UCP 53) e 15,78 g/L (UCP 542) com as variáveis independentes reguladas no maior nível do planejamento (+1). Estes resultados podem ser considerados excelentes quando comparados com vários relatos da literatura como Lima *et al.* (2003) que investigando o efeito da concentração de fosfato na produção de biomassa por *C. elegans*, obteve resultados com o valor máximo de 3,29 g/L, Andrade *et al.* (2000) utilizando planejamento fatorial para a produção de biomassa e quitina por *C. elegans* e *Mucor javanicus* obteve como melhores resultados 10,42 e 8,75 g/L respectivamente, mostrando resultados inferiores aos descritos neste trabalho. Com relação a outros representantes dos Zygomycetes, em 1979 White, Farina e Fulton, investigaram a produção de quitosana por *Mucor rouxii* e obtiveram valores de produção de biomassa numa faixa de 9,0 to 14,0 g/L após 80 horas de cultivo. A produção de biomassa obtida nesta pesquisa foi superior a descrita por Rast *et al.* (1991) durante um estudo utilizando *Mucor rouxii*, o qual alcançou um rendimento de 7,0 g/L e Synowieck & Al-Khateeb (1997) que utilizando o mesmo microrganismo, narraram rendimentos de biomassa em torno de 4,0 g/L após 48 horas de crescimento.

O comportamento do consumo de nutrientes no meio de cultivo foi significativamente afetado pelas trocas das variáveis independentes. O consumo de glicose foi relativamente menor quando a concentração de glicose foi regulada no nível mais alto (+1), onde o consumo máximo foi de 74,94% e no menor nível (-1) foi de 99,32%. O consumo de proteínas totais mostrou uma oscilação de valores entre 78,0 a 18,2% no nível máximo e quando as variáveis

foram reguladas no menor nível o consumo variou entre 90,09 e 73,0%. O consumo de fosfato pelas células de *C. elegans*, foi determinado pela concentração de fosfato remanescente no meio de cultivo ao final do crescimento nas diferentes condições os resultados obtidos mostraram um mais alto consumo quando as variáveis independentes estavam reguladas no nível máximo, sendo de 98 a 58,5% e quando as variáveis estavam na regulação mínima, houve baixa nos valores de consumo, sendo de 26,9 a 11,25%. De acordo com Andrade *et al.*, 2000, estes resultados, sugerem um comportamento bioquímico clássico de absorção de nutrientes.

O pH permaneceu na faixa ácida no nível de regulação máxima das variáveis independentes variando entre 5,10 e 3,71, enquanto que no nível mínimo os valores oscilaram entre 7,78 e 6,9 permanecendo na faixa alcalina, fato este, facilmente explicado pelo alto consumo de proteínas, que causa a liberação de aminoácidos no meio de cultivo (Smith *et al.*, 1977)

A potencial de acúmulo PoliPi intracelular é comum a todos os tipos de organismos (Kulaev, 1979). Os estudos acerca deste potencial são certamente, mais abundantes em bactérias, no entanto, organismos superiores como algas, fungos, protozoários e invertebrados são também conhecidamente acumuladores de PoliPi (Kulaev & Vagabov, 1983). O primeiro organismo onde foi verificada a presença de PoliPi foi a levedura *Sacharomyces cerevisiae* (Liebermann, 1888; Melasniemi & Hernesmaa, 2000).

Os resultados obtidos em relação ao acúmulo de PoliPi por *C. elegans* demonstraram um grande potencial. Uma interrelação foi estabelecida entre o acúmulo de PoliPi e a variação da concentração de glicose e temperatura de cultivo. Os melhores resultados foram demonstrados por *C. elegans* (UCP

542); esta amostra foi isolada de sedimento de mangue de uma área poluída no município de Rio Formoso, Pernambuco - Brasil. Os melhores resultados foram obtidos quando a variável independente concentração de glicose foi regulada no alto nível (+1), independentemente da temperatura de cultivo para todas as amostras investigadas. A respeito deste fato Kulaev *et al.*, 2000 relataram que o consumo de glicose e o acúmulo de PoliPi ocorrem paralelamente até que o nível de glicose esteja baixo, sugerindo que neste estágio, os níveis de glicose não poderiam suportar as necessidades de ATP pela célula, desencadeando o emprego de PoliPi para a produção de energia.

O acúmulo de PoliPi em vários organismos, tem sido investigado ao longo do tempo por um grande número de pesquisadores, entretanto estes estudos ainda não foram suficientes, principalmente em células eucarióticas, para o estabelecimento da via metabólica de produção deste polímero.

Já em 1976, Dietrich mostrou a ocorrência de PoliPi em algumas espécies de Zygomycetes. O acúmulo de PoliPi foi investigado em *Mucor racemosus* e foram mostrados rendimentos em torno de 4,6 a 5,6% de fosfato em relação ao peso seco da biomassa (James & Cassida, 1964).

É bem estabelecido que a levedura *S. cerevisiae* acumula uma larga quantidades de PoliPi em vacúolos quando está em condições de alta disponibilidade de fosfato (Pi) precedido por um período de estarvação de Pi, fenômeno este, conhecido como “polyphosphate overplus” (Harold, 1966; Ogawa *et al.*, 2000); nestas condições o acúmulo de PoliPi pode chegar a 20% do peso seco da biomassa (Nesmeyanova, 2000). O acúmulo de PoliPi em diferentes compartimentos celulares tem sido melhor estudado neste microrganismo, onde o conteúdo de PoliPi no citoplasma é grandemente

influenciado pela idade e pelas condições de cultivo (Kulaev & Kulakovskaya, 2000).

Para o incremento da acumulação de PoliPi por *Burkholderia cepacia* Mullan, *et al.* (2002) investigaram a influencia do pH neste processo e narraram o fenômeno de “estímulo ácido da absorção de fosfato”, os resultados de acúmulo de PoliPi neste microrganismo alcançaram valores de 3,3 μmol fosfato/mg de proteína celular, representando 13,6% do peso seco celular. O acúmulo de PoliPi por células *Propionibacterium shermanii* crescidos em lactato ou glicose mostrou o resultado máximo de 3% em relação ao peso seco da massa micelial (Clark *et al.*, 1986).

A levedura *Candida humicola* foi estudada para verificação da capacidade de acumulação de PoliPi utilizando-se um meio basal mineral foi alcançado um rendimento máximo de 0,105 mg de P_i /mg de proteína, representando 5,7% do peso seco da biomassa (McGrath & Quinn, 2000).

Os resultados obtidos neste trabalho revelaram um grande potencial de acúmulo de PoliPi nas amostras investigadas, principalmente pelas amostras de *C. elegans* (UCP 542) e *C. elegans* (UCP 57), que demonstraram valores similares ou melhores em relação aos dados descritos na literatura.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos órgãos de fomento brasileiros CAPES e CNPq e as universidades UNICAP e UFPE.

REFERÊNCIAS

Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W.; Blackwell, M. (1996). Introductory Mycology. John Wiley & Sons Publishers, New York, p.356-379.

- Andreeva, N.A., Kulakovskaya, T.V., Kulaev, I.S. (2000).** Inorganic polyphosphate and phosphohydrolases in *Halobacterium salinarum*. *Microbiology*(Moscow) **69**, 499-505.
- Ambrósio, S. T., Campos-Takaki G. M. (2004).** Decolorization of reactive azo dyes by *Cunninghamella elegans* UCP 542 under co-metabolic conditions. *Bioresource Technology* **91**, 69-75.
- Andrade, V.S.; Neto, B.B.; Souza, W.; Campos-Takaki. G.M. (2000).** A factorial design analysis of chitin production by *Cunninghamella elegans*. *Canadian Journal of Microbiology* **46**, 1042-1045.
- Balasubramanian, V., Guha, B., Swamidas, A.S.J., Seshadri, R. (2000).** Influence of shielded metal arc welded cruciform joint dimensions on toe crack failures of pressure vessel grade steels. *Engine Fail Anal* **7**, 169-179.
- Bayhan, G.M. (2004).** An alternative procedure for estimation problem in 2^n factorial experimental models. *Com. Ind Engineer* **47**, 1-15.
- Carlile, M.J, Watkinson, S.C., (1996).** *The Fungi*. Tokyo, Academic press.
- Campos Takaki, G.M. (2000).** Presence of inorganic polyphosphate in Mucoralean fungi. Annual Publisher of Research Center for Pathogenic Fungus and Microbial Toxicosis. Chiba University, Japan.
- Cerniglia, C.E., Gibson, D.T. (1977).** Metabolism of naphthalene by *Cunninghamella elegans*. *Applied and Environmental Microbiology* **34**, 363-370.
- Chen, K., Yao, Y.L. (2000).** Process optimization in pulsed laser micromachining with applications in medical device manufacturing. *Interna. J Advance in Manufactor Technology* **16**, 243-249.

- Cho, C.K., Yun, M.H., Yoon, C.S., Lee, M.W. (1999).** An ergonomic study on the optimal gear ratio for a multi-sped bicycle. *International Journal of Industrial Ergonomic* **23**, 95-100.
- Clark, J.E., Beegen, H., Wood, H.G. (1986).** Isolation of intact chains of polyphosphate from *Propionibacterium shermanii* grown on glucose or lactate. *Journal of Bacteriology* **168(3)**, 1212-1219.
- Dietrich, S.M.C. (1976).** Presence of polyphosphate of low molecular weight in Zygomycetes. *Journal of Bacteriology* **127**, 1408-1413.
- Fiske, C.H., Subbarow, Y. (1925).** The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biology and Chemistry*. **66**, 375-400.
- Franco, L.O., Maia, R.C.C., Porto, A.L.F., Messias, A.S., Fukushima, K., Campos Takaki, G.M. (2004a).** Heavy metal biosorption by chitin and chitosan from *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). *Brazilian Journal of Microbiology*, **35**, 243-247.
- Franco, L.O., Stamford, T.C.M., Stamford, N.P., Campos-Takaki, G.M. (2004b).** *Cunninghamella elegans* como fonte de quitina e quitosana. *Revista Analytica* **13**, 52-56.
- Gerlitz, T.G.M., Gerlitz, A. (1997).** Phosphate uptake and polyphosphate metabolism of mycorrhizal and nonmycorrhizal roots of pine and suillus ovinus at varying external pH measured by in vivo ^{31}P -NMR. *Mycorrhiza* **7**, 101-106.
- Harold, F.M. (1966).** Inorganic polyphosphate in biology: structure, metabolism, and function. *Bacteriological Review* **16**, 772-794.

- Hesseltine, C.W.; Anderson, R.F. (1957).** Microbiological Production of Carotenoides I. Zygospor and Carotene produced by intraspecific and crosses of Choanephoraceae in liquid media. *Mycology* **149**, 449-452.
- James, A.W., Casida, L.E. (1963).** Accumulation of phosphorus compounds by *Mucor racemosus*. *Journal of Bacteriology* **1**, 150-155.
- Kawai, S., Mori, S., Murata, K. (2003).** Primary structure of inorganic polyphosphate/ATP-NAD kinase from *Micrococcus flavus*, and occurrence of substrate inorganic polyphosphate. *Bioscience and Biotechnology Biochemistry* **67 (8)**, 1751-1760.
- Keasling, J.D., Van Dien, S.J., Trelstad, P., Renninger, N., McMahon, K. (2000).** Application of polyphosphate metabolism to environmental and biotechnological problems. *Biochemistry (Moscow)* **65**, 385-393.
- Kornberg, A.; Rao, N.N.; Ault-Riche, D. (1999).** Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annual Review of Biochemistry* **68**, 89-125.
- Kulaev, I.; Kulakovskaya, T. (2000).** Polyphosphate and Phosphate Pump. *Annual Review of Microbiology* **54**, 709-734.
- Kulaev, I.S. (2000).** Biochemistry and Biotechnology of Inorganic Polyphosphates. *Biochemistry (Moscow)* **65**, 269-270.
- Kulaev, I.S. (1979).** The biochemistry of inorganic polyphosphate, John Wiley & sons, N.Y. pp. 202-206.
- Kulaev, I.S., Vagabov, V.M., Kulakovskaya, T.V. (1999).** New aspects of inorganic polyphosphate metabolism and function. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **88**, 111-129.
- Kulaev, I.S., Vagabov, V.M. (1983).** Polyphosphate metabolism in micro-organisms. *Advances in Microbiology and Physiology* **24**, 83-171.

- Kulaev, I.S., Vagabov, V.M., Kulakovskaya, T.V., Lichko, L.P., Andreeva, N.A., Trilisenko, L.V. (2000).** The development of A.N. Belozersky's Ideas in polyphosphate biochemistry. *Biochemistry (Moscow)* **65**, 271-278.
- Lichko, L.P., Kulakovskaya, T.V., Kulaev, I.S. (2002).** Two exopolyphosphatases of *Microlunatus phosphovorus*, a polyphosphate-accumulating eubacterium from activated sludge. *Process. Biochemistry* **37**, 799-803.
- Liebermann, L. (1888).** Ueber das Nuclein der hefe und Künstliche darstellung eines Nucleins aus Eiweiss und metaphosphorsäure. *Ber Dtsch Chem Ges* **21**, 598-600.
- Lima, M.A.B., Nascimento, A.E., Souza, W., Fukushima, K., Campos-Takaki, G.M. (2003).** Effect of phosphorus on polyphosphate accumulation by *Cunninghamella elegans*. *Brazilian Journal of Microbiology* **34**, 363-372.
- McGrath, J. W., Quinn, J.P. (2000).** Intracellular accumulation of polyphosphate by the yeast *Candida humicola* G-1 in response to acid pH. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 4068-4073.
- Melasniemi, H., Hernesma, A. (2000).** Yeast spores seem to be involved in biological phosphate removal: a microscopic *in situ* case study. *Microbiology* **146**, 701-707.
- Mondal, D. P., Das, S., Prasad, B.K. (1998).** Study of erosive-corrosive wears characteristics of an aluminum alloy composite through factorial design of experiments. *Wear* **217**, 1-6.
- Mullan, J.P., Quinn, J.P., McGrath, J.W. (2002).** Enhanced phosphate uptake and polyphosphate accumulation in *Burkholderia cepacia* grown under low-pH conditions. *Microbial Ecology* **44**, 69-77.

- Nesmeyanova, M.A. (2000).** Polyphosphate and enzymes of polyphosphate metabolism in *Escherichia coli*. *Biochemistry (Moscow)* **3**, 309-314.
- Ogawa, N. DeRisi, J. Brown, P.O. (2000).** New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. *Molecular Biology* **11**, 309-4321.
- Pestov, N.A., Kulakovskaya, T.V., Kulaev, I.S. (2004).** Inorganic polyphosphate in mitochondria of *Saccaromyces cerevisiae* at phosphate limitation and phosphate excess. *FEMS Yeast Research* **4**, 643-348.
- Rast, D.M.; Horsh, M.; Furter, R. & Gooday, G.W. (1991).** A complex chitnolytic system in exponentially growing mycelium of *Mucor rouxii*. Properties and function. *Journal of General Microbiology* **137**, 2797-2810.
- Rot, K., Huskic, M., Makarovic, M., Mlakar, T., Ljubic, T., Zigon, M. (2001).** Interfacial effects in glass fiber composites as a function of unsaturated polyester resin composition. *Composites: Part A*. **32**, 511-516.
- Shari'a, A.E.N.; Nascimento, A.E.; Lima, M.A.B.; Takaki, G.M.C.; Souza, W. (2002).** Polyphosphate in Zygomycetes: a cytochemical study. *Brazilian Journal of Microbiology*. **33**, 119-126.
- Shiba, T. Tsutsumi, K., Ishige, K., Nogushi, T. 2000.** Inorganic polyphosphate and polyphosphate kinase: their novel biological functions and applications. *Biochemistry (Moscow)*. **65**, 15-323.
- Shiosaki, R. K., Okada, K., Gusmão, N.B., Nigam, P., Falcão, P.S., Silva, N.H., Fukushima, K., Miyaji, M., Campos-Takaki, G.M. (2001).** Biochemical markers in taxonomy of the genus *Cunninghamella*. *Revista iberoamericana de la Micologia* **18**, 123-127.

- Smirnov, A.V.; Kulakovskaya, I.S.; Kulaev, I.S. (2002).** Phosphate accumulation by an extremely halophilic archae *Halobacterium salinarium*. *Process in Biochemistry* **37**, 643-649.
- Smith, J. E.; Deans, S. G.; Anderson, J. G.; Davis, B. (1977).** The Nature of fungal sporulation. in: Biotechnology and Fungal Differentiation. *FEMS Symposium*. **40**, 17-41.
- Srinath, E.G., Sastry, C.A., Pillai, S.C. (1959).** Rapid removal of phosphorus from sewage by activated sludge. *Experientia* **15**, 339-340.
- Synowiecki, J.; Al-Khatteb, N.A.AQ. (1997).** Mycelia of *M. rouxii* as a source of chitin and chitosan. *Food Chem* **60** (4), 605-610.
- Thomas, G.H. (2001).** Cellular functions for inorganic polyphosphate. *TRENDS Microbiology* **9** (10), 468.
- Trezona, R.L., Pickles, M.J., Hutchings, I. M. (2000).** A full factorial investigation of the erosion durability of automotive clearcoats. *Tribology* **36**, 279-300.
- Van Dien, S.J. Keyhani, S., Yang, C. Keasling, J.D. (1997).** Manipulation of independent synthesis and degradation of polyphosphate in *Escherichia coli* for investigation of phosphate secretion from the cell. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 1689-1695.
- Verwater-Lukszo, Z. (1998).** A practical approach to recipe improvement and optimization in the batch processing industry. *Computer Industrial* **36**, 279-300.
- White, S.A.; Farina, P.R.; Fulton, I. (1979).** Production and isolation of chitosan from *Mucor rouxii*. *Applied and Environmental Microbiology* **38**, 323-328.

Zhang, D.; Freeman, J. P.; Sutherland, J. B.; Walker, A E.; Yang, Y.; Cerniglia, C. E. (1996). Biotransformation of chlorpromazine and methdilazine by *Cunninghamella elegans*. *Applied and Environm Microbiology* **62**, 798-803.

SEGUNDO ARTIGO

**Acumulação e caracterização bioquímica de polifosfato
inorgânico durante o crescimento de *Cunninghamella elegans*
UCP 542**

Manuscrito a ser submetido para publicação no periódico
Bioresource Technology - Elsevier Science

**Acumulação e caracterização bioquímica de polifosfato
inorgânico durante o crescimento de *Cunninghamella elegans*
UCP 542**

Luciana de Oliveira Franco & Galba Maria de Campos Takaki

¹ Doutorado em Biologia de Fungos - Universidade Federal de Pernambuco

² Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais - Departamento de Química,
Universidade Católica de Pernambuco.

RESUMO

O polifosfato inorgânico (PoliPi) é um polímero linear formado por unidades repetitivas de ortofosfato unidos através de ligações fosfoanidrílicas. O grau de polimerização do PoliPi é determinado pela quantidade de resíduos de fosfato presentes na cadeia, podendo ser de baixo, médio e alto peso molecular. *Cunninghamella elegans* é uma espécie representante dos Zygomycetes, um importante grupo de fungos, que apresenta amplo campo de aplicação na microbiologia. Neste trabalho foi investigado o potencial de acumulação e os tipos de frações de PoliPi produzidas por *C. elegans* UCP 542, durante o crescimento. Os resultados obtidos demonstraram um acúmulo crescente de PoliPi até a fase estacionária de crescimento, sendo o maior rendimento de 5.9 µg de Pi/mg de biomassa, com 120 horas de cultivo. Observou-se que, o conteúdo e o tipo das frações dependem da fase de crescimento. Um acúmulo mais significativo da fração de médio peso molecular ocorreu a partir do início da fase exponencial, se prolongando até o final da fase estacionária. A presença dos três tipos de frações em todas as fases de crescimento, nos intervalos de tempo analisados, sugeriram um grande potencial de acumulação do polímero, e ao mesmo tempo, observou-se, reposição da fração de médio peso molecular pela degradação da fração de alto peso molecular.

Palavras-chave: polifosfato inorgânico, *Cunninghamella elegans*, Zygomycetes, bioacumulação.

INTRODUÇÃO

Muitos microrganismos estocam fosfato sob a forma de cadeias lineares que podem apresentar de três a centenas de resíduos de fosfatos unidos através de ligações fosfoanidrílicas, denominados de polifosfato inorgânico - PoliPi (Van Dien *et al.*, 1997). Este polímero está presente em bactérias, fungos, plantas e animais (Kornberg, 2000).

A ubiquidade do PoliPi sugere uma grande importância nos processos metabólicos e ao longo do tempo várias funções tem sido atribuídas a esta molécula, destacando-se: reserva de fosfato e fonte de energia. Estudos têm sido realizados no sentido de esclarecer o envolvimento de PoliPi na sobrevivência de microrganismos por longos períodos de privação de nutrientes (Thomas, 2001).

Atualmente a identificação de novos microrganismos que apresentem a habilidade de acumular efetivamente o PoliPi é de grande importância, pois a presença deste polímero nas células pode ser considerado potencial de aplicações em várias áreas da biotecnologia (Sminorv *et al.*, 2002).

Cunninghamella elegans Lendner, apresenta ampla distribuição na natureza, apresentando amplo potencial de aplicação em diferentes áreas da biologia celular, genética, fisiologia, farmacologia e bioquímica (Carlile & Watkinson, 1996; Alexopoulos *et al.*, 1996).

Estudos realizados têm demonstrado a habilidade desta espécie na biorremediação de substâncias recalcitrantes como metais pesados (Franco *et al.*, 2004a); hidrocarbonetos aromáticos policíclicos - HAPs (Shiosaki *et al.*, 2001) e azocorantes utilizados na indústria têxtil (Ambrósio & Campos Takaki,

2004). Adicionalmente, *C. elegans* tem demonstrado habilidade na acumulação de polifosfato inorgânico (Campos-Takaki, 2000; Lima *et al.*, 2003).

Neste trabalho foram analisados o acúmulo de PoliPi, bem como a caracterização de suas frações, durante o crescimento de *C. elegans* UCP 542.

MÉTODOS

Microrganismos – uma amostra de *Cunninghamella elegans* obtida da coleção de culturas da Universidade Católica de Pernambuco (UCP), catalogada como UCP 542. A manutenção foi realizada em meio de cultivo Batata Dextrose Ágar (BDA) sob refrigeração (5°C).

Métodos Microbiológicos

Condições de Cultivo – após sete dias de crescimento em meio BDA, os esporângios foram coletados utilizando-se água destilada e contados em hematocítômetro para padronização de inóculo (10^8 esporângios/mL). Para o cultivo em batelada utilizou-se meio sintético para Mucorales (SMM), constituído por 40 g L^{-1} glicose, 2 g L^{-1} asparagina, 0.005 mg L^{-1} tiamina, 0.50 g L^{-1} fosfato de potássio e $0,25 \text{ g L}^{-1}$ de sulfato de magnésio (Hesseltine & Anderson, 1957). Cerca de 1 mL do pré-inóculo foi transferido para frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL do meio sintético, em seguida foram incubados durante 168 horas sob agitação orbital de 5000 g. Em intervalos de 12 horas foram coletadas alíquotas para acompanhamento do crescimento e extração sequencial de PoliPi. A massa micelial foi coletada através de filtração em membrana de nylon (120F), lavada duas vezes com água destilada, e posteriormete, congelada e submetida a liofilização para determinação do peso

seco. O líquido metabólico foi armazenado a 5 °C para determinações analíticas.

Procedimentos Analíticos

Determinação do consumo de glicose, nitrogênio e fosfato - o consumo de glicose foi determinado pelo método enzimático colorimétrico glicose-oxidase Labtest[®] kit, utilizando-se uma solução de glicose (100 mg/dl) como padrão. Para determinação do consumo de proteínas foi utilizado kit Labtest[®] utilizando-se albumina de soro bovino como padrão (0,50 mg/dl). O consumo de fosfato do meio de cultivo foi avaliado utilizando-se o método colorimétrico descrito por Fiske & Subbarow (1925). A curva padrão foi elaborada a partir de uma solução de fosfato de potássio (0,50 g/L). O pH foi acompanhado através de potenciometria.

Extração seqüencial de polifosfato inorgânico – a extração de PoliPi foi realizada de acordo com o método descrito por Sminorv *et al.* (2002), modificado pelo aumento do tempo de exposição da biomassa ao ácido perclórico de 30 minutos para 24 horas. Uma quantidade padronizada de biomassa (0,5 g) foi tratada pela adição de água destilada deionizada a 0°C durante 10 minutos em homogeneizador e submetida à sonicação durante 3 minutos contínuos (16 KHz). O homogenado foi centrifugado a 5000g durante 10 minutos sob refrigeração e o líquido sobrenadante obtido foi utilizado para a determinação de polifosfato inorgânico. O resíduo foi ressuspenso em uma solução de HClO₄ 0.5N à temperatura de 0°C, por 24 horas. Em seguida submetido a centrifugação nas mesmas condições anteriores, o sobrenadante

obtido corresponde a fração ácido solúvel que corresponde aos PoliPi de baixo peso molecular. O novo resíduo foi então ressuspenso em solução de NaOH 0.05 N pH 12 sob temperatura controlada de 0 °C por 1 h, obtendo-se assim a fração alcali-solúvel por centrifugação, a qual corresponde ao PoliPi de médio peso molecular. Em seguida o resíduo remanescente foi tratado com uma solução de HClO₄ 0.5 N por 30 minutos a 90 °C, e centrifugado nas mesmas condições anteriores e no sobrenadante foi estimada a quantidade de fosfato para determinação da fração ácido insolúvel, a qual é composta pelo PoliPi de alto peso molecular. A quantificação do conteúdo de fosfato nas frações obtidas foi avaliado sob a forma de ortofosfato, após hidrólise ácida de acordo com o método descrito por Fiske & Subbarow (1925). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Análise estatística: todos os resultados foram analisados utilizando-se o programa STATISTICA, versão 5.5, da Statsoft, USA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 apresenta o perfil de crescimento de *Cunninghamella elegans* (UCP 542), de acordo com os parâmetros utilizados para o acompanhamento do crescimento: produção de biomassa, pH, determinação do consumo de glicose, proteínas totais e fosfato durante as 168 horas de cultivo.

Os resultados obtidos evidenciaram que ocorreu uma maior produção de biomassa com 156 horas de crescimento, onde se observou o máximo rendimento (16,4 g/L). Segundo White *et al.* (1979), a produção de massa micelial por *Mucor rouxii* demonstrou rendimentos em torno de 9,0 a 14,0 g/L

inferiores aos resultados aqui encontrados. Rast *et al.* (1991) utilizando amostra de *Mucor rouxii*, obtiveram uma produção de 7,0 g/L; Synowieck & Al-Khateeb (1997) utilizando o mesmo microrganismo, relataram rendimentos de biomassa em torno de 4,0 g/L após 48 horas de crescimento, apresentando resultados muito inferiores aos descritos neste trabalho.

Recentemente, trabalhos desenvolvidos por Andrade *et al.* (2000), Lima *et al.* (2003) e Franco *et al.* (2004b), relataram um perfil de crescimento para *C. elegans* com resultados de rendimento de massa micelial variando em torno de 10,0 a 14,0 g/L, após 96 horas de cultivo, próximos aos resultados obtidos nesta pesquisa.

O comportamento das curvas em relação ao consumo das fontes de glicose, nitrogênio e fosfato por *C. elegans* (UCP 542) durante o crescimento evidenciaram um decréscimo sucessivo em suas concentrações no decorrer das 168 horas de incubação, caracterizando a utilização dos substratos pelo microrganismo. Ao final do cultivo observou-se a presença de glicose remanescente em média de 6,0 g/L, o que de acordo com Andrade *et al.* (2000) significa um excesso de fonte de carbono. Observou-se um decréscimo na concentração de nitrogênio até 72 horas de crescimento e nos intervalos subseqüentes, observou-se um aumento da concentração do nitrogênio, que provavelmente ocorreu pela liberação de metabólitos secundários de natureza protéica no meio de cultivo. A concentração de fosfato no meio de cultivo foi gradualmente diminuída se tornando nula a partir das 132 horas de crescimento, até o final. O perfil de crescimento obtido demonstrou comportamento similar aos descritos recentemente por outros autores que estudaram o crescimento de amostras de *C. elegans* (Shiosaki *et al.*, 2001;

Andrade *et al.*, 2003; Lima *et al.*, 2003; Franco *et al.*, 2004a). O comportamento do pH no decorrer do período de cultivo demonstrou discreta oscilação apresentando valores constantes na faixa de 4,0 a 5,0, concordando com os resultados obtidos por White *et al.*, (1979), cujos valores de pH oscilaram entre 4,5 e 4,0, após 80 horas de crescimento da amostra de *Mucor rouxii* no meio YPD (1,0% de extrato de levedura; 0,3% de peptona e 0,4% de dextrose).

De modo semelhante aos resultados obtidos nesta pesquisa, Synowieck & Al-Khateeb (1997), quando avaliaram o comportamento de pH durante o cultivo de *Mucor rouxii*, obtiveram valores entre 4,1 e 4,5, após 96 horas de cultivo.

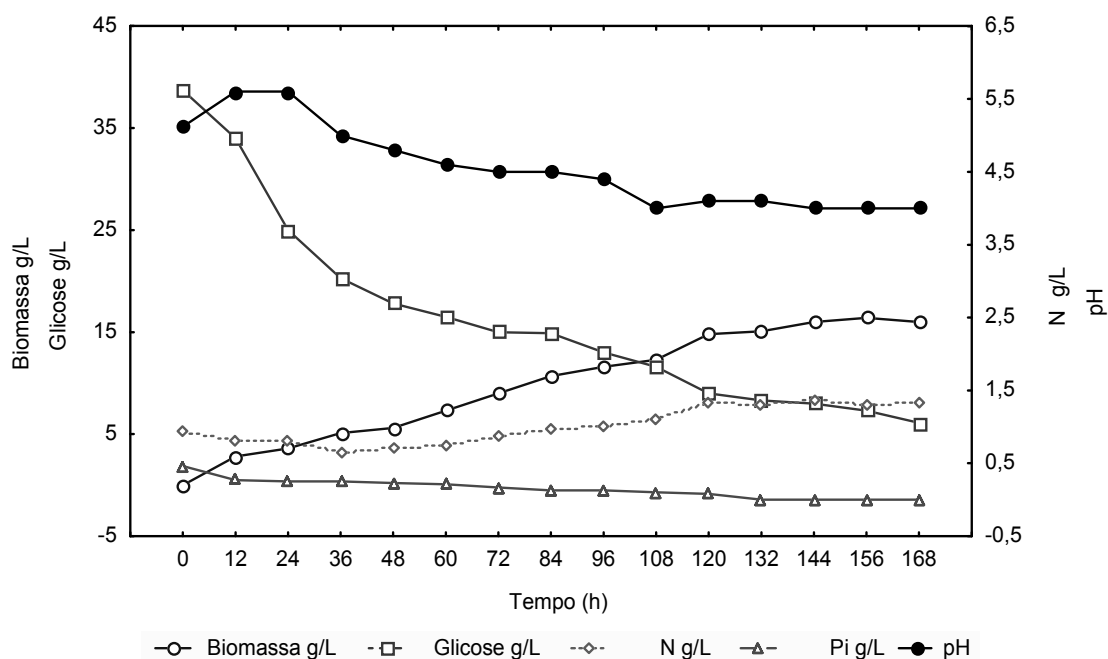


Figura 1. Perfil de crescimento de *C. elegans* UCP 542 durante 168 horas de cultivo em meio sintético para Mucorales.

O acúmulo de polifosfato inorgânico por *C. elegans* (UCP 542) foi avaliado em intervalos de 12 horas durante o período de 168 horas de cultivo. A quantidade de PoliPi aumentou em paralelo com a produção de biomassa e a

presença de PoliPi foi detectada em todas as fases de crescimento. Houve um maior acúmulo até as 156 horas de cultivo, onde se observou rendimento máximo de 5,9 μg de Pi/mg de biomassa, após este período observou-se uma discreta diminuição na concentração de PoliPi obtendo-se rendimento de 5,7 μg de Pi/mg de biomassa no início da fase estacionária de crescimento. A capacidade de acumular PoliPi tem sido estudada por uma grande quantidade de pesquisadores ao longo do tempo, principalmente em procariotos. Cruden *et al.*, (1983), investigaram a capacidade de acumular PoliPi por amostras de *Clostridium* e obtiveram como melhor rendimento um concentração de 0,35% de Pi em relação ao peso seco de biomassa. O *Paracoccus denitrificans* uma bactéria que tem sido muito utilizada como componente de lodos ativados para tratamentos de resíduos industriais exibe capacidade de acumular PoliPi com rendimento máximo de 0,4 mg/g de biomassa (Barak *et al.*, 2000). *Pseudomonas aeruginosa*, uma importante enterobactéria potencialmente patogênica, apresenta níveis de PoliPi em torno de 7% em relação à biomassa (Rashid *et al.*, 2000). Em *Corynebacterium glutamicum* uma bactéria Gram-positiva, atualmente utilizada para produção em larga escala de aminoácidos de interesse na biotecnologia, o nível máximo de acúmulo foi de 4,6 % da biomassa (Ishige *et al.*, 2003). O efeito do pH do meio de cultivo sobre o acúmulo de PoliPi pela bactéria *Burkholderia cepacia* demonstrou um incremento na produção deste polímero (Mullan *et al.*, 2002)

Em organismos eucariotos os relatos acerca da presença de PoliPi, e sobre o metabolismo de produção desta molécula são escassos, embora existam relatos muito antigos da presença deste polímero nestes seres (Nesmeyanova, 2000). Em 1966, Harold em uma revisão relatou a capacidade

de acumulação de PoliPi pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, onde a concentração desta molécula alcançava 20% do peso seco da biomassa. A localização de PoliPi em fungos filamentosos representantes da Ordem Mucorales *Absidia cylindrospora*, *Gongronella butleri* e *Mucor javanicus* foi investigada por Shari'a et al. (2002) que relataram a presença do PoliPi em todas as amostras investigadas. Campos-Takaki (2000) investigou a presença de polifosfato inorgânico em amostras de Mucorales relatando um significativo potencial de acúmulo. O conteúdo de PoliPi em células de *Candida humicola* foi avaliado durante crescimento em pH ácido, atingindo 0,105 mg de Pi/mg de proteína total (McGrath & Quinn, 2000). Existem relatos de que o conteúdo de fósforo no meio de cultivo influencia diretamente o processo de acumulação de PoliPi em células vivas (Kulaev et al., 2000; Lima et al., 2003). Adicionalmente, Pestov et al. (2004) relataram o acúmulo de PoliPi por *S. cerevisiae* em condições de excesso e limitação de fosfato no meio de cultivo.

O grau de polimerização do polifosfato inorgânico é determinado pela quantidade de resíduos de fosfato presentes na cadeia, e de acordo com este parâmetro os polifosfatos podem ser classificados como polifosfato inorgânico de alto, médio e baixo peso molecular, ou ainda, polifosfatos de cadeia curta, média ou longa (Jing-fu & Gui-bin, 2000; Ohtomo et al., 2004).

A extração seqüencial de PoliPi permite a qualificação deste polímero em frações, que podem ser classificadas como polifosfatos de baixo peso molecular, que apresentam até vinte e cinco unidades de fosfato, presentes na fração ácido solúvel. Na fração álcali-solúvel estão presentes os polifosfatos de médio peso molecular que possuem entre 25 e 75 unidades de fosfato na cadeia, e finalmente, os polifosfatos de alto peso molecular que apresentam

mais de 75 resíduos de fosfato na cadeia, estão presentes na fração ácido insolúvel (Kulaev, 1979; Andreeva *et al.*, 2000).

Os resultados obtidos durante a extração fracionada de PoliPi estão demonstrados na Figura 2, onde pode-se observar que no início do crescimento a produção das frações ácido e álcali-solúvel foi similar apresentando um pico máximo às 24 horas de cultivo, correspondendo a 0,068 e 0,058 μg de Pi/mg de biomassa, respectivamente. Após este período a concentração da fração ácido-solúvel decaiu nas 36 horas e voltou a crescer mantendo-se estável até o final do crescimento. O acúmulo da fração álcali-solúvel se manteve constante até o final do crescimento, atingindo o rendimento máximo de 0,35 μg de Pi/mg de biomassa; o ponto máximo de acumulação da fração ácido-insolúvel ocorreu nas 108 horas de crescimento, sendo de 0,18 μg de Pi/mg de biomassa, após este intervalo foi observado um decréscimo contínuo que se manteve até o final do crescimento.

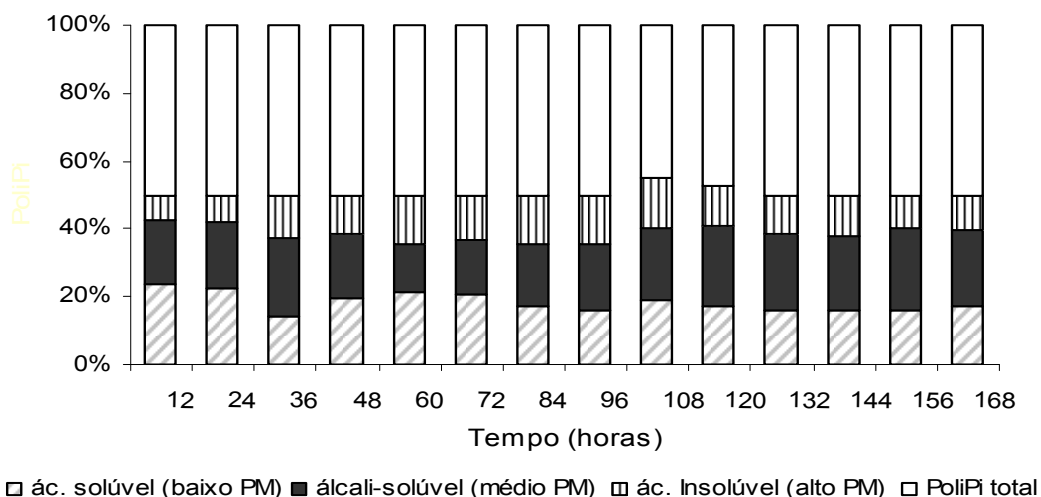


Figura 2. Acúmulo de PoliPi total e frações obtidas durante o crescimento de *C. elegans*.

O conteúdo e os tipos de frações de PoliPi em células vivas está diretamente relacionado às condições de crescimento (Lima *et al.*, 2003).

Durante o crescimento de *Aspergillus niger*, primeiro ocorre a acumulação de PoliPi ácido-insolúvel, e em seguida, na fase estacionária é observada a presença da fração álcali-solúvel que segundo o autor ocorreria pela degradação da primeira fração (Kulaev & Belozersky, 1957). Na bactéria Gram-positiva *Escherichia coli*, o acúmulo de PoliPi ocorre similarmente aos resultados obtidos aqui, a fração ácido-solúvel, contendo PoliPi de baixo peso molecular é formada no início do crescimento (Kornberg *et al.*, 1999).

Segundo Sminorv *et al.* (2002) a produção de PoliPi por *Halobacterium salinarium*, uma Archea extremamente halofílica, ocorre apresentando consideráveis variações dos tipos de frações quando a concentração de fosfato no meio de crescimento era modificada, e ainda que os tipos de frações, dependiam do estágio de crescimento, concordando com os resultados descritos neste trabalho para *C. elegans*.

A partir dos dados obtidos nesta investigação sugere-se que a *C. elegans* (UCP 542) acumula quantidades significativas de PoliPi durante todo o crescimento, demonstrando rendimentos similares ou melhores quando comparados aos resultados apresentados por outros microrganismos investigados.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos aos órgãos de fomento à pesquisa CAPES e CNPq, e, a UNICAP e UFPE.

REFERÊNCIAS

Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W.; Blackwell, M., 1996. Introductory Mycology. John Wiley & Sons Publishers, New York, p.356-379.

- Ambrósio, S. T., Campos-Takaki G. M. (2004). Decolorization of reactive azo dyes by *Cunninghamella elegans* UCP 542 under co-metabolic conditions. *Bioresource Technology* 91, 69-75.
- Andreeva, N.A., Kulakovskaya, T.V., Kulaev, I.S., 2000. Inorganic polyphosphate and phosphohydrolases in *Halobacterium salinarum*. *Microbiology (Moscow)* 69, 499-505.
- Andrade, V.S., Neto, B.B.; Fukushima, K., Campos-Takaki. G.M., 2003. Effect of medium components and time of cultivation on chitin production by *Mucor circinelloides* (*Mucor javanicus* IFO 4570) - A factorial study. *Revista Iberoamericana de la Micologia*. 20, 149-153.
- Andrade, V.S.; Neto, B.B.; Souza, W.; Campos-Takaki. G.M., 2000. A factorial design analysis of chitin production by *Cunninghamella elegans*. *Canadian Journal of Microbiology* 46, 1042-1045.
- Barak, Y., Rijn, J., 2000. Atypical polyphosphate accumulation by the denitrifying bacterium *Paracoccus denitrificans*. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (3), 1209-1212.
- Campos Takaki, G.M., 2000. Presence of inorganic polyphosphate in Mucorales fungi. Annual Publisher of Research Center for Pathogenic Fungus and Microbial Toxicosis. Chiba University, Japan.
- Crocetti, G.R., Hugenholtz, P., Bond, P.L., Schuler, A., Keller, J., Jenkins, D., Blackal, L.L., 2000. Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantitation. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (3), 1175-1182
- Cruden, L.D., Durbin, W.E., Markovetz, J.A., 1983. Utilization of PPi as an energy source by *Clostridium* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 46(6), 1403-1408.

- Fiske, C.H., Subbarow, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *Journal Biology and Chemistry* . 66, 375-400.
- Franco, L.O., Maia, R.C.C., Porto, A.L.F., Messias, A.S., Fukushima, K., Campos Takaki, G.M., 2004a. Heavy metal biosorption by chitin and chitosan from *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, 243-247.
- Franco, L.O., Stamford, T.C.M., Stamford, N.P., Campos-Takaki, G.M., 2004b. *Cunninghamella elegans* como fonte de quitina e quitosana. *Revista Analytica* 13, 52-56.
- Harold, F.M., 1966. Inorganic polyphosphate in biology: structure, metabolism, and function. *Bacteriological Review* 16, 772-794.
- Hesseltine, C.W.; Anderson, R.F., 1957. Microbiological Production of Carotenoides I. Zygospor and Carotene produced by intraspecific and crosses of Choanephoraceae in liquid media. *Mycology* 149, 449-452.
- Ishig, T., Krause, M., Bott, M., Wendisch, V.F., Sahm, H., 2003. The phosphate starvation stimulon of *Corynebacterium glutamicum* determined by DNA microarray analyses. *Journal of Bacteriology* 185(15), 4519-4529.
- Jing-fu, L., Gui-bin, J., 2000. Selective determination of orthophosphates and total inorganic phosphates in detergents by flow injection photometric method. *Talanta* 52, 211-216.
- Kornberg, A., 2000. Tribute to professor Igor S. Kulaev. *Biochemistry (Moscow)* 65 (3), 334p.
- Kornberg, A., Rao, N.N., Ault-Riche, D., 1999. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annual Review of Biochemistry* 68, 89-125.

- Kulaev, I.S., 2000. Biochemistry and Biotechnology of Inorganic Polyphosphates. *Biochemistry (Moscow)* 65,269-270.
- Kulaev, I.S., 1979. The Biochemistry of Inorganic Polyphosphates. Wiley, New York, 255p.
- Kulaev, I.S., Belozersky, A.N. 1957. A investigation using ^{32}P of the physiological role of polyphosphate in the development of *Aspergillus niger*. *Biochimya* 22, 587-596.
- Kulaev, I.S., Vagabov, V.M., Kulakovskaya, T.V., 1999. New aspects of inorganic polyphosphate metabolism and function. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 88, 111-129.
- Lima, M.A.B., Nascimento, A.E., Souza, W., Fukushima, K., Campos-Takaki, G.M., 2003. Effect of phosphorus on polyphosphate accumulation by *Cunninghamella elegans*. *Brazilian Journal of Microbiology* 34, 363-372.
- McGrath, J. W., Quinn, J.P., 2000. Intracellular accumulation of polyphosphate by the yeast *Candida humicola* G-1 in response to acid pH. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4068-4073.
- Mullan, J.P., Quinn, J.P., McGrath, J.W., 2002. Enhanced phosphate uptake and polyphosphate accumulation in *Burkholderia cepacia* grown under low-pH conditions. *Microbial Ecology* 44, 69-77.
- Nesmeyanova, M.A., 2000. Polyphosphate and enzymes of polyphosphate metabolism in *Escherichia coli*. *Biochemistry (Moscow)* 3, 309-314.
- Ohtomo, R., Sekiguchi, Y., Mimura, T., Saito, M., Ezawa, T., 2004. Quantification of polyphosphate: different sensitivities to short-chain polyphosphate using enzymatic and colorimetric methods as revealed by ion chromatography. *Analytical Biochemistry* 328, 139-146.

- Pestov, N.A., Kulakovskaya, T.V., Kulaev, I.S., 2004. Inorganic polyphosphate in mitochondria of *Saccaromyces cerevisiae* at phosphate limitation and phosphate excess. *FEMS Yeast Research* 4, 643-348.
- Rashid, M.H., Rumbaugh, K., Passador, L., Davies, G.D., Hamood, A.N., Iglewski, B.H., Kornberg, A., 2000. Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 97 (17). 9636-9641.
- Rast, D.M.; Horsh, M.; Furter, R. & Gooday, G.W., 1991. A complex chitnolytic system in exponentially growing mycelium of *Mucor rouxii*. Properties and function. *Journal of General Microbiology* 137, 2797-2810.
- Shari'a, A.E.N.; Nascimento, A.E.; Lima, M.A.B.; Takaki, G.M.C.; Souza, W., 2002. Polyphosphate in Zygomycetes: a cytochemical study. *Brazilian Journal of Microbiology*., 33, 119-126.
- Shiosaki, R. K., Okada, K., Gusmão, N.B., Nigam, P., Falcão, P.S., Silva, N.H., Fukushima, K., Miyaji, M., Campos-Takaki, G.M., 2001. Biochemical markers in taxonomy of the genus *Cunninghamella*. *Revista Iberoamericana de la Micology* 18, 123-127.
- Smirnov, A.V.; Kulakovskaya, I.S.; Kulaev, I.S., 2002. Phosphate accumulation by an extremely halophilic archae *Halobacterium salinarium*. *Process in Biochemistry* 37, 643-649.
- Srinath, E.G., Sastry, C.A., Pillai, S.C., 1959. Rapid removal of phosphorus from sewage by activated sludge. *Experientia* 15, 339-340.
- Synowiecki, J.; Al-Khatteb, N.A.AQ., 1997. Mycelia of *M. rouxii* as a source of chitin and chitosan. *Food Chemistry* 60 (4), 605-610.
- Thomas, G.H., 2001. Cellular functions for inorganic polyphosphate. *TRENDS in Microbiology* 9 (10), 468.

Van Dien, S.J. Keyhani, S., Yang, C. Keasling, J.D. (1997). Manipulation of independent synthesis and degradation of polyphosphate in *Escherichia coli* for investigation of phosphate secretion from the cell. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 1689-1695.

White, S.A.; Farina, P.R.; Fulton, I., 1979. Production and isolation of chitosan from *Mucor rouxii*. *Applied and Environmental Microbiology* 38, 323-328.

TERCEIRO ARTIGO

Atividade das Fosfatases Ácida e Alcalina em Amostras de *Cunninghamella elegans* Utilizando um Modelo Fatorial

Manuscrito a ser submetido para publicação no periódico

Word Journal of Microbiology and Biotechnology - Kluwer Journals

Atividade das Fosfatases Ácida e Alcalina em Amostras de *Cunninghamella elegans* Utilizando um Modelo Fatorial

¹Luciana de Oliveira Franco; ²Clarissa Daisy C. Albuquerque & ³Galba
Maria de Campos-Takaki

¹ Doutorado em Biologia de Fungos - Universidade Federal de Pernambuco.

² Departamento de estatística e Informática - Universidade Católica de Pernambuco.

³ Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais - Departamento de Química,
Universidade Católica de Pernambuco

RESUMO

O metabolismo de fosfato é um fator de grande importância para o desenvolvimento celular de qualquer organismo vivo. A principal forma de disponibilização de fosfato ocorre a partir da hidrólise de compostos fosfatados, pela atuação de enzimas denominadas fosfatases. O polifosfato inorgânico é um polímero constituído por unidades repetitivas de ortofosfatos. Neste trabalho foi investigada a atividade enzimática das fosfatases ácida e alcalina em dez amostras de *C. elegans*, um fungo filamentoso pertencente à classe Zygomycetes. Os ensaios foram realizados de acordo com um modelo fatorial de dois níveis (2^2) sem ponto central, tendo como variáveis independentes a concentração de glicose no meio de crescimento e a temperatura de cultivo, e como variável resposta, a atividade enzimática. Os resultados obtidos demonstraram a atividade das duas enzimas em todas as amostras testadas. O maior valor de atividade tanto para a fosfatase ácida como para a alcalina foi demonstrado pela *C. elegans* (UCP 542) sendo de 0,59 U.l/g de biomassa e 0,34 U.l/g de biomassa, respectivamente. A atividade das fosfatases não influenciou o processo de acumulação de PoliPi nas amostras testadas. Os resultados obtidos demonstram maior rendimento quando todas as variáveis independentes estavam reguladas no nível máximo (+1) e o efeito da variável independente temperatura de crescimento foi mais significativo para a variável resposta atividade enzimática.

Palavras-chave: fosfatase ácida, fosfatase alcalina, polifosfato inorgânico, *Cunninghamella elegans*, modelo fatorial.

INTRODUÇÃO

O fosfato (Pi) é um nutriente essencial para todos os tipos de organismos, estando presente na biossíntese dos mais importantes componentes celulares, incluindo ácidos nucleicos e proteínas (Nesmeyanova, 2000). A disponibilização de fosfato ocorre através da hidrólise de compostos fosfatados pela atuação de enzimas denominadas fosfatases (Berton *et al.*, 1997). Populações de microrganismos produtores de fosfatase ácida e alcalina têm sido pouco estudadas, principalmente em fungos (Tarafdar, 1995).

O Polifosfato inorgânico (PoliPi) é um homopolímero linear formado por unidades repetidas de ortofosfato unidas através de ligações fosfoanidrídicas, que termodinamicamente são consideradas de alta energia (Harold 1966; Kulaev *et al.*, 2000). A ocorrência do polifosfato em um grande número de organismos, desde bactérias a células de mamíferos, sugere uma grande importância biológica (Kornberg *et al.*, 1999).

O metabolismo do polifosfato inorgânico é mantido por diferentes grupos de enzimas, responsáveis pelo equilíbrio dinâmico entre síntese e degradação. Ao longo do tempo, várias funções de sido atribuídas ao PoliPi, dentre estas podem ser citadas: reserva de fosfato e energia; estoque e quelação de metais; formação de canais de membrana; participação no transporte de fosfato; envolvimento na função e formação do envelope celular; controle da atividade gênica, regulação da atividade enzimática e uma função vital em respostas celulares ao “stress” ambiental e na adaptação a fase estacionária de crescimento (Kumble & Kornberg, 1995; Kulaev & Kulakovskaya, 2000). No entanto, apesar desta grande importância, escassos estudos foram realizados e a via fisiológica de produção desta molécula relacionando com a produção de

fosfatases, não é ainda totalmente esclarecida, principalmente em seres eucariotos (Thomas, 2001).

Cunninghamella elegans é a principal representante dos Zygomycetes importante devido a sua participação em processos de biodeterioração, biodegradação, biorremediação possuindo amplo potencial de aplicação em várias áreas da biotecnologia (Carlile & Watkinson, 1996).

Nesta pesquisa foram investigados os efeitos da variação da concentração de glicose no meio de crescimento e da temperatura de cultivo sobre a atividade enzimática das fosfatases ácida e alcalina em dez amostras de *C. elegans*, através de um modelo fatorial de dois níveis (2^2), estabelecendo uma correlação entre a atividade destas enzimas e o acúmulo de polifosfato inorgânico por estas amostras.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismos – dez amostras de *Cunninghamella elegans* foram obtidas da coleção de culturas da Universidade Católica de Pernambuco - UCP : *C. elegans* UCP 54, *C. elegans* UCP 48, *C. elegans* UCP 61, *C. elegans* UCP 542, *C. elegans* UCP 47, *C. elegans* UCP 57, *C. elegans* UCP 53, *C. elegans* UCP 56, *C. elegans* UCP 62 e *C. elegans* UCP 72, sendo mantidas em meio de cultivo Batata Dextrose Ágar (BDA) e estocadas à temperatura de 5°C.

Métodos Microbiológicos

Condições de Cultivo – esporangíolos produzidos por *C. elegans* após sete dias de crescimento em BDA, foram coletados com cotonetes estéreis e suspensos em água destilada, contados em hematócrito com

padronização de inóculo em 10^8 esporangíolos/mL. As culturas foram crescidas em meio sintético para Mucorales (SMM), constituído por $40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ glicose, $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ asparagina, $0.005 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ tiamina, $0.50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ fosfato de potássio e $0,25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sulfato de magnésio (Hesseltine & Anderson, 1957).

Um mL do inóculo foi transferido para frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio, incubados durante sete dias (168 horas) sobre agitação orbital de 5000 g. Ao final do crescimento a massa micelial foi coletada por filtração em membrana de nylon (120F), lavada duas vezes com água destilada e posteriormete submetida a liofilização e determinação da biomassa por gravimetria.

Procedimentos Analíticos

Determinação do consumo de glicose, nitrogênio e fosfato - alíquotas do líquido metabólico foram coletadas ao final do crescimento e utilizadas para a realização dos procedimentos analíticos. O consumo de glicose foi determinado através do método enzimático colorimétrico glicose-oxidase Labtest[®] kit, utilizando-se uma curva padrão com uma solução de glicose (100 g/mL). Para determinação do consumo de proteínas foi utilizado kit Labtest[®] utilizando-se albumina de soro bovino (100 mg/dl) como padrão. O consumo de fosfato no meio de cultivo foi avaliado utilizando-se o método colorimétrico descrito por Fiske & Subbarow (1925), e a curva padrão foi elaborada a partir de uma solução de fosfato de potássio ($0,1$ a $0,5 \text{ g/L}$). O pH foi determinado através de potenciometria.

Extração de fosfatases ácida e alcalina: quantidades padronizadas de massa micelial (0,5 mg) foram homogeneizadas em 5 mL de tampão acetato de sódio e sonicadas por três minutos intermitentes (16 KHz) em temperatura controlada de 0 °C (Berton *et al.*, 1997). O extrato obtido foi centrifugado a 5000g.

Atividade enzimática: o líquido sobrenadante obtido após a centrifugação foi utilizado para análise das atividades enzimáticas através de Kit Lab- test® para fosfatase ácida e alcalina. Os ensaios foram realizados com duas repetições autênticas para acompanhamento do erro experimental.

Extração e determinação de polifosfato inorgânico – a extração de PoliPi foi realizada de acordo com o método descrito por Sminorv *et al.* (2002), modificado pelo aumento do tempo de exposição da biomassa ao ácido perclórico de trinta minutos para vinte e quatro horas.

Desenho fatorial - foi utilizado um planejamento fatorial de dois níveis sem ponto central, com ensaios realizados em duplicata. Os valores codificados e reais envolvidos neste modelo estão demonstrados na tabela 1. A concentração de glicose no meio de cultura e a temperatura de cultivo foram utilizadas como variáveis independentes tendo como variável resposta a atividade enzimática das fosfatases ácida e alcalina.

Tabela 1. Matriz do modelo fatorial.

Variáveis independentes	Níveis	
	+1	-1
Glicose (g·L ⁻¹)	40	4
Temperatura (°C)	28	22

Análise estatística: todos os resultados foram analisados utilizando-se o programa STATISTICA, versão 5.5, da Statsoft, USA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O potencial de utilização de modelos fatoriais tanto na realização de pesquisas como em trabalhos aplicados tem sido demonstrado recentemente por vários autores (Balasubramanian *et al.*, 2000; Chen & Yao, 2000). Através da utilização de análise de variância é possível a identificação de parâmetros significativos para um determinado procedimento assim como a interação entre eles, e ainda possibilita a determinação dos níveis mais efetivos de cada fator significativo, o que permite a otimização dos processos de produção (Bayhan, 2004).

Para cada uma das amostras utilizadas, foi realizado um planejamento fatorial completo 2^2 para verificar os efeitos principais e de interação das variáveis independentes, concentração de glicose no meio de cultura e temperatura de cultivo, sobre a variável resposta atividade das fosfatases ácida e alcalina.

Alguns parâmetros foram acompanhados para análise do crescimento: produção de biomassa, consumo de glicose, proteínas e fosfato e comportamento do pH.

Os rendimentos na produção de biomassa foram fortemente afetados pela passagem do nível de concentração de glicose do nível superior (+1) para o nível inferior (-1) para todas as amostras investigadas. Os melhores resultados para a produção de biomassa foram observados quando todas as

variáveis estavam reguladas no nível mais alto (+1), o maior rendimento foi demonstrado pela amostra *C. elegans* UCP 542 que correspondeu a 15,78 g/L.

Os resultados obtidos apresentaram rendimentos iguais ou superiores quando comparados com vários relatos descritos na literatura recente: Lima *et al.* (2003) que investigando o efeito da concentração de fosfato na produção de biomassa por *C. elegans*, obtiveram resultados com o valor máximo de 3.29 g/L; Franco *et al.*, (2004a) obtiveram 12,5 g/L utilizando também amostra de *C. elegans*; Andrade *et al.* (2000) que utilizando planejamento fatorial para a produção de quitina por *C. elegans* e *Mucor javanicus* obtiveram como melhores resultados 10,42 e 8,75 g/L respectivamente. A produção de biomassa obtida nesta pesquisa foi superior a descritas por Rast *et al.* (1991) durante um estudo utilizando *Mucor rouxii*, o qual alcançou um rendimento de 7,0 g/L, Synowieck & Al-Khateeb (1997) utilizando o mesmo microrganismo, narraram rendimentos de biomassa em torno de 4,0 g/L após 48 horas de crescimento, e ainda em 1979 White *et al.*, investigaram a produção de quitosana também por *Mucor rouxii* e obtiveram valores de produção de biomassa numa faixa de 9,0 a 14,0 g/L após 80 horas de cultivo.

O pH permaneceu na faixa ácida no nível de regulação máxima das variáveis independentes variando entre 5,10 e 3,71, enquanto que no nível mínimo os valores oscilaram entre 7,78 e 6,9 permanecendo na faixa alcalina, este fato é facilmente explicado pelo alto consumo de proteínas, que causa a liberação de aminoácidos no meio de cultivo (Smith *et al.*, 1977).

O consumo de nutrientes foi analisado ao final das 168 horas de crescimento, para cada amostra foram avaliados o consumo de glicose, proteínas e fosfato, assim como o comportamento do pH no líquido metabólico.

A interação das variáveis independentes foi positiva para o consumo de glicose demonstrando os maiores valores, 99,32% quando a concentração de glicose e a temperatura estavam reguladas no nível máximo (+1). Houve interação positiva entre as variáveis independentes para o consumo de fosfato obtendo-se valores oscilando entre 98 e 58,5% no nível (+1) e quando as condições eram passadas para o nível (-1) o consumo oscilou entre 26,9 e 11,25%. O consumo de proteínas totais no nível de regulação máxima das variáveis oscilou entre de 78,0 a 18,2% e quando reguladas no nível mínimo os valores variaram entre 90,09 e 73,0%; para este parâmetro a interação entre as variáveis independentes foi negativa. O consumo dos macro e micro nutrientes avaliados mostrou resultados que são plenamente corroborados pelos resultados descritos por Andrade *et al.* (2003) e Franco *et al.*, (2004b) sugerindo um comportamento bioquímico clássico de absorção de nutrientes.

O pH foi afetado pela variação dos níveis permanecendo na faixa ácida no nível máximo oscilando entre 5.10 e 3.71 e no nível mínimo os valores permaneceram na faixa alcalina entre 7.78 e 6.9. Um alto consumo de proteínas acarreta a liberação de grupamentos amino no meio de cultivo que podem provocar a alcalinização do pH (Smith *et al.*, 1977; Tobin *et al.*, 1994).

Os cálculos dos efeitos principais e de interação de todos os fatores envolvidos em um estudo permitem a análise dos efeitos de um planejamento fatorial. Todos os fatores foram calculados pela diferença entre duas médias, cada uma contendo a metade da resposta experimental.

A variável independente concentração de glicose apresentou efeito positivo significativo para a atividade das fosfatase ácida e alcalina quando passou do nível -1 (4g) para o nível +1 (40g), para todas as amostras

estudadas, a variável independente temperatura de crescimento também apresentou efeito positivo significativo para variável resposta quando passou do nível -1 (22°C) para o nível +1 (28°C), em todas as amostras utilizadas.

A variável resposta atividade enzimática foi avaliada após as 168 horas de cultivo; as tabelas 2 a 11 demonstram os níveis e os resultados obtidos para em cada combinação de níveis para cada planejamento realizado.

Tabela 2. Planejamento fatorial para amostra *C. elegans* (UCP 54).

Repetição	Níveis		Atividade enzimática U.I./mg de proteína	
	Concentração de glicose	Temperatura de cultivo	Fosfatase ácida	Fosfatase alcalina
1	-1	-1	0,32	0,11
1	+1	-1	0,34	0,22
1	-1	+1	0,42	0,27
1	+1	+1	0,51	0,31
2	-1	-1	0,30	0,13
2	+1	-1	0,37	0,29
2	-1	+1	0,40	0,25
2	+1	+1	0,55	0,30

Tabela 3. Planejamento fatorial para amostra *C. elegans* (UCP48)

Repetição	Níveis		Atividade enzimática U.I./mg de proteína	
	Concentração de glicose	Temperatura de cultivo	Fosfatase ácida	Fosfatase alcalina
1	-1	-1	0,32	0,09
1	+1	-1	0,34	0,22
1	-1	+1	0,46	0,27
1	+1	+1	0,58	0,30
2	-1	-1	0,27	0,11
2	+1	-1	0,32	0,19
2	-1	+1	0,43	0,25
2	+1	+1	0,52	0,34

Tabela 4. Planejamento fatorial para amostra *C. elegans* (UCP47)

Repetição	Níveis		Atividade enzimática U.I./mg de proteína	
	Concentração de glicose	Temperatura de cultivo	Fosfatase ácida	Fosfatase alcalina
1	-1	-1	0,32	0,11
1	+1	-1	0,36	0,20
1	-1	+1	0,48	0,23
1	+1	+1	0,57	0,26
2	-1	-1	0,36	0,13
2	+1	-1	0,30	0,18
2	-1	+1	0,41	0,27
2	+1	+1	0,47	0,26

Tabela 5. Planejamento fatorial para amostra *C. elegans* (UCP542)

Repetição	Níveis		Atividade enzimática U.I./mg de proteína	
	Concentração de glicose	Temperatura de cultivo	Fosfatase ácida	Fosfatase alcalina
1	-1	-1	0,28	0,15
1	+1	-1	0,30	0,22
1	-1	+1	0,50	0,28
1	+1	+1	0,59	0,32
2	-1	-1	0,30	0,20
2	+1	-1	0,27	0,20
2	-1	+1	0,52	0,31
2	+1	+1	0,61	0,36

Tabela 6. Planejamento fatorial para amostra *C. elegans* (UCP61)

Repetição	Níveis		Atividade enzimática U.I./mg de proteína	
	Concentração de glicose	Temperatura de cultivo	Fosfatase ácida	Fosfatase alcalina
1	-1	-1	0,31	0,13
1	+1	-1	0,42	0,24
1	-1	+1	0,52	0,25
1	+1	+1	0,58	0,30
2	-1	-1	0,30	0,10
2	+1	-1	0,45	0,19
2	-1	+1	0,52	0,29
2	+1	+1	0,49	0,32

Tabela 7. Planejamento fatorial para amostra *C. elegans* (UCP57)

Repetição	Níveis		Atividade enzimática U.I./mg de proteína	
	Concentração de glicose	Temperatura de cultivo	Fosfatase ácida	Fosfatase alcalina
1	-1	-1	0,30	0,12
1	+1	-1	0,37	0,20
1	-1	+1	0,50	0,23
1	+1	+1	0,52	0,29
2	-1	-1	0,27	0,09
2	+1	-1	0,35	0,27
2	-1	+1	0,48	0,18
2	+1	+1	0,50	0,21

Tabela 8. Planejamento fatorial para amostra *C. elegans* (UCP53)

Repetição	Níveis		Atividade enzimática U.I./mg de proteína	
	Concentração de glicose	Temperatura de cultivo	Fosfatase ácida	Fosfatase alcalina
1	-1	-1	0,29	0,10
1	+1	-1	0,42	0,18
1	-1	+1	0,50	0,22
1	+1	+1	0,54	0,24
2	-1	-1	0,25	0,13
2	+1	-1	0,37	0,21
2	-1	+1	0,45	0,23
2	+1	+1	0,50	0,20

Tabela 9. Planejamento fatorial para amostra *C. elegans* (UCP56)

Repetição	Níveis		Atividade enzimática U.I./mg de proteína	
	Concentração de glicose	Temperatura de cultivo	Fosfatase ácida	Fosfatase alcalina
1	-1	-1	0,25	0,07
1	+1	-1	0,35	0,05
1	-1	+1	0,47	0,17
1	+1	+1	0,51	0,20
2	-1	-1	0,23	0,10
2	+1	-1	0,30	0,07
2	-1	+1	0,50	0,20
2	+1	+1	0,49	0,24

Tabela 10. Planejamento fatorial para amostra *C. elegans* (UCP62)

Repetição	Níveis		Atividade enzimática U.I./mg de proteína	
	Concentração de glicose	Temperatura de cultivo	Fosfatase ácida	Fosfatase alcalina
1	-1	-1	0,28	0,09
1	+1	-1	0,38	0,18
1	-1	+1	0,43	0,18
1	+1	+1	0,50	0,25
2	-1	-1	0,20	0,15
2	+1	-1	0,24	0,13
2	-1	+1	0,39	0,19
2	+1	+1	0,54	0,30

Tabela 11. Planejamento fatorial para amostra *C. elegans* (UCP72)

Repetição	Níveis		Atividade enzimática U.I./mg de proteína	
	Concentração de glicose	Temperatura de cultivo	Fosfatase ácida	Fosfatase alcalina
1	-1	-1	0,26	0,10
1	+1	-1	0,36	0,21
1	-1	+1	0,48	0,21
1	+1	+1	0,52	0,27
2	-1	-1	0,20	0,10
2	+1	-1	0,33	0,19
2	-1	+1	0,42	0,32
2	+1	+1	0,27	0,29

A interação das variáveis independentes, concentração de glicose e temperatura de cultivo apresentou efeito positivo para maioria das amostras de *C.elegans*, com exceção das amostras *C.elegans* (UCP 57) e *C.elegans* (UCP 62) que demonstraram efeito negativo. Para todas as amostras estudadas, a variável resposta atividade enzimática foi favorecida pela passagem das variáveis independentes do nível -1 para o nível +1 (aumento da concentração de glicose de 4g/L para 40g/L e da temperatura de cultivo de 22°C para 28°C), em todas as amostras. Os maiores valores de atividade de fosfatase ácida foram demonstrados pela amostra *C.elegans* (UCP 542) sendo de 0,59 U.I./mg

de proteína e também para a atividade da fosfatase alcalina apresentando valor médio de 0,34 U.I/mg de proteína. Os resultados obtidos demonstram maior atividade da fosfatase ácida em todas as amostras utilizadas.

Para os resultados demonstrados pela amostra *C. elegans* UCP 542, foram construídas as análises de superfícies de respostas ilustradas nas Figuras 1 e 2, as quais apresentam o efeito das variáveis independentes sobre a atividade das fosfatases ácida e alcalina, respectivamente.

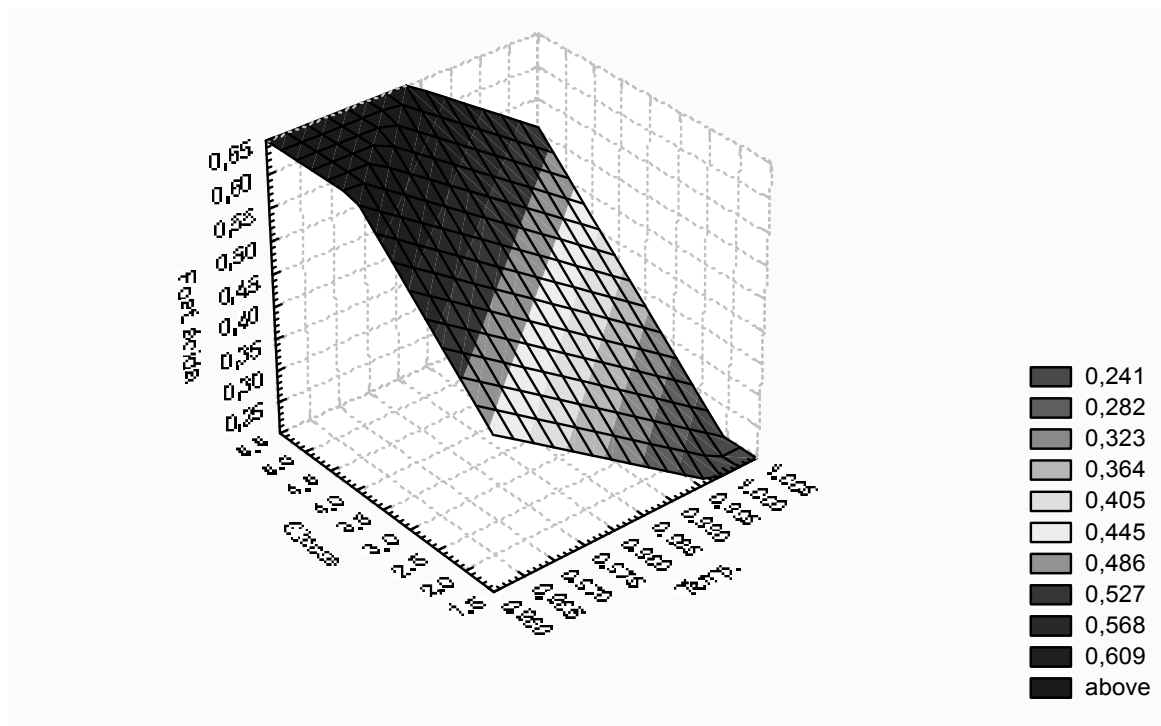


Figura 1. Superfície de resposta para a atividade de Fosfatase ácida em *C.elegans* (UCP 542)

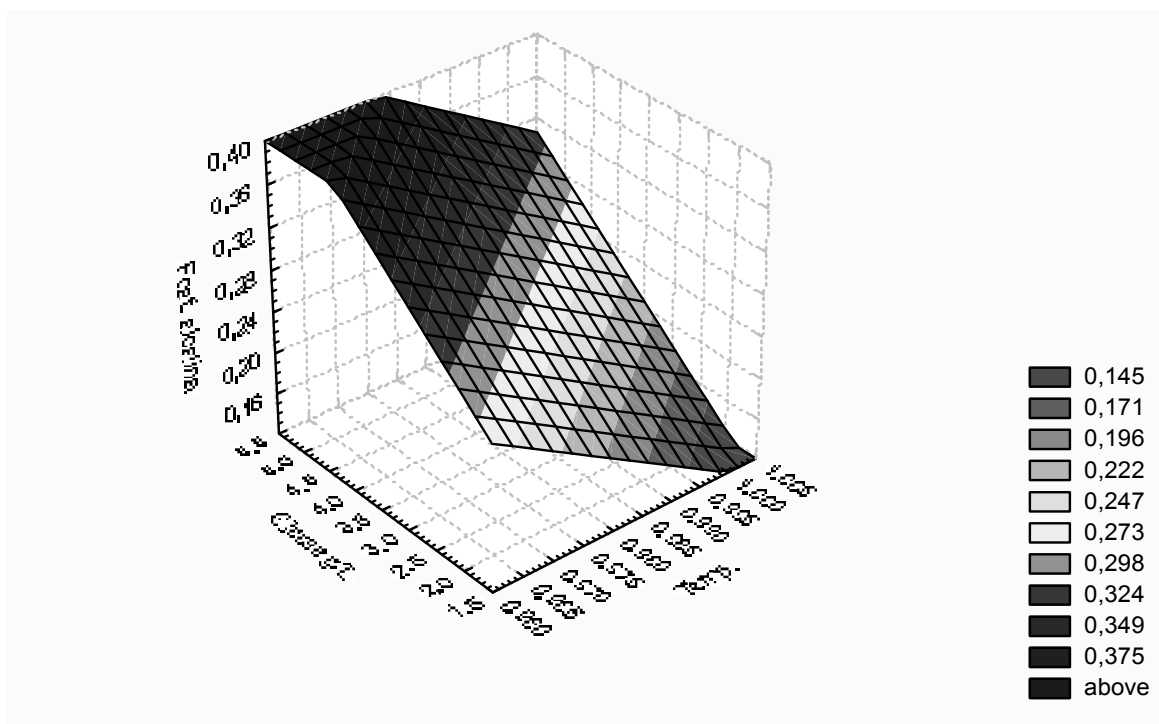


Figura 2. Superfície de resposta para a atividade de Fosfatase alcalina em *C.elegans* (UCP 542)

Na estringência de fosfato, as enzimas fosfatases mobilizam esta molécula a partir da hidrólise de compostos fosfatados (Wyss *et al.*, 1998). Weinberg & Zusman, (1990) investigaram a atividade das fosfatases ácida e alcalina durante o crescimento de *Mixococcus xanthus* e relataram a importância destas enzimas na formação de estruturas de resistência celular.

A atividade das fosfatases está presente em várias espécies de fungos (Baldwin *et al.*, 2001). A produção e termoestabilidade destas enzimas produzidas por *Aspergillus fumigatus* e *A. niger* foi avaliada por Wyss *et al.*, 1998, que obtiveram atividade máxima com valores em torno de 0,5 U./mg de proteína, semelhantemente aos resultados aqui evidenciados.

Já em 1973, Toh-E *et al.*, promoveram o isolamento de fosfatase ácida a partir da biomassa de *Sacharomyces cerevisiae* e correlacionaram a atividade destas enzimas com o metabolismo de polifosfato inorgânico.

Foi analisada a relação entre a atividade enzimática e a acumulação de PoliPi intracelular pelas amostras nas quatro condições estabelecidas pelo modelo fatorial utilizado. Os resultados obtidos estão demonstrados nas figuras 3 a 6.

A atividade das enzimas foi mais significativamente afetada pela mudança na temperatura de cultivo de que pela mudança na concentração de glicose no meio de cultura, enquanto o acúmulo de PoliPi total foi mais significativamente afetado pela variação da concentração de glicose no meio de cultura.

Os resultados evidenciaram que a atividade das enzimas mostrou valores diferenciados de acordo com amostras testadas e as condições de crescimento utilizadas.

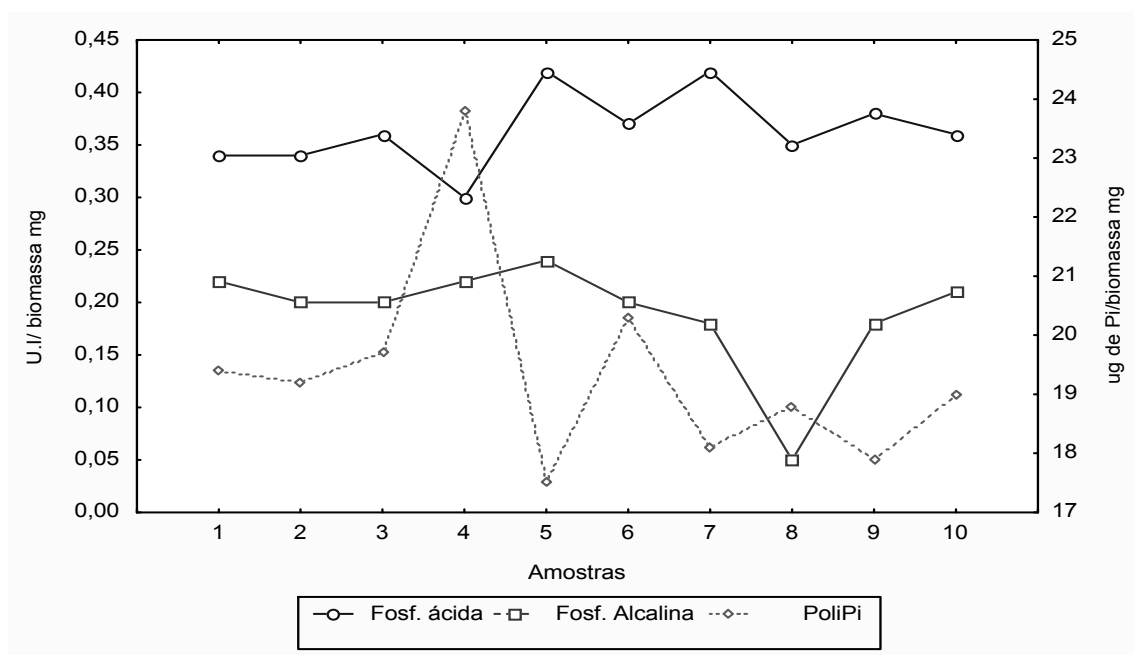


Figura 3. Atividade das fosfatases e acumulação de PoliPi em meio com glicose 40 g/L e temperatura de cultivo de 28°C pelas amostras: 1- *C. elegans* (UCP 54), 2- *C. elegans* (UCP 48), 3- *C. elegans* (UCP 47), 4- *C. elegans* (UCP 542), 5 - *C. elegans* (UCP 61), 6 - *C. elegans* (UCP 57), 7- *C. elegans* (UCP 53), 8- *C. elegans* (UCP 56), 9 - *C. elegans* (UCP 62) e 10 - *C. elegans* (UCP 72).

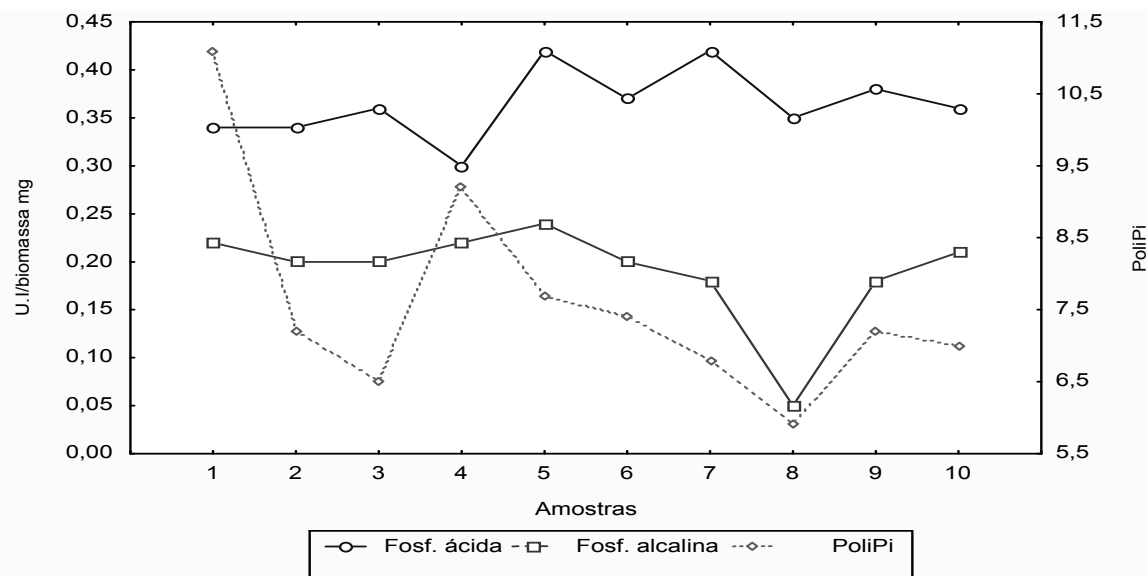


Figura 4. Atividade das fosfatases e acumulação de PoliPi em meio com glicose 40 g/L e temperatura de cultivo de 22°C pelas amostras: 1- *C. elegans* (UCP 54), 2- *C. elegans* (UCP 48), 3- *C. elegans* (UCP 47), 4- *C. elegans* (UCP 542), 5 - *C. elegans* (UCP 61), 6 - *C. elegans* (UCP 57), 7- *C. elegans* (UCP 53), 8- *C. elegans* (UCP 56), 9 - *C. elegans* (UCP 62) e 10 - *C. elegans* (UCP 72).

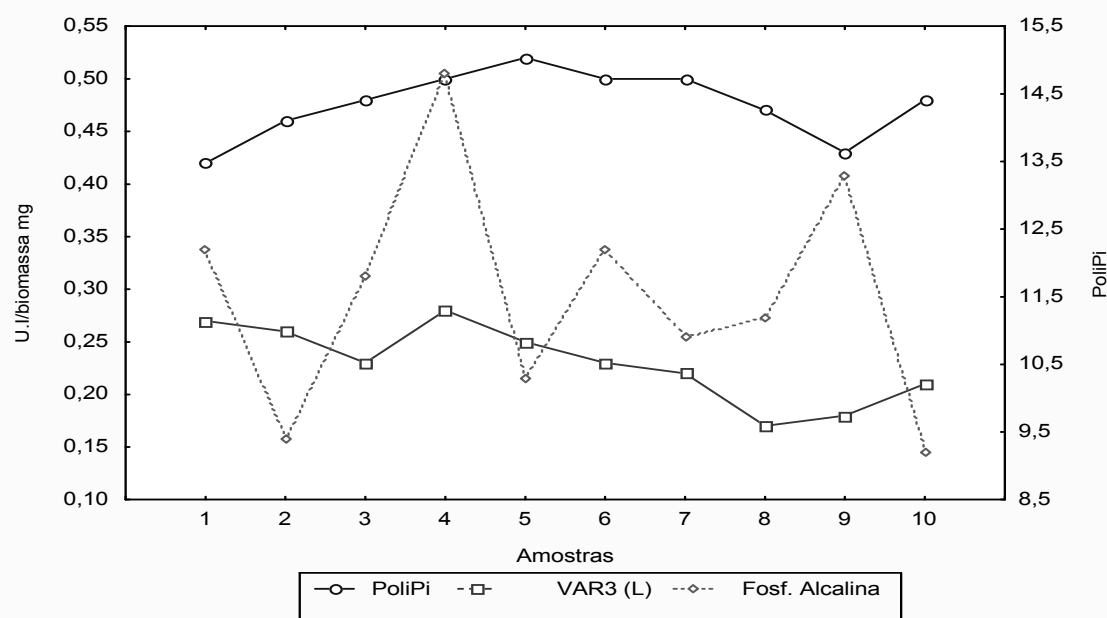


Figura 5. Atividade das fosfatases e acumulação de PoliPi em meio com glicose 4 g/L e temperatura de cultivo de 28°C pelas amostras: 1- *C. elegans* (UCP 54), 2- *C. elegans* (UCP 48), 3- *C. elegans* (UCP 47), 4- *C. elegans* (UCP 542), 5 - *C. elegans* (UCP 61), 6 - *C. elegans* (UCP 57), 7- *C. elegans* (UCP 53), 8- *C. elegans* (UCP 56), 9 - *C. elegans* (UCP 62) e 10 - *C. elegans* (UCP 72).

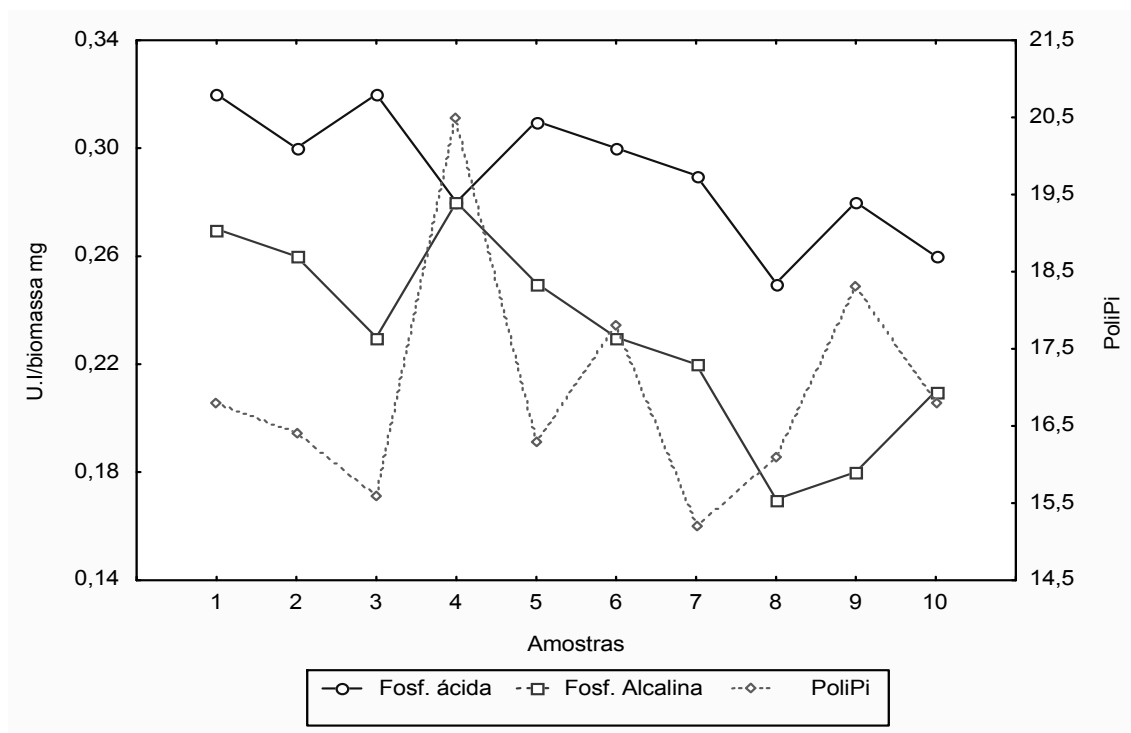


Figura 6. Atividade das fosfatases e acumulação de PoliPi em meio com glicose 4 g/L e temperatura de cultivo de 22°C pelas amostras: 1- *C. elegans* (UCP 54), 2- *C. elegans* (UCP 48), 3- *C. elegans* (UCP 47), 4- *C. elegans* (UCP 542), 5 - *C. elegans* (UCP 61), 6 - *C. elegans* (UCP 57), 7- *C. elegans* (UCP 53), 8- *C. elegans* (UCP 56), 9 - *C. elegans* (UCP 62) e 10 - *C. elegans* (UCP 72).

A atividade das fosfatases ácida e alcalina é influenciada pelos níveis de fosfato disponíveis, que ativa ou reprime suas atividades (Nahas, 2002). O acúmulo de PoliPi intracelular por vários tipos de microrganismos é diretamente influenciado pela concentração de glicose e de fosfato no meio de cultivo (Kornberg, 2000; Lima *et al.*, 2003).

Os resultados aqui obtidos demonstraram que todas as amostras de *C. elegans* testadas apresentaram atividade das enzimas fosfatases ácida e alcalina, e que os valores das atividades foram variados em função primeiramente da amostra e também pelas diferentes condições de crescimento impostas pelo modelo fatorial.

A atividade das fosfatases não influenciaram a acumulação de PoliPi até as 168 horas de crescimento analisadas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos órgãos de fomento CAPES e CNPq, e a UNICAP e UFPE.

REFERÊNCIAS

- Andrade, V.S., Neto, B.B.; Fukushima, K., Campos-Takaki. G.M., 2003. Effect of medium components and time of cultivation on chitin production by *Mucor circinelloides* (*Mucor javanicus* IFO 4570) - A factoryal study. *Revista Iberoamericana de la Micologia*. 20, 149-153.
- Andrade, V.S.; Neto, B.B.; Souza, W.; Campos-Takaki. G.M. (2000). A factorial design analysis of chitin production by *Cunninghamella elegans*. *Canadian Journal of Microbiology* 46, 1042-1045.
- Balasubramanian, V., Guha, B., Swamidas, A.S.J., Seshadri, R. (2000). Influence of shielded metal arc welded cruciform joint dimensions on toe crack failures of pressure vessel grade steels. *Engine Fail Anal* 7, 169-179.
- Baldwin, J.C., Karthikeyan, A.S., Raghothama, K.G. (2001) LePS2, a phosphorus starvation-induced novel acid phosphatase from tomato. *Plant Physiology* 125, 728-737.
- Bayhan, G.M. (2004). An alternative procedure for estimation problem in 2^n factorial experimental models. *Cometei Industrial Engineering* 47, 1-15.
- Berton, R.S., Pratt, P.F., Frankenberger, W.T. 1997. Phosphorus availability in soils emended with organic materials, estimated by three chemical methods

and two enzyme activities. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*, 21 (4) 617-624.

Carlile, M.J, Watkinson, S.C., (1996). *The Fungi*. Tokyo, Academic press.

Chen, K., Yao, Y.L. (2000). Process optimization in pulsed laser micromaching with applications in medical device manufacturing. *International Journal in Advances Manufacturing Technology* 16, 243-249.

Fiske, C.H., Subbarow, Y. (1925). The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biology and Chemistry* 66, 375-400.

Franco, L.O., Maia, R.C.C., Porto, A.L.F., Messias, A.S., Fukushima, K., Campos Takaki, G.M. (2004a). Heavy metal biosorption by chitin and chitosan from *Cunninghamella elegans* (IFM 46109). *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, 243-247.

Franco, L.O., Stamford, T.C.M., Stamford, N.P., Campos-Takaki, G.M. (2004b). *Cunninghamella elegans* como fonte de quitina e quitosana. *Revista Analytica* 13, 52-56.

Harold, F.M. (1966). Inorganic polyphosphate in biology: structure, metabolism, and function. *Bacteriological Review* 16, 772-794.

Hesseltine, C.W.; Anderson, R.F. (1957). Microbiological Production of Carotenoides I. Zygospor and Carotene produced by intraspecific and crosses of Choanephoraceae in liquid media. *Mycology* 149, 449-452.

Kornberg, A., 2000. Tribute to professor Igor S. Kulaev. *Biochemistry* (Moscow) 65 (3), 334p.

Kornberg, A.; Rao, N.N.; Ault-Riche, D. (1999). Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annual Review of Biochemistry* 68, 89-125.

- Kulaev, I.; Kulakovskaya, T. (2000). Polyphosphate and Phosphate Pump. *Annual Review of Microbiology* 54,709-734.
- Kulaev, I.S., Vagabov, V.M., Kulakovskaya, T.V., Lichko, L.P., Andreeva, N.A., Trilisenko, L.V. (2000). The development of A.N. Belozersky's Ideas in polyphosphate biochemistry. *Biochemistry* (Moscow) 65, 271-278.
- Kumble, K.D., Kornberg, A. (1995) Inorganic polyphosphate in mammalian cells and tissues. *Journal of Biology Chemical* 270, 5818-5827.
- Lima, M.A.B., Nascimento, A.E., Souza, W., Fukushima, K., Campos-Takaki, G.M. (2003). Effect of phosphorus on polyphosphate accumulation by *Cunninghamella elegans*. *Brazilian Journal Microbiology* 34, 363-372.
- Nahas, E. 2002. Microrganismos do solo produtores de fosfatases em diferentes sistemas agrícolas. *Bragantia*, 61 (3), 267-275.
- Nesmeyanova, M.A. (2000). Polyphosphate and enzymes of polyphosphate metabolism in *Escherichia coli*. *Biochemistry* (Moscow) 3, 309-314.
- Rast, D.M.; Horsh, M.; Furter, R. & Gooday, G.W. (1991). A complex chitnolytic system in exponentially growing mycelium of *Mucor rouxii*. Properties and function. *Journa General of Microbiology* 137, 2797-2810.
- Smirnov, A.V.; Kulakovskaya, I.S.; Kulaev, I.S., 2002. Phosphate accumulation by an extremely halophilic archae *Halobacterium salinarium*. *Process in Biochemistry* 37, 643-649.
- Smith, J. E.; Deans, S. G.; Anderson, J. G.; Davis, B. (1977). The Nature of fungal sporulation. in: Biotechnology and Fungal Differentiation. *FEMS Symposium*. 40, 17-41.

- Synowiecki, J.; Al-Khatteb, N.A.AQ. (1997). Mycelia of *M. rouxii* as a source of chitin and chitosan. *Food Chemistry* 60 (4), 605-610.
- Tarafdar, J.C., Visual demonstration of in vivo acid fosfatase activity of V A mycorrhizal ungi. *Current Science*, 69 (6), 541-543.
- Thomas, G.H. (2001). Cellular functions for inorganic polyphosphate. *TRENDS Microbiology* 9 (10), 468.
- Tobin, J.M.; White, C.; Gadd, G.M. Metal accumulation by fungi: Applications in Environmental biotechnology. *Journal of industrial Microbiology*, 13: 126-130, 1994.
- Toh-E, A., Ueda, Y., Kakimoto, S., Oshima, Y. 1973. Isolation and caracterization of acid phosphatase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 133 (2), 727-738.
- Weinberg, A.R. & Zusman, D.R. 1990. Alkaline, acid, and neutral phsophatase activities are induced during development in *Myxococcus xantus*. *Journal of Bacteriology* 172 (5), 22-94-2302.
- White, S.A.; Farina, P.R.; Fulton, I. (1979). Production and isolation of chitosan from *Mucor rouxii*. *Applied and Environmental Microbiology* 38, 323-328.
- Wyss, M., Pasamontes, L., Rémy, R., Kohler, J., Kuszniir, E., Gadiant, M., Mülleer, F., Van Loon, A.P.M.G. 1998. Comparison of the thermostability of three acid phosphatases from molds: *Aspergillus fumigatus*, *A. niger* phytase, and *A. niger* pH 2,5 acid phosphatase. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (11), 4446-4451.

CONCLUSÕES

PRIMEIRO ARTIGO

- Dentre as amostras testadas o espécime *C elegans* (UCP 542) demonstrou o maior potencial de acúmulo de PoliPi;
- A variáveis independentes testadas possuem efeitos principais e de interação positivos significativos para a variável resposta;
- O pH foi influenciado pela modificação das variáveis independentes;
- Os melhores rendimentos para a variável resposta foram observados com a combinação de variáveis independentes no nível mais alto (+1).

SEGUNDO ARTIGO

- A variáveis independentes testadas possuem efeitos principais e de interação significativos para a variável resposta, atividade enzimática;
- O efeito isolado da variável independente, temperatura de cultivo foi mais significativo para a variável resposta, atividade enzimática.
- A atividade de fosfatase ácida e alcalina ocorreu em todas as amostras de *C. elegans* testadas, no entanto esta atividade não apresenta correlação com o metabolismo de PoliPi durante o intervalo de crescimento testado.
- A enzima fosfatase ácida apresentou maior atividade para todas as amostras testadas.

TERCEIRO ARTIGO

- As variáveis independentes testadas possuem efeitos principais e de interação significativos para a variável resposta, atividade enzimática;
- O efeito isolado da variável independente, temperatura de cultivo foi mais significativo para a variável resposta, atividade enzimática.
- A atividade de fosfatase ácida e alcalina ocorreu em todas as amostras de *C. elegans* testadas, no entanto esta atividade não apresenta correlação com o metabolismo de PoliPi durante o intervalo de crescimento testado.
- A enzima fosfatase ácida apresentou maior atividade para todas as amostras testadas.