

ROBERTA CORSINO FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO EM ESCALA GENÔMICA DE FITASES FÚNGICAS,
OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO E EXPRESSÃO DA FITASE DE *Talaromyces
pinophilus***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2019

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

F413c
2019
Ferreira, Roberta Corsino, 1984-
Caracterização em escala genômica de fitases fúngicas,
otimização da produção e expressão da fitase de *Talaromyces*
pinophilus / Roberta Corsino Ferreira. – Viçosa, MG, 2019.
xvi, 141f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Valéria Monteze Guimarães.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Enzimas. 2. Bioinformática. 3. Recombinação (Genética).
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica
e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica Aplicada. II. Título.

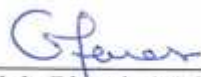
CDD 22 ed. 572.7

ROBERTA CORSINO FERREIRA

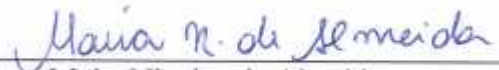
**CARACTERIZAÇÃO EM ESCALA GENÔMICA DE FITASES FÚNGICAS,
OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO E EXPRESSÃO DA FITASE DE *Talaromyces
pinophilus***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 31 de julho de 2019.



Gabriela Piccolo Maitan-Alfenas



Maira Nicolau de Almeida



Maria Catarina Megumi Kasuya



Rafaela Zandonade Ventorim



Valéria Monteze Guimarães
(Orientadora)

Aos meus pais Silvana e Carlos Roberto, a quem prometi um dia que eu me tornaria doutora.

A minha irmã Maria pelo companheirismo e amizade, que mesmo à distância sempre foi presente e muito parceira.

*A minha vó Joana pelo lar sempre aconchegante.
A toda minha família de sangue e de coração pelo apoio.*

E a todos os meus amigos que de forma direta ou indireta fizeram parte dessa conquista.

**Com amor e gratidão,
Dedico.**

“Uma criança, um professor, um livro e um lápis podem mudar o mundo. ” – Malala Yousafzai

”A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo. ” – Nelson Mandela, University of the Witwatersrand, África do Sul, 2003

“A inteligência e o caráter é o objetivo da verdadeira educação. ” – Martin Luther King

”A humanidade precisa de homens práticos que aproveitem ao máximo seu trabalho e, sem esquecer o bem geral, salvaguardem seus próprios interesses. Mas a humanidade também precisa de sonhadores, para quem o desenvolvimento desinteressado de uma empresa seja tão cativante que é impossível para eles dedicarem seus cuidados aos seus próprios benefícios materiais. ” – Marie Curie

“O combustível para a evolução é a diversidade, com a seleção natural levando a contínuas adaptações e melhorias no trabalho da natureza. Organismos (e organizações) sem essa diversidade estão condenados à extinção em um mundo em rápida mudança. ” – Frances H. Arnold

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

Àquele que me dá forças e coragem para seguir em frente.

Aos meus pais Silvana e Carlos Roberto pelo incentivo, confiança e amor. A minha irmã Maria Clara pelo companheirismo de sempre, que mesmo à distância sempre se fez presente na minha vida. Aos meus familiares e amigos de Montes Claros e região pelo apoio.

À Universidade Federal de Viçosa por ter sido a minha segunda casa durante todos esses anos. Ao programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada – UFV, pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro concedido para a realização desse trabalho. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo durante todo o curso.

Ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária - BIOAGRO/UFV pela estrutura que me permitiu a realização do meu trabalho. Aos funcionários do BIOAGRO/UFV, em especial ao Sr. Paulo pelo carinho e gentileza na recepção.

À Clínica de Doenças de Plantas do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, na pessoa do Professor Robert Weingart Barreto e do funcionário José Orlando Saraiva Neto, pela concessão das placas com os fungos ascomicetos fitopatogênicos utilizados na prospecção e de um modo especial à Carmem Herrera pelo carinho e atenção com que me recebeu.

Ao Laboratório de Associações Micorrízicas do Departamento de Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, pela concessão das placas com os fungos basidiomicetos utilizados na prospecção e por ter sido tão bem recebida no laboratório. Ao José Maria Rodrigues, à Camila Costa por me ensinarem a trabalhar com os cogumelos.

Ao Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, na pessoa do Professor Ronaldo Alves Pinto Nagem, por conceder o espaço para a realização da transformação das células utilizadas no trabalho e ao Renato Godoi pela ajuda imensurável.

Ao Núcleo de Biomoléculas da Universidade Federal de Viçosa, na pessoa do Dr. Edvaldo Barros pelo auxílio durante as análises de espectrometria de massa e interpretação dos resultados, além de todo ensinamento sobre a técnica. Ao Laboratório de Biologia Molecular de Plantas pelo fornecimento de água deionizada e pela amizade.

Ao Professor Paulo Sérgio Monteiro e à Professora Monique Eller pelas contribuições durante o meu exame de qualificação. E às professoras Maíra Nicolau de Almeida, Gabriela Piccolo Maitan-Alfenas e Maria Catarina Megumi Kasuya e à Dra. Rafaela Zandonade Ventrone pela participação na minha banca de defesa do doutorado e todas as contribuições.

À Dr. Marina Quádrão pela coorientação e imensa colaboração, por todos os ensinamentos, pela amizade e confiança no meu trabalho. Ao Professor Sebastião Tavares de Resende pela disponibilização do laboratório para as atividades.

À minha orientadora Professora Valéria Monteze Guimarães pela confiança, orientação, amizade e, por acreditar no meu trabalho me desafiando com uma pesquisa tão complexa e difícil (só quem trabalha ou trabalhou com fitase para saber do que estou falando). Obrigada por tudo, mas principalmente por ser essa mulher forte que tanto me inspira e me orgulho de ter sido aluna (quando eu crescer quero igual a você rsrs).

Aos professores do Departamento de Bioquímica Aplicada pelos ensinamentos e colaborações, especialmente o professor Tiago Antônio Mendes pelas correções em um dos artigos. Aos funcionários do Departamento de Bioquímica Aplicada pela atenção e amizade. Em especial agradeço ao Eduardo Monteiro pela sua competência para lidar com as burocracias exigidas pelo programa e atenção para comigo.

A todos dos Laboratórios de Análises Bioquímicas e de Biologia Molecular e Filogeografia. Aos meus amados colegas Marcele Martins, Ednílson Mascarenhas, Ana Maria Camargos, Mariana Bicalho, Tiago Leal, Thiago Dutra, Kimberly Beira-Mar, Marcelo Godoy, Marciana Morales, Livia Fialho e Igor Ribas, com quem convivi pouco, mas muito queridos por mim. À Rafaela Ladeira, Amanda Passarinho, pela troca de

experiências. À Lílian Fialho por todo auxílio e treinamentos. Aos queridos Rodrigo Lorenzoni, Jéssica Nayara e Marina Aline pelas conversas e boas risadas.

Às minhas lindezas Elisa Barreto, Maria Isabella Petra, Mariana Furtado e Pollyana Cantarutti por tornarem os meus dias mais leves, divertidos, e pelo ombro amigo. E à Camila Coelho pela acolhida, pela parceria de todas as horas, pelos melhores “rolês” e por ser parte da minha vida, enfim... eu ainda não sei como será viver longe. Amo todas vocês minhas queridas, os laços são eternos.

Aos meus parceiros amados Túlio Morgan e Murillo Peterlini (uma das melhores pessoas que já conheci), definitivamente eu não teria feito esse trabalho sem vocês, serei eternamente grata, pela parceria, companheirismo e aprendizado. Vocês são geniais, incríveis! E às minhas crianças: Luiz Vinícius, Rafaella Breder, Jean Pierre, Riziane Gomes e especialmente, ao meu pequeno príncipe Yan Clevelares, meu dia não renderia nada sem vocês, obrigada e parabéns pela dedicação de vocês.

Aos meus queridos amigos Jordanna Karolyne, Gabriel Viana, Jorge Lima Muniz, Bárbara Lopes, Gustavo Marcílio, Guilherme Carvalho, Rafael Tassinari, Roseany Mendes, Fabiana Teixeira, Gabriella Peterlini, Lívia Reis, Bruna Cunha e Marcela Pellegrini, pela força e incentivo e, a todos os amigos da UFV e de Viçosa pela amizade, companheirismo e alegrias à qual me proporcionaram.

À cidade de Viçosa por esses onze anos de vivência, sofrida, intensa e de tantas alegrias, será sempre meu lugarzinho no meio do nada, minha Terra do Nunca, minha Viçosa Perereca, minha Viçosa Viciosa dos melhores rocks. Aquele lugar para o qual eu sempre vou querer voltar um dia.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a concretização desse meu sonho de ser doutora, minha eterna gratidão, vocês são parte dessa conquista.

BIOGRAFIA

ROBERTA CORSINO FERREIRA, filha de Carlos Roberto Ferreira da Silva e Silvana Corsino da Silva, nasceu em Montes Claros, Estado de Minas Gerais, em 12 de abril de 1984. Em dezembro de 2001 completou o ensino médio na Escola Estadual Professor Plínio Ribeiro em Montes Claros-MG.

Em 2007, iniciou o curso de Zootecnia na Faculdade de Estudos Administrativos (FEAD), em Belo Horizonte-MG, e em agosto de 2008 transferiu-se para a Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em novembro de 2012. Em abril de 2013, iniciou o Curso de Mestrado em Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de dissertação em março de 2015. Em agosto de 2015, iniciou o curso de Doutorado em Bioquímica Aplicada na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa de tese em julho de 2019.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS	7
1. Objetivos Gerais.....	7
2. Objetivos Específicos.....	7
CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA	8
1. Ácido Fítico.....	9
1.1. Fitato como fator antinutricional.....	9
1.2. Fitase.....	12
2. Classificação das fitases.....	12
2.1. Posição onde se inicia a hidrólise.....	13
2.2. De acordo com o pH de atividade.....	13
2.3. Diferenças estruturais e catalíticas.....	13
3. Organismos produtores e técnicas de produção de fitases.....	18
4. Mercado mundial de fitase.....	22
5. Fitase na nutrição animal.....	25
5.1. Características bioquímicas das fitases de interesse para aplicação em rações.....	27
5.2. Superdosagem de fitase em rações para animais não ruminantes.....	29
6. Referências Bibliográficas.....	30
CAPÍTULO II – Genome-scale characterization of fungal phytases and a comparative study between Beta-propeller phytases and histidine acid phosphatases	45
1. Introdução.....	48
2. Material e Métodos.....	49
3. Resultados e Discussão.....	53
4. Referências Bibliográficas.....	68
5. Apêndices.....	74
CAPÍTULO III – Otimização da produção da fitase do fungo <i>Talaromyces pinophilus</i> cultivado em casca de soja utilizando a metodologia de superfície de resposta	83
1. Introdução.....	85

2. Material e Métodos.....	86
3. Resultados e Discussão.....	90
4. Referências Bibliográficas.....	110
5. Apêndices.....	113
CAPÍTULO IV - Clonagem, expressão e caracterização parcial da fitase do fungo <i>Talaromyces pinophilus</i> em <i>Pichia pastoris</i> GS115.....	117
1. Introdução.....	119
2. Material e Métodos.....	120
3. Resultados e Discussão.....	130
4. Referências Bibliográficas.....	139
CONCLUSÕES GERAIS.....	142

LISTA DE TABELAS

Capítulo I - Revisão de Literatura

Tabela.1: Teor em fósforo dos principais alimentos utilizados na alimentação de animais não ruminantes.....	10
Tabela 2: Propriedades bioquímicas das fitases.....	20
Tabela 3: Principais fitases comerciais, empresas provedora, microrganismos produtores e hospedeiros e tipo de fitase.....	24
Tabela 4: Efeitos da suplementação com fitases fúngicas em rações para não ruminantes.....	26

Capítulo II – Genome-scale characterization of fungal phytases and a comparative study between Beta-propeller phytases and histidine acid phosphatases

Tabela 1: Physicochemical parameters predicted for histidine acid phosphatases and β -propeller phytases according to analysis by ExPasy ProtParam tool.	56
Tabela 2: Secretion parameters predicted for histidine acid phosphatases and β -propeller phytases according to analysis by signalP 4.1, ExPasy ProtParam, SecretomeP 2.0a, NetNGlyc1.0 tool.....	59
Tabela 3: Extracellular phytase activity from fungal extracts.....	64

Capítulo III – Otimização da produção da fitase do fungo *Talaromyces pinophilus* cultivado em casca de soja utilizando a metodologia de superfície de resposta

Tabela 1: Combinações de níveis, segundo Fatorial Fracionado Resolução IV, dos fatores peptona (g/L), tempo de cultivo (dias), biomassa (%), CaCl_2 (g/L) e sacarose (g/L) ensaiadas no experimento com os respectivos valores observados de atividade enzimática da fitase do fungo <i>T. pinophilus</i> em U/mL e U/mg	91
Tabela 2: Efeitos principais e de interação dos fatores estudados sobre a atividade de fitase secretada pelo fungo <i>T. pinophilus</i> em U/mL e respectivos valores calculados do teste t (T) e ρ -valores (P).....	93
Tabela 3: Efeitos principais e de interação dos fatores estudados sobre a atividade de fitase secretada pelo fungo <i>T. pinophilus</i> em U/mg e respectivos valores calculados do teste t (T) e ρ -valores (P).....	94
Tabela 4: Combinações de níveis dos fatores peptona (g/L), e sacarose (g/L), biomassa (%) e tempo (dias) ensaiados no experimento de deslocamento, com os respectivos valores observados da atividade de fitase do fungo <i>T. pinophilus</i> em U/mL e U/mg.....	96
Tabela.5: Valores observados de atividade da fitase em U/mL e em U/mg da fitase do fungo <i>T. pinophilus</i> cultivado em fermentação submersa, utilizando casca de soja moída, em experimento composto central rotacionado (DCCR).....	97
Tabela 6: Composição centesimal da casca de soja.....	98

Tabela 7: Modelos ajustados, com unidades naturais, para a atividade enzimática da fitase em U/mL e em U/mg e os respectivos valores de R^2105

Tabela 8: Concentrações de peptona e sacarose e tempo de cultivo, valores de atividade de fitase preditos e valores de desejabilidade individual calculados para atividade de fitase em U/mL e em U/mg.....107

Tabela 9: Validação do \hat{y} =U/mL na condição 1 e do \hat{y} =U/mg na condição 2.....108

Capítulo IV – Clonagem e expressão da fitase 7227 do fungo *Penicillium pinophilum* em *Pichia pastoris* GS115

Tabela 1: Condições da PCR de colônia de *E. coli* BL21 transformadas.....122

Tabela 2: Atividade específica (U/mg) e concentração total de proteínas do sobrenadante dos clones 1 e 2/2000 μ g/mL de zeocina de *P. pastoris* pPICZ α B-TEV-Phy7227 sobre o fitato em diferentes tempos de cultivo.....132

Tabela 3: Proteína identificada pela estratégia de LC-MS/MS e comparada com sequências depositadas no UniProt pelo software PEAKS.....135

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I - Revisão de Literatura

Figura 1: Estrutura do ácido fítico ou mio-inositol 1,2,3,4,5,6-hexaquisfosfato-di-hidrogenofosfato.....	9
Figura 2: Mecanismo catalítico das fosfatases ácidas de histidinas.....	14
Figura 3: Estrutura das fitases β -hélice.....	15
Figura 4: Estrutura geral da cisteína fosfatase de <i>S. ruminantium</i>	17
Figura 5: Estrutura simulada de fosfatase ácida púrpura de Arabdopsis.....	18

Capítulo II – Genome-scale characterization of fungal phytases and a comparative study between Beta-propeller phytases and histidine acid phosphatases

Figura 1: Multidimensional Scheduling.....	82
Figura 2: Alignments of phytase classified as histidine-acid family of phytases (HAP) in this study.....	80
Figura 3: Alignments of phytase classified as belonging to the β -propeller family (β PP) in this study.....	81

Capítulo III – Otimização da produção da fitase do fungo *Penicillium pinophilum* SRI-3 cultivado em casca de soja utilizando a metodologia de superfície de resposta

Figura 1: Seleção de fatores com maior efeito sobre a resposta. Gráficos de Pareto para análises de efeitos dos fatores sobre a resposta A) atividade enzimática sobre o fitato (U/mL), e B) atividade específica (U/mL) utilizando $\alpha = 0,05$ para comparação dos efeitos.....	112
Figura 2: Efeitos principais dos fatores estudados sobre: A) a atividade enzimática da fitase sobre o fitato (U/mL) e B) atividade específica (U/mg) do fungo <i>P. pinophilum</i> SRI-3. As médias mostradas foram ajustadas de acordo com os efeitos apresentados na tabela 1 Propriedades bioquímicas das fitases.....	114
Figura 3: Efeito da interação entre os fatores estudados sobre A) atividade enzimática da fitase (U/mL) sobre o fitato e; B) atividade específica (U/mg) do fungo <i>P. pinophilum</i> . As médias mostradas foram ajustadas de acordo com os efeitos apresentados na tabela 1.....	116
Figura 4: Gráficos de superfície de resposta para a atividade específica (U/mg). A) e B) em função da interação da peptona com a sacarose; C) e D) em função da interação do tempo com a sacarose e E) e F) em função da interação do tempo com a peptona.....	123
Figura 5: Gráficos de superfície de resposta, respectivamente, para a atividade enzimática da fitase (U/mL). A) e B) em função da interação da peptona com a sacarose; C) e D) em	

função da interação do tempo com a sacarose e E) e F) função da interação do tempo com a peptona.....125

Figura 6: Gráficos de otimização das respostas. A) Desejabilidade da atividade enzimática (U/mL) B) Desejabilidade da atividade específica (U/mg) C) Desejabilidade conjunta das atividades enzimática (U/mL) e específica (U/mg)130

Capítulo IV – Clonagem e expressão da fitase 7227 do fungo *Talaromyces pinophilus* SRI-3 em *Pichia pastoris* GS115

Figura 1: Esquema do vetor pPICZ α B-TEV (BR 10 2017 014488 7) e esquema de inserção da sequência codificadora da fitase 7227 entre os sítios denominados sítio de restrição e *NotI*.....120

Figura 2: Eletroforese em gel de agarose 0,9% para revelação da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) das colônias de *E. coli* BL21 pPICZ α B-TEV-Phy7227 transformadas com os primers F' α -fator e R'AOX1. MM: marcador molecular; VF: vetor pPICZ α B-TEV-Phy7227 fechado; VL: vetor pPICZ α B-TEV-Phy7227 linearizado; Col 1: colônia 1 de *E. coli* BL21; Col 2: colônia 2 de *E. coli* BL21; Col 3: colônia 3 de *E. coli* BL21; Col 4: colônia 4 de *E. coli* BL21; Col 5: colônia 5 de *E. coli* BL21; VV: vetor pPICZ α B vazio sem o gene Phy7227; CN: *E. coli* BL21 sem o vetor 11) vetor pPICZ α B-TEV-Phy7227 linearizado com *SacI* (sem PCR). Marcador molecular Thermo Fischer 1Kb Gene Ruler.....130

Figura 3: Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) da *P. pastoris* GS115 não transformada (a) clones 1 (b) e clone 2 (c). MM: Marcador molecular e tempos de cultivo de 0 a 120.....134

Figura 4: Alinhamento múltiplo de sequência da proteína identificada pela estratégia de LC-MS/MS comparada com sequências depositadas no UniProt pelo software PEAKS.....135

Figura 5: Atividade relativa (%) da fitase sobre o fitato de sódio em tampão acetato de sódio 100 mM em função de: a) curva de pH do ensaio e b) estabilidade em pH após incubação por (■) 60 min e (●) 90 min.....136

Figura 6: Atividade relativa (%) da fitase sobre o fitato de sódio em tampão acetato 100 mM pH 6,0 em função de: a) curva de temperatura de ensaio e; b) termoestabilidade da fitase a (■) 60° C e (●) 50° C.....137

LISTA DE ABREVIATURAS

P; Pi – fosfato e fosfato inorgânico

Ins – mio-inositol

Ins P; Ins P3 e Ins P6 (IP6) – mio-inositol fosfato, mio-inositol trifosfato e mio-inositol hexaquisfosfato

Ptd Ins P – fosfatidilinositol fosfato

KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

HAP – fosfatase (fitase) histidina ácida

β PP – fosfatase (fitase) em β hélice

PAP – fosfatase (fitase) ácida púrpura

PTP/ PCP – proteína tirosina/ cisteína fosfatase (fitase)

AMP; ADP e ATP – adenosina monofosfato, adenosina difosfato e adenosina trifosfato

Phy – fitase

EDTA – Ácido etilenodiamo tetra acético

FS – Fermentação submersa

FES – fermentação em estado sólido

FTU – unidade de fitase

***p*NPP** – para-nitrofenil fosfato

U/gds e U/mL – unidade enzimática por grama de substrato e unidade enzimática por mililitro

rpm – rotação por minuto

K_M e K_{Map} – constante de Michaelis-Menten e constante de Michaelis-Menten aparente

k_{cat} e k_{catap} – constante catalítica e constante catalítica aparente

$V_{m\acute{a}x}$ – velocidade máxima

RESUMO

FERREIRA, Roberta Corsino, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **Caracterização em escala genômica de fitases fúngicas, otimização da produção e expressão da fitase de *Talaromyces pinophilus***. Orientadora: Valéria Monteze Guimarães. Coorientadora: Marina Quádrio Raposo Branco Rodrigues.

Os alimentos de origem vegetal utilizados nas rações para animais possuem ácido fítico ou fitato, um fator antinutricional, devido à sua capacidade de se ligar a cátions e macromoléculas impossibilitando a absorção desses nutrientes pelos animais. Os animais não ruminantes não sintetizam ou produzem níveis insuficientes de fitase, enzima capaz de catalisar a hidrólise do fitato. Sendo assim, objetivou-se avaliar o potencial de fungos fitopatogênicos e habitantes de solo de expressão e secreção de fitases com potencial para aplicação biotecnológica na produção de ração. Dessa forma, foram selecionados doze fungos, entre ascomicetos e basidiomicetos, para uma caracterização em escala genômica por meio de uma predição *in silico* das sequências dessas enzimas. Cinquenta sequências com potencial de hidrólise do fitato foram identificadas, sendo que, trinta são classificadas como fitases pertencentes às famílias beta-hélice e das fosfatases ácidas de histidina, possibilitando o entendimento da identidade enzimática, mostrando as diferenças entre estas famílias de fitase. Os resultados sugerem que, além das fitases pertencentes à família das fosfatases ácidas de histidina, alguns fungos ascomicetos selecionados podem secretar fitases da família beta-hélice. Entre os microrganismos estudados, o fungo *Talaromyces pinophilus* foi selecionado para a otimização produção de fitase por meio da metodologia de superfície de resposta, utilizando casca de soja como substrato. Pela metodologia de superfície de resposta foi possível otimizar a produção da fitase pelo *T. pinophilus*, se mostrando uma ferramenta fundamental nesse processo ao fornecer modelos matemáticos confiáveis. A concentração de peptona e o tempo de cultivo foram os fatores que possuíram maiores efeitos nas atividades enzimáticas, tanto em U/mL como em U/mg. Enquanto a presença do cloreto de cálcio no meio promoveu uma redução na atividade. Os códons otimizados do gene 7227 do fungo *T. pinophilus* foram clonados e expressos em sistema heterólogo em *P. pastoris*. A espectrometria de massa foi utilizada para identificação da proteína recombinante confirmando a expressão. A enzima recombinante do clone 2 apresentou melhor atividade específica com 36 h de cultivo, temperatura ótima de 55° C em pH 6,0 e permaneceu estável em diferentes valores de pH (3,0-6,0), demonstrando potencial para aplicação na indústria de rações.

ABSTRACT

FERREIRA, Roberta Corsino, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. **Genomic scale characterization of fungal phytases, optimization of production and expression of phytase from *Talaromyces pinophilus*.** Advisor: Valéria Monteze Guimarães. Co-advisor: Marina Quádrio Raposo Branco Rodrigues.

Vegetals used in the animal feed have phytic acid or phytate, an antinutritional factor due to ability to bind to cations and other macromolecules, which hamful its the absorbtion of nutrients by animals. Non-ruminant animals do not synthesize or insufficiently synthesize phytase, an enzyme capable of catalyzing phytate hydrolysis. Thus, the objective was to evaluate the potential of phytopathogenic fungi and soil inhabitants of expression and secretion of phytases with potencial for biotechnological application in feed production. Thus, twelve fungi were selected for genomic scale characterization through an in silico prediction of the sequences of these enzymes. Fifty sequences with phytate hydrolysis potential were identified, and thirty are classified as phytases belonging to the beta-propeller families and histidine acid phosphatases, allowing the understanding of the enzymatic identity, showing the differences between these phytase families. The results suggest that, in addition to phytases belonging to the histidine acid phosphatase family, some selected ascomycete fungi may secrete beta-propeller phytases. Among the microorganisms studied, the fungus *Talaromyces pinophilus* was selected for the phytase production optimization by the response surface methodology, using soybean hull as substrate. By the response surface methodology it was possible to optimize the phytase production by *T. pinophilus*, proving to be a fundamental tool in this process by providing reliable mathematical models. Peptone concentration and cultivation time were the factors that had the greatest effects on enzymatic activities, both in U/mL and U/mg. While the presence of calcium chloride in the medium promoted a reduction in activity. Optimized codons of the 7227 *T. pinophilus* gene were cloned and expressed in a heterologous system in *P. pastoris*. Mass spectrometry was used to identify the recombinant protein confirming the expression. Clone 2 recombinant enzyme showed better specific activity with 36 h of culture, optimal temperature of 55 °C at pH 6.0 and remained stable at different pH values (3.0-6.0), demonstrating potential for application in feed industry.

INTRODUÇÃO GERAL

A produção animal é uma atividade dispendiosa, e os custos com a alimentação constituem cerca de 2/3 dos custos totais da produção podendo variar de acordo com o sistema utilizado (RAVINDRAN, 2013; DEBBIE, 2018). Os alimentos de origem vegetal usados na formulação das rações possuem fatores antinutricionais que interferem no processo digestivo dos animais (SHANMUGAM, 2018).

Dentre esses fatores antinutricionais, o ácido fítico se destaca pela elevação dos custos da produção, devido à necessidade de suplementação das rações com P inorgânico, visto que, é o terceiro nutriente com maior valor econômico na formulação de rações (BALWANI, CHAKRAVARTY & GAUR, 2017). Cerca de 80% do P presente em cereais e leguminosas usados nas rações está na forma de ácido fítico ou fitato. Ambos, o ácido fítico ou o fitato não podem ser digeridos e absorvidos por animais não ruminantes, e são eliminados nas fezes promovendo uma redução da eficiência produtiva dos animais e aumento da incidência de problemas ambientais relacionados como a eutrofização de corpos aquáticos (RABOY, 2003).

O ácido fítico é quimicamente descrito como mioinositol 1, 2, 3, 4, 5, 6-hexaquis dihidrogênio fosfato ou Ins P6 (IUPAC-IUBMB). O ácido fítico pode existir na forma livre ou em complexo metal-fitato, dependendo do pH e da concentração do íon metálico, formando quelatos. Da mesma forma, pode complexar com proteínas e carboidratos, sendo por isso considerado um fator antinutricional, por dificultar a absorção de minerais, a digestibilidade dos carboidratos e proteínas complexados, e conseqüentemente reduzir a energia e a disponibilidade de aminoácidos da dieta (BALWANI, CHAKRAVARTY & GAUR, 2017). O fitato pode ser removido dos grãos de cereais e leguminosas por meio de processos físico-químicos que envolvem a moagem, imersão ou extração com soluções aquosas, mas estes tratamentos também removem parte dos minerais e fibras alimentares, levando a perdas nutricionais (HURRELL, 2004). A hidrólise enzimática utilizando a fitase tem sido a forma mais eficiente para eliminar os efeitos antinutricionais do fitato, sem perdas de nutrientes e disponibilizando o fósforo e outras moléculas complexadas (SONG *et al.*, 2019).

A enzima mio-inositol hexafosfato fosfohidrolase (EC. 3.1.3.8; EC. 3.1.3.26 e EC. 3.1.3.72), também conhecida como fitase, constituem uma classe especial de fosfatases que catalisam a hidrólise sequencial do fitato, liberando ácido fosfórico e mio-inositol (e seus intermediários fosforilados) (WODZINSKI & ULLAH, 1996). As fitases podem ser sintetizadas por plantas e microrganismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Os microrganismos se destacam na produção industrial de fitases

principalmente pelo maior rendimento e eficiência de produção quando comparados a organismos superiores, como por exemplo, as plantas (ADEOLA, 2010; BHAVSAR *et al.*, 2013). Tem sido descrita a produção de fitases microbianas em fermentação submersa (FS) ou fermentação em estado sólido (FSS) (BALA *et al.*, 2014; COBAN & DEMIRCI, 2014). Estes processos de produção de fitases podem se tornar mais econômicos quando são utilizados subprodutos e/ou resíduos agroindustriais como fonte de carbono para o crescimento dos microrganismos produtores (TRIPATHI *et al.*, 2017).

As fitases podem ser classificadas como ácidas ou alcalinas, de acordo com o pH ótimo para atividade catalítica. As fitases também são classificadas de acordo com a posição inicial de hidrólise do fitato como 3-fitases, 6-fitases (principalmente microbianas) ou 5-fitases (vegetais). De acordo com o mecanismo catalítico, existem fitases pertencentes às fosfatases ácidas de histidina (HAPs), fosfatases ácidas púrpuras (PAPs), cisteína fosfatases (CPs) ou fitases β -hélice (BPPs) (LEI *et al.*, 2007).

Há cerca de 20 anos, as fitases vem sendo usadas comercialmente em dietas de aves e suínos, e as previsões indicam que seu uso continuará a crescer (AMERAH *et al.*, 2011). A indústria de enzimas para ração animal, acumulou uma receita de US \$ 1,1 bilhão em 2016, e poderá ultrapassar US \$ 2 bilhões até 2024 (USHASREE *et al.*, 2019). Entre os diferentes produtos do mercado de enzimas, a fitase constitui o maior mercado, desde 2015, com uma participação de 83,6% do total da receita industrial (GRAND VIEW RESEARCH, 2017). As principais empresas produtoras de fitases são a Novozymes (DSM), a DuPont (Danisco), a AB vista Enzymes e a BASF. O volume de vendas de fitases aumentou de 114.235 toneladas em 2012, para 152.622 toneladas em 2016, uma taxa média de crescimento de 5,96% (DIGITAL JOURNAL, 2018).

Diversos estudos têm demonstrado resultados satisfatórios em termos de desempenho animal e boa aceitação da utilização de fitases como aditivo na nutrição animal (USHASREE *et al.*, 2016; PRIYODIP *et al.*, 2017; CANGUSSU *et al.*, 2018). Em rações para suínos tem sido mostrado que a utilização de fitases equivalentes a 400 ou 500 FTU/kg é capaz de disponibilizar 0,4 até 1,08 g de P /kg ração, dependendo da fonte da enzima (ADEOLA *et al.*, 2010). Para aves, a matriz nutricional preconizada para fitase (4%, 500 FTU/kg) promove decréscimo de 17% na excreção de fósforo e redução de 6,40% no custo total da ração (JUNQUEIRA *et al.*, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2016). No entanto, o melhor desempenho animal em resposta à suplementação de fitases continua sendo uma grande limitação e um desafio para as indústrias de rações, que têm adotado a superdosagem como uma alternativa à baixa atividade da fitase. Entretanto, essa prática está estreitamente relacionada ao aumento nos custos de produção, tornando-a inviável

(LEE *et al.*, 2017). Dessa forma, a pesquisa por modelos enzimáticos mais termoestáveis, com alta atividade e específica e resistência à atividade de proteases tem sido uma alternativa para evitar a superdosagem de fitases pela indústria de rações e consequentemente reduzir o custo final da ração (DERSJANT-LI *et al.*, 2015). Além disso, para a utilização industrial da fitase, sua produção deve ser otimizada. A expressão heteróloga de proteínas é um método prático para aumentar o rendimento de um gene alvo com o desenvolvimento de vetores para expressão de proteínas em hospedeiros apropriados (DREJER *et al.*, 2018). Além disso, a engenharia de proteínas, estudos estruturais e de imobilização são alternativas para aumentar a eficiência das fitases e da sua utilização industrial (TURNER *et al.*, 2007; DREJER *et al.*, 2018).

Dessa forma, neste trabalho foi feita uma revisão de literatura, no capítulo I, abordando a classificação das fitases correlacionando as suas características bioquímicas com as suas possíveis aplicações em rações para animais, conforme a espécie e a faixa etária do animal. No capítulo II, foi realizada a caracterização em escala genômica, baseado em estudos *in silico*, de fitases potencialmente expressas por fungos fitopatogênicos e/ou habitantes do solo e a validação experimental da produção de fitases pelos fungos selecionados. Por último, foram feitas a otimização da produção de fitase do fungo *Talaromyces pinophilus*, utilizando a metodologia de superfície de resposta e a expressão heteróloga de uma das fitases deste mesmo fungo nos capítulos III e IV, respectivamente. Com isso, buscou-se o entendimento dos meios de produção, assim como, das propriedades funcionais dessas enzimas, auxiliando na busca por fitases mais adequadas para aplicação industrial.

REFERÊNCIAS

- Adeola O. Phosphorus equivalency value of an *Escherichia coli* phytase in the diets of White Pekin ducks. 2010. *Poultry Science*. 89, 1199–1206.
- Amerah, A.M.; Gilbert, C.; Simmins, P.H.; Ravindran, V. 2011. Influence of feed processing on the efficacy of exogenous enzymes in broiler diets. *World's Poultry Science Journal*. 67.
- Bala, A.; Sapna; Jain, J.; Kumari, A.; Singh, B. 2014. Production of an extracellular phytase from a thermophilic mould *Humicola nigrescens* in solid state fermentation and its application in dephytinization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 3, 259–264. 24
- Balwani, I.; Chakravarty, K. & Gaur, S. 2017. Role of phytase producing microorganisms towards agricultural sustainability. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 12 (March), 23–29.
- Cangussu, A.S.R.; Aires, A.D.; Aguiar, R.W.S.; Bordignon-Junior, S.E.; Viana, K.F.; Barbosa, L.C.B.; Cangussu, E.W.D.S.; Brandi, I.V.; Portella, A.C.F.; Dos Santos, G.R.; Sobrinho, E.M.; Lima, W.J.N. 2018. Characterization of the catalytic structure of plant phytase, protein tyrosine phosphatase-like phytase, and histidine acid phytases and their biotechnological applications. *Enzyme Research*.
- Coban, H. B. & Demirci, A. 2014. Screening of phytase producers and optimization of culture conditions for submerged fermentation. *Bioprocess and biosystems engineering*. 37, 4, 609-616.
- Debbie, J. 2018. 4-Step Guide to Pig Feeding and Rations. *Farmers Weekly*.
- Dersjant-Li, Y.; Awati, A.; Schulze, H. And Partridge, G. 2015. Phytase in nonruminant animal nutrition: a critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. *Journal of Science of Food and Agriculture*. v.95, p.878–96.
- Digital Journal, 2018. Global Phytases Market Will Grow at a CAGR 7.9% and Reach USD 590 Million by 2023, from USD 380 Million in 2017. <http://www.digitaljournal.com/pr/3879134>.
- Drejer, E.B., Hakvag, S., Irla, M., Brautaset, T. 2018. Genetic tools and techniques for recombinant expression in thermophilic Bacillaceae. *Microorganisms*. 10 (6(2)).
- Grand View Research. Animal Feed Enzymes Market Analysis by Product (Phytases, Carbohydrases, proteases), by Formulation (Liquid, Dry), by Application (Poultry, Pigs, Ruminant, Pets, Aqua), by, and Segment Forecasts, 2018–2025. Report ID:GVR-1-68038–759-9.2017.

- Hurrell, R.F. Phytic acid degradation as a means of improving iron absorption. 2004. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. 74, 445–452.
- IUPAC-IUB Commission On Biochemical Nomenclature (CBN). Nomenclature of cyclitols, recommendations (1973) *Biochemistry Journal*, 153, 23-31 (1976); *Europe Journal Biochemistry*, 57, 1-7 (1975); *Pure Applied Chemistry*, 37, 285- 297 (1974).
- Junqueira, O.M.; Filardi, R.S.; Ligeiro, E.C.; Casartelli, E.M.; Sarah Sgavioli, S.; Assuena, V.; Duarte, K. F.; Laurentiz, A. C. 2010. Avaliação técnica e econômica da matriz nutricional da enzima fitase em rações contendo farelo de girassol para poedeiras comerciais. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 39, 10, 2200-2206.
- Lamid, M., Al-Arif, A., Asmarani, O., Warsito, S.H. 2018. Characterization of phytase enzymes as feed additive for poultry and feed. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 137 (1). 25
- Lee, S. A., D.; Nagalakshmi, M. V. L. N.; Raju, S. V.; Rama Rao, & M. R. Bedford. 2017. “Effect of Phytase Superdosing, Myo-Inositol and Available Phosphorus Concentrations on Performance and Bone Mineralisation in Broilers.” *Animal Nutrition*. 3, 247–251. doi:10.1016/j.aninu.2017.07.002
- Lei, X.G., J.M. Porres, E.J. Mullaney And H. Brinch-Pedersen. 2007. Phytase: source, structure, and application. In: *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications* (Polaina, J. and Maccabe, A.P., eds). New York: Springer, Dordrecht, The Netherlands. 505-529.
- Priyodip, P.; Prakash, P.Y.; Balaji, S. 2017. Phytases of probiotic bacteria: characteristics and beneficial aspects. *Indian Journal Microbiology*. 57, 2, 148–154.
- Raboy, V. Myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. *Phytochemistry*. 2003. 64, 1033–1043.
- Ravindran, V., 2013. Feed enzymes: the science, practice, and metabolic realities. *Journal Applied Poultry Research*. 22, 3, 628.
- Ribeiro Jr., V.; Salguero, S.C.; Gomes, G.; Barros, V.R.S.M.; Silva, D.L.; Barreto, S.L.T.; Rostagno, H.S.; Hannas, M.I.; L.F.T. Albino, L.F.T. 2016. Efficacy and phosphorus equivalency values of two bacterial phytases (*Escherichia coli* and *Citrobacter braakii*) allow the partial reduction of dicalcium phosphate added to the diets of broiler chickens from 1 to 21 days of age. *Animal Feed Science and Technology*. 221, 226–233.
- Song, H.Y; Sheikha, A.F.; Hu, D.M. 2019. The positive impacts of microbial phytase on its nutritional applications. *Trends in Food Science & Technology*. 86, 553- 562.

- Tripathi, P., Garg, S., Panwar, D., Panwar, D., Kaira, G.S., Kumar, R., Kapoor, M. 2017. Phytase from *Citrobacter koseri* PM-7: Cost-Effective Production Using Agro-Industrial Residues, Biochemical Characterization and Application in dePhytinization. *Waste Biomass Valorization*. 8, 4, 1105–1119.
- Turner, P.; Mamo, G.; Karlsson, E.N. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microbial Cell Factories* 6, 9. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-9>. Published 2007 Mar 15.
- Ushasree, M. V.; Jaiswal, A.K. Krishna, S.; Pandey, A. 2019. Thermostable phytase in feed and fuel industries. *Bioresource Technology*. 278, 400-407.
- Ushasree, M.V., Vidya, J., Pandey, A. 2016. Other enzymes phytases. In: Pandey, A., Negi, Soccol, C. (Eds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products*. Elsevier. 309–333.
- Wodzinski, R.J. And Ullah, A.H.J. 1996. Phytase. *Advances in Applied Microbiology, Scientific Research*. 42, 263-302.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar em escala genômica as fitases potencialmente expressas por fungos fitopatogênicos e/ou habitantes do solo, visando a otimização da produção e expressão heteróloga de uma fitase de *Talaromyces pinophilus*.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Prospectar e caracterizar *in silico* fitases não estudadas e potencialmente expressas por fungos fitopatogênicos e habitantes do solo com genoma sequenciado
- Validar o potencial de secreção das fitases pelos fungos cultivados em fermentação sólida e fermentação submersa;
- Selecionar os fatores controláveis importantes para a otimização da produção da fitase pelo fungo *Talaromyces pinophilus*, utilizando a metodologia de superfície de resposta e validar o modelo obtido nas combinações ótimas;
- Otimizar o gene de uma fitase da família das fosfatases ácida de histidina de *Talaromyces pinophilus* e realizar a expressão heteróloga em *P. pastoris*;
- Realizar a caracterização bioquímica parcial da fitase recombinante expressa em *P. pastoris*.

CAPÍTULO I

Revisão de Literatura

1 – Ácido Fítico

O mio-inositol 1,2,3,4,5,6-hexaquisfosfato-di-hidrogenofosfato (Figura 1) é uma fonte primária de fósforo essencial para a reserva deste e outros nutrientes para a germinação de sementes e crescimento das plantas (LOEWUS, 2002; TAHIR *et al.*, 2012).

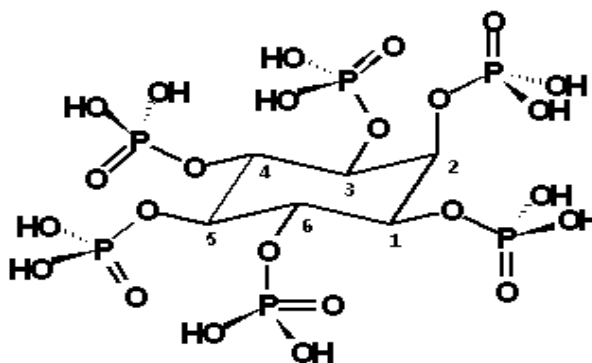


Figura 1 – Estrutura do ácido fítico ou mio-inositol 1,2,3,4,5,6-hexaquisfosfato-di-hidrogenofosfato (IUPAC, 1968)

Em seu estado natural é referido como ácido fítico, no entanto, seus sais são designados como fitatos. Eles são em sua maioria presentes como sais de cátions mono e divalentes como K^+ , Na^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} (RABOY, 2003). Muitas nomenclaturas são utilizadas para o ácido fítico na literatura, podendo ser denominado de mio-inositol 1,2,3,4,5,6-hexaquis (dihidrogênio) fosfato, mio-inositol hexaquisfosfato, Ins (1,2,3,4,5,6) P6, InsP6 ou IP6 (DURELL & GARLANT, 1968; RABOY, 2003). O mio-inositol é o isômero do inositol mais abundante na natureza (ALMEIDA *et al.*, 2003; DUCHEK, ADAMS & HUDLICK, 2011). Dentre os isômeros do inositol, o mio-inositol é o único que pode ser produzido pela síntese “de novo” a partir da D-glicose-6-fosfato, enquanto os outros isômeros são sintetizados a partir mio-inositol (MICHELL, 2008).

O ácido fítico é originado a partir da fosforilação completa do mio-inositol por duas vias biossintéticas (GREINER *et al.*, 2002). O mio-inositol pode ser diretamente fosforilado, até formar o ácido fítico ou então pode ser convertido em intermediários fosfatidilinositol fosfato (Ptd Ins P), até completar a fosforilação (RABOY *et al.*, 2002). Após o florescimento das plantas, inicia-se a sua biossíntese e o ácido fítico formado se acumula durante a maturação das sementes (BOHN *et al.*, 2008).

1.1 – Fitato como fator antinutricional

A maior parte das rações para animais não ruminantes é composta por ingredientes de origem vegetal. Entretanto, esses alimentos possuem fatores antinutricionais como o ácido fítico (SINGH *et al.*, 2011a).

Na tabela 1 são apresentados alguns dos alimentos de origem vegetal que são utilizados nas formulações de rações para animais não ruminantes, e os seus respectivos valores percentuais de fósforo total, fósforo disponível e fósforo fítico.

Tabela 1 – Teor em fósforo dos principais alimentos utilizados na alimentação de animais não ruminantes.

Alimento	% de fósforo (P)*		
	P total	P disponível ¹	P fítico
Farelo de algodão (39%)	1,03	0,44	0,59
Farelo de arroz desengordurado	1,89	0,28	1,61
Farelo de girassol	1,03	0,34	0,69
Milho (grão moído)	0,25	0,06	0,19
Casca de soja	0,15	0,12	0,03
Farelo de soja (48%) ²	0,63	0,24	0,39
Farelo de trigo	0,97	0,33	0,64

* Em matéria natural. Adaptado das Tabelas Brasileiras de Requisitos Nutricionais e Composição de Alimentos para Aves e Suínos (2011). ¹Valores calculados ou estimados. ²Percentual de proteína bruta.

O ácido fítico liga-se a aminoácidos carregados positivamente, como arginina, histidina e lisina, formando complexos proteína-fitado, tornando a proteína complexada resistente à digestão pela pepsina (Ravindran, Bryden, & Kornegay, 1995), tripsina, quimotripsina (Deshpande & Damodaran, 1989), lipase (Knuckles, 1988) e amilase (KNUCKLES & BETSCHART, 1987). Nesse caso, a inibição da digestibilidade do amido é correlacionada linearmente com o grau de fosforilação do inositol, em que os ésteres de fosfato de inositol interagem de forma não competitiva com a amilase, que consequentemente, tem a atividade enzimática reduzida devido à redução da solubilidade e/ou bloqueio dos sítios ativos (CHERYAN, 1980). A ligação fitato-proteína é forte em meios ácidos com pH inferior a 5, sendo em meios cujos valores de pH próximos são próximos à neutralidade, a interação é mais fraca e podendo envolver cátions divalentes, que são cofatores de enzimas (KNUCKLES & BETSCHART, 1987). Adicionalmente, o ácido fítico pode aumentar as perdas endógenas de aminoácidos (Cowieson, Ravindran

& Selle, 2008) como consequência do aumento da secreção de enzimas digestivas e mucinas ou da redução da reabsorção dos aminoácidos.

A ingestão de fitato também reduz o índice glicêmico, dada a formação de complexos com carboidratos dos alimentos. Dessa forma, reduz a solubilidade e afeta a digestibilidade e absorção de glicose (LEE *et al.*, 2006). Assim como, ocorre com a amilase o fitato também interage com a lipase e a redução da solubilidade dos lipídeos dificulta o acesso ao sítio ativo (CHERYAN, 1980). Além disso, o fitato pode atuar impedindo a oxidação de lipídeos, devido à quelação com íons metálicos, como o ferro que são os principais catalisadores dessas reações, com isso a digestibilidade dessas moléculas diminui (LIU *et al.*, 2010). Os lipídeos combinados ao fitato de cálcio podem formar sabões metálicos no lúmen intestinal de aves e outros animais, resultando em digestão reduzida de gorduras saturadas (LEESON, 1993).

Os complexos insolúveis formados pelo fitato com proteínas e íons metálicos são carregados negativamente e também são poluidores em potencial (KEBREAB *et al.*, 2012). Aproximadamente, 70% do P total da alimentação de animais não ruminantes em confinamento é excretado na forma de fitato (BALWANI, CHAKRAVARTY & GAUR, 2017). Sendo assim, a suplementação de fósforo inorgânico tem sido utilizada nas rações para compensar a baixa absorção de fósforo fítico. Por outro lado, a excreção de fitato por esses animais tem causado problemas ambientais (KEBREAB *et al.*, 2012). Os níveis elevados de fitato e fósforo inorgânico excretados chegam aos corpos d' água, por meio de lixiviação ou escoamento superficial, podendo levar à eutrofização de águas superficiais e o florescimento de algas (SCHINDLER *et al.*, 2016).

A poluição por fósforo constitui uma grande preocupação na pecuária intensiva, sendo o melhor aproveitamento do fósforo pelos animais uma alternativa para reduzir o requerimento de suplementação de P nas rações e diminuir a poluição de corpos aquáticos (SELLE & RAVINDRAN, 2007, 2008; SINGH *et al.*, 2011b.).

O ácido fítico pode ser removido dos grãos e sementes de cereais e leguminosas por várias metodologias, incluindo métodos físicos, químicos e biológicos. O cozimento, a imersão e a autoclavagem são métodos físicos que reduzem o teor de fitato em cereais e sementes oleaginosas (IBRAHIM *et al.*, 2002). No entanto, esses métodos possuem correlação entre o tempo do processamento e a quantidade de ácido fítico presente nos grãos, além disso, perdas de alguns minerais podem ocorrer inviabilizando os processos (RAMADAN, 2012; ERTAS & BILGIÇLI *et al.*, 2014). Os métodos químicos de extração do fitato incluem as cromatografias (DUONG *et al.*, 2017) e os tratamentos ácido/básico.

Dentre os métodos biológicos pode-se citar: o uso de enzimas (fitases), naturalmente encontradas nas sementes e grãos durante a germinação; melhoramento genético de plantas, gerando cultivares “livre” de fitato; e melhoramento genético de animais, gerando animais transgênicos capazes de sintetizar fitase endógena (ENVIROPIG™, 2011). Durante a germinação, em grãos de cereais e leguminosas, o fitato é hidrolisado pela fitase endógena, assim o fosfato é disponibilizado gradativamente para o desenvolvimento da planta. A atividade da enzima aumenta com o avançar do processo germinativo (GREINER E KONIETZNY, 2006). O método considerado mais eficiente para remoção do ácido fítico de grãos e cereais é a hidrólise catalisada por fitase, devido ao alto rendimento e eficiência e a pequena perda de minerais ou proteínas relacionadas ao processo (GUPTA *et al.*, 2015).

A desfosforilação de fitato por meio da hidrólise enzimática promove uma melhoria no valor nutricional porque a remoção de grupos fosfato a partir do anel inositol aumenta a biodisponibilidade de minerais essenciais na dieta (SINGH, 2013).

2 – Fitase

As fitases, mio-inositol hexafosfato fosfohidrolase (EC. 3.1.3.8; EC. 3.1.3.26 e EC. 3.1.3.72) são enzimas da classe das fosfatases que catalisam a hidrólise do ácido fítico, uma forma orgânica de fósforo não digerível por animais não ruminantes existente em grãos, sementes e óleos de sementes (VOHRA & SATYANARAYANA, 2003; SINGH *et al.*, 2011b). As fitases são a forma mais eficiente de remoção do fitato pois não diminuem o valor nutricional dos alimentos, ao contrário, elas enriquecem as rações por disponibilizarem o fosfato e outros nutrientes essenciais à dieta dos animais (SONG *et al.*, 2018).

2.1 – Classificação das fitases

As fitases podem ser classificadas segundo a posição onde se inicia a hidrólise dos grupamentos fosfato, segundo o pH de atividade e segundo as diferenças estruturais e catalíticas (KUMAR & SINHA, 2018).

2.1.1 – Posição onde se inicia a hidrólise

Essa classificação é baseada no ataque preferencial ao átomo de carbono presente no anel do ácido fítico de acordo com a classificação da Comissão de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NCIUBMB), com a Comissão IUPAC-IUBMB e pela Nomenclatura Bioquímica (JCBN). Primeiramente, foram descritos apenas dois tipos de fitases, a 3-fitase (EC 3.1.3.8) e a 6-fitase (EC 3.1.3.26).

As 3-fitases liberam como o primeiro produto 1,2,4,5,6-pentaquisfosfato, e 6-fitases liberam 1,2,3,4,5 pentaquisfosfato, juntamente com P inorgânico. Posteriormente, foram descritas outras fitases tais como 1, 4 e 5-fitases (LEI *et al.*, 2013).

As fitases apresentam uma forte preferência pelos grupos fosfatos dispostos equatorialmente. A catálise da hidrólise do fosfato na posição axial encontra maior resistência, em relação às outras posições (BLÜHER *et al.*, 2017). Dessa forma, fitases classificadas como 2-fitase são menos ativas em comparação às fitases dos tipos 3 e 6, por exemplo, já que o grupo fosfato ligado ao C2 está disposto axialmente na estrutura do anel de mio inositol, como mostrado na Figura 1 (MENEZES-BLACKBURN *et al.*, 2015).

2.1.2 – De acordo com o pH de atividade

As fitases também podem ser classificadas de acordo com o pH de melhor atividade da enzima. As fitases que possuem melhor atividade catalítica numa faixa de pH entre 2,5 e 6,0 são classificadas como fitases ácidas, enquanto, aquelas que atuam melhor em pH 7,0 ou 8,0 são consideradas fitases alcalinas (OH *et al.*, 2004; KUMAR *et al.*, 2017).

As fitases ácidas são comumente produzidas por fungos, bactérias gram (-), como a *Escherichia coli* e leveduras, ao passo que as fitases alcalinas são produzidas por grupos específicos de bactérias como as do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas*, podendo também ser encontradas em algumas plantas como no pólen de lírio (BHAVSAR, KUMAR & KHIRE, 2011).

2.1.3 – Diferenças estruturais e catalíticas

As fosfatases que catalisam a hidrólise do ácido fítico e/ou fitato podem ser bem diferentes quanto à estrutura e sítios ativos (YAO *et al.*, 2011). Baseado na geometria do sítio ativo e no mecanismo catalítico, as fitases são agrupadas em quatro classes distintas (LEI *et al.*, 2013). As fitases de diferentes classes possuem mecanismos catalíticos distintos que são determinados pela combinação de sítios conservados da enzima: um sítio ativo, um sub sítio de ligação, sítios iônicos de ligação, bem como outros sítios chave que formam motivos únicos que permitem classificar estruturalmente as fitases (FAN *et al.*, 2013). De acordo com as características catalíticas e estruturais, as fitases podem ser classificadas em quatro grandes classes descritas a seguir.

A) Fosfatase ácida de Histidina

As fitases microbianas, em sua maioria, pertencem às subfamílias das fosfatases de histidina e apresentam propriedades bioquímicas, estereoespecificidade e cinética bem diversificadas (WU *et al.*, 2014).

O mecanismo de catálise das fosfatases ácidas de histidina produzidas por *Escherichia coli* SixA consiste na fosforilação e desfosforilação de um resíduo de histidina (His8) (LEE *et al.*, 2003). A transferência em linha do grupo fosfato do substrato para a enzima ocorre com a participação dos resíduos de aminoácidos (Arg-His-Gli-X-Arg-X- Pro), onde o x representa qualquer resíduo de aminoácido, que possa ocupar os sítios nessas posições no heptapeptídeo que compõem a assinatura do sítio catalítico das enzimas dessa família, conforme mostrado na Figura 2 (RIGDEN, 2008; BALABAN *et al.*, 2018). As ligações de hidrogênio formadas entre estes resíduos do sítio catalítico e o grupo fosfato, antes, durante e após a transferência, gera um 'bolsão de fosfato' (LEE *et al.*, 2003).

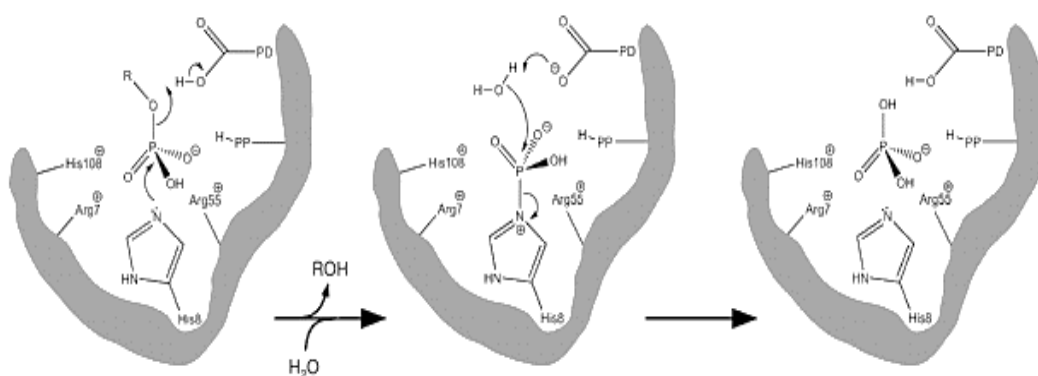


Figura 2 – Mecanismo catalítico das fosfatases ácidas de histidinas (RIGDEN, 2008).

De acordo com Yao *et al.* (2011) a estrutura cristalina da fitase de *Aspergillus ficuum* em resolução 2-5 Å revelou três domínios distintos: um domínio maior, α -helicoidal; um domínio β -folha, e um domínio menor, α -helicoidal. A estrutura cristalina da fitase de *Escherichia coli* mostrou dois domínios, um contendo cinco α -hélices e duas β -folhas, e outro incluindo seis α -hélices e nove β -folhas (LIM *et al.*, 2000; WU *et al.*, 2014).

B) Fosfatases em β -hélices (alcalinas)

As fitases em β -hélice, também conhecidas como fitases alcalinas, são produzidas, principalmente, por bactérias gram positivas do gênero *Bacillus* (BALABAN *et al.*,

2016). Estas fitases apresentam alta atividade em valores de pH próximos ao neutro, exibem atividade em temperaturas relativamente mais elevadas e apresentam maior resistência à ação de proteases em ambiente intestinal quando comparadas a fitases de outros grupos (BORGHI *et al.*, 2015). O peso molecular das fitases classificadas como alcalinas é de aproximadamente 36 kDa (BALABAN *et al.*, 2016). As fitases alcalinas, em geral, apresentam uma alta especificidade para o ácido fítico e fitato de cálcio e não possuem atividade significativa sobre outros ésteres de fosfato (KUMAR *et al.*, 2017).

A estrutura das enzimas β -hélice revela uma arquitetura de dobramento diferente, sendo formada por uma hélice de seis pás (CHEN *et al.*, 2011; KUMAR *et al.*, 2017). A família de fitases formada pelas enzimas que apresentam a conformação de β -hélice apresenta dependência de íons Ca^{2+} (OH *et al.*, 2006). A estrutura cristalina da fitase de *Bacillus amyloliquefaciens* (O66037) revelou a existência de seis íons Ca^{2+} , sendo que três deles possuem ligação de alta fidelidade e são necessários para a estabilidade da enzima, como pode ser observado na Figura 3 (FAN *et al.*, 2013).

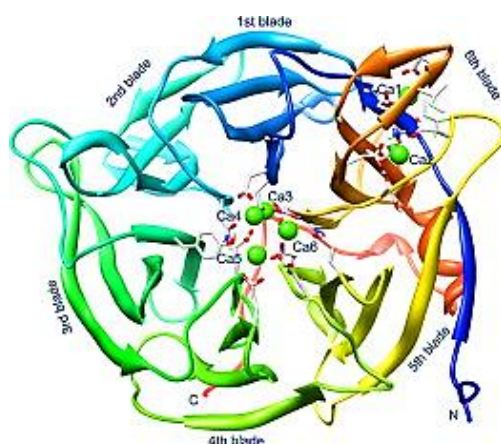


Figura 3 – Estrutura das fitases β -hélice (CHEN *et al.*, 2015).

Os outros três íons Ca^{2+} formam uma tríade de baixa afinidade por seis resíduos de glutamato e aspartato carregados negativamente, criando um ambiente eletrostático favorável para a ligação do ácido fítico (FAN *et al.*, 2013; KUMAR *et al.*, 2017). A ausência de íons Ca^{2+} pode levar à perda da atividade das fitases β -hélice devido à mudança na conformação revelada pelas diferenças nos espectros de dicroísmo circular da fitase de *Bacillus amyloliquefaciens* (O66037) (OH *et al.*, 2001; SHIN *et al.*, 2001).

As porções C-terminais das fitases alcalinas são relativamente conservadas, com a presença de um motivo **DG** (Asp e Gly), já as porções N-terminais apresentam uma grande diversidade de motivos pouco conservados (OH *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2011).

A asparagina (Asn) presente na região C-terminal é um importante resíduo catalítico que doa prótons para o átomo de oxigênio da ligação fosfomonoéster (KUMAR *et al.*, 2014).

C) Proteína Tirosina/Cisteína Fosfatase

A proteína tirosina/cisteína fosfatase apresenta um arranjo estrutural conservado no sítio ativo, (**His-Cys-X-X-Gli-X-X-Arg**), localizado em uma estrutura de dois laços, situado numa bolsa rasa perto da extremidade do domínio em direção ao C-terminal (BLÜHER *et al.*, 2017; SHARMA *et al.*, 2018). A estrutura das PCP/PTP, possibilita uma proximidade entre a cisteína catalítica (nucleófilo) e a arginina envolvida na ligação ao grupamento fosfato do fitato (PUHL, GREINER & SELINGER, 2008). O átomo de cisteína ou tirosina, dependendo da proteína, é o nucleófilo no sítio catalítico destas enzimas, levando à formação do intermediário tirosinil ou cisteinil-fosfato, ao passo que a arginina está envolvida tanto na ligação do substrato quanto na estabilização da reação intermediária (PUHL, GREINER & SELINGER, 2008; BLÜHER *et al.*, 2017). O mecanismo catalítico da reação PTP requer a participação de um ácido geral e uma base geral (CHU *et al.*, 2004; WEBER *et al.*, 2014).

O substrato se liga à bolsa de ligação ao fosfato da enzima pela coordenação de dois átomos de oxigênio presentes no grupo fosforil com a cadeia lateral de guanidínio do resíduo de arginina no sítio ativo conservado (PUHL, GREINER & SELINGER, 2008; BLÜHER *et al.*, 2017). As ligações amida N-H estabilizam o grupo fosforil no complexo enzima-substrato e o ânion tiolato de cisteína na enzima não complexada. (CHU *et al.*, 2004). O resíduo conservado de histidina e a hélice que segue a alça conservada de ligação ao fosfato. A histidina não se liga diretamente ao hidrogênio com cisteína mas faz parte de uma rede de ligação de hidrogênio que finalmente polariza os grupos amida N-H na alça de ligação ao fosfato e fornece microdipolos positivos orientado para a cisteína (CHU *et al.*, 2004; WEBER *et al.*, 2014). Na hidrólise enzimática do fosfomonoéster da tirosina ocorre a formação de um intermediário fosfoenzima que é transferido para o resíduo de cisteína conservado em HCXXGXXRS (T) para formar um intermediário de fosfato de tiol. Em seguida, o resíduo de cisteína é desprotonado em pH fisiológico e atua como nucleófilo atacando o centro de fósforo do substrato. A saída do do peptídeo contendo tirosina é facilitada pela doação de prótons do resíduo de ácido aspártico conservado (PUHL, GREINER & SELINGER, 2008; BLÜHER *et al.*, 2017).

As proteínas tirosina/cisteína fosfatases apresentam uma atividade máxima em temperaturas entre 50 e 55°C, valores de pH entre 4,0 e 5,0. Além disso, os cátions de

chumbo promovem o aumento na atividade dessas enzimas, enquanto os cátions de ferro, mercúrio e zinco atuam como fortes inibidores (CHU *et al.*, 2004).

Na superfamília da proteína fosfatase de tirosina (PTP) de *Selenomonas ruminantium*, bactérias anaeróbias habitantes do rúmen, o motivo de aminoácido conservado Cys-X₅-Arg é a característica mais marcante, onde se localiza o sítio catalítico "P-loop" (ligação-fosfato) da PTPHyA, conforme mostrado na Figura 4 (CHU *et al.*, 2004; BLÜHER *et al.*, 2017).

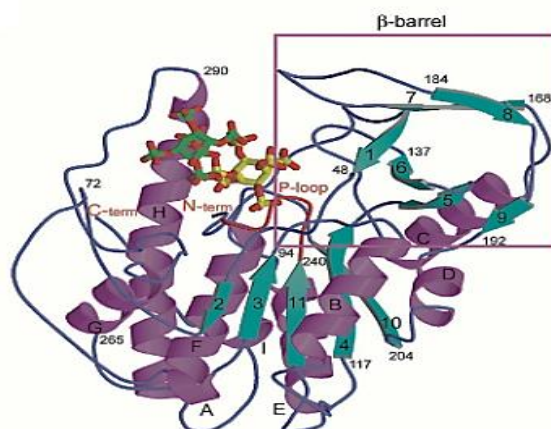


Figura 4 - Estrutura geral da cisteína fosfatase de *S. ruminantium* (CHU *et al.*, 2004).

D) Fosfatase ácida púrpura

As fitases do grupo fosfatase ácida púrpura (PAP) catalisam a hidrólise do fitato presente nas plantas liberando fosfato inorgânico e ésteres fosfóricos de mio-inositol, que servem como fonte de P na germinação de sementes, na adaptação da planta aos estresses abióticos e oxidativos e na adaptação ao NaCl (LI *et al.*, 2012). As fosfatases ácidas púrpuras (PAPs) são enzimas pertencentes à superfamília das metalofosfoesterases e podem ser produzidas por diversos tipos de organismos e por isso, são chamadas de cosmopolitas (LI *et al.*, 2012; WONGKAEW *et al.*, 2013). As PAPs podem ser produzidas por animais, plantas, bactérias e fungos. Entretanto, a maioria das enzimas dessa família já caracterizadas foram identificadas em sementes de plantas, principalmente cereais e leguminosas (WONGKAEW *et al.*, 2013).

As fitases do grupo PAP apresentam um centro de metal binuclear formado por Fe³⁺ e Fe²⁺ (em animais) ou Fe³⁺ e Zn²⁺ ou Fe³⁺ e Mn²⁺ (em plantas), os quais são fundamentais para o funcionamento das PAPs, sendo que a sua retirada ou sua substituição pode levar à perda de atividade enzimática (BHADOURIA *et al.*, 2017). As

fitases PAP possuem sete resíduos de ligação de metal conservados (AspXGli-Gli**Asp**XX**Tir**-Gli**Asn**His (Asp/Glu) -ValXX**His**-Gli**His**X**His**; os resíduos em negrito indicam os resíduos onde se ligam os metais, e x representa os sítios que podem ser ocupados por quaisquer aminoácidos), os quais formam um centro bimetálico responsável pela atividade catalítica sobre o fitato (LI *et al.*, 2012; BHADOURIA *et al.*, 2017) como mostrado na Figura 5.

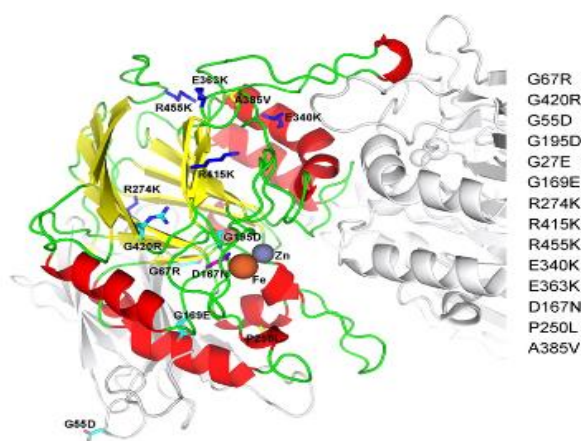


Figura 5 – Estrutura simulada de fosfatase ácida púrpura de *Arabidopsis* (Wang *et al.*, 2011).

As fitases ácidas púrpuras também atuam sobre uma ampla gama de substratos, no entanto, possuem uma maior afinidade pelo fitato. As PAPs são induzidas por baixas quantidades de fosfato inorgânico presente nas plantas, o que explica a necessidade da enzima em catalisar a hidrólise do fitato e liberar o Pi para a germinação de sementes, e também são importantes no metabolismo de ROS (espécies reativas de oxigênio), nitrogênio, celulose e metabolismo do carbono (LI *et al.*, 2012).

3 – Organismos produtores e técnicas de produção de fitases

As fitases podem ser produzidas a partir de inúmeras fontes, incluindo plantas, animais e microrganismos. Apesar da ampla distribuição em vegetais, a produção de fitase a partir de plantas é considerada ineficiente e dispendiosa, necessitando de desenvolvimento metodológico (BITAR & REINHOLD, 1972; GUPTA *et al.*, 2015). As fitases de animais são encontradas em fígado de vitelo, no sangue de animais vertebrados inferiores, a exemplo de aves, répteis e peixes, e na borda em escova do intestino de aves (NELSON *et al.*, 1976). Além de plantas e animais, fitases podem ser secretadas por vários microrganismos incluindo bactérias, leveduras e fungos filamentosos (SHANMUGAM, 2018).

Fitases bacterianas podem ser produzidas a partir de *Lactobacillus*, *Pseudomonas* e *Mycobacterium*, por exemplo. As bactérias anaeróbias no rúmen são capazes de produzir fitases, mesmo na presença de um elevado nível de fosfato (AWAD *et al.*, 2014; HAESE *et al.*, 2016). Já os fungos mais promissores na produção de fitase são aqueles pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium* e *Rhizopus* spp. os quais foram testados para a produção de fitases extracelulares glicosiladas (GONTIA-MISHRA *et al.*, 2013). A fitase de *Aspergillus niger* foi a primeira a ser produzida comercialmente (ZHANG *et al.*, 2010, BUDDHIWANT *et al.*, 2015). Entretanto, algumas espécies de leveduras tais como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schwanniomyces castelli* e *Schizophyllum commune* também têm sido relatadas como produtores potenciais de fitases extracelulares glicosiladas (SINGH *et al.*, 2011a).

As propriedades bioquímicas de algumas fitases já estão caracterizadas na literatura (Tabela 2). Ainda há uma necessidade de busca por novos organismos com potencial para a produção de fitase, visto que, as enzimas já caracterizadas ainda não abrangem todas as propriedades de interesse para aplicação na formulação de rações para animais como, por exemplo, atividade em ampla faixa de pH, termoestabilidade em altas temperaturas e resistência à atividade de proteases gastrointestinais (KHAN *et al.*, 2013).

Tabela 2 – Propriedades bioquímicas das fitases

Fonte	Meio de cultivo	Atividade Enzimática	Temperatura (°C)	pH	Referência
Bactérias					
<i>Bacillus licheniformis</i>	SmF (recomb)	5,45 U/mg	75,0	7,0	Borgi <i>et al.</i> , (2014)
<i>Selenomonas ruminantium</i>	SmF (recomb)	16,23 U/mg	55,0	5,0	Puhl, Greiner & Selinger, (2008)
<i>Klebsiella pneumoniae 9-3B</i>	SmF (recomb)	13,60 U/mg	50,0	4,0	Escobin-Mopera <i>et al.</i> , (2012)
<i>Shigella sp.</i>	SmF (recomb)	176,00 U/mL	60,0	5,5	Pal Roy <i>et al.</i> , (2016)
<i>Bacillus subtilis</i> B.S. 46	SmF (recomb)	4,59 U/mL	57,5	9,5	Rocky-Salimi <i>et al.</i> , (2016)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	SmF - PSM	36,60 U/mL	50,0	5,5	Muslim <i>et al.</i> , (2018)
<i>Bacillus megaterium</i>	SmF	14,50 U/mL	60,0	7,0	Demirkan <i>et al.</i> , (2017)
<i>Lactobacillus coryniformis</i> MH121153	SmF	97,08 U/mL	60,0	5,0	Demir, Dikbas & Beydemir, (2018)
<i>Enterobacter sp.</i> ACSS	SSF	153,20 U/mL	60,0	2,5	Chanderman <i>et al.</i> , (2016)
Fungos					
<i>Aspergillus flavus</i> ITCC 6720	SSF	46,53 U/mg	45,0	7,0	Gaind & Singh (2015)
<i>Aspergillus tubingensis</i> SKA	SSF	60,89 U/mL	30,0	5,5	Qasim <i>et al.</i> , (2017)
<i>Rhizopus microsporus var. microsporus</i>	SSF	53,03 U/mL	55,0	4,5	Sato <i>et al.</i> , (2016)
<i>Aspergillus niger</i>	SSF	54,56 U/mL	56,0	5,3	Neima - Vielma <i>et al.</i> , (2018)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	SSF	0,77 U/mg	30,0	7,0	Hassan & Al-Jabory, (2016)
<i>Aspergillus niger</i> UFV-1	SmF	186,60 U/mg	60,0	2,0	Monteiro <i>et al.</i> , (2015)

Tabela 2 – Propriedades bioquímicas das fitases (continuação).

Fungos	Método de fermentação	Atividade enzimática	Temperatura (°C)	pH	Referência
<i>Ganoderma sp.</i> MR-56	SmF	14,50 U/mL	60,0	4,0	Salmon <i>et al.</i> , (2016)
<i>Rhizopus stolonifer</i>	SmF	–	65,0	5,0	Monteiro <i>et al.</i> , (2012)
<i>Penicillium oxalicum</i> PJ3	SmF	0,96 U/mg	55,0	4,5	Lee <i>et al.</i> , (2015)
<i>Kluyveromyces lactis</i>	SmF	72,00 U/mg	55,0	5,0	Usharee <i>et al.</i> , (2014)
<i>Aspergillus niger</i> NCIM 536	SmF	160 U/mL	50,0	2,5	Shah <i>et al.</i> , (2017)
<i>Candida tropicalis</i> NCIM3321	SmF	1,95 U/mL	70,0	4,5	Puppala <i>et al.</i> , (2018)
<i>Thermomyces lanuginosus</i> IMI 096218	SmF	2,5 U/mL	70,0	5,5	Bujna <i>et al.</i> , (2016)
<i>Aspergillus ficuum</i>	SmF	1,82 U/gds	27,0	8,2	Tian & Yuan, (2016)
<i>Muscodor sp.</i>	SmF	4,10 U/mg	30,0	5,0	Alves <i>et al.</i> , (2016)
<i>Thermomyces lanuginosus</i> SSBP	SmF	24,11 U/mL	55,0	5,0	Makolomakwa <i>et al.</i> , (2017)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	SmF	23,00 U/mL	40,0	6,0	Sanni, Lawal & Enujiugha, (2018)
<i>Aspergillus oryzae</i> SBS50	SmF	58,82 U/mL	50,0	5,0	Sapna, (2017)
<i>Sporotrichum termophile</i>	SmF (recomb)	480 U/mL	60,0	5,0	Maurya <i>et al.</i> , (2017)
<i>Sporotrichum thermophile</i>	SmF (recomb)	480 U/mL	60,0	5,0	Ranjan & Satyanarayana, (2016)
Plantas					
<i>Vigna umbellata</i> (feijão)	recomb	2,22 U/mg	40,0	4,0	Belho <i>et al.</i> , (2016)

Fitases de interesse biotecnológico industrial geralmente são produzidas por microrganismos a partir de dois tipos de processos: a fermentação submersa (FS) e a fermentação em estado sólido (FES) (BALA *et al.*, 2014; COBAN & DEMIRCI, 2014). Existem várias linhas na literatura que defendem um ou outro processo, como aquele de maior eficiência para a produção da enzima e, que geralmente, está relacionado à espécie do microrganismo (HANSEN *et al.*, 2015).

Apesar da maior parte das fitases industriais serem produzidas por microrganismos cultivados em fermentação submersa (FS), a produção dessas enzimas a partir de organismos cultivados em fermentação em estado sólido (FSS) tem ganhado espaço em alguns países (SURESH & RADHA, 2015). A FSS tem sido apontada como uma alternativa viável e econômica, pela possibilidade de ser realizada utilizando subprodutos e resíduos da agroindústria (RANI & GHOSH, 2011; TRIPATHI *et al.*, 2017).

As fitases produzidas por fungos e bactérias podem ser comercializadas na forma de coquetéis enzimáticos, como proteínas purificadas ou proteínas expressas em sistemas heterólogos (USHASREE *et al.*, 2017). Além disso, os avanços na engenharia genética permitiram à indústria de enzimas oferecer produtos com propriedades melhoradas e muitas vezes com custos reduzidos (GAIND & SINGH, 2015; LEE *et al.*, 2015; BOONCHOO *et al.*, 2019). As técnicas de engenheiramento de enzimas associadas à expressão heteróloga têm sido utilizadas, não só para melhorar as propriedades como estabilidade térmica e resistência à atividade proteolítica no trato digestivo, mas também para melhorar a produtividade da enzima, contribuindo para a utilização dessas enzimas nos processos de peletização e extrusão de rações (WU *et al.*, 2014; SONG *et al.*, 2019).

4 – Mercado mundial de fitase

Quando se fala em nutrição animal, estima-se que os aditivos alimentares podem movimentar cerca de US\$ 37 bilhões em 2022, no mercado mundial, devido ao aumento da demanda por proteína animal (SARROUH *et al.*, 2012). As enzimas constituem o grupo de aditivos alimentares mais consumido na produção animal (SONG *et al.*, 2019). O Oriente Médio, os Estados Unidos e a Europa detêm uma grande parte do mercado mundial de enzimas industriais, enquanto, os principais produtores de fitases estão localizados na Europa, EUA e Japão (USHASREE *et al.*, 2017).

A maior parte da fitase produzida no mundo é destinada à alimentação animal, mas também pode ser utilizada para aplicações industriais, como por exemplo, na panificação, na produção de cervejas, na produção de etanol de milho, na indústria

farmacêutica, na indústria de papel, na melhoria do solo e na diminuição da poluição ambiental (SONI, 2010; HASSAN & AL-JOBORY, 2016).

As principais fitases disponíveis no mercado atual são enzimas bem diversificadas, e podem ser produzidas por técnicas e organismos diferentes, sendo assim o custo pode variar de acordo com o fabricante (Tabela 3).

Tabela 3 – Principais fitases comerciais, empresas provedoras, microrganismos produtores e hospedeiros e classificação de fitase.

Nome comercial	Empresa Provedora	Fonte	Hospedeiro	Classificação
Finase [®] P/L	AB Vista	<i>Trichoderma reesei</i>	<i>Escherichia coli</i>	3
Allzyme [®] SSF	Altech	<i>Aspergillus niger</i>	Selvagem	3
Natuphos [®]	BASF	<i>Aspergillus niger</i>	Selvagem	3
Rovabio [®]	Adisseo	<i>Talaromyces versatilis</i>	Selvagem	3
Phyzyme [®] XP	Danisco	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	6
Ronozyme [®] Hiphos	Novozymes/DSM	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Peniophora lycii</i>	6
Ronozyme [®] np	Novozymes/DSM	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Citrobacter braakii</i>	6
Quantum Blue [®]	AB Vista	<i>Escherichia coli</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	6
Quantum [®]	AB Vista	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pichia pastoris</i>	6
3A [®] Phytase	3 ^a	<i>Aspergillus niger</i>	Selvagem	3
Native Bacterial Phytase [®]	Creative Enzymes	<i>Bacterial</i>	Selvagem	4
Nutrizyme [®] PHYP	Sunson	<i>Aspergillus niger</i>	Selvagem	6
Endopower [®] Alfa	Uniquímica	<i>Aspergillus niger</i>	Selvagem	3
Axtra [®] PHY	Danisco	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Buttiauxella sp</i>	6

Apesar do Brasil ser um dos maiores produtores e exportadores de proteína animal, o mercado brasileiro de enzimas, especialmente a fitase, ainda é dominado por empresas multinacionais (USHASREE *et al.*, 2017). Dessa forma, o Brasil configura-se ainda como um grande consumidor de enzimas importadas, muitas produzidas aqui, mas utilizando tecnologia e capital estrangeiro.

O primeiro relato sobre fitase ocorreu vez em 1907, mas a pesquisa sobre esta enzima cresceu consideravelmente nas três últimas décadas (USHASREE *et al.*, 2017). A primeira fitase mundialmente comercializada, a NATUPHOS[®], foi lançada em 1991 pela BASF (RODRIGUEZ *et al.*, 1999a; 1999b, PANDEY *et al.*, 2001). O desenvolvimento das fitases foi lento, porque nos primeiros anos o custo benefício da inclusão não era satisfatório frente à inclusão do fósforo inorgânico (KEBREAB *et al.*, 2012).

Contudo, dentre as enzimas utilizadas na suplementação de rações, a fitase tem sido a mais consumida, por promover um benefício triplo: elimina as propriedades antinutricionais do ácido fítico; diminui o requerimento de fosfato inorgânico nas dietas e reduz os níveis de fosfato eliminados nas fezes dos animais (SARROUH *et al.*, 2012).

5 – Fitase na nutrição animal

Cerca de 60% da fitase produzida no mundo, atualmente, tem sido destinada a produtos para alimentação animal (ADEOLA E COWIESON, 2011). Diversas empresas multinacionais têm se dedicado à produção dessa enzima a partir de vários microrganismos. Os efeitos da suplementação de fitase em rações podem ser observados para diferentes espécies e categorias de animais não ruminantes (Tabela 4).

Tabela 4 – Efeitos da suplementação com fitases fúngicas em rações para não ruminantes.

Grupo/ Dosagem	Espécie animal	Efeito no desempenho e utilização de nutrientes	Referência
Aquacultura			
250–1500 FTU/kg	Peixe-leite	Melhoria no ganho de peso, aumento da deposição de proteínas	Hassan <i>et al.</i> , (2009)
1500 FTU/kg	Tilápia do Nilo	Melhoria da digestibilidade de dietas contendo pinhão-bravo	Kumar <i>et al.</i> , (2011)
30-1050 FTU/kg	Bagre	Melhoria na absorção intestinal de Pi	Zhu <i>et al.</i> , (2015)
Aves			
500-1500 FTU/kg	Patos	Melhoria no ganho de peso e mineralização óssea	Adeola (2010)
500-5000 FTU/kg	Frangos	Melhor desempenho e digestibilidade de aminoácidos	Walk <i>et al.</i> , (2011)
Fitase recombinante	Poedeiras	Aumento da deposição de fósforo e cálcio nos ossos	Ghosh <i>et al.</i> , (2015)
500-1000 FTU/kg	Frangos	Melhoria no desempenho, mesmo em dietas com baixo teor de nutrientes	Liu <i>et al.</i> , (2015)
1000 FTU/kg	Frangos de corte	Maior digestibilidade da matéria seca e nível de energia metabolizável aparente	Schramm <i>et al.</i> ,(2016)
1000 FTU/kg	Frangos de corte	Ganho de peso e conversão alimentar nas dietas pré e pós-peletização	Moss <i>et al.</i> , (2017)
500-2000 FTU/kg	Frangos	A suplementação de fitase com superdosagem foi economicamente viável	Truong <i>et al.</i> , (2017)
Suínos			
500 FTU/Kg	Suínos	Melhoria no ganho de peso e biodisponibilidade de minerais	Madrid <i>et al.</i> , (2013)
750 FTU/kg	Leitões	Melhoria na eficiência de alimentação e desempenho de engorda	Skiba, Sobol & Raj, (2017)
5000 FTU/Kg	Leitões	Biodisponibilidade de melhoria de Ca e P de razão	Schlegel & Gutzwiller, (2016)
500-5000 FTU/Kg	Javalis	Aumento da produção de espermatozóides e eficiência reprodutiva	Stewart <i>et al.</i> , (2018)
1000-3000 FTU/Kg	Suínos	Aumentar as concentrações plasmáticas de mio-inositol	Cowieson <i>et al.</i> , (2017)

Uma das características mais relevantes de fitases destinadas à nutrição animal é a manutenção da atividade no trato gastrointestinal dos animais, o que requer que a enzima apresente atividade ótima em ampla faixa de pH (CHANDERMAN *et al.*, 2016). A enzima adicionada à dieta pode ser desnaturada, de forma irreversível, no estômago e/ou intestino delgado, dependendo da estabilidade da enzima ao pH (USHASREE *et al.*, 2014; NIU *et al.*, 2017). Outra característica importante refere-se à resistência proteolítica. Fitases resistentes à atividade de proteases podem contribuir para a redução do nível de inclusão desse aditivo em rações para animais não ruminantes (NIU *et al.*, 2015).

Zhu *et al.*, (2015) avaliaram a atividade de uma fitase de uma estirpe de *Buttiauxella sp.* no trato gastrointestinal de peixe bagre e mostraram que o estômago representa o local para melhor atividade da fitase ácida, enquanto o intestino superior é o principal local para a absorção do fósforo inorgânico, produto da hidrólise catalisada pela fitase no estômago. No caso de peixes, é interessante que a fitase seja ativa em temperatura ambiente ou mais baixas, devido à temperatura da água dos tanques de criação, já que se tratam de animais pecilotérmicos, ou seja, a temperatura do corpo do animal varia de acordo com a do ambiente (GREILING *et al.*, 2019).

Para aves e suínos é importante avaliar a categoria do animal, ou seja, a idade do animal ou fase de crescimento. Animais mais jovens demandam uma maior carga de enzimas exógenas por não terem o trato gastrointestinal completamente formado, além disso, há a questão dos distúrbios gastrointestinais relacionados ao primeiro contato com uma dieta sólida e pouco digestível (SKIBA, SOBOL & RAJ, 2017; TRUONG *et al.*, 2017)). A adição de uma fitase de *Escherichia coli* à dieta de leitões com baixo nível de fósforo mostrou-se eficiente para a redução das concentrações do fitato ileal, promovendo melhorias no desempenho e no crescimento dos animais (LAIRD *et al.*, 2016).

5.1 – Características bioquímicas das fitases de interesse para aplicação em rações

A escolha da fitase mais adequada a ser adicionada na alimentação animal é uma questão complexa, e requer o conhecimento de diversas características bioquímicas e moleculares da enzima, que irão direcionar a especificidade da potencial aplicação (MOSS *et al.*, 2017).

Essa complexidade se deve ao fato de que as fitases microbianas variam muito nas suas propriedades *in vitro* como a termoestabilidade, estabilidade em diferentes valores de pH e a resistência a proteases; e apresentam, em geral, baixa atividade específica (PANDEY, 2001; BALWANI, CHAKRAVARTY & GAUR, 2017). A termoestabilidade

das fitases tem sido uma característica de grande interesse da indústria em processos como a peletização e a extrusão de rações para animais, visto que esses processamentos são realizados em altas temperaturas (80-100 °C) (DERSJANT-LI *et al.*, 2015; SPEIGHT, 2016; MOSS *et al.*, 2017).

Dessa forma, as fitases da família HAP (fitases ácidas de histidina) não são muito adequadas para aplicação antes do processamento de rações, pois são termoestáveis em temperaturas em torno de 60°C (MOSS *et al.*, 2017). Ao contrário, as fitases β -hélice já estudadas são ativas em temperaturas mais elevadas (entre 70 e 80°C) e podem ser termoestáveis em temperaturas entre 85-95°C (OH *et al.*, 2003; BOUKHRIS *et al.* 2015). Essas características são interessantes pois favorecem a aplicação dessas enzimas na ração antes do processamento. Entretanto, as fitases dessa família possuem atividade em pH mais básico (6,0 – 8,0) em comparação às outras famílias (OH *et al.*, 2004). Sendo assim, o pH baixo do estômago dos animais pode inativá-las ou até mesmo desnaturá-las. Isso pode ser uma justificativa para o fato de as fitases comerciais serem em sua maioria da família HAP (BALABAN *et al.*, 2018).

As fitases estão disponíveis no mercado na forma líquida ou sólida (EFSA, 2010). A forma líquida é mais recomendada para rações extrusadas e peletizadas, como as rações de animais de companhia ou *pets* (aves e peixes ornamentais, cães e gatos, principalmente) (MOSS *et al.*, 2017). Dessa forma, as fitases, assim como outras enzimas, podem ser pulverizadas após o processamento, sem comprometer a atividade enzimática (SPEIGHT, 2016).

As fitases da família HAP, por exemplo, apresentam atividade em ampla faixa de pH (2,0 a 5,5) (Chanderman *et al.*, 2016), o que pode ser bem favorável para atuação no trato gastrointestinal dos animais. Além disso, essas fitases também apresentam boa resistência à atividade de proteases, como a pepsina no estômago e a tripsina no duodeno (Chanderman *et al.*, 2016), o que favorece a sua passagem pelo trato gastrointestinal sem sofrer perdas em sua atividade.

Entretanto, todas essas características dificilmente serão encontradas em um único modelo enzimático, devido à grande variabilidade de características bioquímicas e organismos produtores dentro dessa família (OH *et al.* 2003). Sendo assim, para se obter uma fitase atuando em diferentes valores de pH são necessários mais de uma enzima ou isoformas diferentes num único produto comercial (KONIETZNY & GREINER, 2004).

As cisteína/tirosina fosfatases ácidas (PCP/ PTP) e as fitases púrpuras (PAP) possuem propriedades bioquímicas semelhantes às fitases da família HAP (Wongkaew *et al.*, 2013; Blüher *et al.*, 2017), permitindo as mesmas formas de aplicação. Entretanto,

essas enzimas não são tão estudadas quanto aquelas pertencentes à família HAP. As PAP conhecidas são produzidas por plantas e o processo de extração é oneroso e com baixo rendimento (Tian *et al.*, 2018), enquanto, as PCP/ PTP já estudadas eram produzidas apenas por bactérias anaeróbicas *Selenomas ruminantium* (SHARMA *et al.*, 2018)

Dentre as técnicas empregadas na tentativa de se aumentar a estabilidade térmica, estabilidade em diferentes valores de pH, além de resistência a íons metálicos e proteases, técnicas como a imobilização de fitase tem sido bem difundidas e engenharia de enzimas envolvendo técnicas como mutagênese sítio-dirigida (HARATI *et al.*, 2017; FAKHRAVAR & HESAMPOUR, 2018).

5.2 – Superdosagem de fitase em rações para animais

A superdosagem de fitase é um conceito de suplementação enzimática que tem sido bastante discutido (LEE *et al.*, 2017). Esse conceito se baseia na aplicação de três a cinco vezes a dose padrão de fitase recomendada pelos fabricantes, para hidrólise completa ou parcial dos fosfatos de inositol (IP6) e seus intermediários (IP1, 2, 3, 4 e 5). Pequenas quantidades de fitato, de seus intermediários ou isômeros promovem fortes efeitos antinutricionais, interferindo na biodisponibilidade de proteínas e íons de metais divalentes (BEDFORD & WALK, 2016). O aumento das quantidades de enzima nas formulações de rações tem sido uma estratégia com alto investimento de capital e ainda com baixo custo/benefício para o produtor (RIBEIRO *et al.*, 2016).

Beaulac *et al.* (2015) demonstraram um aumento no ganho de peso, na conversão alimentar com níveis crescentes de fitase (0, 500, 1500 e 3000 FTU / kg) em dietas para frango de corte com teor de fitato igual 0,96%, além de redução no consumo de cálcio (0,85%) e do fósforo disponível (0,32%) e uma redução de 10% nos níveis de aminoácidos da dieta. Esse aumento no desempenho com os níveis de superdose de fitase está associado à capacidade da enzima em catalisar a hidrólise da maioria do fitato presente na dieta, resultando em um aumento na absorção de nutrientes (LEE *et al.*, 2017).

A superdosagem de fitase tem efeito mais significativo sobre a conversão alimentar do que em outros parâmetros de desempenho animal (LEE *et al.*, 2017). A biodisponibilidade do ferro está relacionada com a concentração de fitato, sendo que a superdosagem de fitase contribui para uma redução da concentração de fitato e dos seus efeitos antinutricionais, melhorando assim a biodisponibilidade do ferro (KIM *et al.*, 2018).

O benefício da superdosagem da fitase pode também estar relacionado ao mio-inositol que é produzido no organismo animal e que é subsequentemente absorvido e

utilizado em várias funções biológicas (MICHELL, 2008). Muitos animais podem sintetizar o mio-inositol pela “síntese de novo” a partir de D-glicose-6-fosfato em vários tecidos (GREINER *et al.*, 2002; MICHELL, 2008). Esse mio-inositol pode ser refosforilado dentro dos tecidos formando mais ácido fítico (LEE *et al.*, 2017).

A necessidade de utilização de superdose de fitase nas rações está também associada ao fato da maioria das fitases apresentarem naturalmente baixa atividade enzimática, e apresentarem baixa especificidade pelo substrato, e também devido às diferenças na catálise promovida por cada família (SINGH *et al.*, 2018). As fitases da família β são mais específicas, sendo o ácido fítico e/ou o fitato de cálcio seus substratos preferenciais, o que pode limitar a sua utilização, uma vez que o ácido fítico encontra-se complexado com diferentes íons (OH *et al.*, 2001; KUMAR *et al.*, 2017). Já no caso da fitases da família HAP, estas não são tão específicas e possuem afinidade por vários substratos fosfatados (SINGH *et al.*, 2018). Dessa forma, as fitases HAP podem catalisar a hidrólise de todos os intermediários do ciclo catalítico, apesar de terem o fitato de sódio como substrato preferencial (ZHANG *et al.*, 2018).

6 – Referências

- Abpa – Associação Brasileira De Proteína Animal. 2018. Dados Estatísticos Sobre Exportação. Disponível em: <http://www.abipecs.org.br/pt/estatisticas/mundial/exportacao.html>, Acesso em: 08/2018. USDA, NRCS. 2018. The PLANTS Database (<http://plants.usda.gov/>, 23 August 2018). National Plant Data Team, Greensboro, NC.
- Adeola O. 2010. Phosphorus equivalency value of an *Escherichia coli* phytase in the diets of White Pekin ducks. *Poultry Science*. 89, 1199–1206.
- Adeola, O.; & Cowieson, A.J. 2011. Board-invited review: opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve nonruminant animal production. *Journal of Animal Science*. 89, 3189–3218.
- Afify, Ael-M.; El-Beltagi, H. S.; Abd El-Salam, S. M.; And Omran, A. A. 2011. Bioavailability of iron, zinc, phytate and phytase activity during soaking and germination of white sorghum varieties. *PLoS ONE*. 6, 10, 25512.
- Akter, M., Graham, H. & Iji, P.A. 2016. Response of broiler chickens to different levels of calcium, non phytate phosphorus and phytase. *Br. Poultry Science*. 57, 799-809.

- Almeida, M. V.; Silva, A. D.; Souza, M. V. N.; Benício, A. A. A. 2003. A cascata dos fosfoinosítídeos. *Química Nova*. 26, 105-111.
- Alltech. 2017. "Global Feed Survey"- Levantamento anual. <https://alltech.com>.
- Alves, N.M.; Guimaraes, L.H.S.; Piccoli, R.H.; Cardoso, P.G. 2016. Production and partial characterization of an extracellular phytase produced by *Muscodor sp.* under submerged fermentation. *Advances in Microbiology*. 6, 23–32.
- Awad, G.E.; Helal, M.M.; Danial, E.N.; Esawy, M.A. 2014. Optimization of phytase production by *Penicillium purpurogenum* GE1 under solid-state fermentation by using Box-Behnken design. *Saudi Journal of Biological Science*, 21, 81-8.
- Azeem, M.; Riaz, A.; Chaudhary, A. N.; Hayat, R.; Hussain, Q.; Tahir, M. I.; & Imran, M. 2015. Microbial phytase activity and their role in organic P mineralization. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 61, 6, 751-766.
- Bala, A.; Sapna; Jain, J.; Kumari, A.; Singh, B. 2014. Production of an extracellular phytase from a thermophilic mould *Humicola nigrescens* in solid-state fermentation and its application in dephytinization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 3, 259–264.
- Balaban, N.P.; Suleimanova, A.D.; Valeeva, L.R.; Shakirov, E.V.; Sharipova, M.R. 2016. Structural characteristics and catalytic mechanism of *Bacillus* β -propeller phytases. *Biochemistry*. 81, 8, 785–793.
- Balaban, N.P., Suleimanova, A.D., Shakirov, E.V. Sharipova, M.R. 2018. Histidine Acid Phytases of Microbial Origin. *Microbiology*. 87, 745.
- Balwani, I.; Chakravarty, K. & Gaur, S. 2017. Role of phytase producing microorganisms towards agricultural sustainability. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 12(March), 23–29.
- Beaulac, K., M. R.; Bedford, A.; Kessel, K.; Schwean-Lardner, M.; Kautzman, D.; Abbott, & Classen, H. 2015. High levels of dietary phytase increase growth and nutrient digestibility in young broilers. *Poultry Science Journal*.
- Bedford, M.R. & Walk, C.L. 2016. Chapter 3. Reduction of phytate to tetrakisphosphate (IP4) to trisphosphate (IP3), or perhaps even lower, does not remove its antinutritive properties. *Phytate destruction - consequences for precision animal nutrition*, eISBN: 978-90-8686-836-0 | ISBN: 978-90-8686-290-0. 45 – 52.
- Belho, K.; Nongpiur, S.R.; Ambasht, P.K. 2016. Purification and partial characterization of phytase from rice bean (*Vigna umbellata* Thunb.) germinated seeds. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*. 25, 327–330.

- Bhavsar, K.; Kumar, V.R.; Khire, J. M. 2011. High-level phytase production by *Aspergillus niger* NCIM 563 in solid-state culture: Response surface optimization, up-scaling, and its partial characterization. *Journal Industrial Microbiology Biotechnology*. 38, 1407-1417.
- Bhavsar, K.; Buddhiwant, P.; Soni, S.K.; Depan, D.; Sarkar, S.; Khire, J.M. 2013. Phytase isozymes from *Aspergillus niger* NCIM 563 under solid state fermentation: Biochemical characterization and their correlation with submerged phytases. *Process Biochemistry*. 48, 1618-1625.
- Bhadouria, J.; Singh, A.P.; Mehra, P.; Verma, L.; Srivastawa, R.; Parida, S.K.; Giri, J. 2017. Identification of purple acid phosphatases in chickpea and potential roles of Ca PAP7 in seed Phytate accumulation. *Scientific Reports*. 7, 11012.
- Bitar, K.; Reinhold, J.G. 1972. Phytase and alkaline phosphatase activities in intestinal mucosae of rat, chicken, calf, and man. *Biochimica et Biophysica Acta*. 268, 442-52.
- Blüher, D.; Laha, D.; Thieme, S.; Hofer, A.; Eschen-Lippold, L.; Masch, A.; Balcke, G.; Pavlovic, I.; Nagel, O.; Schonsky, A.; Hinkelmann, R.; Wörner, J.; Parvin, N.; Greiner, R.; Weber, S.; Tissier, A.; Schutkowski, M.; Lee, J.; Jessen, H.; Schaaf, G. & Bonas, U. 2017. A 1-phytase type III effector interferes with plant hormone signaling. *Nature Communications* | 8: 2159.
- Bohn, L.; Meyer, A. S.; Rasmussen, S. K. 2008. Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *Journal of Zhejiang University Science B*. 9, 3, 165-191.
- Borgi, M. A., Khila, M., Boudebouze, S., Aghajari, N., Szukala, F., Pons, N., Maguin, E. & Rhimi, M. 2014. The attractive recombinant phytase from *Bacillus licheniformis*: biochemical and molecular characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98, 5937–5947.
- Boukhris, I.; Farhat-Khemakhem, A.; Blibech, M.; Bouchaala, K.; Chouayekh, H. 2015. Characterization of an extremely salt-tolerant and thermostable phytase from *Bacillus amyloliquefaciens* US573. *International Journal of Biological Macromolecules*. 80, 581–587.
- Boonchoo, K.; Puseenam, A.; Kocharin, K.; Tanapongpipat, S. And Roongsawang, N. 2019. Sucrose-inducible heterologous expression of phytase in high cell density cultivation of the thermotolerant methylotrophic yeast *Ogataea thermomethanolica*. *FEMS Microbiology Letters*. 52.
- Brnić, M.; Hurrell, R.F.; Songré-Ouattara, L.T.; Diawara, B.; Kalmogho-Zan, A.; Tapsoba, C.; Zeder, C. And Wegmüller, R. 2017. Effect of phytase on zinc absorption

- from a millet-based porridge fed to young Burkinabe children. *European Journal of Clinical Nutrition*. 71, 137-141.
- Buddhiwant, P.; Bhavsar, K.; Kumar, V. R.; & Khire, J. M. 2015. Phytase Production by Solid State Fermentation of Groundnut Oil Cake by *Aspergillus niger*: A Bioprocess Optimization Study for Animal Feedstock Applications. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 46, 6, 531-538.
- Bujna, E.; Rezessy-Szabó, J.M.; Nguyen, D.V. And Nguyen, D.Q. 2016. Production and some properties of extracellular phytase from *Thermomyces lanuginosus* IMI 096218 on rice flour as substrate. *Mycosphere*. 7, 10, 1576-1587.
- Chanderman A, Puri Ak, Permaul K, Singh S. 2016. Production, characteristics and applications of phytase from a rhizosphere isolated *Enterobacter sp.* ACSS. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 39, 10, 1577–1587.
- Chen, C.K.-M.; Chan, N.-L.; Wang, A.H.-J. 2011. The many blades of the β -propeller proteins: conserved but versatile. *Trends in Biochemical Sciences*. 36, 553-561.
- Cheryan, M. 1980. Phytic acid interactions in food systems. *CRC Critical Reviews in Food Sci. and Nutr*. 13, 297.
- Chu, H. M.; Guo, R. T.; Lin, T. W.; Chou, C. C.; Shr, H. L.; Lai, H. L.; Tang, T. Y.; Cheng, K. J.; Selinger, B. L. & Wang, A. H. 2004. Structures of *Selenomonas ruminantium* phytase in complex with persulfated phytate: DSP phytase fold and mechanism for sequential substrate hydrolysis. *Structure*. 12, 2015–2024.
- COBAN, H. B. & DEMIRCI, A. 2014. Screening of phytase producers and optimization of culture conditions for submerged fermentation. *Bioprocess and biosystems engineering*. 37, 4, 609-616.
- Cowieson, A.J.; Ruckebusch, J.-P.; Sorbara, J.O.B.; Wilson, J.W.; Guggenbuhl, P.; Roos, F.F. 2017. A systematic view on the effect of phytase on ileal amino acid digestibility in broilers. *Animal Feed Science and Technology*. 225, 182-194.
- Cowieson, A.J.; Ravindran, V. & Selle P.H. 2008. Influence of dietary phytic acid and source of microbial phytase on ileal endogenous amino acid flows in broiler chickens. *Poultry Science*. 87, 2287–2299.
- Cowieson, A.J.; Ruckebusch, J.P.; Knap, I.; Guggenbuhl, P.; Fru-Nji, F. 2016. Phytate-free nutrition: a new paradigm in monogastric animal production, *Animal Feed Science and Technology*. 222, 180-189.
- Demir, Y.; Dikbaş, N.; Beydemir, S. 2018. Purification and Biochemical Characterization of Phytase Enzyme from *Lactobacillus coryniformis* (MH121153). *Molecular Biotechnology*. 60, 11, 783–790.

- Demirkan, E.; Sevgi, T.; Akcakoca, D. And Ersoy, F. 2017. Partial purification, characterization and wheat bran degradation studies of a new phytase from the *Bacillus megaterium* EBD 9-1 strain. Turkish Biochemical Society. 42, 3, 329–337.
- Deshpande, S. S. & Damodaran, S. 1989. Effect of phytate on solubility, activity and conformation of trypsin and chymotrypsin. Journal of Food Science. 54, 3, 695-699.
- Dersjant-Li, Y.; Awati, A.; Schulze, H.; Partridge, G. 2015. Phytase in non-ruminant animal nutrition: a critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors. Journal Science Food Agriculture. 95, 878-896.
- Duchek, J.; Adams, D. R.; Hudlicky, T. 2011. Chemoenzymatic Synthesis of Inositol, Conditols, and Cyclitol Analogues. Chemistry Review. 111, 4223-4258.
- Durell, J.; Garland, J. T. 1968. Cyclitol and Phosphoinositides: Chemistry Metabolism and Function. 165, 743.
- EFSA 2010. Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) Scientific Opinion on Ronozyme® P (6-phytase) as feed additive for chickens and turkeys for fattening, laying hens, and piglets (weaned), pigs for fattening and sows (poultry and pigs). European Food Safety Authority (EFSA). Parma, Italy.
- Escobin-Mopera, L.; Ohtani, M.; Sekiguchi, S.; Sone, T.; Abe, A.; Tanaka, M.; Meevootisom, V. And Asano, K. 2012. Purification and characterization of phytase from *Klebsiella pneumoniae* 9-3B. Journal of Bioscience and Bioengineering. 113, 562-567.
- Fakhravar, A. & Hesampour, A. 2018. Rational design-based engineering of a thermostable phytase by site-directed mutagenesis. Molecular Biology Reports. 45, 2053–2061.
- Fan, C. M.; Wang, Y. H.; Fu, C. Y. & Zheng, Y. F. 2013. Fingerprint motifs of phytases, African Journal of Biotechnology. 12, 1138-1147.
- Gaind, S. & Singh, S. 2015. Production, purification and characterization of neutral phytase from thermotolerant *Aspergillus flavus* ITCC 6720. International Biodeterioration & Biodegradation. 99, 15-22.
- Ghosh, M.; Huynh, D.; Sodhi, S.S.; Sharma, N.; Kim, J. H.; Kim, N.; Mongre, R.K.; Park, W.P.; Shin, H.S.; Ko, S.; Oh, S.; Choi, C.W.; Oh, S.J. & Jeong, D. 2015. Impact of a Novel Phytase Derived from *Aspergillus nidulans* and Expressed in Transgenic *Lemna minor* on the Performance, Mineralization in Bone and Phosphorous Excretion in Laying Hens. Pakistan Veterinary Journal. 35, 3, 360-364.

- Gibson, R. S.; Raboy, V. & King, J. C. 2018. Implications of phytate in plant-based foods for iron and zinc bioavailability, setting dietary requirements, and formulating programs and policies. *Nutrition Reviews*. 76, 11, 793–804.
- Gontia-Mishra, I.; Deshmukh, D.; Tripathi, N.; Tantwai, K.; Bardiya-Bhurat, K. & Tiwari, S. 2013. Isolation, morphological and molecular characterization of phytate-hydrolyzing fungi by 18S rDNA sequence analysis. *Brazilian Journal Microbiology*. 44, 317323.
- Greiner, R.; Farouk, A.; Alminger, M. L.; Carlsson, N. G. 2002. The pathway of dephosphorylation of myo-inositol hexakisphosphate by phytate-degrading enzymes of different *Bacillus spp.* *Canadian Journal of Microbiology*. 48, 986–994.
- Gupta, R. K.; Gangoliya, S. S.; Singh, N. K. 2015. Reduction of Phytic acid and enhancement of bioavailable micronutrient in food grains. *Journal of Food Science & Technology*. 52, 2, 676-84.
- Haefner, S.; Knietsch, A.; Scholten, E.; Braun, J.; Lohscheidt, M.; Zelder, O. 2005. Biotechnological production and application of phytases. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 68, 588–597.
- Haese, E.; Lengowski, M.; Gräter, E.; Föll, A.; Möhring, J.; Steingass, H.; Schollenberger, M. & Rodehutschord, M. 2016. Ruminant phytate degradation of maize grain and rapeseed meal in vitro and as affected by phytate content in donor animal diets and inorganic phosphorus in the buffer. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 101, 5, 868–880.
- Hansen, G.H.; Lübeck, M.; Frisvad, J.C.; Lübeck, P.S.; Andersen, B. 2015. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. *Process Biochemistry*. 50, 1327-1341.
- Harati, J.; Siadat, S.O.R.; Taghavian, H.; Kaboli, S.; Khorshidi, S. 2017. Improvement in biochemical characteristics of glycosylated phytase through immobilization on nanofibers. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 12, 96-103.
- Hassan, A. A., & Al-Jobory, H. A. 2016. Purification and Characterization of Phytase from Fruit Bodies of Local mushroom *Pleurotus ostreatus* Grown by Solid State Fermentation. *Tikrit Journal of Pure Science*. 21, 1.
- Hassan, S.; Altaff, K.; Satyanarayana, T. 2009. Use of Soybean Supplemented with Cell Bound Phytase for Replacement of Fish Meal in the Diet of Juvenile Milkfish, *Chanos chanos*. *Pakistan Journal of Nutrition*. 8, 4, 341–344.
- IUPAC-IUB Commission On Biochemical Nomenclature (CBN). (1968). Nomenclature of cyclitols, recommendations (1973) *Biochemistry Journal*, 153, 23-31 (1976);

- Europe Journal Biochemistry, 57, 1-7 (1975); Pure Applied Chemistry, 37, 285-297 (1974);
- Kebreab, E.; Hansen, A.V.; Strathe, A.B. 2012. Animal production for efficient phosphate utilization: from optimized feed to high efficiency livestock. *Current Opinion in Biotechnology*. 23, 872–877.
- Khan, S. A.; Chanudhry, H. R.; Butt Y. S.; Jameel, T.; Ahamd, F. 2013. The effect of phytase enzyme on the performance of broiler flock (a-review). *Poultry Science Journal*. 1, 2, 117-125.
- Kim, J. C.; Wilcock, P. And Bedford, M. R. 2018. Iron status of piglets and impact of phytase superdosing on iron physiology: A review. *Animal feed science and technology*. 235, 8-14.
- Knuckles, B. E. 1988. Effect of phytate and other myo-inositol phosphate esters on lipase activity. *Journal of Food Science*. 53, 250–252.
- Knuckles, B. E. & Betschart, A. A. 1987. Effect of phytate and other myoinositol phosphate esters on alpha-amylase digestion of starch. *Journal of Food Science*. 52, 719–721.
- Konietzny, U. & Greiner, R. 2004. Bacterial phytase: potential application, in vivo function and regulation of its synthesis. *Brazilian Journal of Microbiology*. 35, 11–18.
- Kumar, V.; Sinha, A. K. 2018. Chapter 3 - General aspects of phytases, Editor(s): Carlos Simões Nunes, Vikas Kumar, *Enzymes in Human and Animal Nutrition*, Academic Press. 53-72, ISBN 9780128054192.
- Kumar, V.; Yadav, A.N.; Verma, P.; Sangwan, P.; Saxena, A.; Kumar, K.; Singh, B. 2017. β -Propeller phytases: Diversity, catalytic attributes, current developments and potential biotechnological applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 98, 595–609.
- Kumar, V.; Sangwan, P.; Verma, A.K.; Agrawal, S. 2014. Molecular and Biochemical Characteristics of Recombinant β -Propeller Phytase from *Bacillus licheniformis* Strain PB-13 with Potential Application in Aquafeed. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 173, 2, 646–659.
- Kumar, V.; Singh, P.; Sangwan, P.; Verma, A.K.; Agarwal, S. 2011. Phytase producing bacteria from Himalayan soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Annals of Biology*. 27, 2, 121–128.

- Laird, S.; Kühn, I.; P. Wilcock, R. Miller. H.M. 2016. The effects of phytase on grower pig growth performance and ileal inositol phosphate degradation. *Journal of Animal Science*. 94, 142–145.
- Lee, S. A., D.; Nagalakshmi, M. V. L. N.; Raju, S. V.; Rama, R. & Bedford, M. R. 2017. “Effect of Phytase Superdosing, Myo-Inositol and Available Phosphorus Concentrations on Performance and Bone Mineralisation in Broilers.” *Animal Nutrition*. 3, 247–251. doi:10.1016/j.aninu. 2017.07.002
- Lee, S. H.; Cho, J.; Bok, J.; Kang, S.; Choi, Y. & Lee, P. C. 2015. Characterization, gene cloning, and sequencing of a fungal phytase, PhyA, from *Penicillium oxalicum* PJ3. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 45, 4, 336-347.
- Lee, S. H.; Park, H. J.; Chun, H. K.; Cho, S. Y.; Cho, S. M. & Lillehoj, H. S. 2006. Dietary phytic acid lowers the blood glucose level in diabetic KK mice. *Nutrition Research*. 26, 9, 474–479.
- Lee, D. C.; Cottrill, M. A.; Forsberg, C. W. & Jia, Z. 2003. Functional insights revealed by the crystal structures of *Escherichia coli* glucose-1-phosphatase. *Journal of Biology and Chemistry*. 278, 31412–31418
- Leeson, S. 1993. Recent advances in fat utilization by poultry. In *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia*. Armidale, NSW: The University of New England. 170–1981.
- Lei, X.G.; Weaver, J.D.; Mullaney, E.J.; Ullah, A.H.; Azain, M.J. 2013. Phytase, a new life for an “old” enzyme. *Annual Review on Animal Biosciences*. 1, 283-309.
- Li, R.J.; Lu, W.J.; Guo, C.J.; Li, X.J.; Gu, J.T.; Xiao, K. 2012. Molecular characterization and functional analysis of OsPHY1, a purple acid Phosphatase (PAP)-type phytase gene in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Integrative Agriculture*. 11, 1217–1226.
- Lim, D.; Golovan, S.; Forsberg, C.W.; Jia, Z.C. 2000. Crystal structures of *Escherichia coli* phytase and its complex with phytate. *Nature Structural & Molecular Biology*. 7, 108–13.
- Liu, N.; Ru, Y.; Wang, J. & Xu, T. 2010. Effect of dietary sodium phytate and microbial phytase on the lipase activity and lipid metabolism of broiler chickens. *British Journal of Nutrition*. 103, 862–868
- Liu, S. Y.; Bold, R.M.; Plumstead, P.W.; Selle, P.H. 2015. Effects of 500 and 1000 FTU/kg phytase supplementation of maize based diets with two tiers of nutrient specifications on performance of broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*. 207, 159-167.

- Loewus, F. A. 2002. Biosynthesis of phytate in food grains and seeds. In: Food Phytates, Sathe, S. K., Reddy, N. R. (Eds). Boca Raton, Londres. 280p.
- Madrid, J.; Martínez, S.; López, C.; Hernández, F. 2013. Effect of phytase on nutrient digestibility, mineral utilization and performance in growing pigs. *Livestock Science*. 154, 144-151.
- Makolomakwa, M.; Puri, A. K.; Permaul, K.; Singh, S. 2017. Thermo-acid-stable phytase-mediated enhancement of bioethanol production using *Colocasia esculenta*. *Bioresource Technology*. 235, 396-404.
- Matyka, S.; Korol, W. & Bogusz, G. 1990. The retention of phytin phosphorus from diets with fat supplements in broiler chicks. *Animal feed science and technology*. 31, 3, 223-230.
- Menezes-Blackburn, D.; Gabler, S.; Greiner, R. 2015. Performance of seven commercial phytases in an in vitro simulation of poultry digestive tract *Journal of Agricultural & Food Chemistry*. 63, 6142-6149.
- Michell, R. H. 2008. Inositol derivatives: evolution and functions. *Nature*. 9, 151-161.
- Monteiro, P.S.; Guimarães, V.M.; De Melo, R.R.; Rezende, S.T. 2015. Isolation of a thermostable acid phytase from *Aspergillus niger* UFV-1 with strong proteolysis resistance. *Brazilian Journal of Microbiology*. 46, 1, 251-260.
- Monteiro, P.S.; De Melo, R.R.; Murillo Peterlini Tavares, M.P.; Falkoski, D.L.; Guimarães, V.M.; Pereira, O.L.; Rezende, S.T. 2012. Production optimization, characterization and evaluation of *Rhizopus Stolonifer* phytase in the hydrolysis of phytate in animal feed. *Revista Brasileira de Agrociência*. 18 2-4, 117-132.
- Moss, A. F., Chrystal, P. V., Truong, H. H., Liu, S. Y., & Selle, P. H. 2017. Effects of phytase inclusions in diets containing ground wheat or 12.5% whole wheat (pre- and post-pellet) and phytase and protease additions, individually and in combination, to diets containing 12.5% pre-pellet whole wheat on the performance of broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*. 234, 139–150.
- Muslim, S.N.; Mohammed Ali, A.N.; Al-Kadmy, I.M.S.; Khazaal, S.S.; Ibrahim, S.A.; Al-Saryi, N.A.; Al-Saadi, L.G.; Muslim, S.N.; Salman, B.K.; Aziz, S.N. 2018. Screening, nutritional optimization and purification for phytase produced by *Enterobacter aerogenes* and its role in enhancement of hydrocarbons degradation and biofilm inhibition. *Microbial Pathogenesis*. 115, 159–167.
- Neira-Vielma, A. A.; Aguilar, C. N.; Ilyina, A.; Contreras-Esquivel, J. C.; Carneiroda-Cunha, M. Das G.; Michelena-Álvarez, G., & Martínez-Hernández, J. L. 2018. Purification and biochemical characterization of an *Aspergillus niger* phytase

- produced by solid-state fermentation using triticale residues as substrate. *Biotechnology Reports*. p.49–54.
- Nelson, T. S. 1976. The hydrolysis of phytate phosphorus by chicks and laying hens. *Poultry Science*. 55, 2262–2264.
- Niu, C.; Luo, H.; Shi, P.; Huang, H.; Wang, Y.; Yang, P.; Yao, B. 2015. N-Glycosylation improves the pepsin resistance of histidine acid phosphatase phytases by enhancing their stability at acidic pH and reducing pepsin's accessibility to its cleavage sites. *Applied and Environmental Microbiology*. 82, 1004–14.
- Nomenclature Committee Of The International Union Of Biochemistry. 1989. Numbering of atoms in myo-inositol. *Biochemistry Journal*. 258, 1–2.
- Oh, B.C.; Chang, B. S.; Park, K.H.; Ha, N.C.; Kim, H.K.; Oh, B.H. And Oh, T.K. 2001. Calcium-dependent catalytic activity of a novel phytase from *Bacillus amyloliquefaciens* DS11, *Biochemistry*. 40, 9669-9676.
- Oh, B.C.; Choi, W.C.; Park, S.; Kim, Y.O.; Oh, T.K. 2004. Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 63, 362–372.
- Oh, B.C.; Kim, M. H.; Yun, B.S.; Choi, W.C.; Park, S. C.; Bae, S.C. And Oh, T.K. 2006. Ca²⁺-inositol phosphate chelation mediates the substrate specificity of beta-propeller phytase, *Biochemistry*. 45, 9531-9539.
- Pal Roy, M.; Mazumdar, D.; Dutta, S.; Saha, S. P. And Ghosh, S. 2016. Cloning and Expression of Phytase appA Gene from *Shigella sp.* CD2 in *Pichia pastoris* and Comparison of Properties with Recombinant Enzyme Expressed in *E. coli*. *PLoS One*. 11, e0145745.
- Pandey, A.; Szakacs, G.; Soccol, C.R.; Rodriguez-Leon, J.A.; Soccol, V.T. 2001. Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresource Technology*. 77, 203–214.
- Puhl, A. A.; Greiner, R.; & Selinger, L. B. 2008. A protein tyrosine phosphatase-like inositol polyphosphatase from *Selenomonas ruminantium* subsp. lactilytica has specificity for the 5-phosphate of myo-inositol hexakisphosphate. *International Journal Biochemistry and Cellular Biology*. 40, 2053-2064.
- Puppala, K.R.; Naik, T.; Shaik, A.; Dastager, S.; Kumar V, R.; Dharme, M. 2018. Evaluation of *Candida tropicalis* (NCIM 3321) extracellular phytase having plant growth promoting potential and process development. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 13, 225-235.

- Qasim, S.S.; Shakir, K.A.; Al-Shaibani, A.B.; Walsh, M.K. 2017. Optimization of culture conditions to produce phytase from *Aspergillus tubingensis* SKA. Food and Nutrition Sciences. 8, 733–745.
- Raboy, V. 2003. Myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. Phytochemistry. 64, 1033–1043.
- Raboy, V., Young, K. A., Larson, S. R., Cook, A. 2002. Genetics of Phytic Acid Synthesis and Accumulation. In: Reddy, N. R., Sathe, S. K. (Eds) Food Phytates. CRC Press LLC, New York, 280.
- Ramadan, E.A. 2012. Effect of processing and cooking methods on the chemical composition, sugars and phytic acid of soyabeans. Food and Public Health. 2, 1, 11-15.
- Rani, R. & S. Ghosh, S. 2011. Production of phytase under solid-state fermentation using *Rhizopus oryzae*: Novel strain improvement approach and studies on purification and characterization. Bioresourch Technology. 102, 10641-10649.
- Ranjan, B., & Satyanarayana, T. 2016. Recombinant HAP Phytase of the Thermophilic Mold *Sporotrichum thermophile*: Expression of the Codon-Optimized Phytase Gene in *Pichia pastoris* and Applications. Molecular Biotechnology. 58, 2, 137–147.
- Ravindran, V.; Bryden, W. L.; Kornegay, E. T. 1995. Phytates: Occurrence, Bioavailability and Implications in Poultry Nutrition. Poultry and Avian Biology Reviews. 6, 2, 125-143.
- Ribeiro Jr., V.; Salguero, S.C.; Gomes, G.; Barros, V.R.S.M.; Silva, D.L.; Barreto, S.L.T.; Rostagno, H.S.; Hannas, M.I.; L.F.T. Albino, L.F.T. 2016. Efficacy and phosphorus equivalency values of two bacterial phytases (*Escherichia coli* and *Citrobacter braakii*) allow the partial reduction of dicalcium phosphate added to the diets of broiler chickens from 1 to 21 days of age. Animal Feed Science and Technology. 221, 226–233.
- Rigden, D.J. 2008. The histidine phosphatase superfamily: Structure and function. Biochemical Journal. 409, 333–348.
- Rocky-Salimi, K.; Hashemi, M.; Safari, M. And Mousivand, M. 2016. A novel phytase characterized by thermostability and high pH tolerance from rice phyllosphere isolated *Bacillus subtilis* B.S.46. Journal Advanced Research. 7, 381-390.
- Rodriguez, E.; Han Y.; Lei, X.G. 1999a. Cloning, sequencing, and expression of an *Escherichia coli* acid phosphatase/phytase gene (appA2) isolated from pig colon. Biochemistry and Biophysics Research Communications. 257, 117–23.

- Rodríguez, E.; Porres, J.M.; Han, Y.; Lei, X.G. 1999b. Different sensitivity of recombinant *Aspergillus niger* phytase (r-PhyA) and *Escherichia coli* pH 2.5 acid phosphatase (r-AppA) to trypsin and pepsin in vitro. *Archives Biochemistry Biophysics*. 365, 262–67.
- Romero, C.; Salas, M.; García, A.C.; Mendoza, G.; Plata, F.; Cervantes, M.; Viana, T.; Morales, A. 2009. Effect of phytase from *Aspergillus niger* on nutrient digestibility and activity of trypsin and chymotrypsin in weanling pigs, *Archivos de Zootecnia*. 58, 363–369.
- Salmon, D.N.X.; Fendrich, R.C.; Cruz, M.A.; Montibeller, V.W.; Vandenberghe, L.P.S.; Soccol, C.R.; Spier, M.R. 2016. Bioprocess for phytase production by *Ganoderma sp.* MR-56 in different types of bioreactors through submerged cultivation. *Biochemical Engineering Journal*. 114, 288-297.
- Sands, J. S.; Ragland, D.; Dilger, R.N. And Adeola, O. 2009. Responses of pigs to *Aspergillus niger* phytase supplementation of low-protein or high-phytin diets. *Journal Animal Science*. 87, 2581-2589.
- Sanni, D. M.; Lawal, O. T. & Enujiugha, V. N. 2019. Purification and Characterization of Phytase from *Aspergillus fumigatus* Isolated from African Giant Snail (*Achatina fulica*). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 17, 225-232.
- Sapna, B.S. 2017. Purification and characterization of a protease-resistant phytase of *Aspergillus oryzae* SBS50 whose properties make it exceptionally useful as a feed supplement. *International Journal of Biological Macromolecules*. 103, 458–466.
- Sarrouh, B.; Santos, T.M.; Miyoshi, A.; Dias, R. And Azevedo, V. 2012. Up-To-Date Insight on Industrial Enzymes Applications and Global Market. *Bioprocessing & Biotechniques*.
- Sato, V.S.; Jorge, J.A.; Guimaraes, L.H.S. 2016. Characterization of a thermotolerant phytase produced by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* biofilm on an inert support using sugarcane bagasse as carbon source. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 179, 610–624.
- Schindler, D. W.; Carpenter, S. R.; Chapra, S.C.; Hecky, R.E.; Orihel, D.M. 2016. Reducing Phosphorous to Curb Lake Eutrophication is a Success. *Environmental Science & Technology*. 50, 8923- 8929.
- Schramm, V. G.; Durau, J.F.; Barrilli, L.N.E.; Sorbara, J.O.B.; Cowieson, A.J.; Félix, A.P.; And Maiorka, A. 2017. “Interaction between xylanase and phytase on the digestibility of corn and a corn/soy diet for broiler chickens.” *Poultry Science*. 96, 1204–1211.

- Selle, P.H.; Ravindran, V. 2007. Microbial phytase in poultry nutrition. *Animal Feed Science and Technology*. 135, 1–41.
- Selle, P.H.; Ravindran, V. 2008. Phytate-degrading enzymes in pig nutrition. *Livestock Science*. 133, 9-122.
- Shanmugam, G. 2018. Characteristics of Phytase Enzyme and its Role in Animal Nutrition. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 7, 3, 1006-1013.
- Shah, P.C., Kumar, V.R., Dastager, S.G., And Khire, J.M. 2017. *AMB Express*. 7, 66. Doi 10.1186/s13568-017-0370-9.
- Sharma, R., Kumar, P., Kaushal, V., Das, R., And Navani, N. K. 2018. A novel protein tyrosine phosphatase like phytase from *Lactobacillus fermentum* NKN51: cloning, characterization and application in mineral release for food technology applications. *Bioresource Technology*. 249, 1000–1008.
- Shin, S.; Ha, N.; Oh, B.; Oh, T.; Oh, B. 2001. Enzyme mechanism and catalytic property of β -propeller phytase. *Structure*. 9, 851–858
- Singh, B. 2013. Improved production of protease-resistant phytase by *Aspergillus oryzae* and its applicability in the hydrolysis of insoluble phytates. *Journal of industrial microbiology & Biotechnology*. 40, 8, 891-899.
- Singh, B.; Kunze, G.; Satyanarayana, T. 2011a. Developments in biochemical aspects and biotechnological applications of microbial phytases. *Biotechnology Molecular Biology Review*. 6, 3, 69–87.
- Singh, B.; Satyanarayana, T. 2011b. Microbial phytases in phosphorus acquisition and plant growth promotion. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 17, 93–103.
- Singh, B.; Sharma, K.K.; Amit Kumari, A.; Anil Kumar, A.; Gakhar, S.K. 2018. Molecular modeling and docking of recombinant HAP-phytase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* reveals insights into molecular catalysis and biochemical properties. *International Journal of Biological Macromolecules*. 115, 501–508.
- Song, H.Y; Sheikha, A.F.; Hu, D.M. 2019. The positive impacts of microbial phytase on its nutritional applications. *Trends in Food Science & Technology*. 86, 553-562.
- Soni, S.; Magdum, A.; Khire, J. 2010. Purification and characterization of two distinct acidic phytases with broad pH stability from *Aspergillus niger* NCIM 563. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 2009–18.
- Speight, R. 2016. Biotechnology in the development of improved phytases. In: 27th Annual Australian Poultry Science Symposium, Sydney. N.S.W., 14–17.

- Suresh, S. & Radha, K. V. 2015. Effect of a mixed substrate on phytase production by *Rhizopus oligosporus* MTCC 556 using solid-state fermentation and determination of dephytinization activities in food grains. *Food Science and Biotechnology*. 24, 2, 551-559.
- Skiba, G.; Sobol, M. & Raj, S. 2017. Femur morphometry, densitometry, geometry and mechanical properties in young pigs fed a diet free of inorganic phosphorus and supplemented with phytase. *Archives of Animal Nutrition*. 71, 1, 81–92.
- Stewart, K. R.; Bradley, C.L.; Wilcock, P.; Domingues, F.; Klevefeld, M.; Hundley, J. And Cabezon, F.A. 2018. Superdosing phytase fed to mature boars improves semen concentration and reproductive efficiency. *The Professional Animal Scientist*. 34, 95–102.
- Tabelas Brasileiras Para Aves E Suínos: Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais. 2016. 4. ed. Viçosa, MG: Ed. UFV, 252.
- Tahir, M.; Shim, M.Y.; Ward, N.E.; Smith, C.; Foster, E.; Guney, A.C.; Pesti, G.M. 2012. Phytate and other nutrient components of feed ingredients for poultry. *Poultry Science*. 91, 928–935.
- Tian, M.; Yuan, Q. 2016. Optimization of phytase production from potato waste using *Aspergillus ficuum*. *3 Biotechnology*. 6, 256.
- Tripathi, P., Garg, S., Panwar, D., Panwar, D., Kaira, G.S., Kumar, R., Kapoor, M. 2017. Phytase from *Citrobacter koseri* PM-7: Cost-Effective Production Using Agro-Industrial Residues, Biochemical Characterization and Application in de-Phytinization. *Waste Biomass Valorization*. 8, 4, 1105–1119.
- Truong, H.H.; Yu, S.; Moss, A.F.; Partridge, G.G.; Liu, S.Y.; Selle, P.H. 2017. Phytase inclusions of 500 and 2000 FTU/kg in maize-based broiler diets impact on growth performance, nutrient utilization, digestive dynamics of starch, protein (N), sodium and IP 6 phytate degradation in the gizzard and four small intestinal segments *Animal Feed Science and Technology*. 223, 13-22.
- Ushasree, M. V.; Shyam, K., Vidya, J. & Pandey, A. 2017. Microbial phytase: Impact of advances in genetic engineering in revolutionizing its properties and applications. *Bioresource Technology*. 245, 1790–1799.
- Ushasree, M.V.; Vidya, J.; Pandey, A. 2014. Gene cloning and soluble expression of *Aspergillus niger* phytase in *E. coli* cytosol via chaperone co-expression. *Biotechnology Letters*. 36, 85–91.

- Vohra, A.; Satyanarayana, T. 2003. Phytases: microbial sources, production, purification and potential biotechnological applications. *Critical Reviews Biotechnology*. 23, 29–60.
- Walk, C. L.; Santos, T. T. & Bedford, M. R. 2014. “Influence of Superdoses of a Novel Microbial Phytase on Growth Performance, Tibia Ash, and Gizzard Phytate and Inositol in Young Broilers.” *Poultry Science*. 93, 1172–1177. doi:10.3382/ps.2013-03571.
- Weber, S.; Stirnimann, C.U.; Wieser, M.; Frey, D.; Meier, R.; Engelhardt, S.; Li, X.; Capitani, G.; Kammerer, R.A.; Hilbi, H. 2014a. A type IV translocated *Legionella* cysteine phytase counter acts intracellular growth restriction by phytate. *Journal of Biological Chemistry*. 289, 49, 34175-34188.
- Woyengo, T. A.; Beltranena, E. & Zijlstra, R. 2014. Non Ruminant Nutrition Symposium: Controlling feed cost by including alternative ingredients into pig diets: A review. *Journal of Animal Science*. 92, 4, 1293–1305.
- Wongkaew, A.; Srinives, P. And Nakasathien, S. 2013. Isolation and characterization of purple acid phosphatase gene during seed development in mungbean. *Biologia Plantarum*. 57, 2, 267–273.
- Wu, T.H; Chem, C.C.; Cheng, Y.S.; Ko, T.P.; Lin, C.Y.; Lai, H.L.; Huang T.Y.; Liu, J.R.; Guo, R.T. 2014. Improving specific activity and thermostability of *Escherichia coli* phytases by structure-based rational design. *Journal of Biotechnology*. 175, 1–6.
- Yao, H.; Huang, J.; Tan, J. 2012. The surface display of phytase on yeast cell and activity assay of the displayed proteins. *Journal of Yeast and Fungal Research*. 3, 58-64.
- Zhao, Q.; Liu, H.; Zhang, Y.; Zhang, Y. 2010. Engineering of protease-resistant phytase from *Penicillium sp.*: high thermal stability, low optimal temperature and pH. *Journal of Biosciences and Bioengineering*. 110, 638-45.
- Zhang, G. Q.; Dong, X. F.; Wang, Z. H.; Zhang, Q.; Wang, H. X.; Tong, J. M. 2010. Purification, characterization, and cloning of a novel phytase with low pH optimum and strong proteolysis resistance from *Aspergillus ficuum* NTG-23. *Bioresource Technology*. 101, 4125-4131.
- Zhu, W.X.; Zhong, G.F.; Hua, X.M.; Ju, M.; Chen, X.M.; Du, Z.Y. 2016. The optimum active site of acidic phytase in the gastrointestinal tract of channel catfish (*Ictalurus punctatus*): in vitro and in vivo studies. *Aquaculture Nutrition*. 22, 881–889.

CAPÍTULO II

Genome-scale characterization of fungal phytases and a comparative study between
beta-propeller phytases and histidine acid phosphatases

Genome-scale characterization of fungal phytases and a comparative study between beta-propeller phytases and histidine acid phosphatases

Roberta Corsino Ferreira^a, Murillo Peterlini Tavares^a, Túlio Morgan^a, Yan da Silva Clevelares^a, Marina Quádrio Raposo Branco Rodrigues^a, Maria Catarina Megumi Kasuya^b, Tiago Antônio de Oliveira Mendes^a, Valéria Monteze Guimarães^a

^aDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Viçosa, Av. PH Rolfs, s/n, 36570-900, Viçosa, MG, Brazil.

^bDepartment of Agricultural Microbiology, Federal University of Viçosa

*Corresponding author. Tel.: (+5531)3612-5100; fax: (+5531)3612-5101. E-mail address: vmonteze@ufv.br (V. Guimarães).

Acknowledgment

We acknowledge the Brazilian institutions CAPES for the scholarship granted to the first author, FAPEMIG and CNPq for the resources provided to complete this study.

Supplementary material

E-supplementary data of this work can be found in the online version of the paper.

ABSTRACT

Plant foods used in formulation of animal feed have antinutritional factors, such as phytic acid or phytate that interfere with the digestive process, due to its ability to bind cations and macromolecules. Non-ruminant animals do not synthesize or insufficiently produce phytase, enzyme capable of catalyzing phytate hydrolysis. In this context, the present work intended to prospect for new organisms that produce phytases, especially phytopathogenic and soil fungi. In the first step of the prospection strategy, genomic analyzes of these microorganisms allowed to select twelve potentially phytases-producing fungi. Based on the analysis of the distribution and profile of the MDS plots it was possible to identify the existence of four well-defined groups of phytate degrading enzymes: esterase-like, β -propeller phytases (β PP), phosphoglycerate mutase-like, and phytases belonging to the histidine acid phosphatases family (HAP). Genome-scale study of the predicted genes encoding the phytases belonging to the HAP family and β PP phytases, the *in silico* characterization of these fungal enzymes and the analysis of possible secretion signs were performed. The differences between these phytases sequences showed in the multiple sequence alignments indicate the divergences between the catalytic activities of these enzymes. The predicted fungal β PP phytases exhibited a higher molecular mass (around 77 kDa) compared with bacterial β PP phytases described in the literature, probably due the EGF-like domain, that was present in these fungal β PP phytases. Twelve sequences of phytases showed the presence of signal peptide, of which seven were classified as HAP and five as β PP phytases, while ten sequences were predicted as phytases secreted by non-classical pathways. After cultivation of these fungi for induction of enzymes expression, the enzymatic extracts were evaluated for the ability to hydrolyze sodium phytate at 50 °C, and pH ranging from 2.0 to 9.0. Seven fungi were identified as phytase producers based on phosphate release under conditions of the enzyme assay. The results obtained from *in silico* analyzes combined with experimental enzymatic activities suggest that in addition to HAP phytases, some selected fungi could secrete β PP phytases.

Keywords: Fungi, histidine acid phosphatases, beta-propeller phytases, *in silico* characterization.

Introduction

Phytic acid (myo-inositol 1, 2, 3, 4, 5, 6-hexaphosphate dihydrogenphosphate) and its respective salts known as phytates are formed by a myo-inositol ring with six phosphate-linked groups (Singh et al. 2011; Raboy, 2003). Phytic acid is the predominant form of phosphorus storage by plants, especially cereals, oilseeds and legumes (Vohra & Satyanarayana, 2003).

Non-ruminant animals, including humans, are unable to hydrolyze phytic acid due to the absence of phytases in the digestive tract. Therefore, phytic acid is considered an antinutritional factor for these animals, since it may act as a chelating agent and bind to cations such as Ca^{2+} , Mg^{+2} , Zn^{+2} , Fe^{+2} , Cu^{+2} , Cu^{+} and K^{+} , affecting the uptake and digestion of minerals (Raboy, 2003). In addition, phytic acid can form complexes with proteins and carbohydrates from the diet, which reduces the solubility, digestibility and availability of these macromolecules (Zhao et al. 2010; Singh, 2013).

Some animals, plants and microorganisms (Adeola & Cowieson, 2011) can naturally produce the phytase (myo-inositol hexaphosphate phosphohydrolase). Commercial phytases, usually of microbial origin, has been used as a supplement in feed for non-ruminant animals. This enzyme promotes a triple benefit: i) it eliminates the antinutritional properties of phytic acid; ii) it decreases inorganic phosphate supplementation in diets and iii) it reduces phosphate levels eliminated in animal feces (Sarrouh et al. 2012). However, for the efficient reduction of phytate in feed, the phytase must exhibit suitable properties for this industrial application, such as high thermostability, stability at different pH values of the animal gastrointestinal tract and resistance to proteases. In addition to these required properties, ideal phytase needs to show high activity against phytate and its derivatives (Ushasree et al. 2019). In order to achieve the good performance of the animals, the feed industry has adopted the strategy of using phytase superdoses. Although efficient, this procedure can increase the costs of feed production (Shanmugam, 2018).

Phytases can be produced by different techniques and from several organisms (Bhavsar et al. 2013). Despite the significant advances in enzyme technology, the phytases production on an industrial scale is still a challenge, since the characterized or commercial available phytases may have poor/undesirable biochemical and structural properties, low specific activity and low yield of production (Awad et al. 2014; Song et al. 2019).

Phytases are structurally classified in four groups, which show distinct catalytic mechanisms (Fan et al. 2013). The first group of phytases, and the most studied, is the histidine acid phosphatase superfamily (HAPs) comprising phytases and other less phytate

specific phosphatases. The other three groups include β -propeller phytase (β PPs), purple acid phosphatase (metalloenzyme-PAP), and protein tyrosine phosphatase (cysteine-phytase, homologous to tyrosine phytase) (Singh et al. 2011).

This work aimed to select between soil and phytopathogenic fungi, those with potential for phytases production, based on *in silico* studies of the physicochemical properties and the secretion parameters of the predicted phytases. Finally, the experimental validation of the phytases production by the selected fungi was performed. Our objective was to identify phytases that can be used in future biotechnological applications, especially for animal feed supplementation.

Material and methods

Selection of fungal species

Initially, a bibliographical survey was carried out to identify the soil fungi and phytopathogenic fungi associated with plants rich in phytate, which could be potentially phytase producers (Kimati et al. 2005). After this initial study, the fungal species that had the genome sequenced, annotated and deposited at the databases National Center for Biotechnology Information-NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) or Joint Genome Institute-JGI (<https://genome.jgi.doe.gov/programs/fungi/index.jsf>) were selected.

For this work, six phytopathogenic ascomycetes fungi: *Alternaria alternata* (Keissl, 1912), *Alternaria brassicicola* (Wiltshire, 1947), *Colletotrichum graminicola* (Mishra & Siradhana, 1979), *Fusarium graminearum* (Schwabe, 1839), *Setosphaeria turcica* (K.J. Leonard & Suggs, 1974), *Verticillium dahliae* (Kleb, 1913) were kindly provided by the Department of Plant Pathology/ UFV. Three species of ascomycetes fungi: *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curtis; Wei, 1950), *Chrysosporthe cubensis* (Gryzenhout & Wingf, 2004), *Talaromyces pinophilus* (Samson, Yilmaz, Frisvad & Seifert 2011) were supplied by the Laboratory of Biochemical Analyzes/ BIOAGRO/ UFV and three species of basidiomycete fungi (*Lepista nuda* (Cook, 1871), *Pycnoporus sanguineus* (Murrill, 1904), *Trametes gibbosa* (Fries, 1836) were kindly provided by the Laboratory of Mycorrhizal Associations/ BIOAGRO/ UFV. The sequenced genomes of the fungi *C. cubensis* and *T. pinophilus* were deposited in NCBI, but the predicted protein-encoding genes were not publicly available.

***In silico* prospecting and analysis**

Obtaining the annotated genomes

Proteomes were recovered from the MycoCosm portal of JGI. Since the protein-encoding genes of *C. cubensis* and *T. pinophilus* were not public and available, genomic scaffolds sequences in FASTA format (Assembly accession numbers: GCA_001282315.1 and GCA_001571465.2 respectively) were submitted as input files for AUGUSTUS (v. 3.2.2.) program (Stanke & Morgenstern, 2005). The *ab initio* gene prediction was carried out using meta-parameters of the phylogenetically closed organism *Neurospora crassa* and *Aspergillus niger* as reference for *C. cubensis* and *T. pinophilus*, respectively. The final file was obtained containing the FASTA sequences of the protein corresponding to the predicted genes.

The protein sequences of the selected organisms were subjected to a sequence similarity search using BLASTp version 2.2.21 program (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) (Altschul et al. 1990) against a local database of fungi phytase sequences obtained from NCBI. The E-values of the alignments were used as cut-off parameters, and alignments with values smaller than $1E-15$ were selected for analysis. Selected sequences were subjected to protein domain prediction using hmmscan from HMMER Markov package (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/search/hmmscan>) (Potter et al. 2018). Only sequences with the predicted domains of the histidine acidic phosphatase superfamily (HAP) and β -propeller phytases (β PP) were selected for further analysis of parameter prediction. Among the HAP superfamily, the proteins identified as phytase were those that showed conserved specific sequences, the protein signatures (PF00328), already reported in the literature. The β -propeller phytases were identified by the presence of the signature PF02333. Double-function histidine acid phosphatases were disregarded for *in silico* analysis.

Prediction of protein parameters

The physico-chemical parameters such as theoretical isoelectric point (pI), extinction coefficient (ϵ), instability index (Ii), aliphatic index (Ai), mean hydrophobicity (GRAVY), number of negative residues (- R) and positive residues (+ R), were computed/predicted by Expasy ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>) (Wilkins et al. 1999). The prediction of the N and O-glycosylation sites was performed with NetNglic 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) (Gupta et al. 2004) and NetOglic 4.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) (Gupta et al. 2004),

respectively. The disulfide bonds were predicted using the Cys-Rec Softyberry tool (http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=cys_rec&group=help&subgroup=propt) (Stultz et al., 1993). For the prediction of signal peptide and transmembrane regions, the SignalP 4.1 Server (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21959131>) (Petersen et al. 2011) and TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) (Krogh et al. 2001) with default parameters, respectively.

Multiple sequence alignments

The sequences of the phytases under study were submitted to multiple sequence alignments using Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (McWilliam et al. 2013). For the HAP group, the experimentally characterized phytase sequences of *A. niger* 3K4P (Oakley, 2010) and *Debaryomyces castellii* 2GFI (Ragon et al. 2009) were included in the alignment, while for the β PP group, the characterized phytase sequences of *Bacillus subtilis* 3AMR (Zeng et al. 2011) and *Bacillus amyloliquefaciens* 2POO (Ha et al. 2000) were used. The multiple sequences alignments allowed to create a distance matrix using the distmat algorithm EMBOSS package applying the Kimura distance protein method (Kimura, 1980). Multidimensional scaling plots (MDS) (Kruskal & Wish, 1978; Young & Hamer, 1987) based on distance matrix were constructed using statistical software R (Team, 2013) for visualization of clustering based on sequences similarity. The clusters in the MDS chart were defined using the K-means algorithm. Cluster visualization was defined using the K-means algorithm and the number of clusters was validated using the Elbow method. The multiple sequence alignments were visualized using the Jalview program (Waterhouse et al. 2009) for analysis of residue conservation.

Culture conditions

The fungi were grown in Petri dishes containing potato dextrose agar medium (PDA; VETEC Química Fina Ltda., Brazil) at 28° C and pH 5.5. The fungi used in this work were grown under semi-solid-state fermentation, except *T. pinophilus* that was cultivated under submerged fermentation. Experiments were carried out in triplicate.

Semi-solid state fermentation (SSF) and enzyme extraction

Initially, 5 agar plugs cut out of a 7 day-old colony of fungi grown on potato dextrose agar (PDA) plates were transferred to 125 ml Erlenmeyer flasks containing 50

ml of previously sterilized medium with the following composition, in g/L; potato dextrose broth (PDB), 36.0 and sodium phytate, 0.02. The flasks were placed under shaking at 150 rpm, 28 °C, for 5 days. The culture obtained was aseptically homogenized and used to prepare the culture in the semi-solid state. The enzymatic production, via semi-solid fermentation (SSF), was carried out in a 125 mL Erlenmeyer flasks containing 6.25 g of wheat bran and 9.25 mL of the culture media (final moisture of 60%) with the following composition, in g/L: sucrose, 1.0; peptone, 5.0; CaCl₂ 0.1. The flasks were autoclaved at 120 °C for 20 min and then inoculated with 5 mL (approximately 1.5×10^6 spores/mL). The flasks remained at 25 and 28 °C for basidiomycetes and ascomycetes, respectively, in a controlled temperature chamber and the extraction of secreted enzymes was performed after 7 days of fermentation. The proteins secreted during SSF were extracted with sodium acetate buffer, 50 mM, pH 5, at a ratio of 10:1 (buffer/ dry substrate), under the agitation of 150 rpm in Marconi® shaker for 60 min at room temperature. The crude extract was collected by filtration through nylon cloth followed by centrifugation at 15000 g for 10 min at 4 °C. The supernatant was used as the crude extract of the enzyme.

Submerged fermentation (SmF)

Initially, five disks of 6 mm diameter were removed from the plate containing the fungi *T. pinophilus* which was inoculated in 125 ml Erlenmeyer flasks containing 50 mL of previously sterilized medium, pH 5.5, containing 3% of wheat bran, sucrose (10 g/L), peptone (5 g/L), Tween-20 (2.5 mL/L) and CaCl₂ (0.10 g/L) (Gunashree & Venkateswaran, 2008; Monteiro et al. 2012). The culture media were maintained at 28 °C, 180 rpm, for 7 days. Subsequently, the culture media were centrifuged at 15000 x g for 10 min at 4 °C and the supernatants were used as the crude extract of the enzyme.

Enzyme activity and protein quantification

Phytase activity was determined according to modified method Heinonen & Lahti, (1981) and Monteiro et al. (2012), measuring the inorganic phosphate released from the sodium phytate substrate (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). The enzymatic assay was carried out at different pH values, from 2 to 9 using the following buffers 100 mM: Glycine/HCl (pH 2.0-3.5); sodium acetate (pH 4.0-6.5) and Tris/HCl (7.0-9.0). The assay contained 600 µL of 1.5 mM sodium phytate solution in buffer and 150 µL of enzyme extract. The reaction was performed at 50 °C for 30 min and it was stopped by the addition of 250 µL of 10 % (w/v) trichloroacetic acid solution. Then, 1000 µL of colorimetric reagent was added (Tausky-Shorr, 1953). This reagent contained 10 % (v/v) of stock

solution (10 % (w/v) ammonium molybdate in 5 M sulfuric acid) and 5 % (w/v) ferrous sulfate in deionized water. The control of the enzyme assay was performed out at the same conditions, but using the trichloroacetic acid solution before the reaction. Spectrophotometric readings were performed at 700 nm and absorbance values were correlated with a standard curve obtained with potassium phosphate (KH₂PO₄). The enzymatic assays were carried out in triplicate. Relative standard deviations of the measurements were below 10%. The enzyme unit was defined as the amount of enzyme required to release 1 μmol inorganic phosphate per minute under the assay condition. Protein concentration was determined by (Bradford, 1976), using bovine serum albumin (BSA) as standard.

Results

Prospecting of fungi with potential for phytase production

The phytopathogenic and/or soil fungi selected for this study were those that had the sequenced genome and showed putative phytase encoding genes. This strategy directed screening and identification of fungi that potentially produce phytases not characterized and described in the literature (Table S1).

Prediction and *in silico* analysis of fungi phytases

The predicted enzymes capable of catalyzing phytate hydrolysis identified by JGI were clustered on a multidimensional scale (MDS) plot (Fig. 1). Based on the analysis of the distribution and profile of the MDS plots it was possible to identify the existence of four well-defined groups of enzymes (Fig. 1a). According to the arrangement of the clusters, the group of βPP phytases was located on the left side, while the predicted enzymes belonging to the HAP superfamily (two groups of enzymes, the PGM-*like* and HAP phytases) were located on the right side, and the enzymes with dual function phytase/ esterase could be observed at the top (Fig. 1a). The proteins predicted as HAP phytases and the PGM-*like* overlapped in the MDS graph (Fig. 1a), suggesting the fact that both belong to the same superfamily (Rigden, 2008). In addition, the predicted HAP phytases could be divided into three distinct clusters (Fig. 1b).

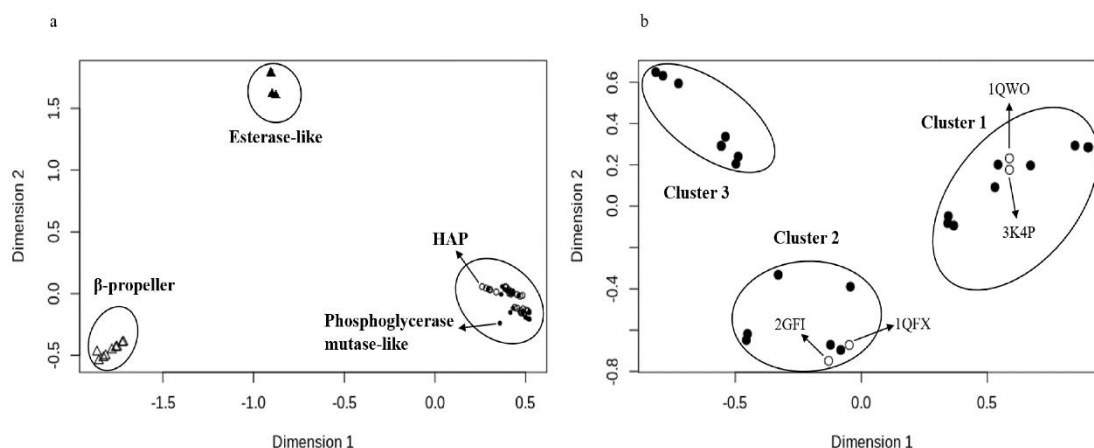


Fig. 1 Multidimensional Scaling Analysis (MDS)

a. MDS plot of fungal phytases belonging to β -propeller family (left); phosphoglycerate mutase-like (right); esterases-like (up); and histidine acid phosphatases family (right). b. MDS plot of phytases belonging to histidine acid phosphatase superfamily. The fungal species and their respective NCBI accession numbers for each protein are highlighted in MDS as following: 1QWO spot: *Aspergillus fumigatus* 1QWO; 3K4P spot: *Aspergillus niger* 3K4P; 2GFI spot: *Debaryomyces castellii* 2GFI and 1QFX spot: *Aspergillus niger* 1QFX.

These results suggest that these phytases belonging to the same HAP family could have structural and biochemical variability. The PGM-like sequences were detected in the genome of *C. cubensis*, *C. graminicola*, *C. cassicola*, *F. graminearum*, *P. sanguineus* and *V. dahliae* fungi (Table S2). The presence of esterase coding sequences was verified in *A. alternata* (403471), *L. nuda* (527697), *T. gibbosa* (1320189) and *S. turcica* (34467). The esterase-like was another group of proteins identified as phytate degrading enzyme by JGI (Table S2).

The prediction of fungal phytases by similarity searches resulted in 50 predicted members belonging to the histidine acid phosphatases superfamily (HAP phytases and phosphoglycerate mutase-like (PGM-like)) (Fan et al. 2013; Balaban et al. 2018), β -propeller phytases (β PP) (Balaban et al. 2016; Kumar et al. 2017), and esterase-like enzymes. After a manual curation step and analysis of sequence variability using phytases experimentally characterized and described in literature as belonging to the HAP and β PP families (Rigden, 2008; Kumar et al. 2017), thirty sequences of phytases were predicted, of which twenty-three had the HAP signature and the other seven phytases contained the β PP signature. The JGI database contained twenty-one of these sequences annotated. Nine putative phytase sequences were unpublished, and these sequences were annotated by this study and classified as belonging to the HAP superfamily. These phytases were

characterized *in silico* regarding physicochemical parameters, using the Expsy ProtParam tool (Table 1; Table S3).

Table 1 Physicochemical parameters predicted for histidine acid phosphatases and β -propeller phytases according to analysis by ExPASy ProtParam tool.

Fungal Nomenclature (JGI)	JGI ID Protein	MW	pI	ϵ	Ii	Ai	GRAVY	R (-)	R (+)
<i>Alternaria alternata</i>	356871 ^c	61.00	5.23	85260	35.08	78.12	-0.265	57	35
	405153 ^c	59.94	4.71	58720	38.71	71.37	-0.205	50	28
	344553 ^c	54.74	7.24	82905	36.05	72.52	-0.541	57	57
	479563 ^b	77.60	4.72	71500	29.28	77.55	-0.183	91	58
<i>Alternaria brassicicola</i>	9921 ^b	77.96	4.83	68520	28.02	77.52	-0.181	92	62
	986 ^{ac}	58.09	5.12	57230	37.89	70.86	-0.214	45	31
	5269 ^{ac}	58.62	7.59	94490	35.28	72.19	-0.448	56	57
<i>Chrysosporthe cubensis</i>	1768 ^{ac}	66.07	5.59	85760	40.70	75.71	-0.513	57	55
	7247 ^{ac}	56.64	4.64	95395	36.12	70.76	-0.250	60	48
<i>Colletotrichum graminicola</i>	4411 ^b	80.70	4.36	102315	24.10	82.64	-0.241	60	47
<i>Corynespora cassiicola</i>	615278 ^b	77.36	4.27	69885	40.02	75.14	-0.192	58	34
<i>Fusarium graminearum</i>	5886 ^b	83.98	5.24	94420	26.40	74.15	-0.118	104	53
<i>Lepista nuda</i>	476144 ^c	69.44	5.66	108010	37.87	72.54	-0.135	98	39
	1162592 ^{ac}	54.16	5.17	64330	39.98	75.69	-0.347	103	87
	1163530 ^c	44.61	4.86	43340	36.81	71.71	-0.222	95	61
	1261991 ^c	48.74	5.88	62840	30.76	78.47	-0.295	52	35

MW, molecular weight (g/mol); pI, isoelectric point; EC, extinction coefficient ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$); Ii, instability index; Ai, aliphatic index; GRAVY, grand average hydropathicity; -R, number of negative residues; +R, number of positive residues. ^aPhytases noted by this study. ^bPhytases predicted by JGI as part of the β -propeller family; ^cPhytases predicted by JGI as part of the HAP family.

Table 1 Physicochemical parameters predicted for histidine acid phosphatases and β -propeller phytases according to analysis by ExPASy ProtParam tool.

Fungal Nomenclature (JGI)	JGI ID Protein	MW	pI	ϵ	Ii	Ai	GRAVY	R (-)	R (+)
<i>Setosphaeria turcica</i>	92222 ^b	78.25	4.77	77335	35.03	76.32	-0.223	46	34
	32355 ^c	55.07	6.76	85635	36.75	76.08	-0.273	44	30
	152582 ^c	60.77	5.77	59750	38.03	70.79	-0.128	40	34
	21528 ^c	56.86	4.70	73395	34.09	70.39	-0.347	70	44
<i>Talaromyces pinophilus</i>	6307 ^{ac}	57.05	4.71	73270	40.38	73.43	-0.138	58	27
	7227 ^{ac}	51.01	4.44	70415	36.40	74.54	-0.265	62	39
<i>Trametes gibbosa</i>	1320625 ^c	67.75	5.47	103750	44.70	73.98	-0.151	50	34
	1322210 ^c	63.71	5.82	92290	43.57	80.34	-0.386	58	52
	1325564 ^c	58.14	6.05	91260	34.17	72.90	-0.088	57	36
	1354848 ^c	60.13	5.02	77810	33.46	79.57	-0.144	46	42
	1348647 ^c	53.24	6.16	46340	35.40	77.96	-0.176	40	37
	1373926 ^{ac}	54.17	6.37	70750	43.14	75.22	-0.057	46	39
	1343092 ^{ac}	47.90	5.76	77850	33.65	84.18	-0.108	103	45
<i>Verticillium dahliae</i>	7363 ^b	80.24	4.31	108845	29.82	82.79	-0.198	57	32

MW, molecular weight (g/mol); pI, isoelectric point; EC, extinction coefficient ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$); Ii, instability index; Ai, aliphatic index; GRAVY, grand average hydropathicity; -R, number of negative residues; +R, number of positive residues. ^aPhytases noted by this study. ^bPhytases predicted by JGI as part of the β -propeller family; ^cPhytases predicted by JGI as part of the HAP family.

Fungal HAP phytases described in literature have a molecular mass between 42 and 90 kDa (Singh et al., 2018; Balaban et al., 2018), as well as the predicted molecular masses of the fungal HAP phytases of this study, that ranging from 44 to 69 kDa. In contrast, β PP phytases reported in literature have molecular mass of about 40 kDa and are described only in bacteria (Sanangelantoni et al., 2018). In this work, the predicted fungal β PP phytases have a higher molecular mass, around 77 kDa; this fact may be associated with the EGF-*like* domain present in the predicted sequences of the fungal β PP phytases of this study. The HAP and β PP phytases showed values of predicted isoelectric point between 4.70-7.59 and 4.27-5.24, respectively. The previously described fungal HAP phytases have an isoelectric point close to 5.0 (Singh et al., 2018) and between 4.0 and 6.0 for bacterial β PP phytases (Verma et al., 2016). This result could indicate the acid or basic character of these enzymes, and may be related to the amount of amino acid residues negatively and positively charged, which can be observed by the R (-) and R (+) index. The predicted values of the molar extinction coefficient (ϵ) of these HAP and β PP phytases ranged from 43340 to 108010 and from 68520 to 108845, respectively. The ϵ value of fungal β PP phytases were higher compared with this value of *Bacillus* β PP phytase that is about 46300 (Verma et al. 2016).

In this study, the predicted instability index (Ii) (Table 1) values of the HAP and β PP phytases were predominantly less than 40, indicating that these enzymes could have prolonged half-life ($t_{1/2}$). The exception was found to HAP phytases (1320625, 1373926 and 1322210) of basidiomycete fungus *Trametes gibbosa*, which showed Ii value higher than 40, indicating theoretical $t_{1/2}$ less than 5 h. The predicted phytases exhibited higher values of aliphatic index (Ai), 70.39 - 84.18, which suggests that these enzymes could be thermostable at high temperatures. The GRAVY index values indicate that these phytases could have significant solubility in aqueous media (mean of -0.238 ± 0.12).

The fungal phytases are mostly extracellular enzymes, although intracellular phytases have been reported, but exhibiting low phytate specificity (Azeke et al., 2010). In this study, the parameters of secretion of predicted phytases were analyzed (Table 2).

Table 2 Secretion parameters predicted for histidine acid phosphatases and β -propeller phytases according to analysis by signalP 4.1, Expasy ProtParam, SecretomeP 2.0a, NetNGlyc1.0 tool.

Fungal Nomenclature (JGI)	JGI ID Protein	Seq length	SP length	TM helices	non-classical secretion	Asn-X-Ser/Thr N-Glycosylation
<i>Alternaria alternata</i>	356871 ^c	552	n.d.	n.d.	Yes	N131, N215, N271
	405153 ^c	556	22/23	n.d.	No	N224, N323, N406
	344553 ^c	488	Anchored	1 (32-54)	No	N228, N274, N360, N397
	479563 ^b	731	20/21	n.d.	No	N24, N115
<i>Alternaria brassicicola</i>	9921 ^b	731	20/21	n.d.	No	N22, N547
	986 ^{ac}	538	22/23	n.d.	No	N206, N388
	5269 ^{ac}	520	n.d.	n.d.	No	N33, N181, N306, N392, N429, N436
<i>Chrysosporthe cubensis</i>	1768 ^{ac}	601	n.d.	1 (51-73)	Yes	N102, N117, N349, N373
	7247 ^{ac}	516	n.d.	1 (49-71)	Yes	N24, N68, N328, N364, N547
<i>Colletotrichum graminicola</i>	4411 ^b	754	24/25	n.d.	No	N151, N333, N455, N496
<i>Corynespora cassicola</i>	615278 ^b	731	20/21	n.d.	No	N143, N219, N400, N424
<i>Fusarium graminearum</i>	5886 ^b	774	n.d.	1 (20-42)	No	N30, N505, N539
<i>Lepista nuda</i>	476144 ^c	634	Anchored	n.d.	No	N28, N138, N218, N277
	1162592 ^{ac}	496	21/22	n.d.	No	n.d.
	1163530 ^c	410	n.d.	n.d.	Yes	N433
	1261991 ^c	439	n.d.	n.d.	Yes	N83, N139, N348

ID: Protein identification; Seq length: Length of amino acid chain; SP, signal peptide: Presence or absence; TM transmembrane helices: Presence or absence; n.d, not detected; N-glycosylation sites. ^aPhytases noted by this study. ^bPhytases predicted by JGI as part of the β -propeller family; ^cPhytases predicted by JGI as part of the HAP family.

Table 2 Secretion parameters predicted for histidine acid phosphatases and β -propeller phytases according to analysis by signalP 4.1, Expasy ProtParam, SecretomeP 2.0a, NetNGlyc1.0 tool.

Fungal Nomenclature (JGI)	JGI ID Protein	Seq length	SP length	TM helices	non-classical secretion	Asn-X-Ser/Thr N-Glycosylation
<i>Setosphaeria turcica</i>	92222 ^b	731	n.d.	n.d.	Yes	N24, N68, N548
	152582 ^c	549	n.d.	n.d.	Yes	N525
	21528 ^c	520	n.d.	n.d.	Yes	N30
	32355 ^c	489	Anchored	n.d.	No	N106, N410
<i>Talaromyces pinophilus</i>	6307 ^{ac}	510	n.d.	1 (42-61)	Yes	N127, N211, N267, N296, N386
	7227 ^{ac}	465	20/21	n.d.	No	N186, N271, N368
<i>Trametes gibbosa</i>	1320625 ^c	615	Anchored	1 (42-64)	No	N361, N398
	1322210 ^c	581	n.d.	1 (25-47)	Yes	N300
	1325564 ^c	521	Anchored	1 (35-57)	No	n.d.
	1343092 ^c	445	20/21	n.d.	No	N201, N298
	1354848 ^c	552	19/20	n.d.	No	n.d.
	1373926 ^{ac}	502	19/20	n.d.	No	N219, N277, N493
	1348647 ^{ac}	490	n.d.	n.d.	No	N246, N462
<i>Verticillium dahliae</i>	7363 ^b	753	24/25	n.d.	No	N141, N372, N402

ID: Protein identification; Seq length: Length of amino acid chain; SP, signal peptide: Presence or absence; TM transmembrane helices: Presence or absence; n.d, not detected; N-glycosylation sites. ^aPhytases noted by this study. ^bPhytases predicted by JGI as part of the β -propeller family; ^cPhytases predicted by JGI as part of the HAP family.

Twelve sequences of phytases showed the presence of signal peptide, of which seven were classified as HAP and five as β PP phytases. Protein sequences that showed no signal peptide were predicted as proteins secreted by non-classical pathways. These proteins can be secreted without conventional signs of secretion and, thus independent of endoplasmic reticulum protein targeting to the Golgi complex (Nickel and Seedorf, 2008). Nine of these proteins were HAP phytases and only one belonged to the β PP family. Among the sequences studied, five HAP phytases have an anchoring structure that could help in the transport of the protein to the extracellular medium. The presence of a single transmembrane helix could indicate that these enzymes may be retained in the plasmatic membrane. Seven HAP phytases and one β PP phytase showed the presence of transmembrane helices.

N-glycosylation sites were predicted for most of the phytases studied. Glycosylation is a post-translational modification of protein, important for thermostability and catalytic site stabilization, as well as protection against proteolysis (Niu et al., 2015). Among the predicted phytases, only the sequences 1354848, 1325564 of the fungus *T. gibbosa* and 1162592 of the fungus *L. nuda* do not have predicted N-glycosylation sites (Table 2).

The twenty-three predicted phytases identified by JGI as belonging to the HAP superfamily were characterized by homology using multiple alignments (Fig. 2). These alignments showed conservation of the heptapeptide RHGXRRP at the N-terminal position and showed the HD catalytic dipeptide at the C-terminal (Rigden, 2008). The prediction analysis for the presence of conserved cysteines and possible disulfide bonds were performed by Cys-Rec Softyberry bioinformatics tool using the secondary protein structure and neural networks (Fig. 2 and Table S3). The HAP phytases predicted in this study showed conserved cysteine residues.

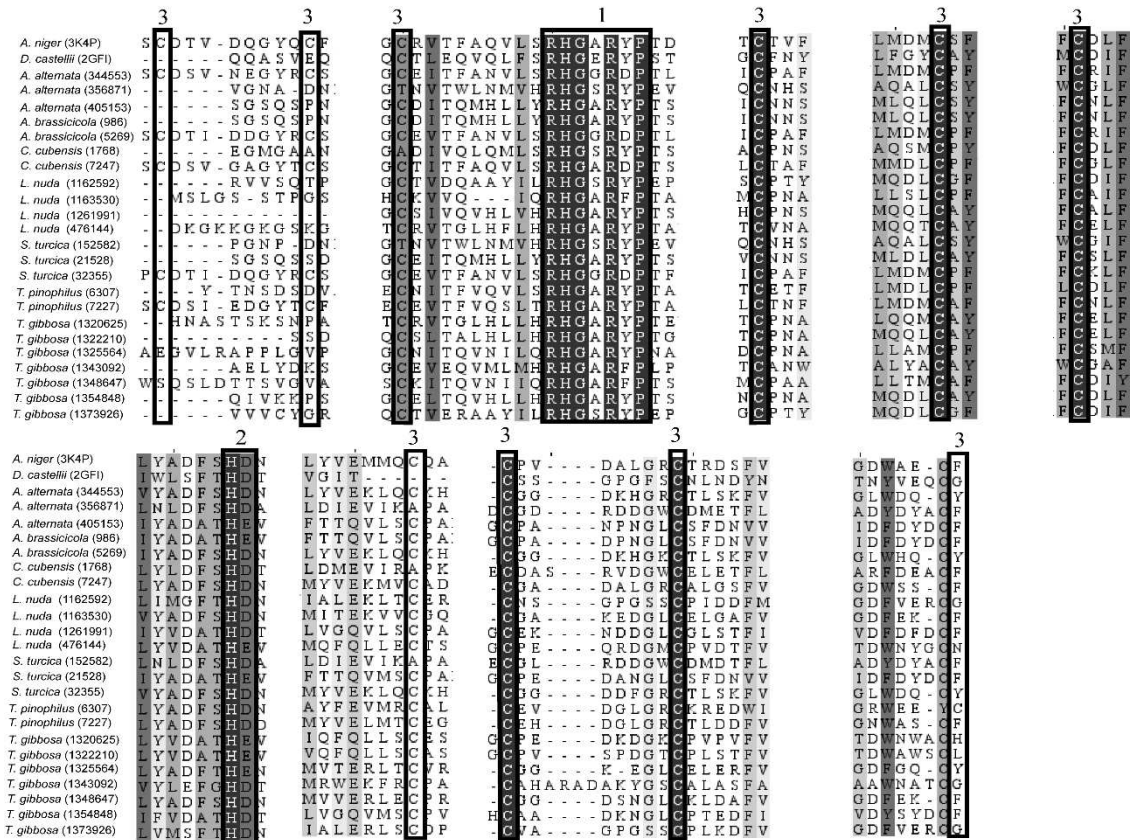


Fig. 2 Multiple sequence alignment of predicted fungal phytases belonging to the histidine acid phosphatases family (HAP) using Clustal omega. Box 1: signature of the conformational heptapeptide RHGXRXP; box 2: signature of the catalytic site HD; box 3: the eight conserved cysteines capable of forming disulfide bonds; blue: additional cysteines that do not maintain the same conservation pattern, but may occasionally form disulfide bonds. The known phytases sequences from *Aspergillus niger* (3KP4) and *Debaryomyces castellii* (2GFI) were used as reference for this study.

In addition, the seven predicted phytases identified as belonging to β PP family were characterized by homology using multiple alignments (Fig. 3). It has been reported in the literature that bacterial β PP phytases have calcium-binding sites, since these enzymes are dependent on this metal for their catalytic activity and structural stability. In this study, the Ca^{2+} binding residues found in the predicted fungal β PP phytases are conserved, as showed in *Bacillus* phytases (Fig. 3). In addition, the fungal β PP phytases predicted in the present study showed the catalytic sequence DG conserved, and exhibited the EFG-like domains (Fig. 3). These domains were not identified in previously characterized *Bacillus* β PP phytases (Kumar et al. 2017).

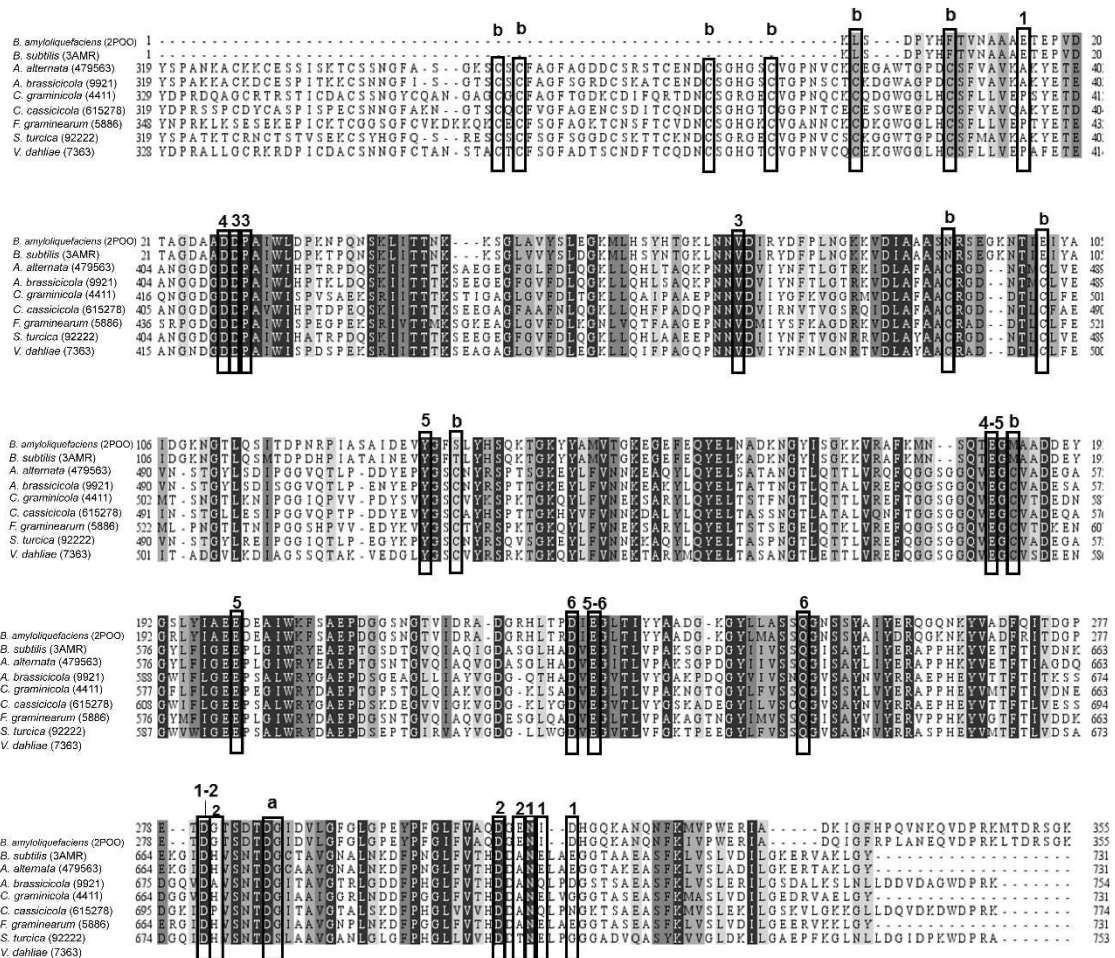


Fig. 3 Multiple sequence alignment of predicted fungal phytases belonging to the β -propeller family (β PP) using Clustal omega.

box a: signature of the catalytic site DG; box b: conserved cysteines capable of forming disulfide bonds. Boxes from 1 to 3: triad of Ca^{2+} binding amino acids responsible for thermal and conformational stabilities; boxes from 4 to 6: triad of amino acids binding to Ca^{2+} responsible for catalysis. The numbers indicated above the sequences, refer to the position of the calcium binding sites.

Cultivation of the fungi for phytase production

In order to validate the *in silico* prediction analyzes, the selected fungi were cultivated in semi-solid and liquid medium to assess the possible expression and secretion of phytases (Table 3).

Table 3 Extracellular phytase activity from fungal extracts.

Assay pH	Fungi						
	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Chrysosporthe cubensis</i>	<i>Corynespora cassiicola</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Setosphaeria turcica</i>	<i>Talaromyces pinophilus</i>	<i>Verticillium dahliae</i>
2.0	n.d.	0.301±0.13	n.d.	0.410±0.17	n.d	n.d	n.d
2.5	n.d	0.208±0.07	n.d.	n.d	n.d	0.175±0.04	n.d
3.0	n.d.	n.d.	n.d	n.d.	0.217±0.08	n.d.	n.d.
4.0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d	n.d	n.d.	n.d.
4.5	n.d	n.d.	n.d.	n.d	n.d	0.150±0.03	n.d.
5.0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d	n.d	0.142±0.03	n.d.
5.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.180±0,03	n.d.
6.0	n.d.	n.d.	0.054±0.01	n.d	n.d	0.130±0,04	n.d.
6.5	n.d.	0.302±0.07	n.d.	0.600±0.18	n.d	n.d	n.d
7.0	0.307±0.14	n.d.	0.100±0.02	n.d	n.d	n.d	0.039±0.02
7.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d	n.d	n.d	n.d.
8.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d	n.d	n.d	0.048±0.02
9.0	n.d	n.d	n.d	n.d	0.088±0.03	n.d	n.d

The enzymatic assay was carried out at 50 °C, pH 2-9, for 30 min, using sodium phytate as substrate. The enzymatic activity values represent the average of three repetitions. n.d = no detected.

The fungal enzymatic extracts were evaluated for the ability to hydrolyze sodium phytate. These enzymatic reactions indicated nine fungi as possible phytase producers, since small amount of phosphate was released and detected from the enzyme assays. The fungus *T. pinophilus* was cultivated in submerged fermentation and showed enzymatic activity at pH values of 2.5 and between 4.5-6.0. The fungus *C. cubensis* showed enzymatic activity at pH values of 2.0; 2.5 and 6.5. This result may be a confirmation of the *in silico* analyzes that indicated the presence of two putative phytase genes of HAP superfamily and one gene of PGM-like. The fungi *C. cassicola* exhibited enzymatic activity at pH values of 6.0 and 7.0, while *V. dahliae* showed activity at pH values of 7.5 and 8.5. The both fungi have putative genes for the β PP phytases, which are classified as alkaline enzymes (Kumar et al. 2014; Borgi et al. 2014), and two PGM-like encoding gene. The fungus *S. turcica* showed enzyme activity at pH 3.0 and 9.0 and had putative genes of phytases belonging to β PP and HAP family, and esterase-like. On the other hand, the *A. alternata* exhibited enzyme activity only at pH 7.0 and contained putative genes for β PP phytase, HAP phytase and esterase-like. Meanwhile, the fungus *F. graminearum* (DOA 1137) showed activity at acidic pH 2.0 and 6.5, which may be indicative of the activity of the PGM-like and β PP enzymes, respectively. In the experimental conditions used, no phytase activity was detected from the enzymatic assays using the crude extracts of the fungi *A. brassicicola*, *L. nuda*, *P. sanguineus* and *T. gibbosa*.

Discussion

Predictive analyzes of fungal genomes revealed protein coding genes with the potential to catalyze phytate hydrolysis, classified into four enzyme groups. Among these proteins, two families of known phytases were identified, the HAP and β PP phytases, that have high specificity for phytate. In addition, the phosphoglycerate mutase-like enzymes were also identified. These enzymes together with HAP phytases and other phosphatases make up the HAP superfamily, since these enzymes have the same protein signature. Another group identified was formed by esterase-like enzymes. The identification of sequences classified as esterase-like could be justified due the activity hydrolytic of these enzymes on the ester-like bonds, which are found in the phytic acid. In this molecule, the phosphate groups are bonded to myoinositol by phosphomonoester linkage type (Sacco et al. 2012; Zhang et al. 2018). However, the knowledge about the biochemical characteristics of esterase-like is still scarce. The HAP superfamily can be subdivided into two branches: the first consists of cofactor-dependent phosphoglycerate mutase and

fructose-2,6-bisphosphates; and the second consists of phytases (Rigden, 2008; Sacco et al. 2012). In general, enzymes classified as phosphatases can act on various phosphate substrates, while the enzyme classified as phytase, should have catalytic activity on phytic acid as a preferred substrate (Singh et al. 2018; Zhang et al. 2018). Thus, in the present work, the PGM-*like* and esterase-*like* proteins, although identified as enzymes that may be associated with phytic acid hydrolysis, were not used for *in silico* characterization studies, because these enzymes are less specific for phytate catalysis.

The *in silico* analysis showed that some fungi were multigenic for HAP phytase, but these fungi had only one putative gene for β PP phytase. The HAP family enzymes challenge the currently accepted classification system, since they are promiscuous. However, these enzymes share the same general hydrolysis reaction mechanism, therefore they are grouped in the same cluster, and it can be seen in the MDS graph plot (Fig 1a). The sequences identified as HAP phytases were arranged in three clusters (Fig. 1). The distribution of clusters indicates the variability between HAP phytases sequences, which could be due the biochemical and structural characteristics of these enzymes (Singh et al., 2018).

The differences between HAP and β PP phytases sequences showed in the multiple sequence alignments (Figs. 2 and 3), indicate the divergences between the catalytic activities of these enzymes. The HAP phytases predicted in this study showed the signatures of this family, that are the heptapeptide RHGXXRP and the HD catalytic dipeptide (Rigden, 2008). These phytases exhibited conserved cysteine residues, that could not be directly involved in catalysis, but could be essential for the formation of disulfide bridges, important for maintaining the molecular structure required for the organization of the active site and substrate binding domain (Wang et al., 2004). According Kumar et al. (2013), the number of disulfide bonds alters the pattern of hydrogen bonds, increasing the distances between atoms and dihedral angles in the active site of HAP phytases. In this study, the isoelectric points and the R (-) and R (+) index predicted for HAP phytases may indicate the acid character, with possible activity at lower pH, as observed for the HAP phytases already described in the literature (Singh et al., 2018).

The β PP phytases show very particular properties and the absence of a specific signature, as found in the HAP phytases. The bacterial β PP phytases have a very peculiar tertiary structure consisting of β structural elements forming a six blade propeller. The active center is located on the β propeller surface and mainly consists of negatively charged amino acids (Oh et al. 2001; Balaban et al. 2016). The β PP phytases predicted in

this study showed the conserved Ca²⁺ binding residues (Fig. 3), as founded in bacterial β PP phytases. It has been reported in the literature that bacterial β PP phytases are dependent of Ca²⁺ for its catalytic activity and structural stability. Three calcium-binding sites of high affinity (Ca1, Ca2 and Ca3) are responsible for thermostability, and three sites of low affinity (Ca4, Ca5 and Ca6) are responsible for the catalytic activity (Oh et al. 2001; Balaban et al. 2016). For the phytate hydrolysis reaction, calcium must be present in the reaction medium or complexed with phytic acid, which explains the higher affinity of β PP for calcium phytate compared to other phosphate substrates.

Most β PP phytases reported in the literature are produced by bacteria, mainly by the genus *Bacillus* (Kumar et al. 2017). In this study, the presence of β PP phytase genes were detected in ascomycete fungi. The fungal β PP phytase could have a phylogenetic relationship with the enzymes of the same family identified in filamentous bacteria (actinomycetes) (Boukhris et al. 2015; Kumar et al. 2014). In addition, the fungal β PP phytases analyzed in this study showed different predicted parameters compared with the characterized bacterial β PP phytases (Verma et al. 2016; Kumar et al. 2017). The fungi β PP phytases exhibited higher molecular mass values compared to those reported for bacterial β PP phytases (Kumar et al., 2017), probably due to predicted EGF-*like* domain. Furthermore, bacterial β PP phytases have been described in the literature as alkaline enzymes with higher thermostability (Kumar et al. 2017). Accordingly, the predicted isoelectric points and the R (-) and R (+) index of these fungal β PP phytases may indicate the alkaline character, as reported for *Bacillus* phytases (Kumar et al., 2017).

Protein sequences that show signal peptide have potential to be exported by classical secretory pathways to the extracellular medium. In this work, the most of predicted fungal HAP and β PP phytases showed a signal peptide or showed to be secreted by non-classical pathways, suggesting that these enzymes could have potential to be secreted by the fungi. In fact, the experimental culture conditions were able to induce phytate degrading enzyme expression in most fungi, except *A. brassicicola*, *L. nuda*, *P. sanguineus* and *T. gibbosa*. Since the fungi genome harbors sequences of phytases from different families and the fungal extracts exhibited activity at different pH values, it is possible to suggest that distinct phytases could be expressed from the same fungus. It is described that in addition to classical phytases, other promiscuous phosphatases that are capable of releasing phosphate from phytate could be secreted by fungi (Rigden, 2008; Sacco et al., 2012). It may be possible that phytase activity is also due to the release of intracellular phosphatases acting on phytate, which may occur due to cell disruption during the enzyme extraction process.

Although in the literature the characterization of mainly bacterial β PP phytases has been reported, the results of *in silico* and experimental analyzes suggest that *A. alternata*, *C. cassiicola*, *F. graminearum*, *S. turcica* and *V. dahliae* could secrete β PP phytases. In these fungi, all predicted β PP phytases had signal peptide or could be secreted by non-classical pathways. Moreover, these fungal extracts exhibited the ability to release phosphate from reaction with sodium phytate, at pH values compatible with the activity of the bacterial β PP phytases (Balaban et al. 2016; Ushasree et al. 2019), which contributes to support this idea.

Some of the fungi had genes encoding HAP and β PP phytases, as well as other phosphatases, but the conditions for the induction of expression of these enzymes may vary according to the specific characteristics of each fungus, and in this case, the experimental conditions used could be unsuitable for some fungi. In addition, the assay conditions are crucial for detecting the enzyme activity, which depends on the intrinsic biochemical and kinetic properties of each enzyme. The possibility that some of the fungi studied can produce different phytases is interesting and may be favorable from an industrial point of view, since these predicted enzymes showed distinct but complementary biochemical properties, such as pH of activity, that may enhance phytate hydrolysis. This study allowed identifying fungal HAP and β PP phytases that can be used in future biotechnological applications, especially for animal feed supplementation.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest

The authors report no conflicts of interest.

Compliance with ethics requirements

This article does not contain any studies with human or animal subjects.

References

- Adeola O, Cowieson AJ. (2011). Board-invited review: opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve nonruminant animal production. *J Anim Sci.*, v.89, p.3189–3218.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.*, v.215, p.403–410.

- Awad, G.E.; Helal, M.M.; Danial, E.N.; Esawy, M.A. (2014). Optimization of phytase production by *Penicillium purpurogenum* GE1 under solid-state fermentation by using Box-Behnken design. Saudi J of Biolog Sci., v.21, p.81-8.
- Azeke MA, Greiner R, Jany KD. (2010). Purification and characterization of two intracellular phytases from the tempeh fungus *Rhizopus oligosporu*. J Food Biochem. v.35, n.1, p.213-237.
- Balaban NP, Suleimanovaa AD, Shakirova EV, and Sharipovaa MR. (2018). Histidine Acid Phytases of Microbial Origin. Microb., v. 87, n.6, p.745–756.
- Balaban NP, Suleimanova AD, Valeeva LR, Shakirov EV, Sharipova MR. (2016). Structural characteristics and catalytic mechanism of *Bacillus* β -propeller phytases. Biochem., v.81, n.8, p.785–793.
- Bhavsar K, Buddhiwant P, Soni SK, Depan D, Sarkar S, Khire JM. (2013). Phytase isozymes from *Aspergillus niger* NCIM 563 under solid state fermentation: Biochemical characterization and their correlation with submerged phytases. Proc. Biochem., v.48, p.1618-1625.
- Borgi M A, Khila M, Boudebouze S, Aghajari N, Szukala F, Pons N, Maguin E, Rhimi M. (2014). The attractive recombinant phytase from *Bacillus licheniformis*: biochemical and molecular characterization. Appl. Microb. and Biotech., v.98, p.5937–5947.
- Boukhris I, Farhat-Khemakhem A, Blibech M, Bouchaala K, Chouayekh H. (2015). Cloning and characterization of the first actinomycete β -propeller phytase from *Streptomyces* sp. US42 Int. J. Biol Macromol., v.80, p. 581-587.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analyt. Biochem., v.72, p.248–254.
- Fan CM, Wang YH, Fu CY, Zheng YF. (2013). Fingerprint motifs of phytases. African J. of Biotech. v.12, p.1138-1147.
- Gunashree B, Venkateswaran G. (2008). Effect of different cultural conditions for phytase production by *Aspergillus niger* CFR 335 in submerged and solidstate fermentations. J. of Ind. Microb. & Biotech. v.35, p.1587-1596.
- Gupta R, Jung E, Brunak S. (2004). Prediction of N-glycosylation sites in human proteins. In preparation.
- Ha, N.C.; Oh, B.C.; Shin, S.; Kim, H.J.; Oh, T.K.; Kim, Y.O.; Choi, K.Y.; Oh, B.H. (2000) Crystal structures of a novel, thermostable phytase in partially and fully calcium-loaded states. Nat Struct Mol Biol., v.7, p.147-153.

- Heinonen JK, Lahti RJ. (1981). A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to assay of inorganic pyrophosphatase. *Analyt Biochem.*, v.113, p.313-317.
- Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA. (2005). ed. *Manual de Fitopatologia. Volume 2. Doenças das Plantas Cultivadas. 4ª Edição.* Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo. p.666.
- Kimura, M. (1980). 'A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences', *J Mol Evol.*, v.16, p.111–120.
- Krogh A, Larsson B, Von Heijne, Sonnhammer ELL. (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *J of Mol Biol.*, v.305, n.3, p.567-580.
- Kruskal J, Wish M. (1978). *Multidimensional Scaling.* SAGE.
- Kumar V, Singh P, Jorquera MA, Sangwan P, Kumar P, Verma AK & Agrawal S. (2013). Isolation of phytase-producing bacteria from Himalayan soils and their effect on growth and phosphorus uptake of Indian mustard (*Brassica juncea*). *W J Microb and Biotech*, v.29, n.8, p.1361-1369.
- Kumar V, Sangwan P, Verma AK, Agrawal S. (2014). Molecular and Biochemical Characteristics of Recombinant β -Propeller Phytase from *Bacillus licheniformis* Strain PB-13 with Potential Application in Aquafeed. *Appl. Biochem. Biotech.* v.173, n.2, p.646–659.
- Kumar V, Yadav AN, Verma P, Sangwan P, Saxena A, Kumar K, Singh B. (2017). β -Propeller phytases: Diversity, catalytic attributes, current developments and potential biotechnological applications. *Inter. J. Biol. Macrom.*, 98, 595–609.
- McWilliam H, Li W, Uludag M, Squizzato S, Park Ym, Buso N, Cowley A, Lopez R. (2013). Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic acids res* 41 (Web Server issue): W597-600.
- Monteiro, P.S.; De Melo, R.R.; Tavares, M.P.; Falkoski, D.L; Guimarães, V.M.; Pereira, O.L.; Rezende, S.T. (2012). Production optimization, characterization and evaluation of *Rhizopus Stolonifer* phytase in the hydrolysis of phytate in animal feed. *Rev. Bras. de Agrociên.* v.18 n. 2-4, p.117-132.
- Nickel W, Seedorf M. (2008). Unconventional Mechanisms of Protein Transport to the Cell Surface of Eukaryotic Cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* v.24, p.287–308. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175320>.

- Niu C, Luo H, Shi P, Huang H, Wang Y, Yang P, Yao B. (2015). N-Glycosylation improves the pepsin resistance of histidine acid phosphatase phytases by enhancing their stability at acidic pHs and reducing pepsin's accessibility to its cleavage sites. *Appl. and Envir. Microb.*, v.82, p.1004–14.
- Oakley AJ. (2010). The structure of *Aspergillus niger* phytase PhyA in complex with a phytate mimetic. *Bioch and Bioph Res Commun.* v.397, n.4, p.745-749.
- Oh BC, Chang B S, Park KH, Ha NC, Kim HK, Oh BH, Oh TK. (2001). Calcium-dependent catalytic activity of a novel phytase from *Bacillus amyloliquefaciens* DS11. *Biochem.*, 40, 9669-9676.
- Petersen TN, Brunak S, Von Heijne G, Nielsen H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods.* v.8, p.785-786.
- Potter SC, Luciani A, Eddy SR, Park Y, Lopez R, Finn RD. (2018). HMMER web server: 2018 update. *Nucleic Acids Research Web Server Issue 46:W200-W204.*
- Raboy V. (2003). Myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. *Phytochem.* v.64, p.1033–1043.
- Ragon M, Hoh F, Aumelas A, Chiche L, Moulin G, Boze H. (2009). Structure of *Debaryomyces castellii* CBS 2923 phytase. *Acta Crystallogr. Sect.F 65:* 321-326.
- Rigden DJ. (2008). The histidine phosphatase superfamily: Structure and function. *Biochem. J.*, v.409, p.333–348.
- Sacco F, Perfetto L, Castagnoli L, Cesareni G. (2012). O intermatoma da fosfatase humana: um intrincado retrato de família. *Letras FEBS.* v.586, n.17, p.2732-2739.
- Sanangelantoni AM, Malatrasi M, Trivelloni E, Visioli G, & Agrimonti C. (2018). A novel β -propeller phytase from the dioxin-degrading bacterium *Sphingomonas wittichii* RW-1. *Appl Microb and Biotech.* v.102, p.8351–8358. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9248-2>
- Sarrouh B, Santos TM, Miyoshi A, Dia R, Azevedo V. (2012) “Up-To-Date insight on industrial enzymes applications and global market,” *J. of Bioproc. & Biotechn.* S4, 002-020.
- Shanmugam G. (2018). Characteristics of Phytase Enzyme and its Role in Animal Nutrition. *Int J of Cur Microb and Ap Sci.*, v.7, n.3, p.1006-1013.
- Singh B. (2013). Improved production of protease-resistant phytase by *Aspergillus oryzae* and its applicability in the hydrolysis of insoluble phytates. *J. Ind. Microbiol. & Biotechnol.*, v.40, n.8, p.891-899.

- Singh B, Kunze G, Satyanarayana T. (2011). Developments in biochemical aspects and biotechnological applications of microbial phytases. *Biotechnol. Mol. Biol. Review.*, v.6, n.3, p.69–87.
- Singh B, Sharma KK, Amit Kumari A, Anil Kumar A, Gakhar SK. (2018). Molecular modeling and docking of recombinant HAP-phytase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* reveals insights into molecular catalysis and biochemical properties. *Int J of Biol Macrom.*, v.115, p.501–508.
- Song HY, Sheikha AF, Hu DM. (2019). The positive impacts of microbial phytase on its nutritional applications. *Trends in Food Sci & Techn.* v.86, p.553-562
- Stanke M, Morgenstern B. (2005). AUGUSTUS: a web server for gene prediction in eukaryotes that allows user-defined constraints. *Nucl Acids Res.* v.33, W465 – W467.
- Stultz, CM, White JM, and Smith TF. (1993). Structural analysis based on state-space modeling. *Protein Sci.*, v.2, p.305-314.
- Tausky HH, Skorr E. (1953). A micro colorimetric method for determination of inorganic 297 phosphorous. *J. Biol. Chem.*, v.202, p.675-685.
- Team RC. (2013). “R: A language and environment for statistical computing”. 201.
- Ushasree MV, Jaiswal AK, Krishna S, Pandey A. (2019). Thermostable phytase in feed and fuel industries. *Biores Techn.* v.278, p.400-407.
- Verma A, Singh VK, Gaur S. (2016). Computational based functional analysis of *Bacillus* phytases. *Comput. Biol. and Chem.*, v.60, p.53-58.
- Wang XY, Meng FG, Zhou HM. (2004). The role of disulfide bonds in the conformational stability and catalytic activity of phytase. *Biochem Cell Biol.* v.82, p.329-334.
- Vohra A, Satyanarayana, T. (2003). Phytases: microbial sources, production, purification and potential biotechnological applications. *Crit. in Rev. Biotechnol.* v.23, p.29–60.
- Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ. (2009). Jalview Version 2-a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinf.*, v.25, p.1189-1191.
- Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Williams KL, Appel RD, Hochstrasser DF. (1999). Protein Identification and Analysis Tools in the ExPASy Server. *Meth in Molec Biol.* v.112, p.531–552.
- Yao H, Huang, J, Tan J. (2012). The surface display of phytase on yeast cell and activity assay of the displayed proteins. *J. Yeast and Fungal Res.*, v.3, p.58-64.

- Young F, Hamer R. (1987). *Multidimensional Scaling: History, Theory, and Applications*. Lawrence Erlbaum Associates, Hillsdale, NJ.
- Zeng YF, Ko TP, Lai HL, Cheng YS, Wu TH, Ma Y, Chen CC, Yang CS, Cheng KJ, Huang CH, Guo RT, Liu J.R. (2011). Crystal structures of *Bacillus* alkaline phytase in complex with divalent metal ions and inositol hexasulfate. *J Mol Biol.*, v.409, p.214-224.
- Zhao Q, Liu H, Zhang Y, Zhang Y. (2010). Engineering of protease-resistant phytase from *Penicillium sp.*: high thermal stability, low optimal temperature and pH. *J Biosci and Bioeng.*, v.110, p.638-45.
- Zhang H, Yang L, Ding W, Ma Y. (2018). Theoretical Studies on the Catalytic Cycle of Histidine Acid Phosphatases Revealing an Acid Proof Mechanism. *J Phys Chem B.*, v.122, n.30, p.7530–7538.

Supplementary

Table S1 Fungi used for the survey of potential phytase producers.

Fungi	JGI Name	JGI Code	Genome References
<i>Acremonium zeae</i> B*	-	-	-
<i>Alternaria alternata</i> ^a	<i>A. alternata</i> MPI-PUGE-AT-0064 v1.0	Altalt1	(Martin, 2016) (Project ID: 1103684)
<i>Alternaria brassicicola</i> ^a	<i>A. brassicicola</i>	Altbr1	Ohm RA et al., 2012
<i>Bipolaris oryzae</i> ^a	-	-	-
<i>Blumeria graminis</i> ^c	<i>B. graminis</i> f. sp. <i>hordei</i> DH14	Blugr2	Frantzeskakis L et al., 2018
<i>Botryodiplodia theobromae</i> ^a	-	-	-
<i>Botrytis cinerea</i> ^d	<i>B. cinerea</i> v1.0	Botci1	Staats M et al., 2012
<i>Cercospora sojina</i> ^a	-	-	-
<i>Cercospora sorghi</i> ^a	-	-	-
<i>Chrysosporthe cubensis</i>	-	-	-
<i>Cochliobolus heterostrophus</i> ^c	<i>C. heterostrophus</i> C5 v2.0	CocheC5_3	Ohm RA et al., 2012
<i>Cochliobolus miyabeanus</i> ^c	<i>C. miyabeanus</i> ATCC 44560 v1.0	Cocmi1	Condon BJ et al., 2013
<i>Colletotrichum gossypii</i> ^a	-	-	-

^a Fungi with genome annotated in JGI with phytase-encoding gene. ^b Fungi without genome annotated in JGI with phytase-encoding gene.

Table S1 Fungi used for the survey of potential phytase producers not yet described in the literature. (Continuation).

Fungi	JGI Name	JGI Code	Genome References
<i>Colletotrichum graminicola</i> ^b	<i>C. graminicola</i> M1.001	Colgr1	O'Connell RJ et al., 2012
<i>Corynespora cassiicola</i> ^b	<i>C. cassiicola</i> CCP v1.0	Corca1	Lopez D et al., 2018
<i>Diaporthe phaseolorum</i> ^a	-	-	-
<i>Exserohilum turcicum</i> ^b	<i>S. turcica</i> Et28A	Settu3	Ohm RA et al., 2012
<i>Fusarium graminearum</i> ^b	<i>F. graminearum</i>	Fusgr1	Cuomo CA et al., 2007
<i>Fusarium solani</i> ^c	<i>F. solani</i> MPI-SDFR-AT-0091 v1.0	Fusso1	(Martin, 2016) (Project ID: 1103684)
<i>Gloeocercospora sorghi</i> ^a	-	-	-
<i>Lepista sp</i> ^b	<i>L. nuda</i> CBS247.69 v1.0	Lepnud1	Du J et al., 2018
<i>Macrophomina phaseolina</i> ^d	<i>Macrophomina phaseolina</i> MS6	Macph1	Islam MS et al., 2012
<i>Magnaporthe grisea</i> ^c	<i>Magnaporthe grisea</i> v1.0	Maggr1	Dean RA et al., 2005
<i>Penicillium pinophilum</i>	-	-	Li CX et al., 2017
<i>Phaeosphaeria maydis</i> ^a	-	-	-
<i>Phoma sorghina</i> ^a	-	-	-
<i>Phomopsis helianthi</i> ^a	-	-	-
<i>Puccinia triticinea</i> ^c	<i>Puccinia triticina</i> 1-1 BBBB Race 1	Puctr1	Cuomo CA et al., 2017

^a Fungi with genome annotated in JGI with phytase-encoding gene. ^b Fungi without genome annotated in JGI with phytase-encoding gene.

Table S1 Fungi used for the survey of potential phytase producers not yet described in the literature. (Continuation)

Library UFV Name	JGI Name	JGI Code	Genome References
<i>Ramulispora sorghi</i> ^a	-	-	-
<i>Puccinea purpurea</i> ^a	-	-	-
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	<i>P. sanguineus</i> BRFM1264	Pycsa1	Rosso, Project ID: 1024952
<i>Rhizoctonia solani</i> ^d	<i>R. solani</i> AG-1 IB	Rhiso1	Wibberg D et al., 2013
<i>Sclerotinia sclerotium</i> ^d	<i>S. sclerotiorum</i> v1.0	Scslsc1	Amselem J et al., 2011
<i>Sclerotium oryzae</i> ^a	-	-	-
<i>Sclerotium rolfsii</i> ^a	-	-	-
<i>Septoria glycines</i> ^a	-	-	-
<i>Stagonospora nodorum</i> ^c	<i>S. nodorum</i> SN15 v2.0	Stano2	Hane JK et al., 2007
<i>Stenocarpella maydis</i> ^a	-	-	-
<i>Thanatephorus cucumeris</i> ^c	<i>T. cucumeris</i> MPI-SDFR-AT-0096 v1.0	Thacu1	(Martin & Spatafora, 2016) (Project ID: 1103684)
<i>Thielaviopsis basicola</i> ^a	-	-	-
<i>Tilletia barclayana</i> ^a	-	-	-
<i>Trametes gibbosa</i> ^b	<i>T. CIRM.BRFM 1770</i> v1.0	Tragib1	Berrin et al., 2012
<i>Ustilaginoidea virens</i> ^c	<i>U. virens</i>	Ustvir1	Kumagai T et al., 2016
<i>Verticillium dahliae</i> ^b	<i>V. dahliae</i> VdLs.17	Verda1	Klosterman SJ et al., 2011

^a Fungi with genome annotated in JGI with phytase-encoding gene. ^b Fungi without genome annotated in JGI with phytase-encoding gene.

Table S2 Phytase domains according annotation databases: JGI, Pfam, ProSite, Super Family.

Nome JGI	Protein ID JGI	Identification	Anotação JGI	Domain Pfam	Domain ProSite	Domain Super Family
<i>Alternaria alternata</i> 133aPRJ v1.0	356871	HAP phy	HAP	PF00328	PS00616	SSF53254
	405153	HAP phy	HAP	PF00328	PS00616	SSF53254
	344553	HAP phy	HAP	PF00328	PS00616	SSF53254
	479.563	βPP	(3-phytase) β-propeller	PF02333	PS51662	SSF50956
	403360	Esterase-like	Esterase-like	PF13449		
<i>Alternaria brassicicola</i>	9921	βPP	(3-phytase) β-propeller	PF02333		
	986	HAP phy	no assembly	no assembly	no assembly	no assembly
	5269	HAP phy	no assembly	no assembly	no assembly	no assembly
<i>Chrysosporthe cubensis</i>	7247	HAP phy	no assembly	no assembly	no assembly	no assembly
	1768	HAP phy	no assembly	no assembly	no assembly	no assembly
	2414	PGM-like	no assembly	no assembly	no assembly	no assembly
<i>Colletotrichum</i> <i>graminicola</i> M1.001	4411	βPP	(3-phytase) β-propeller	PF02333	no assembly	SSF50956
	1760	PGM-like	PGM-like	PF00328	PS00616	SSF53254
	4006	PGM-like	PGM-like	PF00328	PS00616	SSF53254
	4266	PGM-like	PGM-like	PF00328	PS00616	SSF53254
	232677	PGM-like	PGM-like	PF00328	PS00616	SSF53254

Table S2 Phytase domains according annotation databases: JGI, Pfam, ProSite, Super Family. (continuation).

Nome JGI	Protein ID JGI	Identification	Anotação JGI	Domain Pfam	Domain ProSite	Domain Super Family
<i>Corynespora cassiicola</i> CCP v1.0	615278	βPP	(3-phytase) β-propeller	PF02333	PS00616	SSF50956
	567361	PGM-like	PGM-like	PF00328	PS00616	SSF53254
<i>Fusarium graminearum</i> v1.0	5886	βPP	(3-phytase) β-propeller	PF02333		SSF50956
	2254	PGM-like	PGM-like	PF00328		SSF50956
	636	PGM-like	PGM-like	PF00328		SSF50956
	476144	HAP phy	HAP	PF00328	PS00616	SSF53254
<i>Lepista nuda</i> CBS247.69 v1.0	1163530	HAP phy	HAP	PF00328	PS00778	SSF53254
	121991	HAP phy	HAP	PF00328	PS00616/00778	SSF53254
	527697	Esterase-like	Esterase-like	PF13449		
	1584140	PGM-like	PGM-like	PF00328	PS00616	SSF53254
<i>Pycnoporus sanguineus</i> BRFM1264	565834	PGM-like	PGM-like	PF00328	PS00616	SSF53254
	1754255	PGM-like	PGM-like	PF00328	PS00616	SSF53254
	1674222	PGM-like	PGM-like	PF00328	PS00616	SSF53254
	1663039	PGM-like	PGM-like	PF00328	PS00616	SSF53254
	1605422	PGM-like	PGM-like	PF00328	PS00616	SSF53254
	1598040	PGM-like	PGM-like	PF00328	PS00616	SSF53254
	1596098	PGM-like	PGM-like	PF00328	PS00616	SSF53254

Table S2 Phytase domains according annotation databases: JGI, Pfam, ProSite, Super Family. (continuation)

Nome JGI	Protein ID JGI	Identification	Anotação JGI	Domain Pfam	Domain ProSite	Domain Super Family
<i>Setosphaeria turcica</i> Et28A	92222	βPP	(3-phytase) β-propeller	PF02333	PS51662	SSF50956
	152582	HAP phy	HAP	PF00328	PS00616/00778	SSF53254
	21528	HAP phy	HAP	PF00328	PS00616	SSF53254
	34467	Esterase-like	Esterase-like	PF13449		
	32355	HAP phy	HAP	PF00328	PS00616/00778	SSF53254
<i>Talaromyces pinophilus</i>	7227	HAP phy	not annotated	not annotated	not annotated	not annotated
	9580	PGM-like	not annotated	not annotated	not annotated	not annotated
	6307	HAP phy	not annotated	not annotated	not annotated	not annotated
<i>Trametes gibbosa</i> CIRM.BRFM 1770 v1.0	1320625	HAP phy	HAP	PF00328	PS00616	SSF53254
	1322210	HAP phy	HAP	PF00328	PS00616	SSF53254
	1325564	HAP phy	HAP	PF00328	PS00616	SSF53254
	1354848	HAP phy	HAP	PF00328	PS00616	SSF53254
	1348647	HAP phy	HAP	PF00328	PS00616	SSF53254
	1320189	Esterase-like	Esterase-like	PF13449		
<i>Verticillium dahliae</i> v1.0	8404	PGM-like	PGM-like	PF00328		SSF50956
	547	PGM-like	PGM-like	PF00328		SSF50956
	7363	βPP	(3-phytase) β-propeller	PF02333		SSF50956

Table S3 Predictive analysis of phytases using NetOGlyc4.0, Cys-Rec Softyberry.

JGI Nomenclature	JGI ID Protein	GalNAc-Thr/Tyr O-Glycosylation	Cys and disulfide bonds
<i>Alternaria alternata</i> 133aPRJ v1.0	356871 ^c	O35	6 (270-511, 319-533, 332-503)
	405153 ^c	n.d.	8 (141-537, 284-480, 349-515)
	344553 ^c	n.d.	11 (62-100, 71-236, 457-465)
	479563 ^b	n.d.	20 (no S-S bonds)
<i>Alternaria brassicicola</i>	9921 ^b	O19, O26, O32	20 (no S-S bonds)
	986 ^{ac}	O25, O27, O29, O37, O38, O83, O104, O108, O163, O273, O279	5 (98-145, 183-194)
	5269 ^{ac}	O48, O108, O167, O168, O391, O394, O397, O435, O438, O442	12 (11-268, 94-103, 132-467, 319-335, 489-497)
<i>Chrysosporthe cubensis</i>	1768 ^{ac}	O82, O85, O91, O94, O95, O96, O103	8 (88-568, 90-371, 323-384)
	7247 ^{ac}	O77, O92, O103, O108, O112	10 (78-118, 87-514, 485-493)
<i>Colletotrichum graminicola</i> M1.001	4411 ^b	O442	19 (140-371, 337-362, 344-392, 347-386, 353-581, 360-528, 380-394, 491-498)
<i>Corynespora cassiicola</i> CCP v1.0	615278 ^b	n.d.	18 (134-365, 326-351, 329-381, 337-392, 349-369, 360-517, 375-383, 480-487)
<i>Fusarium graminearum</i> v1.0	5886 ^b	n.d.	20 (no S-S bonds)

ID: Protein identification of JGI; N-Glycosylation: Presence or absence and position of the N-glycosylation sites in the protein sequence; O-Glycosylation: Presence or absence and position of the O-glycosylation sites in the protein sequence; Disulfide Connections: Presence or absence, amount and position of cysteines where disulfide bonds occur. ^aPhytases noted by this study. ^bPhytases predicted by JGI as part of the β -propeller family; ^cPhytases predicted by JGI as part of the HAP family.

Table S3 Predictive analysis of phytases using NetOGlyc4.0, Cys-Rec Softyberry. (Continuation)

JGI Nomenclature	JGI ID Protein	GalNAc-Thr/Tyr O-Glycosylation	Cys and disulfide bonds
<i>Lepista nuda</i> CBS247.69 v1.0	476144 ^c	O16, O20, O26, O30, O32, O40, O43, O44, O92, O93, O97, O98, O100, O111, O112, O121, O123, O128, O132, O169, O197, O207, O376, O472, O476, O479, O480, O481, O484, O522, O523, O625, O626, O627, O629	12 (56-424, 77-589, 81-215, 581-611)
	1162592 ^{ac}	O34, O46, O100, O102, O183, O195, O199, O200, O201, O204, O220, O351, O354, O355, O360, O361, O364, O370, O406, O483, O484	8 (53-436, 202-444)
	1163530 ^c	O2, O6, O50, O62, O66, O179, O284, O287, O290, O291, O293, O325, O330	8 (168-228, 357-377, 385-408)
	1261991 ^c	n.d.	8 (26-386, 167-394)
<i>Setosphaeria turcica</i> Et28A	92222 ^b	n.d.	18 (134-391, 326-516, 329-350, 337-569, 359-374, 364-382, 368-380, 479-486)
	152582 ^c	n.d.	6 (266-500, 315-508, 328-530)
	21528 ^c	O14, O63, O80	9 (103-311, 212-246, 442-469, 477-499)
	32355 ^c	n.d.	11 (57-466, 63-72, 101-458, 237-487)

ID: Protein identification of JGI; N-Glycosylation: Presence or absence and position of the N-glycosylation sites in the protein sequence; O-Glycosylation: Presence or absence and position of the O-glycosylation sites in the protein sequence; Disulfide Connections: Presence or absence, amount and position of cysteines where disulfide bonds occur. ^aPhytases noted by this study. ^bPhytases predicted by JGI as part of the β -propeller family; ^cPhytases predicted by JGI as part of the HAP family.

Table S3 Predictive analysis of phytases using NetOGlyc4.0, Cys-Rec Softyberry. (Continuation)

<i>Talaromyces pinophilus</i>	6307 ^{ac}	O254, O271, O278, O422, O423	9 (35-315, 105-448, 250-505, 475-483)
	7227 ^{ac}	O19, O27, O53, O101, O327, O333, O334, O335, O338, O341, O385, O389	11 (28-212, 37-279, 68-462, 433-441)
<i>Trametes gibbosa</i> CIRM.BRFM 1770 v1.0	1320625 ^c	n.d.	9 (192-566, 336-388, 401-533, 558-588)
	1322210 ^c	n.d.	9 (153-502, 161-305, 527-535)
	1325564 ^c	n.d.	9 (137-489, 272-332, 496-519)
	1343092 ^c	n.d.	9 (200-248, 414-440)
	1354848 ^c	O34	9 (277-473, 503-533)
	1373926 ^{ac}	n.d.	9 (50-199, 260-388, 432-440)
	1348647 ^{ac}	n.d.	9 (105-241, 431-456, 464-487)
<i>Verticillium dahliae</i> v1.0	7363 ^b	n.d.	19 (no S-S bonds)

ID: Protein identification of JGI; N-Glycosylation: Presence or absence and position of the N-glycosylation sites in the protein sequence; O-Glycosylation: Presence or absence and position of the O-glycosylation sites in the protein sequence; Disulfide Connections: Presence or absence, amount and position of cysteines where disulfide bonds occur. ^aPhytases noted by this study. ^bPhytases predicted by JGI as part of the β -propeller family; ^cPhytases predicted by JGI as part of the HAP family.

CAPÍTULO III

Otimização da produção da fitase pelo fungo *Talaromyces pinophilus* cultivado em casca de soja utilizando a metodologia de superfície de resposta

Resumo

O ácido fítico é uma molécula encontrada em plantas, a exemplo de cereais e leguminosas, e constitui a principal forma de armazenamento de fósforo dos vegetais. O fitato pode formar quelatos com íons bivalentes e outras biomoléculas que são eliminados nas fezes dos animais, acarretando também em problemas ambientais. A fitase é uma enzima capaz de catalisar a hidrólise do fitato, e pode ser produzida por diversos organismos. A produção de enzimas por fungos é um processo complexo influenciado por diversos fatores, como a composição do meio de cultivo, temperatura, pH e tempo de cultivo. A utilização de substratos de baixo custo é uma alternativa para tornar o processo de produção de enzimas mais viável. Neste trabalho, as condições que otimizam a produção da fitase pelo fungo *Talaromyces pinophilus* cultivado em casca de soja moída em fermentação submersa, foram estudadas por meio da metodologia de superfície de resposta (MSR). Os resultados do experimento fatorial fracionado permitiram determinar os fatores tempo de cultivo, concentração de peptona, concentração de sacarose e concentração de biomassa como importantes na variação das respostas, e o fator CaCl_2 como não relevante. No delineamento composto central rotacionado foram estudados os fatores concentração de peptona e de sacarose e o tempo de cultivo do fungo. Com base nos resultados fornecidos pela análise de desejabilidade individual foram escolhidas duas condições para produção de fitase e validação dos modelos uma para atividade enzimática e outra para atividade específica. A metodologia de superfície de resposta promoveu a otimização da produção da fitase do *Talaromyces pinophilus* com um aumento de 1,5x na atividade enzimática e 6,6x na atividade específica. A casca de soja moída pode ser uma alternativa viável para a produção de fitase a partir do fungo *Talaromyces pinophilus*.

1 – Introdução

O hexaquisfosfato de mioinositol, também conhecido como ácido fítico é uma molécula encontrada em plantas a exemplo de cereais e leguminosas. O ácido fítico é a principal forma de armazenamento de fósforo dos vegetais (RABOY, 2003), sendo assim, essa molécula está presente na alimentação animal que é constituída basicamente por ingredientes vegetais (BALWANI, CHAKRAVARTY & GAUR, 2017). O ácido fítico, ou o sal fitato, podem formar quelatos com íons bivalentes e outras moléculas como proteínas, carboidratos e lipídeos. Dessa forma, tanto o fitato como os íons e moléculas a ele complexados são eliminados nas fezes dos animais, acarretando problemas ambientais (SHANMUGAM, 2018).

O fitato pode ser extraído dos grãos por meio de métodos químicos, físicos e biológicos, no entanto o emprego desses métodos não é muito viável devido a perdas nutricionais (AFIFY *et al.*, 2011; RAMADAN, 2012). A fitase é uma enzima capaz de catalisar a hidrólise do fitato com uso na indústria para este fim bem difundido (AZEEM *et al.*, 2015). As fitases podem ser produzidas por diversos organismos como animais, plantas, fungos e bactérias. Entretanto, os fungos se destacam na produção de fitases com aplicação industrial devido, principalmente, à facilidade de cultivo em diferentes biomassas e à grande quantidade de enzimas secretadas. Os fungos podem então ser cultivados utilizando-se de coprodutos agroindustriais contextualizando assim o conceito de economia circular e reduzindo os custos de produção das enzimas (ASTOLFI *et al.*, 2019).

A casca da soja é um exemplo de coproduto agroindustrial que pode ser utilizado como fonte de carbono para o cultivo de fungos (RAVINDRAN *et al.*, 2018). Em sua composição, a casca de soja, apresenta um teor de 0,03% de fitato (TABELAS BRASILEIRAS DE AVES E SUÍNOS, 2017). Sendo assim, a presença deste fator antinutricional limita a utilização da casca de soja na alimentação animal mesmo em baixas concentrações. Por outro lado, o teor de fitato presente na casca pode ser utilizado como indutor para a produção de fitase por fungos cultivados em fermentação em estado sólido (FSS) ou fermentação submersa (FS) (NEIRA-VIELMA *et al.*, 2018).

A produção de enzimas por fungos é um processo complexo influenciado por diversos fatores como a composição do meio de cultivo, temperatura, pH e tempo de cultivo (MONTEIRO *et al.*, 2012). Algumas estratégias têm sido traçadas para tornarem o processo de produção de enzimas mais eficiente como a utilização de engenharia

genética, otimização de processos com ferramentas estatísticas e uso de substratos de baixo custo (ANURADHA, 2014).

O fungo *T. pinophilus* pode ser encontrado no ar, no solo, na vegetação e em ambientes internos. *T. pinophilus* é um fungo saprófita e contribui para a decomposição da matéria orgânica (TSANG *et al.*, 2018). O fungo *T. pinophilus*, anteriormente classificado como pertencente do gênero *Penicillium*, possui importância econômica e biotecnológica (LI *et al.*, 2017). Alguns dos representantes deste gênero podem causar doenças em plantas e animais, causando danos à atividade agrícola, mas podem também serem utilizados para a indústria farmacêutica, alimentícia, além de serem importantes produtores de enzimas (VISSER *et al.*, 2015).

Segundo Montgomery (2001), a metodologia de superfície de resposta é um conjunto de técnicas matemáticas e/ou estatísticas fundamentais à modelagem e à análise nas aplicações em que a resposta de interesse seja influenciada por algumas variáveis e o objetivo seja otimizar essa resposta.

A utilização de coprodutos como biomassas para crescimento de fungos visando a produção de enzimas pode ser mais eficiente se associadas a técnicas de otimização, como por exemplo, a metodologia de superfície de resposta (CUNHA *et al.*, 2017). Nesse estudo, o alvo foi avaliar a interferência da composição do substrato, assim como outros fatores como por exemplo, a tempo de cultivo, a concentração de peptona, sacarose e CaCl_2 que podem afetar a produção de fitases secretadas pelo fungo *Talaromyces pinophilus*.

Dessa forma, objetivou-se com este trabalho identificar por meio da metodologia de superfície de resposta as condições de cultivo que otimizam a produção da fitase produzida pelo fungo *T. pinophilus* cultivado em meio contendo casa de soja, suplementada com sacarose, peptona e CaCl_2 em tempos determinados conforme delineamento experimental.

2 – Materiais e Métodos

2.1 – Seleção do fungo e da biomassa

O fungo foi selecionado a partir de um levantamento das principais espécies de fungos habitantes do solo e/ou fungos fitopatogênicos associados a cereais e leguminosas que possuem fitato em sua composição. O fungo foi isolado em uma unidade de produção de gado em Minas Gerais, Brasil, como parte de um estudo de bioprospecção e selecionado devido à sua produção elevada de enzimas (dados não mostrados). Foi mantido na Coleção Micológica do Laboratório de Análises Bioquímicas da Universidade

Federal de Viçosa, MG, Brasil. O fungo foi identificado pelo Centraalbureau voor Schimmel, Utrecht, Holanda, como *P. pinophilum*, hoje classificado como *T. pinophilus*. Foi propagado rotineiramente em agar dextrose de batata a 28 ° C por 7 dias e mantido a 10 ° C por 2 a 10 dias. O fungo *T. pinophilus*, possui genoma sequenciado, porém ainda não anotado em bancos de dados, o qual apresenta dois genes putativos (7227 e 6307) para a expressão de fitase da família das fosfatases ácidas de histidina.

O substrato utilizado para cultivo de *T. pinophilus* neste trabalho foi a casca de soja, gentilmente cedida pela empresa Caramuru Alimentos S/A, Itumbiara-GO. Esse coproduto possui 0,3% de fitato em sua composição, que pode atuar como indutor para a produção de fitase e tem sido descartada pela indústria da soja não havendo destinação adequada.

2.2 – Otimização da produção de fitases utilizando a metodologia de superfície de resposta

A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) foi utilizada sob forma de experimentos sequenciais para otimização da produção das fitases pelo fungo *T. pinophilus*. A MSR possui etapas distintas (seleção de fatores controláveis, seleção de níveis dos fatores ou deslocamento, modelagem e validação).

2.2.1 – Levantamento de dados, seleção dos fatores e planejamento experimental

Os fatores controláveis, ou seja, fatores conhecidos com potencial de alterar o rendimento de produção da fitase foram previamente investigados quanto à influência na secreção de fitases por fungos. Para esse estudo foram testados cinco tipos de biomassa: milho desintegrado palha e sabugo (moído), farelo de soja, farelo de arroz, farelo de trigo e casca de soja moída e dois meios mínimo mineral, o PSM (meio específico para fitase: fitato de sódio 5 g/L; glicose 15 g/L; NH₄NO₃ 5 g/L; KCl 0,5 g/L; MgSO₄·7H₂O 0,05 g/L; MnSO₄·7H₂O 0,01 g/L; FeSO₄·7H₂O 0,01 g/L) e um meio contendo peptona 0,5 g/L, sacarose 10g/L e CaCl₂ 0,10 g/L (resultados no anexo). A biomassa que proporcionou melhores resultados foi a casca de soja e o milho, no entanto, somente a casca foi selecionada para dar continuidade no estudo de otimização. Enquanto o meio contendo peptona, sacarose e CaCl₂ proporcionou melhores atividades enzimáticas que o meio PSM.

Os fatores, concentração de peptona (g/L), concentração de sacarose (g/L), teor de biomassa (%), tempo de cultivo dos fungos (dias) e concentração de CaCl₂ (g/L) selecionados foram avaliados por meio de um delineamento fatorial fracionado (1/2

fração) com adição de um ponto central (três repetições), totalizando $(2^{5-1} + 3) = 19$ ensaios, com 16 diferentes combinações entre os fatores e três repetições no ponto central. Para tanto, foram definidos um nível alto (+1), um nível intermediário (0) e um nível baixo (-1) de cada fator, com base em testes prévios realizados no laboratório sobre o efeito destes fatores na produção de fitase pelo fungo *T. pinophilus*. As variáveis resposta (variáveis dependentes) adotadas neste trabalho correspondem às atividades enzimáticas (U/mL) e atividades específicas (U/mg) da fitase secretada pelo fungo *T. pinophilus* cultivado em casca de soja moída em fermentação submersa.

2.2.2 – Delineamento de deslocamento

Com base nos resultados obtidos no experimento fatorial, foi realizado um delineamento de deslocamento, com cinco combinações diferentes de cada fator e duas repetições para cada combinação, perfazendo 10 unidades experimentais. Os passos consistem na diferença entre os níveis de um fator e foram determinados de acordo com o efeito de cada fator estimado no experimento fatorial fracionado, de modo que o deslocamento seguisse pelo caminho de máxima inclinação.

2.2.3 – Delineamento Composto Central Rotacionado (DCCR)

A última etapa consistiu em um Delineamento Composto Central Rotacionado (DCCR), a fim de ajustar modelos matemáticos que explicassem a variação das respostas, atividade enzimática em U/mL e U/mg, em função dos fatores controláveis analisados. O delineamento $(2^3 + 2 \times 3 + 4)$ foi executado com um total de 18 unidades experimentais, dentre elas quatro repetições no ponto central. Os modelos ajustados foram utilizados para estimar os níveis dos fatores que otimizam as respostas de interesse, por meio de análise de desejabilidade.

2.2.4 – Ajuste matemático dos modelos, análise de desejabilidade e validação

Para a obtenção dos modelos matemáticos que explicassem a variação da atividade da fitase em função da concentração dos componentes do meio e do tempo de cultivo foi utilizado o software Minitab[®] 17.0. A construção dos gráficos do delineamento fatorial e da etapa de otimização foi realizada pelo software Statsoft STATISTICA[®] version 10. Realizou-se ANOVA da regressão utilizando o teste t dos coeficientes para verificar a significância a 95% de confiança (p -valor $< 0,05$). Os valores do R^2 da regressão foram analisados para averiguar a qualidade dos ajustes. As pressuposições da ANOVA foram avaliadas, analisou-se a constância da variância dos resíduos bem como a normalidade dos mesmos através do teste de Kolmogorov-Smirnov.

Para comparar a secreção de fitase pelo *T. pinophilus* em diferentes concentrações dos fatores estudados e estimar os níveis das concentrações dos componentes do meio e o tempo de cultivo que maximizam a atividade enzimática em U/mL e U/mg, no presente trabalho, os modelos ajustados foram utilizados para obtenção de modelos de desejabilidade. Para tanto, adotou-se como objetivo a maximização dos valores de atividade e peso e importância iguais a 1 na definição da função de desejabilidade. Segundo o modelo adotado, os valores de desejabilidade podem ser interpretados, com boa aproximação, como percentual do valor máximo obtido para as respostas.

As condições escolhidas para otimização foram ensaiadas em sete repetições a fim de se calcular os parâmetros de validação (Fator Bias e Fator Acurácia) como descrito nas equações a seguir.

$$fb = 10^{(\sum \log(P/O))/n} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde fb é o fator bias, P é o valor predito da variável resposta, O é o valor da resposta obtido experimentalmente e n o número de repetições realizadas no experimento de validação.

$$fe = 10^{[\sum |\log(P/O)|]n} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde fe é o fator exatidão, P é o valor predito da variável resposta, O é o valor da resposta obtido experimentalmente e n o número de repetições realizadas no experimento de validação.

2.3 – Condições de cultivo

O fungo foi cultivado em placas de Petri contendo meio de cultura ágar de dextrose de batata (BDA; Acumedia Ltda., Brasil) a pH 5,5 a 28 °C. Em seguida, 5 discos, com 5mm cada contendo micélios do fungo, foram cortados e inoculados em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 50 mL meio de cultura líquido contendo casca de soja moída, sacarose, peptona e CaCl₂, em pH 5,5 a 28 °C e 150 rpm. O tempo de cultivo foi um dos fatores estudados, e foram determinados em cada etapa da otimização. Os meios de cultivo foram preparados de acordo com o planejamento para otimização da produção usando a Metodologia de Superfície de Resposta. Em seguida, os extratos dos fungos foram filtrados, centrifugados a 10000g por 10 min e os sobrenadantes foram utilizados para o ensaio de atividade de fitase (item 2.4.), e para a quantificação de proteínas totais de acordo com o procedimento descrito por Bradford, (1956). Este método baseia-se no desenvolvimento da cor em função da ligação da proteína com o pigmento Coomassie Brilliant Blue G-250. Os valores de absorvância foram tomados a 595 nm e convertidos

em valores de massa proteica utilizando uma curva padrão construída com soro albumina bovina.

2.4. Determinação da atividade enzimática

A atividade de fitase foi determinada de acordo com o método de Heinonen & Lahti, (1981) modificado, medindo-se o fosfato inorgânico liberado a partir do substrato fitato de sódio (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO). Para o ensaio, foram utilizados 600 µL do substrato fitato de sódio 1,5 mM em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) e 150 µL de extrato enzimático. A reação foi conduzida a 50 °C durante 30 min e paralisada pela adição de 250 µL da solução de ácido tricloroacético 10% (m/v). Em seguida, foram adicionados 1000 µL de reativo colorimétrico (Tausky & Shorr, 1953), preparado a partir de solução de molibdato de amônio 10% (m/v), em ácido sulfúrico 5M. O reativo foi preparado no momento do uso, misturando-se 10% (v/v) da solução formada por ácido sulfúrico e molibdato de amônio, 5% (m/v) de sulfato ferroso e água deionizada. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 700 nm e os valores de absorbância obtidos foram correlacionados com uma curva padrão obtida com fosfato de potássio (KH₂PO₄). Uma unidade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para a liberação de 1 µmol de fosfato inorgânico por minuto, sob as condições de ensaio. Além disso, o controle do ensaio foi feito com a enzima inativada. Os ensaios enzimáticos foram realizados em triplicata.

3. Resultados e Discussão

3.1. Seleção de fatores importantes para a atividade extracelular de fitase e delineamento fatorial fracionado

A MSR se inicia pela seleção de possíveis fatores capazes de influenciar o processo e as respostas de interesse. Muitos fatores observados são considerados de suma importância na produção de fitases fúngicas. Sendo assim, os fatores testados no fatorial fracionado quanto à influência na produção de fitase quando *T. pinophilus* é cultivado em fermentação submersa foram a concentração de peptona (g/L), concentração de sacarose (g/L), tempo (dias de cultivo), concentração de casca de soja (%) e concentração de CaCl₂ (g/L).

O experimento foi realizado segundo o delineamento Fatorial Fracionado de Resolução IV (1/2 de fração), em que foram estudadas 19 combinações diferentes de níveis entre os fatores apresentadas na Tabela 1, juntamente com os valores observados de atividade enzimática da fitase (U/mL) e atividade específica (U/mg) associadas a cada

tratamento testado. Os desvios padrão relativos das medições das atividades enzimáticas ficaram abaixo de 10%.

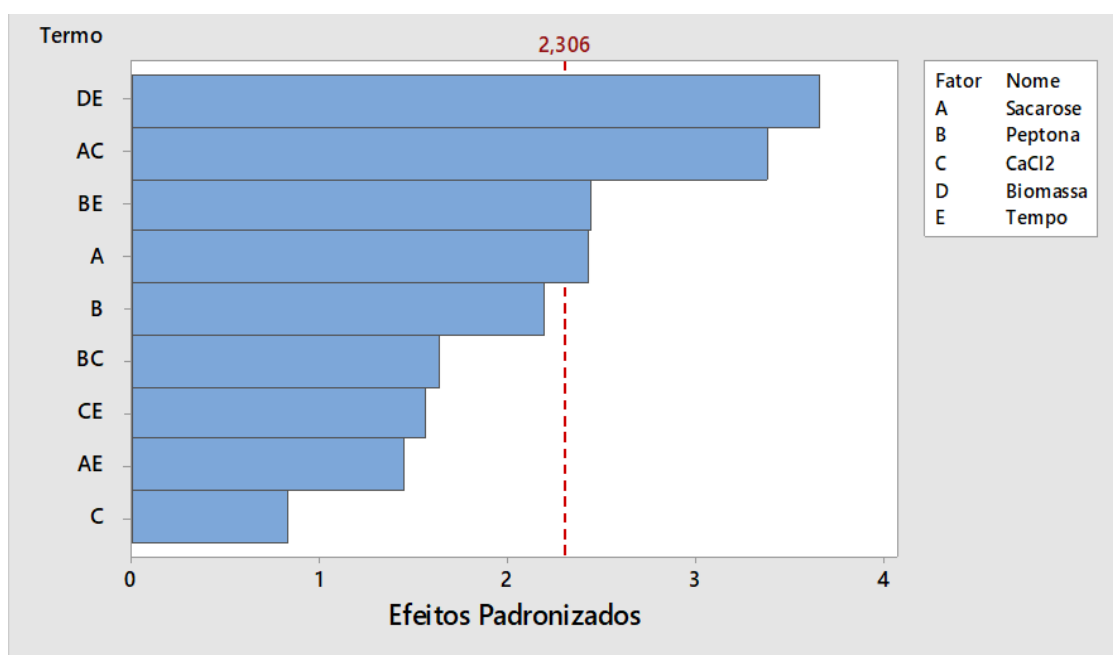
Tabela 1 – Combinações de níveis, segundo Fatorial Fracionado Resolução IV, dos fatores peptona (g/L), tempo de cultivo (dias), biomassa (%), CaCl₂(g/L) e sacarose (g/L) ensaiadas no experimento com os respectivos valores observados de atividade enzimática da fitase do fungo *T. pinophilus* em U/mL e U/mg.

Sacarose	Peptona	Biomassa	CaCl ₂	Tempo	U/mL	U/mg
5	1	5	0,3	12	0,046	0,126
15	5,5	3	0,15	9	0,112	0,395
5	10	5	0	12	0,121	0,422
5	10	1	0,3	12	0,000	0,000
15	5,5	3	0,15	9	0,000	0,000
5	10	1	0	6	0,195	0,704
25	10	5	0	6	0,000	0,000
5	10	5	0,3	6	0,100	0,212
25	1	1	0	6	0,000	0,000
25	10	1	0,3	6	0,140	2,301
15	5,5	3	0,15	9	0,086	1,236
25	10	1	0	12	0,000	0,000
5	1	1	0	12	0,128	0,810
25	1	5	0,3	6	0,000	0,000
5	1	1	0,3	6	0,060	0,629
25	1	1	0,3	12	0,000	0,000
5	1	5	0	6	0,054	0,356
25	10	5	0,3	12	0,132	0,520
25	1	5	0	12	0,095	0,815

A biomassa, isto é, a casca de soja moída, influenciou negativamente a atividade específica da enzima, isso porque apesar de possuir uma boa relação de nutrientes para o crescimento do fungo e secreção de proteínas a concentração de fitato é relativamente baixa quando comparadas à outras biomassas, como o farelo de trigo e o farelo de arroz.

Os gráficos de Pareto utilizados para seleção de fatores com efeito sobre as atividades de fitase em U/mL (Figura 1A) e U/mg (Figura 1B) são mostrados na Figura 1.

A)



B)

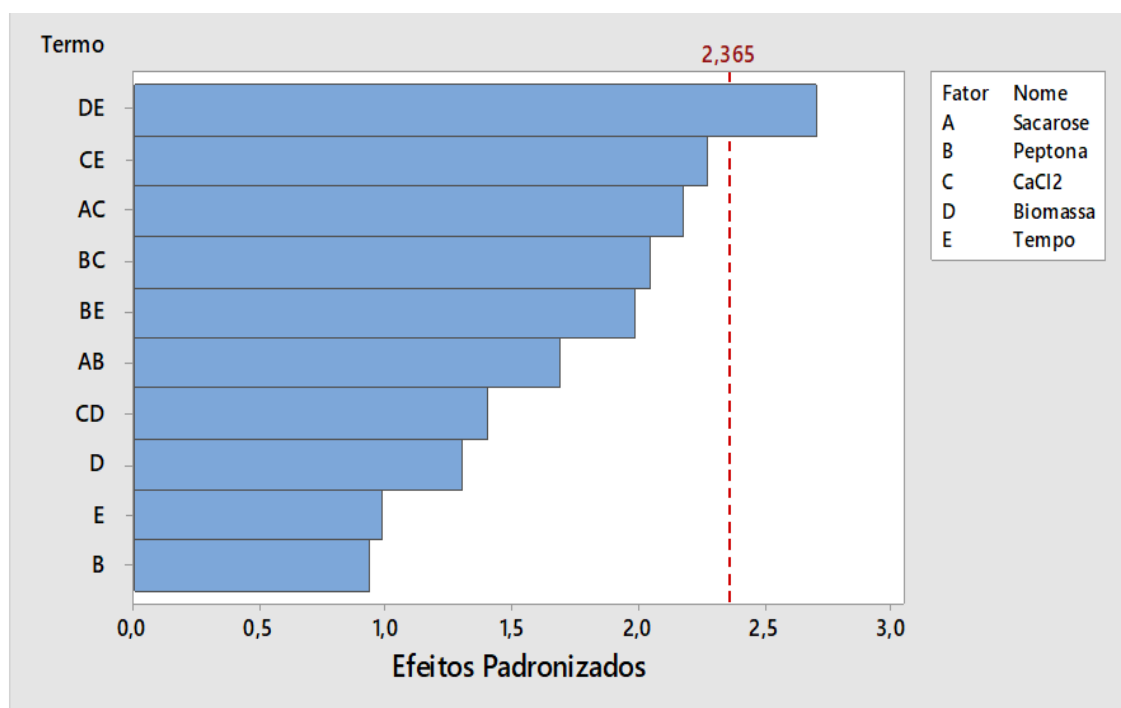


Figura 1 – Seleção de fatores com maior efeito sobre as respostas estudadas. Gráficos de Pareto para análises de efeitos dos fatores sobre a resposta A) atividade de fitase em U/mL, e B) atividade de fitase em U/mg, utilizando $\alpha = 0,05$ para comparação dos efeitos.

O efeito principal de um fator é a medida da variação que ocorre com a característica em estudo correspondente às variações nos níveis desse fator. Já o efeito da interação entre dois fatores é uma medida da variação que ocorre com a característica em estudo, correspondente às variações nos níveis de um fator, ao passar de um nível a outro do outro fator.

As Tabelas 2 e 3 apresentam os efeitos principais e de interações estimados para a influência destes fatores sobre as respostas atividade enzimática da fitase em U/mL e em U/mg, respectivamente, após a seleção utilizando ρ -valor $< 0,05$ como referência.

Tabela 2 – Efeitos principais e de interação dos fatores estudados sobre a atividade de fitase secretada pelo fungo *T. pinophilus* em U/mL e respectivos valores calculados do teste t (T) e ρ -valores (P).

Termo	Efeito	Coefficiente	T	P
Constante		0,06687	7,71	0,000
Sacarose	-0,04213	-0,02107	-2,43	0,041
Peptona	0,03797	0,01898	2,19	0,060
CaCl ₂	-0,01447	-0,00724	-0,83	0,428
Sacarose*CaCl ₂	0,05852	0,02926	3,37	0,010
Sacarose*Tempo	0,02505	0,01252	1,44	0,187
Peptona*CaCl ₂	0,02831	0,01415	1,63	0,141
Peptona*Tempo	-0,04235	-0,02118	-2,44	0,040
CaCl ₂ *Tempo	-0,02701	-0,01351	-1,56	0,158
Biomassa*Tempo	0,06330	0,03165	3,65	0,006
Ct Pt		-0,0008	-0,04	0,971

$R^2 = 86,03\%$

Tabela 3 – Efeitos principais e de interação dos fatores estudados sobre a atividade de fitase secretada pelo fungo *T. pinophilus* em U/mg e respectivos valores calculados do teste t (T) e p-valores (P).

Termo	Efeito	Coefficiente	T	P
Constante		0,4309	4,50	0,003
Peptona	0,1780	0,0890	0,93	0,384
Biomassa	-0,2491	-0,1245	-1,30	0,235
Tempo	-0,1885	-0,0942	-0,98	0,358
Sacarose*Peptona	0,3235	0,1618	1,69	0,135
Sacarose*CaCl ₂	0,4164	0,2082	2,17	0,066
Peptona*CaCl ₂	0,3915	0,1957	2,04	0,080
Peptona*Tempo	-0,3801	-0,1901	-1,98	0,088
CaCl ₂ *Biomassa	-0,2688	-0,1344	-1,40	0,203
CaCl ₂ *Tempo	-0,4353	-0,2176	-2,27	0,057
Biomassa*Tempo	0,5175	0,2588	2,70	0,031
Ct Pt		0,113	0,47	0,655

R² = 82,86%

Quando se compara os efeitos estimados sobre as respostas atividade de fitase em U/mL e em U/mg pode-se sugerir que os fatores estudados exercem influência sobre a secreção da proteína total, observando-se, portanto, diferenças nos efeitos sobre as duas respostas estudadas. Observou-se também o aumento da atividade de fitase quando foi utilizado um menor nível de sacarose. Sendo assim, a concentração de sacarose influenciou negativamente a atividade, resultado semelhante foi observado por Monteiro *et al.*, (2012) para a atividade da fitase do fungo *Rhizopus stolonifer*. Para a peptona, foi observado resultado contrário ao da sacarose, ou seja, a atividade de fitase aumenta com maiores níveis de peptona, e isso pode ser explicado pelo fato de que o microrganismo precisa de nitrogênio para a síntese e secreção da enzima de interesse e de proteínas em geral (GUPTA *et al.*, 2016).

A atividade da fitase foi maior quando não foi utilizado o CaCl₂, de forma que esse sal no meio de cultivo influenciou negativamente a atividade da enzima. Este resultado pode estar relacionado ao fato de que o íon Ca²⁺ pode inibir a atividade das fitases da família das fosfatases ácidas de histidina (OH *et al.*, 2004). Salmon *et al.*, (2014) obteve as melhores respostas para atividade enzimática para o fungo *Ganoderma sp.* MR-56 utilizando maiores níveis de CaCl₂ em SmF.

Os valores de R² são associados à estimativa dos efeitos e mostram a significância dos fatores sobre as respostas estudadas e estes resultados demonstram a complexidade do processo estudado (QASIM *et al.*, 2017). Os modelos ajustados apresentados nas

Tabelas 2 e 3 estão associados a valores de R^2 superiores a 85%, o que evidencia qualidade satisfatória à excelente de ajustes dos modelos.

Com os resultados obtidos no experimento fatorial fracionado foi possível determinar que os fatores tempo de cultivo, concentração de peptona, concentração de sacarose, concentração de biomassa e CaCl_2 e/ou as interações entre os mesmos são importantes em causar variação nas respostas atividade enzimática e específica. A análise dos gráficos da Figura 3 direcionou os ensaios de deslocamento dos níveis de cada fator para seleção da região de modelagem para otimização

A utilização de subprodutos da agroindústria representa uma maneira econômica e sustentável de produção de enzimas, aumentando a viabilidade do processo (CUNHA et al 2017). Nesse sentido, observa-se que a casca de soja foi um bom indutor para a produção de fitase já que o menor nível foi o melhor para a indução da enzima, em que foi utilizado um valor fixo no DCCR. Entretanto, a concentração de fitato de 0,03% (TBAS, 2017) pode ser considerada baixa, visto que, Qasim *et al.*, (2017) utilizando 0,1% do substrato industrial obtiveram melhores resultados para as atividades enzimática e específica da fitase do fungo *Aspergillus tubingensis* SKA. Além disso, a concentração de fósforo disponível da biomassa 0,12 % (Tabelas Brasileiras de Aves e Suínos, 2017) pode ter inibido a secreção e/ou atividade da enzima.

3.2. Experimento de Deslocamento

Os passos do deslocamento (diferença entre os níveis de um fator) foram determinados de acordo com o efeito de cada fator estimado no delineamento fatorial fracionado como mostrado anteriormente (Tabela 1).

Os dados da Tabela 4 mostram o comportamento das respostas avaliadas diante dos diferentes deslocamentos realizados.

Pode ser observado na Tabela 4, as atividades de fitase secretada pelo fungo *T. pinophilus* em U/mL e U/mg no experimento de deslocamento em que o número de combinações ensaiadas não permite o desmembramento dos efeitos de cada fator. Sendo assim, os resultados do ensaio de deslocamento mostram que as respostas possuem um comportamento diferente umas das outras quanto à mudança dos níveis dos fatores estudados.

Tabela 4 – Combinações de níveis dos fatores peptona (g/L), e sacarose (g/L), biomassa (%) e tempo (dias) ensaiados no experimento de deslocamento, com os respectivos valores observados da atividade de fitase do fungo *T. pinophilus* em U/mL e U/mg.

Passo	Combinações			Atividade enzimática (U/mL)	Atividade específica (U/mg)
	Peptona	Tempo	Sacarose		
0	5,5	9	15	0,0870 ± 0,04	0,5866 ± 0,28
1	7,3	8	12,5	0,1018 ± 0,02	0,5757 ± 0,19
2	9,1	7	10	0,2628 ± 0,04	1,5632 ± 0,35
3	10,9	6	7,5	0,3448 ± 0,01	1,9908 ± 0,18
4	12,7	5	5	0,1713 ± 0,03	0,8378 ± 0,19
5	14,5	4	2,5	0,0916 ± 0,02	0,7310 ± 0,21

3.3. Delineamento Composto Central Rotacionado

A análise de variância (ANOVA) da regressão e o teste t para os coeficientes da regressão estão apresentados nas Tabelas 5 e 6 e permitiram ajustar as equações dos modelos. Enquanto a análise do erro experimental, foi realizada de modo a testar as pressuposições da análise de variância (ANOVA) e confirmou que as unidades experimentais foram corretamente distribuídas, não havendo favorecimento ou prejuízo de tratamentos de acordo com a ordem de execução do experimento.

As combinações de níveis testadas e os respectivos valores de atividade de fitase em U/mL e em U/mg são apresentados a seguir (Tabela 5).

Tabela 5 – Valores observados de atividade da fitase em U/mL e em U/mg da fitase do fungo *T. pinophilus* cultivado em fermentação submersa, utilizando casca de soja moída, em experimento composto central rotacionado (DCCR).

Sacarose	Peptona	Tempo	U/mL	U/mg
10,4	11,5	4,8	0,1800	1,6976
8,0	10,0	6,0	0,2140	1,3732
4,0	10,0	6,0	0,1249	1,2459
8,0	10,0	8,0	0,2031	0,9626
12,0	10,0	6,0	0,1667	1,4855
10,4	8,5	7,2	0,1975	1,1523
8,0	10,0	6,0	0,2338	1,4698
5,6	8,5	4,8	0,1877	1,1765
5,6	11,5	7,2	0,1890	1,0727
8,0	7,5	6,0	0,1945	0,8855
5,6	11,5	4,8	0,2530	1,3735
5,6	8,5	7,2	0,1466	0,7130
8,0	12,5	6,0	0,2133	1,2657
10,4	11,5	7,2	0,2080	1,0078
8,0	10,0	6,0	0,1886	1,4295
8,0	10,0	6,0	0,2357	1,2852
10,4	8,5	4,8	0,1352	1,3058
8,0	10,0	4,0	0,1558	2,0393

A produção de fitase foi mais proeminente nos menores tempos para as duas respostas (atividades específica e enzimática), possivelmente explicado pela composição da biomassa. Num primeiro instante, o fungo pode ter consumido todo o fosfato biodisponível para depois começar a síntese de fitase para degradação do fitato presente na biomassa. Em contrapartida, em tempos superiores ao ponto central, a fitase produzida pode ter sofrido a ação de proteases secretadas no meio.

A peptona foi determinante para a atividade específica que apresentou melhores resultados em maiores concentrações deste composto no meio. Possivelmente, a concentração total de proteínas da biomassa, associada à concentração de peptona podem ter influenciado no ajuste das respostas expressas como atividade específica.

Cada coproduto utilizado como substrato para produção de enzimas, pode apresentar uma composição diferente. Sendo assim, é diferente o efeito que cada coproduto tem em relação à indução da produção de enzimas. A presença do fitato, de proteína e carboidratos (glicose, arabinose e xilose, por exemplo) na casca de soja, podem induzir a produção de fitase conforme apresentado na Tabela 6 (Tabelas Brasileiras de Aves e Suínos, 2017).

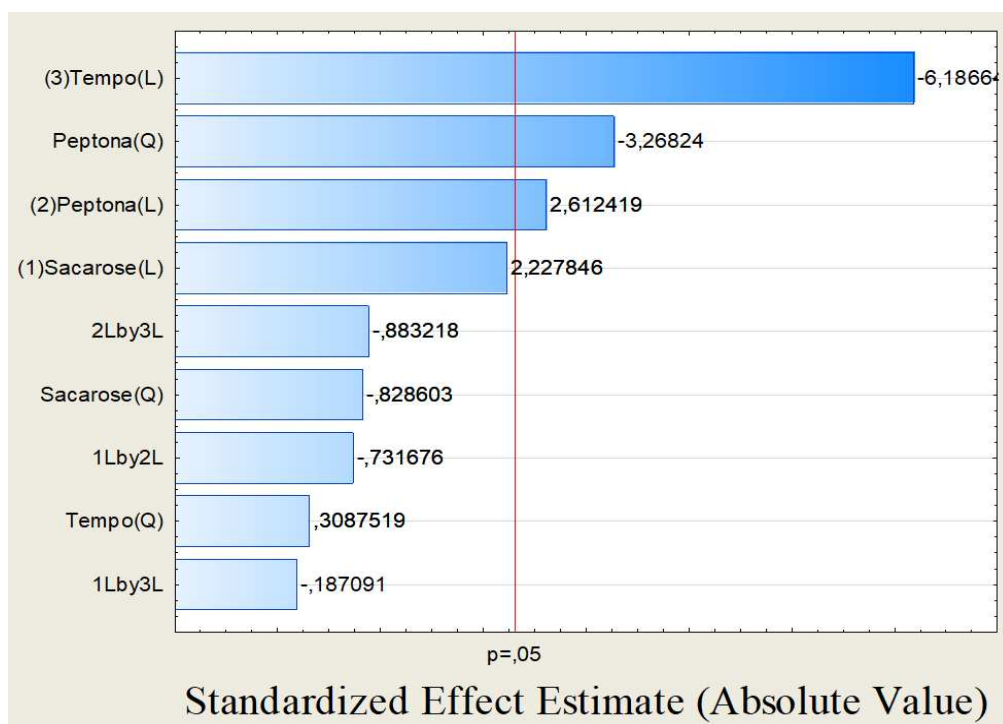
Tabela 6 – Composição centesimal da casca de soja.

Composição centesimal	Total (%)	Composição centesimal	Total (%)
Proteína Bruta	14,40	Arabinose	3,99
Energia Bruta	3959*	Ramnose	0,51
Fibra Bruta	32,90	Manose	4,31
Matéria Orgânica	85,30	Galactose	2,27
FDN	58,10	Glicose	28,76
FDA	46,10	Fucose	0,11
Extrato Etéreo	3,01	Matéria mineral	4,49
Extrato não nitrogenado	35,00	Fósforo Total	0,15
Xilose	7,68	Fósforo Fítico	0,03

Em matéria natural. Adaptado de TABELAS BRASILEIRAS DE EXIGÊNCIAS NUTRICIONAIS E COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS PARA AVES E SUÍNOS (2017). *Kcal.

Os gráficos de Pareto utilizados para seleção de fatores com efeito sobre as atividades de fitase em U/mL (Figura 4A) e U/mg (Figura 4B).

A)



B)

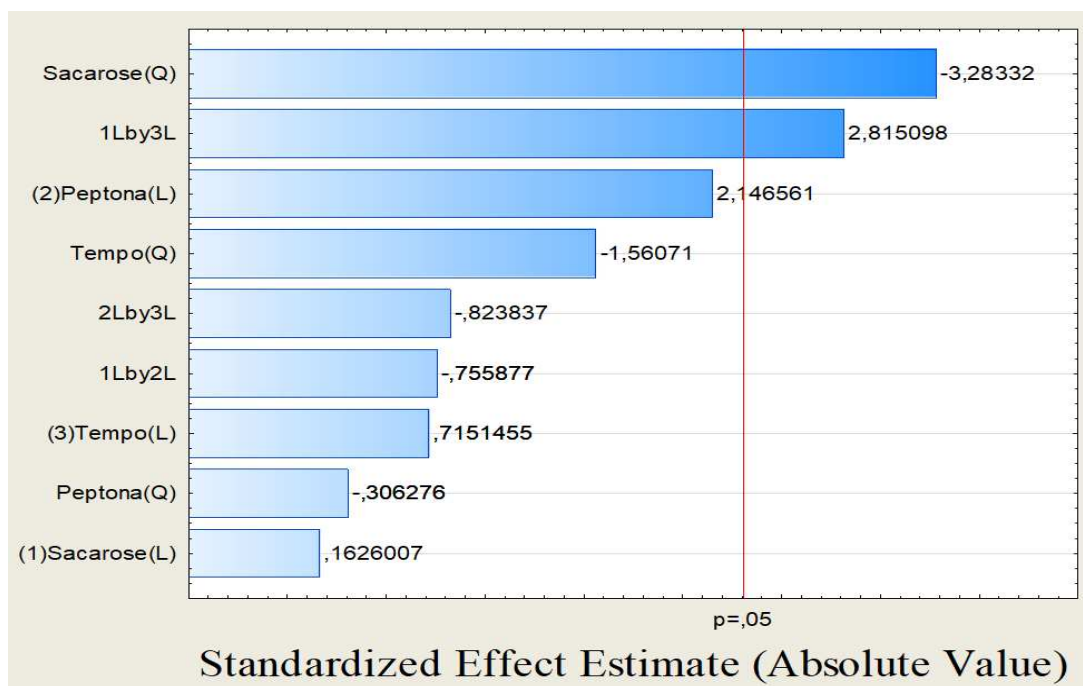
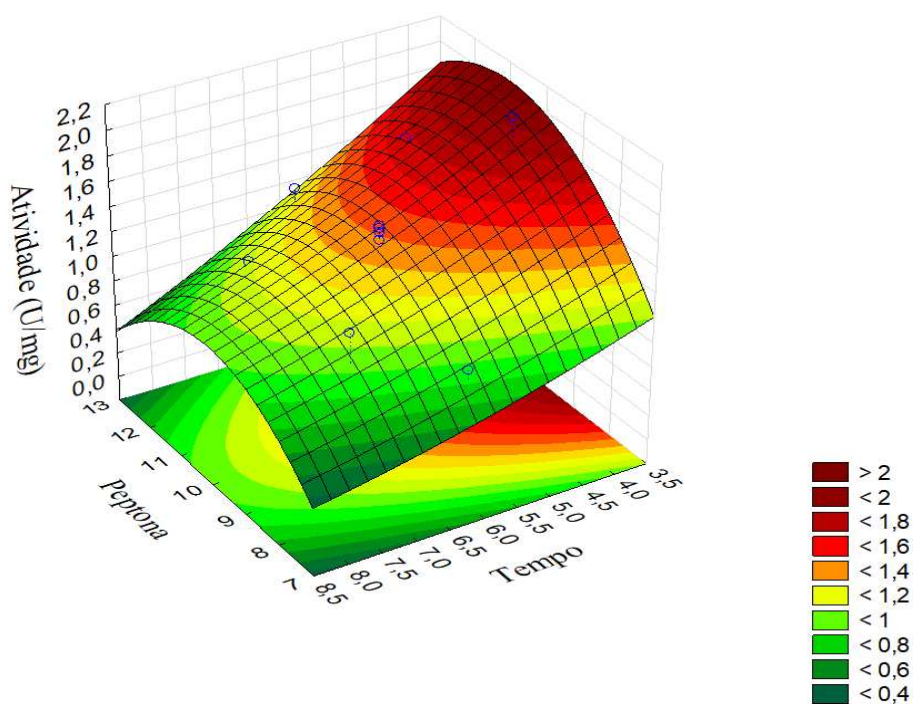


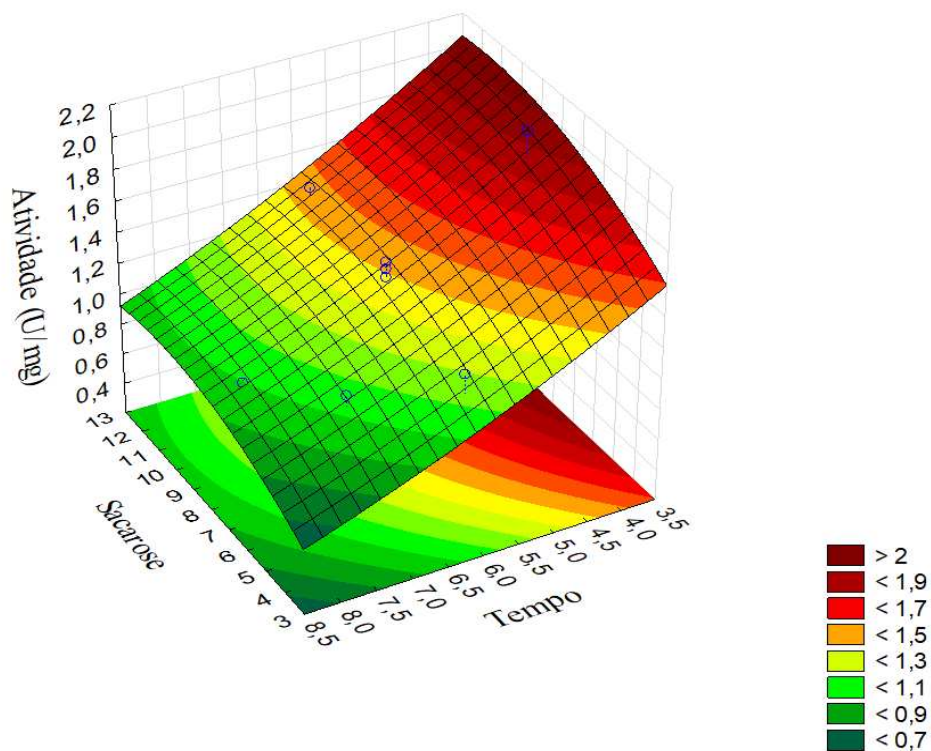
Figura 4: Fatores com maior efeito sobre as respostas estudadas. Gráficos de Pareto do delineamento composto central para análises de efeitos dos fatores sobre a resposta A) atividade da fitase em U/mL, e B) em U/mg sobre o fitato utilizando $\alpha = 0,05$ para comparação dos efeitos.

Os gráficos de superfície e de contorno foram gerados a partir das equações ajustadas para atividade da fitase em U/mg (Figuras 5 e 6).

A



B



C

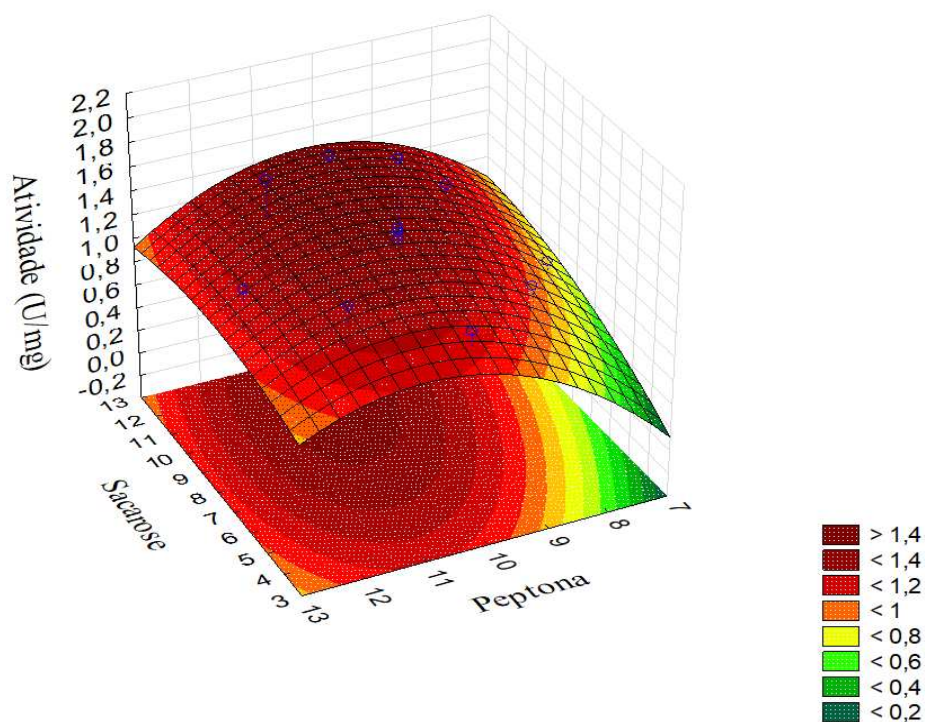


Figura 5: Gráficos de superfície de resposta. Gráficos de superfície ajustados para a resposta atividade da fitase em U/mg em função dos fatores estudados A) peptona e tempo; B) tempo e sacarose; e C) peptona e sacarose.

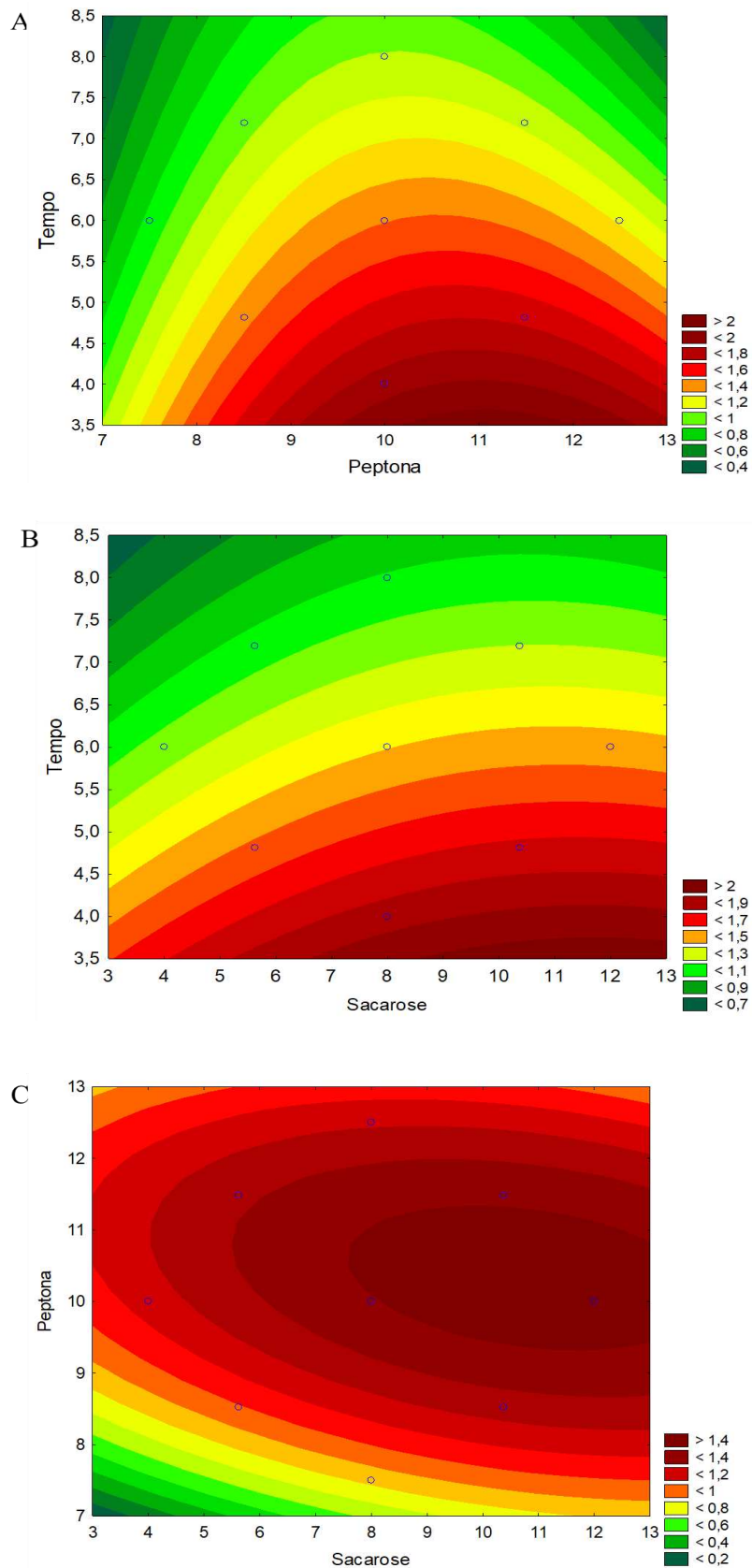
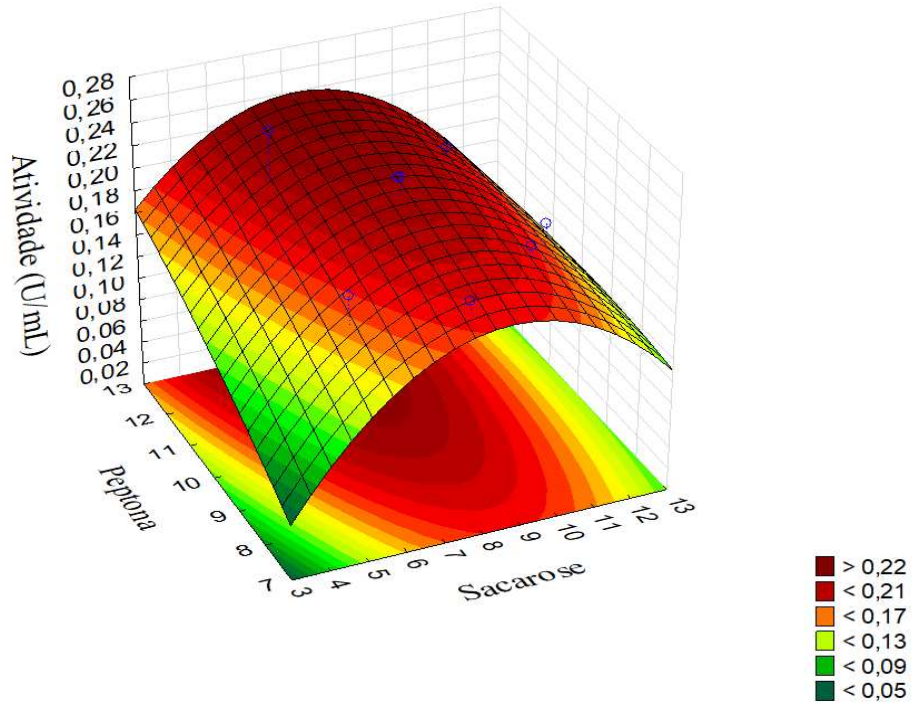


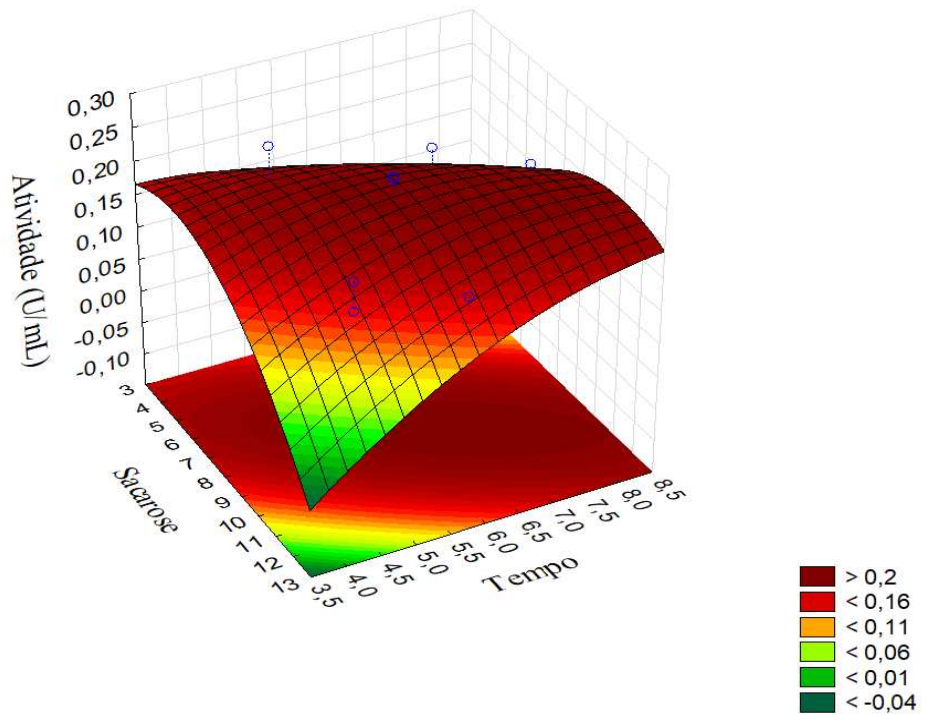
Figura 6: Gráficos de contorno para a atividade da fitase em U/mg. Gráficos de superfície ajustados para a resposta atividade da fitase em U/mg em função dos fatores estudados A) peptona e tempo; B) tempo e sacarose; e C) peptona e sacarose.

Os gráficos de superfície e de contorno foram gerados a partir das equações ajustadas para atividade enzimática em U/mL (Figura 7 e 8).

A



B



C

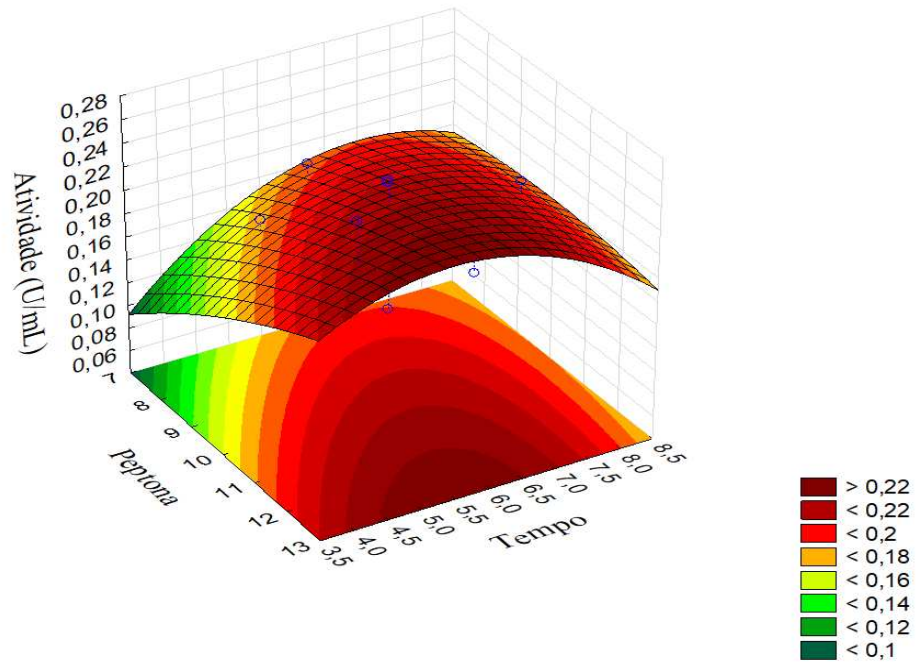
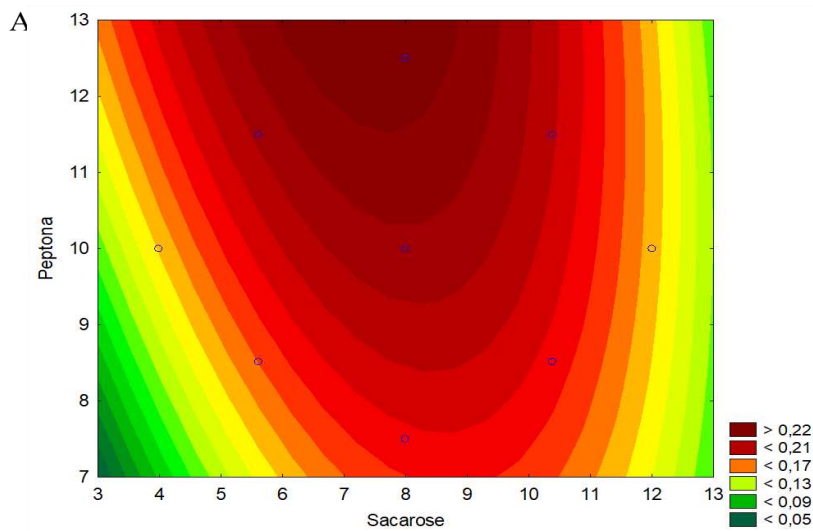


Figura 7: Gráficos de superfície de resposta. Gráficos de superfície ajustados para a resposta atividade da fitase em U/mL em função dos fatores estudados A) peptona e sacarose; B) tempo e sacarose; e C) peptona e tempo.



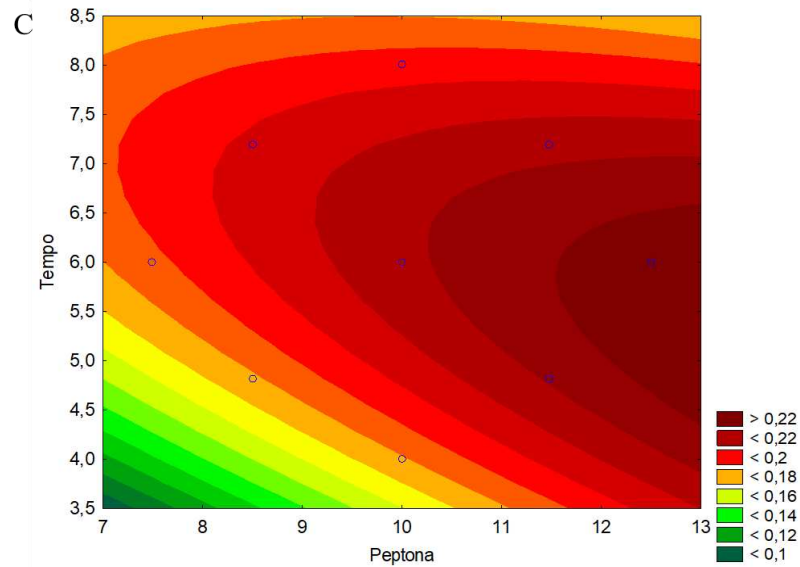
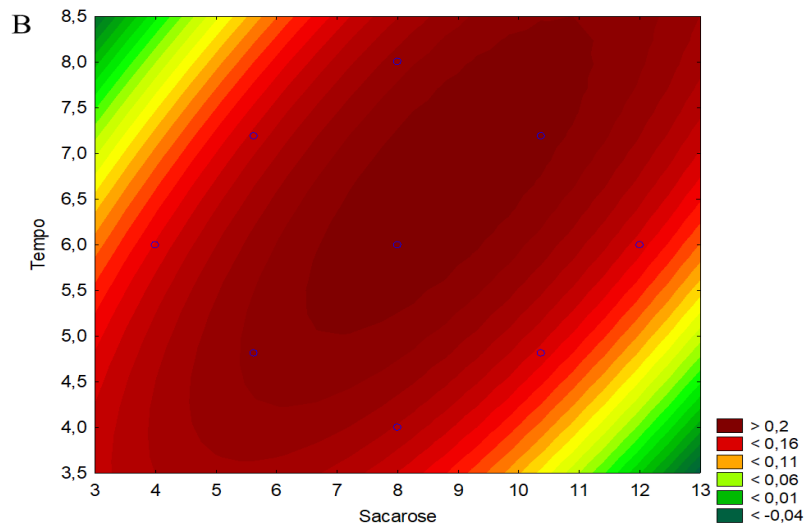


Figura 8: Gráficos de contorno para a atividade da fitase em U/mL. Gráficos de superfície ajustados para a resposta atividade da fitase em U/mL em função dos fatores estudados A) peptona e sacarose; B) tempo e sacarose; e C) peptona e tempo.

3.3.1. Ajuste matemático dos modelos

A Tabela 9 apresenta os modelos ajustados, para a atividade da fitase em U/mL e em U/mg e os respectivos valores de R^2 .

Tabela 7 – Modelos ajustados, com unidades naturais, para a atividade enzimática da fitase em U/mL e em U/mg e os respectivos valores de R².

Condição	Equações dos modelos ajustados	R ²
U/mL		76,72
Sacarose 8,5	Atividade (U/mL) = - 0,081 + 0,0175 S + 0,00959 P + 0,0405 t - 0,00430 S*S - 0,00880 t*t + 0,00864 S*t	
Peptona 12,5		
Tempo 6,0		
U/mg		85,57
Sacarose 12,0	Atividade (U/mg) = - 4,42 + 0,0379 S + 1,280 P - 0,2105 t - 0,0605 P*P	
Peptona 11,0		
Tempo 4,0		

* Indica os termos significativos da equação (p-valor < 0,05). S: sacarose; P: peptona (%); t: tempo (dias).

A análise das equações expressas na Tabela 9, juntamente com os gráficos da Figura 6 e nos anexos 4 e 6A, permitem inferir que a peptona exerce efeito significativo linear e quadrático sobre a atividade de fitase em U/mg enquanto o fator tempo apresenta efeito linear.

De acordo com o modelo ajustado apresentado na Tabela 9 e nos gráficos da Figura 7 e nos Anexos 5 e 6B, observa-se que a sacarose exerce efeito quadrático significativo sobre a atividade da fitase em U/mL. Pode ser observado também a existência de uma interação dupla significativa entre a peptona e a sacarose no modelo ajustado para explicar a atividade da fitase em U/mL.

A existência de interações duplas entre os fatores torna a indicação de níveis para os mesmos complicada, uma vez que a escolha do nível para um fator depende do nível escolhido para outro. Entretanto, a existência de interações pode constituir vantagem, pois quando diversas combinações de fatores podem ser utilizadas para se obter a mesma resposta, níveis mais econômicos de fatores que elevam o custo do processo podem ser indicados. Por exemplo, para a atividade enzimática, as análises provenientes da otimização mostram que a quantidade de sacarose no meio e o tempo de cultivo podem ser reduzidos, levando à formulação de um meio mais econômico e em menos tempo para o crescimento do fungo e produção de fitase. Para a atividade específica, para um menor tempo de cultivo indica que a quantidade de peptona e sacarose deve ser aumentada. Por um lado, esse resultado pode ser favorável, pela diminuição do tempo de fermentação, mas por outro aumenta os custos com a suplementação de nutrientes do meio.

Possivelmente, a concentração total de proteínas da biomassa, a secreção de outras proteínas no meio, ou até mesmo o crescimento do fungo possam ter influenciado no

ajuste das respostas expressas como atividade específica. A sacarose e a peptona apresentaram um efeito linear sobre as atividades da fitase em U/mL e em U/mg, respectivamente.

Analisando os modelos apresentados na Tabela 9 e na Figura 6, é possível perceber que o tempo exerce um efeito muito importante na atividade específica. Do ponto de vista industrial, esse resultando é bem favorável, visto que pode se levar menos tempo no processo de fermentação e conseqüentemente na obtenção dos extratos para aplicação biotecnológica.

Se o objetivo é a purificação da enzima, para aplicação na indústria de alimentos (produção de bebidas e panificação) ou alimentação animal, por exemplo, sugere-se emprego do limite superior de peptona (11,0), superior de sacarose (12,0) no menor tempo de fermentação (4,0). Em contrapartida, se o objetivo é a produção de extratos destinados à produção de etanol, por exemplo, os modelos que visam ao aumento da atividade da fitase em U/mL são mais interessantes. Sendo assim, deve-se diminuir a concentração de sacarose, aumentar a de peptona e usar um tempo de fermentação de 6 dias.

Os valores de R^2 associados às equações ajustadas mostram que os modelos obtidos para as respostas atividades de fitase em U/mL e em U/mg podem ser utilizados para estudo e predição destas variáveis em função dos fatores do modelo dentro das faixas estudadas. Sistemas de fermentação são processos complexos, contendo múltiplos componentes, múltiplas fases e muitos fatores controláveis ou não (QASIM *et al.*, 2017). A complexidade do sistema de produção de enzimas sugere que os fatores estudados, como a concentração de peptona, concentração de sacarose e tempo de cultivo, contribuem para o resultado final de atividade extracelular da fitase (CUNHA *et al.*, 2017).

A análise de desejabilidade consiste de uma ferramenta importante para apontar as condições ótimas de uma resposta ou o conjunto delas para processos ou produtos. A concentração dos componentes do meio e o tempo de cultivo para os quais as atividades enzimáticas em U/mL e U/mg são máximas estão associadas a valores de desejabilidade (D) muito próximo de 1.

Os modelos apresentados na Figura 5 foram utilizados para obtenção de condições que maximizassem as atividades enzimática e específica, individualmente. Sendo assim, foi estabelecido o valor zero como limite inferior para as respostas analisadas, e o valor máximo obtido para aquela resposta como alvo.

As concentrações de peptona e sacarose e o tempo de cultivo que promovem a maximização das atividades de fitase em U/mL e em U/mg, assim como o valor da

desejabilidade (D) individual das respostas foram utilizados para o ajuste do modelo (Tabela 10).

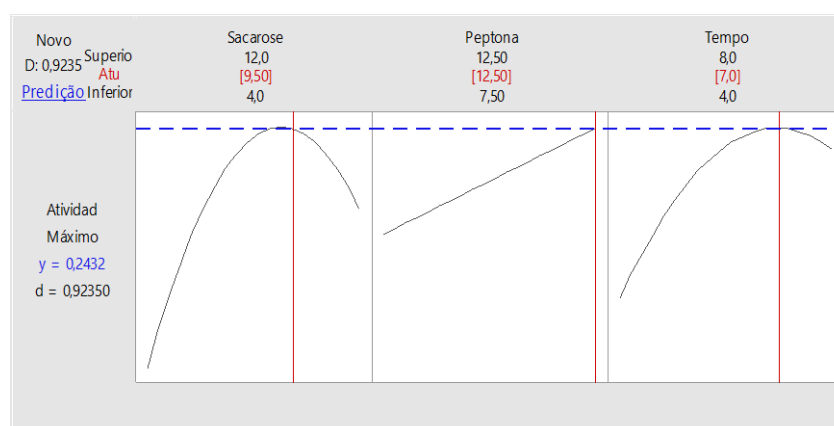
Tabela 8 – Concentrações de peptona e sacarose e tempo de cultivo, valores de atividade de fitase preditos e valores de desejabilidade individual calculados para atividade de fitase em U/mL e em U/mg.

Variável resposta	Peptona	Sacarose	Tempo	\hat{y}	D
Atividade (U/mL)	12,5	9,5	7	0,24	0,92
Atividade (Um/g)	11	12	4	1,95	0,94

\hat{y} = Valores ajustados.

Os gráficos de otimização para as atividades de fitase em U/mL e em U/mg foram obtidos de acordo com os modelos ajustados (Figura 6).

A)



B)

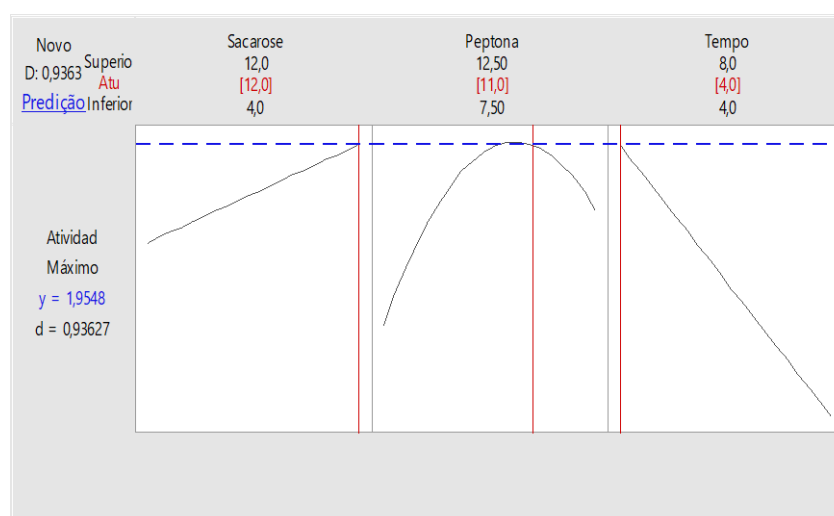


Figura 9: Gráficos de otimização das respostas. A) Desejabilidade para a atividade enzimática da fitase do fungo *T. pinophilus* em U/mL; B) Desejabilidade para a atividade enzimática da fitase do fungo *T. pinophilus* U/mg.

3.4 – Validação dos modelos

A validação dos modelos preditos tem como objetivo verificar se os modelos ajustados descrevem bem os dados experimentais observados. A análise de desejabilidade conjunta não foi passível de ajuste para os modelos obtidos. Dessa forma, com base nos resultados fornecidos pela análise de desejabilidade individual, foram escolhidas duas condições para produção de fitase e validação dos modelos, uma para atividade da fitase em (U/mL) e outra para atividade da fitase em U/mg.

A validação dos modelos estudados, bem como as respostas preditas e observadas, atividade de fitase em U/mL e em U/mg, além dos parâmetros de validação fator Bias e acurácia foram analisados nas condições escolhidas (Tabela 11).

Tabela 9 – Validação do \hat{y} =U/mL na condição 1 e do \hat{y} =U/mg na condição 2.

Condição	Combinações	\hat{Y} pred	\hat{Y} obs	Fb	Fa
Atividade de fitase em (U/mL)	(8,5) sacarose (12,5) peptona (6,0) tempo	0,243	0,3412	0,738	1,363
Condição	Combinações			Fb	Fa
Atividade de fitase em (U/mg)	(12) sacarose (11) peptona (4,0) tempo	1,952	2,194	0,899	1,154

Os resultados mostram que os modelos foram validados apresentando fator Bias muito próximos a 1 e fator exatidão maior que 1, comprovando que esses modelos podem ser aplicados para produção de extratos enzimáticos pelo fungo utilizando casca de soja moída, suplementada com peptona e sacarose. A priorização da maximização de uma resposta (atividade específica ou enzimática) em detrimento da outra deve ser traçada de acordo com a proposta de aplicação biotecnológica.

A otimização da produção de fitase proporcionou um ganho de 1,5x na atividade da fitase em U/mL e 6,6 x na atividade da fitase em U/mg em relação aos resultados de produção da enzima iniciais como mostrado no Anexo 3. Esses resultados confirmam a importância da otimização e de se conhecer os fatores que interferem nas respostas de interesse num processo de produção de enzimas. Contudo, deve-se salientar a importância de se estudar o efeito de outros fatores não analisados nesse trabalho, além de considerar fatores não controláveis que refletem a complexidade do processo de produção da fitase.

4 – Referências

- Afify, Ael-M.; El-Beltagi, H. S.; Abd El-Salam, S. M.; And Omran, A. A. 2011. Bioavailability of iron, zinc, phytate and phytase activity during soaking and germination of white sorghum varieties. PLoS ONE. 6, 10, 25512.
- Astolfi, V.; Astolfi, A. L.; Mazutti, M. A.; Rigo, E.; Di Luccio, M.; Camargo, A. F.; Dalastro, C.; Kubeneck, S.; Fongaro, G.; Treichel, H. 2019. Cellulolytic enzyme production from agricultural residues for biofuel purpose on circular economy approach. Bioprocess and Biosystems Engineering. 1–9.
- Azeem, M.; Riaz, A.; Chaudhary, A. N.; Hayat, R.; Hussain, Q.; Tahir, M. I.; & Imran, M. 2015. Microbial phytase activity and their role in organic P mineralization. Archives of Agronomy and Soil Science. 61, 6, 751-766.
- Balwani, I.; Chakravarty, K. & Gaur, S. 2017. Role of phytase producing microorganisms towards agricultural sustainability. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 12(March), 23–29.
- Baranyi, J.; Pin, C.; Ross, T. 1999. Validating and comparing predictive models. International Journal of Food Microbiology, [S.L]. 48, 159–166.
- Bas, D.; Boyaci, I. H. 2007. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. Journal of Food Engineering. 78, 836–845.
- Barros Neto, B. 2003. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria, 2ª ed. Editora da Unicamp, Campinas, SP.
- Barros Neto, B.; Scarminio, I.S. E Bruns, R.E. 2010. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 4a ed. Bookman, Porto Alegre. 413.
- Box, G.E.P. e N.R. Draper. 1987. Empirical Model-Building and Response. John Wiley & Sons, New York,
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analyt. Biochem. 72, 248–254.
- Cunha, F. M.; Vasconcellos, V. M.; Florencio, C.; Badino, A. C.; Farinas, C. S. 2017. On-Site Production of Enzymatic Cocktails Using a Non-conventional Fermentation Method with Agro-Industrial Residues as Renewable Feedstocks. Waste and Biomass Valorization. 8, 2, 517–526.
- Gunashree, B., Venkateswaran, G. 2008. Effect of different cultural conditions for phytase production by *Aspergillus niger* CFR 335 in submerged and solidstate

- fermentations. *Journal of Industrial Microbiology. & Biotechnology.* 35, 1587-1596.
- Gupta, V.K.; Kubicek, C.P.; Berrin, J.G.; Wilson, D.W.; Couturier, M.; Berlin, A.; Filho, E.X.F.; Ezeji, T. 2016. Fungi enzymes for bio-products from sustainable and waste biomass. *Trends Biochemistry Science.* 41, 633-645.
- HEINONEN, J.K. & LAHTI, R.J. 1981. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to assay of inorganic pyrophosphatase. *Analyt. Biochem.*, 113, 313-317.
- Khuri, A.I. & J.A. Cornell. 1996. *Response Surfaces. Designs and Analyses.* 2nded. Marcell Dekker Inc., New York, 510.
- Li, C.X.; Zhao, S.; Zhang, T.; Xian, L.; Liao, L.S.; Liu, J.L.; Feng, J.X. 2017. Genome sequencing and analysis of *Talaromyces pinophilus* provide insights into biotechnological applications. *Sci. Rep.* 7. 490.
- Menezes, B. S.; Rossi, D. M.; Ayub, M. A. Z. 2017. Screening of filamentous fungi to produce xylanase and xylooligosaccharides in submerged and solid-state cultivations on rice husk, soybean hull, and spent malt as substrates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 33-58.
- Montgomery, D. C. 2001. *Design and analysis of experiments.* John Wiley & Sons, New York,
- Myers, R.H., D.C. Montgomery & C.M. Anderson-Cook. 2009. *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments.* 3rded. John Wiley & Sons, New York. 680.
- Neira-Vielma, A. A.; Aguilar, C. N.; Ilyina, A.; Contreras-Esquível, J. C.; Carneiro-da-Cunha, M. Das G.; Michelena-Álvarez, G., & Martínez-Hernández, J. L. 2018. Purification and biochemical characterization of an *Aspergillus niger* phytase produced by solid-state fermentation using triticale residues as substrate. *Biotechnology Reports.* 17, 49–54.
- Oh, B.C.; Choi, W.C.; Park, S.; Kim, Y.O.; Oh, T.K. 2004. Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 63, 362–372.
- Qasim, S.S.; Shakir, K.A.; Al-Shaibani, A.B.; Walsh, M.K. 2017. Optimization of culture conditions to produce phytase from *Aspergillus tubingensis* SKA. *Food and Nutrition Sciences.* 8, 733–745.
- Raboy, V. 2003. Myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. *Phytochemistry.* 64, 1033–1043.

- Ramadan, E.A. Effect of processing and cooking methods on the chemical composition, sugars and phytic acid of soyabeans. 1953. Food and Public Health. 2012. 2, 1, 11-15.
- Ravindran, V.; Bryden, W. L.; Kornegay, E. T. 1995. Phytates: Occurrence, Bioavailability and Implications in Poultry Nutrition. Poultry and Avian Biology Reviews. 6, 2, 125-143.
- Salmon, D.N.X.; Fendrich, R.C.; Cruz, M.A.; Montibeller, V.W.; Vandenberghe, L.P.S.; Soccol, C.R.; Spier, M.R. 2016. Bioprocess for phytase production by *Ganoderma sp.* MR-56 in different types of bioreactors through submerged cultivation. Biochemical Engineering Journal. 114, 288-297.
- Shanmugam, G. 2018 Characteristics of Phytase Enzyme and its Role in Animal Nutrition. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 7, 3, 1006-1013.
- Tabelas Brasileiras Para Aves E Suínos: Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais. 2017. 4. ed. Viçosa, MG: Ed. UFV, 488.
- Taussky, H. H. & Skorr, E. 1953. A micro colorimetric methods for determination of inorganic 297 phosphorous. Journal of Biology and Chemistry. 202, 675-685.
- Visser, E. M.; Leal, T. Ferreira; Guimarães, M. N. De Almeida; V. Monteze. 2015. Increased enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse from enzyme recycling. Biotechnology for Biofuels. 11, 2-9.
- Wu, C.F.J. E Hamada, M. 2000. Experiments. Planning, analysis, and parameter design optimization. Ed. Wiley-Interscience, New York, 630.

6 – Apêndices

Tabela A1 – ANOVA da regressão para atividade da fitase em U/mL em experimento fatorial fracionado.

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	10	0,059238	0,005924	4,93	0,017
Linear	3	0,013704	0,004568	3,80	0,058
Sacarose	1	0,007100	0,007100	5,90	0,041
Peptona	1	0,005766	0,005766	4,79	0,060
CaCl ₂	1	0,000838	0,000838	0,70	0,428
Interações de 2 fatores	6	0,045533	0,007589	6,31	0,010
Sacarose*CaCl ₂	1	0,013698	0,013698	11,39	0,010
Sacarose*Tempo	1	0,002509	0,002509	2,09	0,187
Peptona*CaCl ₂	1	0,003206	0,003206	2,67	0,141
Peptona*Tempo	1	0,007174	0,007174	5,97	0,040
CaCl ₂ *Tempo	1	0,002919	0,002919	2,43	0,158
Biomassa*Tempo	1	0,016027	0,016027	13,33	0,006
Curvatura	1	0,000002	0,000002	0,00	0,971
Erro	8	0,009621	0,001203		
Falta de ajuste	6	0,002723	0,000454	0,13	0,977
Erro Puro	2	0,006897	0,003449		
Total	18	0,068859			

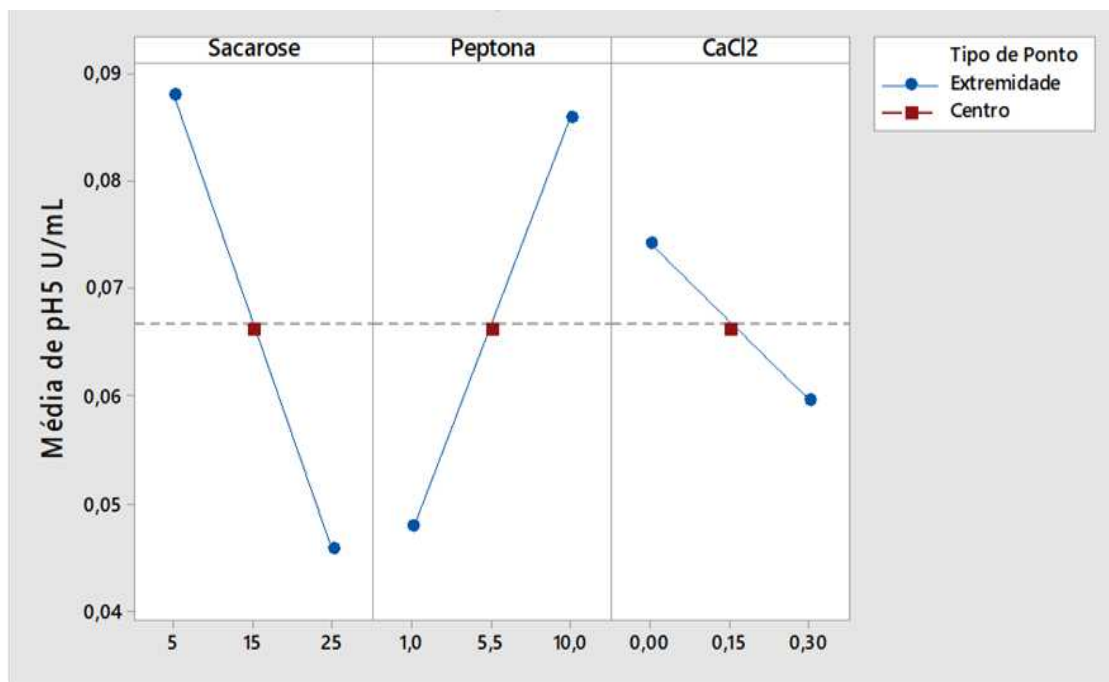
Tabela A2 – ANOVA da regressão para atividade da fitase em U/mg em experimento fatorial fracionado.

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	11	4,97058	0,45187	3,08	0,073
Linear	3	0,51698	0,17233	1,17	0,386
Peptona	1	0,12669	0,12669	0,86	0,384
Biomassa	1	0,24819	0,24819	1,69	0,235
Tempo	1	0,14210	0,14210	0,97	0,358
Interações de 2 fatores	7	4,42157	0,63165	4,30	0,037
Sacarose*Peptona	1	0,41868	0,41868	2,85	0,135
Sacarose*CaCl ₂	1	0,69371	0,69371	4,72	0,066
Peptona*CaCl ₂	1	0,61307	0,61307	4,17	0,080
Peptona*Tempo	1	0,57793	0,57793	3,93	0,088
CaCl ₂ *Biomassa	1	0,28908	0,28908	1,97	0,203
CaCl ₂ *Tempo	1	0,75782	0,75782	5,16	0,057
Biomassa*Tempo	1	1,07128	1,07128	7,29	0,031
Curvatura	1	0,03203	0,03203	0,22	0,655
Erro	7	1,02842	0,14692		
Falta de ajuste	5	0,23192	0,04638	0,12	0,976
Erro Puro	2	0,79650	0,39825		
Total	18	5,99900			

Tabela A3: Atividade da fitase em U/mL e em U/mg da fitase do fungo *T. pinophilus* não otimizada em pH 5,0. Os fatores peptona (g/L), tempo de cultivo (dias), biomassa (%), CaCl₂ (g/L) e sacarose (g/L) foram ensaiados conforme as recomendações da literatura.

Peptona	Sacarose	Biomassa	CaCl₂	Tempo	U/mL	U/mg
5,0	10,0	0,3	0,10	7	0,129	0,338

A)



B)

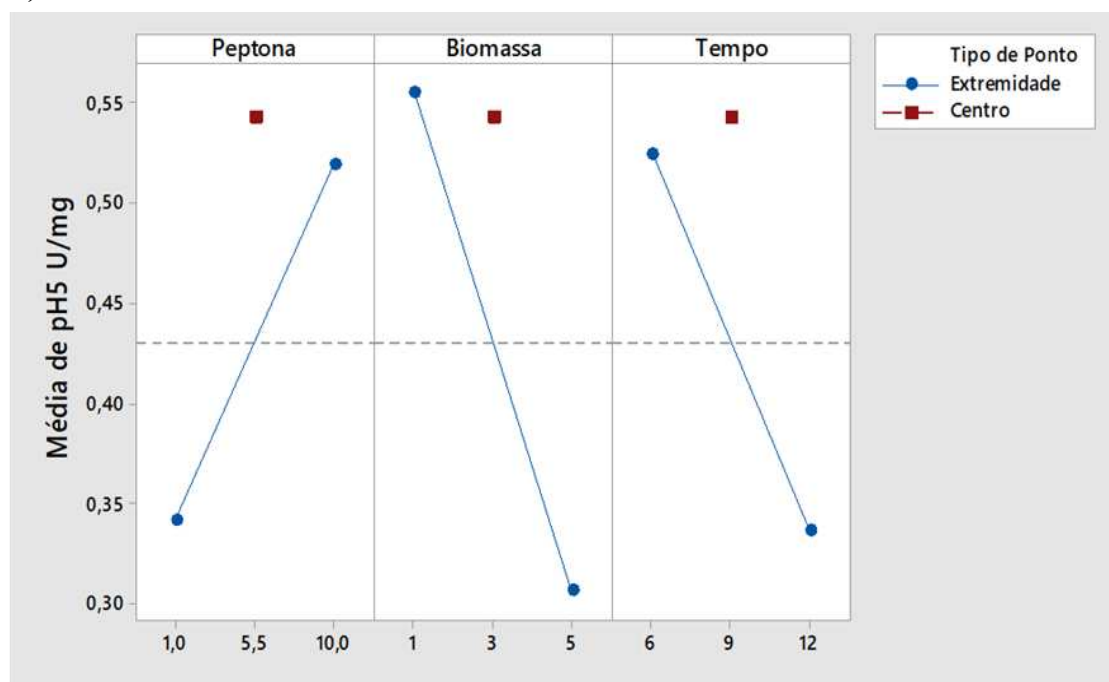
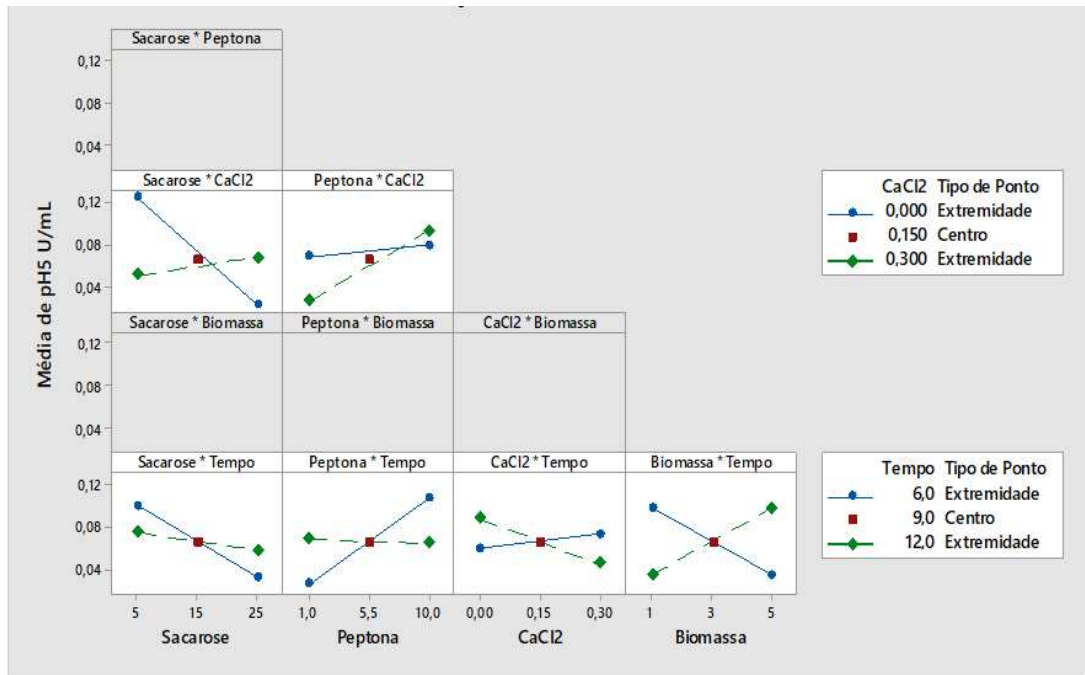


Figura A1. Efeitos principais dos fatores significativos em causar variação nas respostas atividade enzimática da fitase sobre o fitato (U/mL) (A) e atividade específica (U/mg) (B) do fungo *T. pinophilus*. As médias mostradas foram ajustadas de acordo com os efeitos apresentados na Tabela 1.

A)



B)

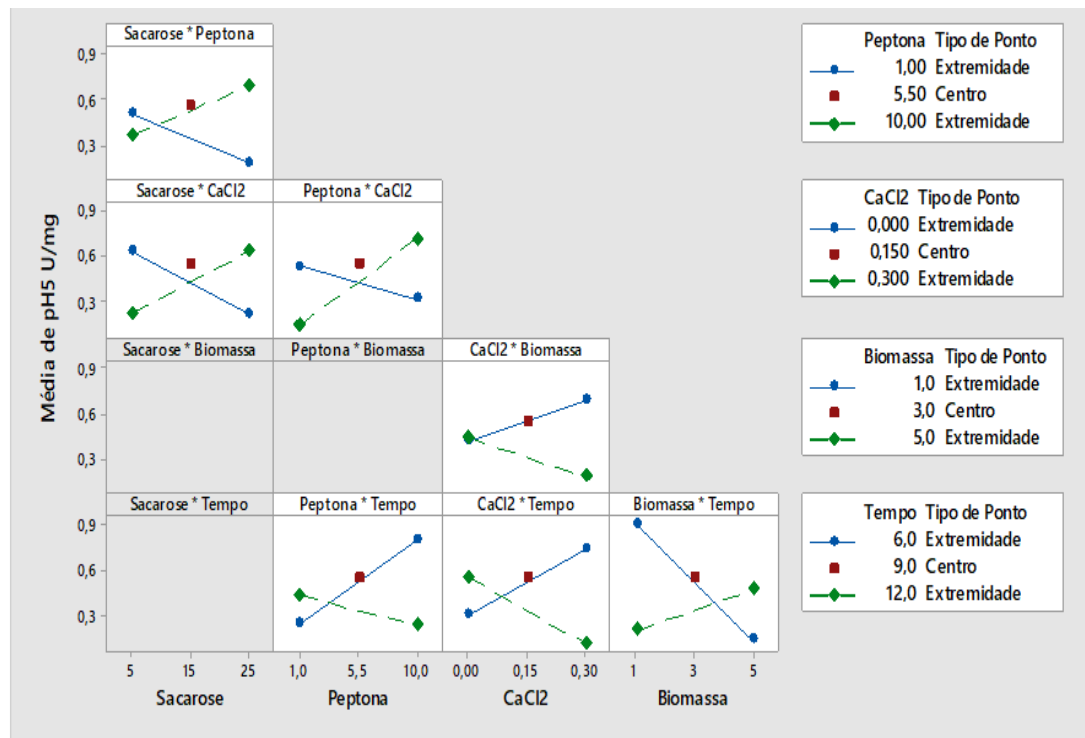


Figura A2. Efeito da interação entre os fatores na variação das respostas atividade enzimática da fitase do fungo *T. pinophilus* em (A) U/mL e em (B) U/mg. As médias mostradas foram ajustadas de acordo com os efeitos apresentados na Tabela 1.

CAPÍTULO IV

Clonagem, expressão e caracterização parcial da fitase do fungo *Talaromyces pinophilus* em *Pichia pastoris* GS115

Resumo

O ácido fítico é a forma orgânica de fósforo abundantemente presente nos produtos vegetais. O fitato pode formar quelatos com minerais como Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} e Zn^{2+} e algumas moléculas orgânicas, e por isso, é considerado como um fator antinutricional, podendo resultar na excreção de grandes quantidades de fósforo. As fitases são as enzimas que catalisam a hidrólise do ácido fítico, liberando fosfato inorgânico e mio-inositol. A levedura *Pichia pastoris* tem sido muito utilizada como um hospedeiro celular para expressão de proteínas recombinantes. O fungo *Talaromyces pinophilus* é uma espécie pouco estudada, que possui em seu genoma dois genes para a expressão de fitase. Sendo assim esse trabalho tem como objetivo a clonagem e expressão do gene Phy7227 do fungo *T. pinophilus* com códon otimizado em PICZαB *P. pastoris* GS115 para a síntese e secreção da fitase para obtenção da enzima em quantidades mais elevadas, para aplicação na indústria de rações. A clonagem e a expressão da fitase Phy7227 foi bem-sucedida, conforme os resultados obtidos na espectrometria de massas que demonstrou se tratar de uma fitase da família HAP. A atividade específica foi maior para o clone 2 com 36h de cultivo. A fitase do *T. pinophilus* atua melhor em pH 6,0 e numa temperatura igual a 55° C. A fitase demonstrou ser estável por 90 e 60 minutos a 50 e 60° C, respectivamente. Conclui-se que o gene putativo da fitase *T. pinophilus* foi clonado e expresso em *P. pastoris* e a sua caracterização parcial mostrou o potencial dessa enzima para aplicação biotecnológica.

6.1 – Introdução

O ácido fítico (hexaquisfosfato de mioinositol) é uma forma orgânica de fósforo abundantemente presente nos produtos vegetais (RABOY, 2003). O ácido fítico praticamente não pode ser hidrolisado por animais não ruminantes devido à falta de nível adequado de fitase (SHANMUGAM, 2018). O fitato, como são chamados os sais do ácido fítico, podem formar quelatos com minerais como Mg^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} e Zn^{2+} e algumas moléculas orgânicas (RABOY, 2003). Assim, o fitato é considerado como um fator antinutricional, podendo levar à deficiência mineral, além de resultar na excreção de grandes quantidades de fósforo (GIBSON, RABOY & KING, 2018). Esse fósforo excretado no ambiente podem acarretar em problemas ambientais, como por exemplo, a eutrofização dos corpos aquáticos (BALWANI, CHAKRAVARTY & GAUR, 2017; SHANMUGAM, 2018).

As fitases são as enzimas que catalisam a hidrólise sequencial das ligações fosfomonoéster do ácido fítico, liberando fosfato inorgânico e mio-inositol (SONG *et al.*, 2018). As dietas utilizadas na produção animal são suplementadas com fosfato inorgânico; no entanto, a utilização da fitase pode reduzir os custos dessa suplementação, além de minimizar os problemas ambientais ocasionados pela excreção de fosfato (BALWANI, CHAKRAVARTY & GAUR, 2017).

As fitases são enzimas com grande apelo comercial, entretanto, algumas características bioquímicas podem limitar o seu uso na indústria, como é o caso da termoestabilidade (VASUDEVAN *et al.*, 2019). A termoestabilidade é uma característica muito importante para o processamento das rações e enzimas mais termoestáveis em temperaturas mais elevadas podem ser mais promissoras para este fim (MAURYA *et al.*, 2017). Uma outra alternativa que vem sendo amplamente utilizada é o aumento da dosagem da enzima em formulações líquidas, o que aumenta o investimento de capital.

A produção de enzima em larga escala, a partir de fungos, possui vários desafios, como o conhecimento sobre fisiologia e genética desses organismos USHASREE *et al.*, 2019). Além disso, o rendimento da secreção de fitase é relativamente baixo; e muitos dos fungos não são reconhecidos como seguros. A expressão de enzimas em sistema heterólogo é uma técnica bastante utilizada com o objetivo de aumentar o rendimento de síntese de uma proteína alvo (MAURYA *et al.*, 2017).

A levedura *Pichia pastoris* tem sido muito utilizada como um hospedeiro celular para expressão de proteínas recombinantes devido ao fato de apresentar facilidade de manipulação genética e poder produzir células em quantidades elevadas (JUTURU & WU, 2018). Esta levedura possui capacidade de secreção de proteínas recombinantes com

as modificações pós traducionais necessárias, como glicosilação, pontes dissulfeto, metilação, acilação, e direcionamento para os compartimentos subcelulares, não interferindo nos processos de enovelamento e dobramento finais da proteína madura (MAURYA *et al.*, 2017; JUTURU & WU, 2018). Associado a isso, ainda tem a ausência de patogenicidade e imunogenicidade podendo ser utilizada na indústria de rações para animais.

O fungo *Talaromyces pinophilus*, anteriormente, classificado como *Penicillium pinophilum* é uma espécie pouco estudada, dentre as espécies deste gênero (TSANG *et al.*, 2018). Esta espécie vem sendo explorada por nosso grupo de pesquisa para a produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas destinadas à produção de etanol, entre outras aplicações, obtendo grande êxito (VISSER *et al.*, 2015). Em testes preliminares utilizando este fungo para produção de fitase nativa, foi observado o seu potencial na produção da enzima, mostrando-se promissor. No entanto, como já mencionado, a secreção de fitase por fungos é baixa. Dessa forma para aumentar a produção extracelular da enzima codificada pelo gene alvo, o sistema de expressão heteróloga pode ser uma alternativa viável (VASUDEVAN *et al.*, 2019).

Sendo assim, esse trabalho tem como objetivo estudar o processo de clonagem e expressão do gene Phy7227 do fungo *T. pinophilus* com códons otimizados em *P. pastoris* GS115 para a síntese e secreção da fitase.

2 – Materiais e Métodos

2.1 – Microrganismo e gene selecionado

O fungo *T. pinophilus* possui genoma sequenciado, entretanto a anotação foi realizada pelo grupo de pesquisa como parte deste trabalho de acordo como descrito no Capítulo II deste trabalho.

Entre as sequências codificadoras de fitase do fungo *T. pinophilus* foi selecionada a identificada como 7227, por apresentar sinal de secreção.

2.2 – Otimização de códons do gene Phy7227 da fitase para expressão heteróloga em *Pichia pastoris*

A sequência codificadora do peptídeo sinal foi retirada da sequência codificadora original antes da mesma ser utilizada como base para obtenção da sequência codificadora otimizada. A sequência codificadora do sinal de secreção α -mating factor, de *Saccharomyces cerevisiae*, compõe o vetor pPICZ α B de expressão em *P. pastoris* (Life Technologies/Invitrogen[®], USA). A sequência codificadora foi construída de modo a

garantir o *frame* das construções após subclonagem no vetor pPICZ α B-TEV (BR 10 2017 014488 7) (Figura 1).

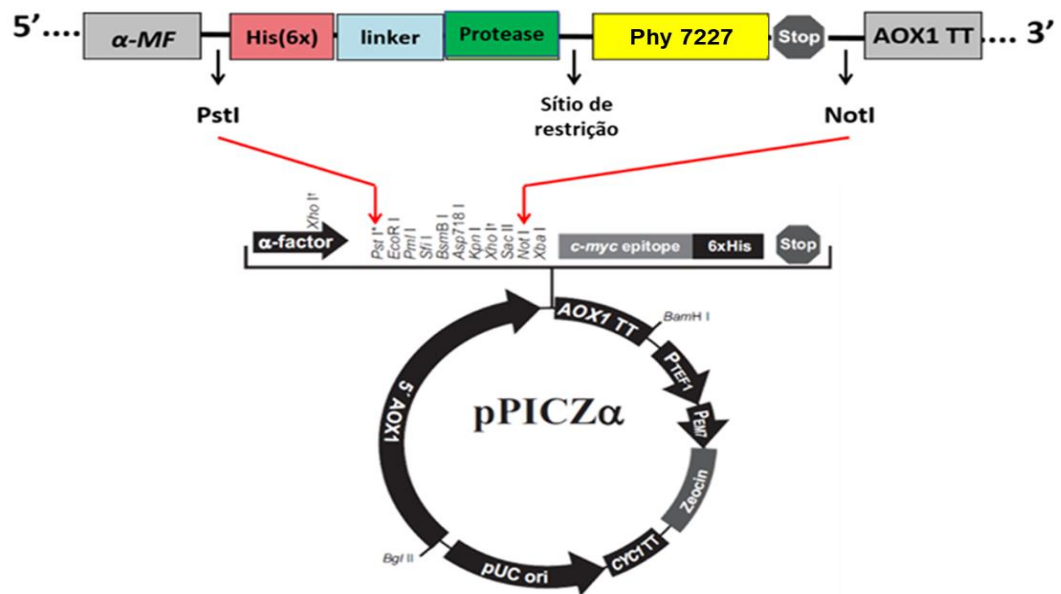


Figura 1 – Esquema do vetor pPICZ α B-TEV (BR 10 2017 014488 7) e esquema de inserção da sequência codificadora da fitase 7227 entre os sítios denominados sítio de restrição e *NotI*.

A sequência de nucleotídeos foi analisada utilizando o programa GCUA version 2.0 (<http://gcu.schoedl.de/>) (FUHRMANN *et al.*, 2004) contra uma tabela de códons de *P. pastoris*, de modo a comparar o uso de códons da sequência codificadora de interesse proveniente de *T. pinophilus* com o uso de códons em *P. pastoris*. A partir desta análise, optou-se pela otimização dos códons para expressão da fitase 7227 em *P. pastoris*. A sequência de aminoácidos da fitase foi inserida no software *on line* (<http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/>) (PUIGBO *et al.*, 2007). Este software otimiza os genes referentes a proteína de interesse de acordo com a tabela de códons mais usuais da de *Pichia pastoris* (<http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=4922>) version of CUTG (Codon Usage Tabulated from GenBank) (NAKAMURA, 2007). Em seguida, foi utilizado novamente o software *on line* GCUA (<http://gcu.schoedl.de/>) (FUHRMANN *et al.*, 2004) para conferir a sequência otimizada. Para conferir se a sequência proteica estava correta, a sequência de nucleotídeos otimizada anteriormente para sequência de aminoácidos correspondente foi traduzida utilizando-se a ferramenta **Translate tool** (<https://web.expasy.org/translate/>) (GASTEIGER *et al.*, 2003). A sequência de proteína obtida com códons otimizados foi comparada com a sequência original para fins de conferência por meio de um alinhamento

usando o programa Mafft version 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) (KATOHI *et al.*, 2017), além de um BLASTp version 2.2.21 program (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

Após essa verificação da sequência otimizada foi utilizado o programa **Gene Designer DNA 2.0** para alterar alguns códons. Alguns critérios foram adotados para a alteração dos códons para evitar erros de leitura por parte do ribossomo durante a expressão: i) códons ricos em AT foram trocados para reduzir a característica de códons muito fracos ocasionando na terminação precoce e acelerando a tradução, o que poderia prejudicar o enovelamento proteico, sendo estes códons trocados por outros que continham pelo menos um G ou C; ii) os códons ricos em GC foram trocados para reduzir as características de força, o que leva ao retardo da expressão, podendo os ribossomos ficarem presos, sendo assim, foram substituídos por códons que continham um A ou T; iii) evitou-se códons repetidos de forma consecutiva, sendo necessário a troca por um códon para quebrar este padrão. iv) Sequências ricas em AT (mais de 6 nucleotídeos) podem levar à terminação precoce da tradução em *P. pastoris* e devem ser evitadas. Além disso, foram alterados dois códons que eram reconhecidos pela enzima de restrição *EcoRI* utilizada na subclonagem da sequência codificadora sintética no vetor de clonagem.

Após isso, o programa GCUA (<http://gcu.schoedl.de/>) foi novamente utilizado para conferir a sequência otimizada. Os códons deveriam ter no mínimo 50% de frequência de uso em *P. pastoris* para serem mantidos na sequência codificadora da fitase 7227. Foram inseridos dois *stop* códons ao fim dos genes otimizados. Além disso, foi verificado se sítios de restrição para as enzimas as *NheI*, *NotI*, *PstI*, *PmeI*, *SacI*, *BstXI*, *XhoI*, *EcoRI* não foram criados após a otimização. Sítio de restrição para *NheI* e *NotI* foram inseridos nas extremidades 5' e 3', respectivamente, de modo a permitir a clonagem da sequência codificadora de interesse no vetor pPICZ α B-TEV (BR 10 2017 014488 7) *in frame* com as sequências codificadoras do peptídeo sinal e da cauda de histidina. O vetor pPICZ α B não complementa a mutação auxotrófica do gene *his4* histinol (desidrogenase) da linhagem GS115; sendo assim houve a necessidade de adição de histidina ao meio de cultura para crescimento das células. Desta forma, a *P. pastoris* GS115 é dependente do aminoácido histidina para o crescimento das colônias, e por isso os meios utilizados foram preparados com uma suplementação desse aminoácido.

A sequência codificadora da fitase 7227, resultante da otimização e construção, foi denominada Phy7227, sendo sintetizada quimicamente e clonada no vetor pPICZ α B-TEV pela empresa americana Genscript (Piscataway, USA).

2.3 – Transformação de células de *Escherichia coli* BL21 com vetores pPICZαB-Phy7227

2.3.1 – Transformação das células de *E. coli* BL21 por eletroporação

O vetor pPICZαB-TEV-Phy7227, contendo a sequência codificadora de fitase Phy7227 do fungo *T. pinophilus*, foi ressuspendido em 1μL de água deionizada num frasco de 1,5μL, incubado a 70°C por 30 min e submetido a agitação em vórtex, e incubado novamente a 70°C por 10 min. Após a ressuspensão, foi realizada a quantificação do DNA plasmidial por espectrofotometria. O vetor pPICZαB-TEV-Phy7227 foi amplificado em *E. coli* BL21 para extração de DNA plasmidial e linearização.

2.3.2 - Reação em cadeia da polimerase (PCR) das colônias de *E.coli* BL21 transformadas

Para realização da PCR das colônias de *E.coli* BL21 em tubos de 0,2 mL foram adicionados 10 μL de água deionizada e inoculado com as colônias escolhidas.

Uma mistura de PCR foi preparada para um total de 11 reações de PCR utilizando-se como moldes ou amostras: i) 5 colônias de *E. coli* BL21 transformada; ii) vetor circular obtido após a extração do plasmídeo (miniprep) como controle positivo; iii) vetor linearizado, após a reação com a *SacI* como controle positivo; iv) controle negativo sem DNA e v) o vetor vazio (sem o gene externo inserido). A mistura continha 44 μL de tampão 5x (verde), 4,4 μL de dNTP's, 11 μL de Primer Forward α-factor (5'), 11 μL de Primer Reverse AOX1 (3'), 1,1 μL GoTaq® DNA Polimerase e 137,5 μL de água deionizada. Para a PCR de colônia, foi adicionado 1 μL da colônia homogeneizada e para a PCR dos vetores, foi adicionado 1 μL da colônia diluída 20x. Em seguida, os tubos foram incubados no termociclador a 95°C por 5 min seguido de um resfriamento a 4°C por 5 min, e submetidos a 30 ciclos do programa de amplificação, apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Condições da PCR de colônia de *E. coli* BL21 transformadas.

Etapa	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	94°C	3 min
Desnaturação	94°C	45 seg
Anelamento	63°C	30 seg
Extensão	72°C	3,5 min
Extensão final	72°C	10 min
Temperatura de manutenção	4°C	∞

2.4 – Extração de DNA plasmidial

Os clones de *E. coli* BL21 transformados contendo a construção pPICZ α B-TEV-Phy7227 foram crescidos em 5mL de meio Luria Bertani (LB) low-salt contendo 25 μ g/mL de zeocina por incubação a 37°C sob agitação orbital em agitador tipo shaker a 250 rpm por 16 horas.

O DNA plasmidial das culturas foi purificado de acordo com o protocolo descrito por Green & Sambrock, (2012). Avaliou-se a qualidade do DNA plasmidial extraído por espectrofotometria e eletroforese em gel de agarose 0,9%, sendo o DNA estocado posteriormente a -20°C.

2.5 – Reação de linearização do DNA extraído da *E.coli* BL21

O vetor pPICZ α B-TEV-Phy7227 foi submetido à reação de linearização a 37°C por 1h em um aparelho de incubação a seco e agitação simultânea (Thermomixer-BIOSAN/Brasil). Na reação foram utilizados 5 μ L de tampão J (Tris/ HCl 10 mM; MgCl₂ 7mM; KCl 50 mM; DTT 1 mM em pH 7,5 a 37 °C); 2 μ L da enzima de restrição SacI (10U/ μ L); 29,5 μ L de água deionizada e 13,5 μ L da amostra contendo 453,1 ng/ μ L de DNA plasmidial. A quantidade de DNA aplicada foi calculada de acordo com o rendimento final após a extração e quantificação espectrofotométrica em Nanodrop ND 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific - Massachusetts, EUA). Após a reação de linearização, o DNA plasmidial foi precipitado com isopropanol a -20°C, lavado com etanol 80% v/v, ressuspendido em água deionizada e novamente quantificado por espectrofotometria e avaliado por eletroforese em gel de agarose 0,9% p/v.

2.6 – Transformação das células de *P. pastoris* GS115 com vetor pPICZ α B-Phy7227 por eletroporação

As células competentes de *P. pastoris* GS115, preparadas segundo protocolo da Invitrogen Life Technologies, foram levemente homogeneizadas, assim como o vetor contendo o DNA linearizado. Em seguida, foram adicionados 10 μ L da amostra contendo 242 ng/ μ L do DNA linearizado diretamente no meio contendo as células competentes e estes foram homogeneizados. Logo após, foram pipetados 90 μ L da solução dentro da cubeta de eletroporação e colocada no gelo por 5 min e, depois, a cubeta foi colocada no eletroporador.

Após a eletroporação, a cubeta foi colocada novamente no gelo e foi adicionado 1 mL de YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de dextrose) gelado para a recuperação das células. Depois da adição do agente de recuperação, as células foram

homogeneizadas suavemente, ressuspendidas e transferidas para um novo tubo (estéril) de 1,5 mL. Os tubos foram incubados a 30°C por 1 a 2h.

As células transformadas foram recuperadas em placas de Petri contendo meio YPDS (1% de extrato de levedura, 18,22% de sorbitol, 2% de peptona, 2% de dextrose e 2% de ágar) com adição de 100 µg/mL de zeocina. As placas foram inoculadas com diferentes quantidades (10 µL, 25 µL, 50 µL, 100 µL, 200 µL e duas de 300 µL) das células da levedura transformada e foram espalhadas com o auxílio de esferas de vidro. Em seguida, as placas foram incubadas a 28°C.

As colônias de *P. pastoris* Phy7227, selecionadas por crescimento em 100µg/mL de zeocina foram transferidas para novas placas contendo meio YPD com zeocina nas concentrações de 100, 500 e 2000 µg/mL

6.2.7 – Ensaio de indução da expressão da fitase r-Phy7227 em *P. pastoris* recombinantes

Para a indução da fitase os clones 22 e 25 foram selecionados, aleatoriamente, dentre aqueles que apresentaram melhor desenvolvimento da cultura em placas contendo YPD e zeocina nas concentrações 100µg/mL e 2000µg/mL. A indução da expressão da fitase recombinante (r-Phy) em *P. pastoris* Phy7227 foi realizada em três etapas, conforme o *EasySelect™ Pichia* Expression Kit, Invitrogen® (2010). A primeira etapa consistiu na produção de pré-inóculo em meio YPD para ativação da *P. pastoris* GS115 pPICZαB-Phy7227, sob agitação de 250 rpm a 28°C, *overnight*. No dia seguinte, foi feita a produção de pré-inóculo para aumento de biomassa de células em meio mínimo tamponado com glicerol e histidina (BMGH) composto por 10% de tampão fosfato 100 mM pH 6,0; 10% de YNB (1,34%); 4 x 10⁻⁵% de biotina; 10% de glicerol (10x) e 1% de histidina (10xM). Para isso, foi medida a DO_{600nm} do pré-inóculo produzido em YPD, e calculado o volume deste pré-inóculo a ser inoculado no BMGH para uma DO_{600nm} inicial igual a 1,0. A cultura em BMGH foi incubada a 28°C em 250 rpm, por aproximadamente 16-18h ou até atingir DO_{600nm} de no máximo 1,0.

Por último, foi produzido o meio mínimo tamponado com metanol e histidina (BMMH) que possui a mesma composição do BMGH, com 10% de metanol (5x) em substituição ao glicerol, para indução da expressão da enzima. Também foi feita a leitura da DO_{600 nm} inicial do pré-inóculo produzido no BMGH, e calculado o volume deste pré-inóculo a ser inoculado no BMMH para uma DO_{600nm} inicial igual a 1,0. Em seguida, o pré-inóculo foi centrifugado a 1500 rpm por 5 min e o sobrenadante descartado. O pellet foi ressuspendido em meio BMMH e inoculado no mesmo meio, e depois incubado a

28°C em 250 rpm. A indução do promotor *AOXI*, que controla a expressão do gene recombinante, foi realizado por adição de 0,5% (v/v) de metanol PA a cada 24 horas nas culturas de *P. pastoris* Phy7227. Após o início da indução, com duração total de 120 horas, alíquotas de 1mL foram retiradas em duplicata. As alíquotas foram centrifugadas a 2500 g, 4°C por 5 min e o sobrenadante foi utilizado para a detecção da atividade enzimática, sendo que o clone com maior atividade foi selecionado para trabalhos de caracterização da enzima. Os sobrenadantes dos clones foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) para confirmação da expressão da proteína. *P. pastoris* GS115, sem o inserto do gene Phy7227, foram utilizadas em todo processo como controle negativo da expressão da enzima recombinante.

2.8 – Ensaio de atividade enzimática da fitase Phy7227 do *T. pinophilus* expressa por *P. pastoris* GS115 pPICZaB utilizando fitato de sódio como substrato.

Antes de iniciar esse ensaio foi necessário realizar a troca do tampão do sobrenadante, utilizando-se tubos de ultrafiltração VIVASPIN® 10 kDa (GE Healthcare - Life Sciences, Pittsburgh/EUA), para retirada do tampão do fosfato do meio, visto que o fosfato é um inibidor da atividade da fitase. A atividade de fitase foi então determinada de acordo com o método de Heinonen & Lahti, (1981) medindo-se o fosfato inorgânico liberado a partir do substrato fitato de sódio (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO). Para o ensaio foram utilizados 60 µL do substrato fitato de sódio 1,5 mM em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,0 e 15 µL de extrato enzimático. A reação foi conduzida a 50°C durante 30 min e paralisada pela adição de 25 µL da solução de ácido tricloroacético 10% (m/v). Em seguida, foram adicionados 100 µL de reativo colorimétrico (TAUSSKY & SHORR, 1953), preparado a partir de solução de molibdato de amônio 10% (m/v), em solução de ácido sulfúrico 5M. O reativo foi preparado no momento do uso, misturando-se 10% (v/v) da solução formada por ácido sulfúrico e molibdato de amônio, 5% (m/v) de sulfato ferroso e água deionizada. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 700 nm e os valores de absorvância obtidos foram correlacionados com uma curva padrão obtida com fosfato de potássio (KH₂PO₄). Uma unidade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para a liberação de 1 µmol de fosfato inorgânico por minuto, sob as condições de ensaio.

2.9 – Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante

A eletroforese em gel de poliacrilamida unidimensional (SDS-PAGE) de acordo com Laemmli, (1970) foi realizada para a separação das proteínas do meio. As amostras

(45 μL) foram ressuspensas em 15 μL de tampão de amostra de eletroforese 4X para SDS-PAGE (1M Tris-HCl pH 6,8; 0,1% azul de bromofenol p/v; 10% SDS v/v; β -mercaptoetanol 4%; 20% glicerol v/v). Em seguida, as amostras foram fervidas em banho maria por 5 minutos. O marcador de massa molecular utilizado foi da BIO-RAD LABORATORIES, Richmond, EUA) Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder na faixa de 10 a 250 kDa. Em cada canaleta do gel foram aplicadas 18 μL de amostras de cada alíquota retirada nos diferentes tempos de cultivo (0, 12, 24, 36, 48, 72, 96 e 120h) para a confirmação da expressão da fitase. Após a corrida, os géis foram corados com a solução de nitrato de prata (OAKLEY *et al.*, 1980).

2.10 – Determinação da sequência da fitase recombinante por espectrometria de massas

A espectrometria de massas foi utilizada para confirmar a expressão da fitase recombinante. Esta análise foi feita junto ao Núcleo de Análises de Biomoléculas (NuBiomol-UFV). Os peptídeos originados da digestão triptica foram analisados diretamente por cromatografia líquida acoplado a um espectrômetro de massas em tandem com ionização por electrospray no modo íon positivo (LC-MS/MS). A separação, e detecção da fitase contida no extrato bruto da cultura induzida foram realizadas por meio de uma eletroforese em gel de poliacrilamida segundo o método de Laemmli (LAEMMLI *et al.*, 1970). Foram adicionadas 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína em 20 μL de amostra em cada canaleta. As soluções foram aquecidas a 100° C por 5 min e aplicadas nos poços, num volume final de 20 μL . Após a corrida eletroforética, a presença das bandas protéicas foi detectada com imersão dos géis numa solução de corante Comassie Brilliant Blue 250 R, por 15 min sob agitação branda. Em seguida, os géis foram descorados com uma solução descorante (ácido acético 7 %, metanol e água).

2.10.1 – Digestão enzimática

Após a separação e detecção das proteínas, as bandas de interesse foram excisadas, trituradas e submetidas à digestão enzimática usando tripsina de pâncreas suíno indicada para utilização em proteômica, tratada com TPCK, referência T-6567(Sigma Aldrich, EUA), seguindo o protocolo descrito por SHEVCHENKO *et al.* (2006). A solução de tripsina foi preparada na concentração final de 25ng/ μL . Resumidamente, as proteínas das bandas excisadas foram descoradas com solução de acetonitrila 50% e bicarbonato de amônio 25mM, em seguida foram desidratadas com acetonitrila 100%, submetidas à redução de suas pontes dissulfeto com solução de Ditioneitol (DTT) 65mM e alquiladas

com solução de iodoacetamida (IAA) 200mM, ambos solubilizados em solução de bicarbonato de amônio 100mM. As proteínas nos fragmentos dos géis, após redução e alquilação, foram lavadas com solução de bicarbonato de amônio 100mM e desidratadas com acetonitrila 100%. Em seguida seguiram para a digestão enzimática por meio da adição de 80µL de solução de tripsina, e incubação em banho maria à 37°C por 22 horas. Finalmente, a digestão enzimática foi paralisada pela adição de solução de acetonitrila 50% e ácido fórmico 5% e os peptídeos trípticos foram recuperados. Após a digestão, os peptídeos trípticos foram secos em centrífuga à vácuo, modelo AG-22331 (Eppendorf®, Alemanha) e armazenados a -80C até o uso.

2.10.2 – Espectrometria de massa (LC-MS/MS)

Os peptídeos trípticos provenientes das digestões enzimáticas foram ressuspensos em 100µL de solução aquosa de ácido fórmico 0,1%, centrifugados a 20.000xg por 20 minutos, sendo 90µL dessa solução transferidos para frascos do amostrador, modelo *total recovery* (Waters, EUA). Os peptídeos trípticos de cada amostra foram aplicados em um sistema LC-MS/MS, composto por um UPLC nanoAcquity (Waters, EUA) e um espectrômetro de massas modelo micrOTOF QII® - QTOF (Bruker Daltonics, Alemanha). A análise cromatográfica das amostras ocorreu em uma coluna *trap* e uma coluna capilar Protecol C18 GHQ303 3,0µm – 300µm x 150mm, operando com uma taxa de fluxo de 4,5µL/min. Os peptídeos foram eluídos automaticamente e injetados no espectrômetro de massas, atuando no modo *online*, com o auxílio de uma agulha de ionização microESI. Nesta etapa, foram utilizadas as soluções de água e ácido fórmico 0,1% (v/v) e acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (v/v), como fase móvel A e B, respectivamente. A programação iniciou por um passo de dessalinização com a manutenção de 5% da fase móvel B (v/v) durante 14 min. Em seguida, foi realizado um gradiente consistindo de uma rampa de subida linear partindo de 5% até 50% da fase móvel B (v/v) durante 30min, permanecendo em 50% durante 5min, rampa de subida linear partindo de 50% até 90% da fase móvel B (v/v) durante 3min, permanecendo em 90% durante 2min, rampa de descida linear partindo de 90% até 10% da fase móvel B (v/v) durante 3min, seguido pela manutenção a 10% durante 3min. A aquisição de dados teve a duração de, aproximadamente, 60 min. O escaneamento dos íons ocorreu no modo positivo para os espectros de MS1 na faixa de massas entre 100 e 2000m/z e MS2 entre 70 e 2000 m/z. O espectrômetro de massas QTOF foi operado no modo auto-MSn, o qual fez a aquisição dos espectros de MS2 para os íons mais intensos em cada espectro de varredura completo, excluindo os íons de carga simples.

A aquisição dos dados no QTOF foi gerenciada pelo aplicativo Hystar, versão 3.2 (Bruker Daltonics, Alemanha), os espectros foram processados com o auxílio dos aplicativos Data Analysis, versão 4.0 (Bruker Daltonics, Alemanha) e CompassXport, versão 3.0 (Bruker Daltonics, Alemanha), utilizando-se as configurações padrões para proteômica. As listas de picos foram geradas no formato *extensible mark-up language* (*mzXML) pelo aplicativo CompassXport.

2.10.3 – Identificação das proteínas

A identificação das proteínas foi realizada por meio da comparação entre as listas de massas geradas e as sequências de proteínas da espécie *T. pinophilus* (download em 24/05/2019, com 11.095 entradas. MycoBank: 560662).

As listas de massas geradas pelo QTOF foram convertidas no formato mzXML, as quais foram comparadas com as sequências depositadas no referido banco de dados por meio do software PEAKS, versão 7.0 (Bioinformatics Solutions Inc., Canadá) (MA *et al.*, 2003). Os parâmetros utilizados para a pesquisa foram: digestão enzimática pela tripsina com uma clivagem perdida; carbamidometilação da cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável, tolerância de erro de 0,3 Da para o íon parental e de 0,6 Da para os fragmentos. As proteínas foram consideradas identificadas quando apresentaram, pelo menos, dois peptídeos alinhados em sua sequência, com FDR (*False Discovery Rate*) menor que um. As planilhas de identificação exportadas pelo aplicativo em cada análise foram manualmente verificadas, as proteínas foram separadas pelo número e sequência de seus peptídeos.

As massas moleculares e pontos isoelétricos teóricos das proteínas identificadas foram obtidos pela ferramenta *ProtParam Tool* do ExPASy Bioinformatics Resource Portal (<http://www.expasy.org>).

2.11 – Caracterização parcial da fitase recombinante Phy7227 de *T. pinophilus*

2.11.1 – Efeito da temperatura e do pH na atividade enzimática

O efeito da temperatura na atividade enzimática foi determinado na faixa de temperatura de 20 a 70 °C. A atividade enzimática foi avaliada conforme ensaio padrão (item 2.6). O efeito do pH foi determinado segundo a mesma metodologia, utilizando as seguintes soluções tampão: glicina-HCl 0,1 M (pH 2,0-3,5), acetato de sódio 0,1 M (pH 4,0-6,0), e Tris-HCl 0,1 M (pH 7,0-8,0). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

2.11.2 – Avaliação da estabilidade térmica e em pH do extrato enzimático

Para a termoestabilidade o extrato enzimático bruto foi pré-incubado a 50 e 60 °C. Em intervalos pré-determinados, alíquotas dos extratos foram coletadas e na sequência foi determinada a atividade enzimática relativa de cada alíquota, por meio da correlação com a atividade enzimática da enzima no tempo 0h de incubação. Para avaliação da estabilidade em diferentes pHs, o extrato enzimático foi incubado em pHs de 2,0-4,0 (intervalo de 1,0) e de 4,5-8,0 (intervalos de 0,5), logo após os extratos foram submetidos ao ensaio padrão de fitase usando o fitato de sódio como substrato. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

6.2.11.3 – Quantificação de Proteínas Totais

A quantificação das proteínas totais solúveis, para a caracterização parcial, foi realizada utilizando o kit de Ensaio de Proteínas BCA (*Thermo*) segundo a metodologia de Smith *et al.*, 1985. A reação foi realizada conforme especificações do fabricante, sendo a curva padrão construída utilizando-se a proteína albumina do soro bovino variando de 0 a 12µg. A leitura de absorbância foi feita em um espectrofotômetro a 562 nm.

3 – Resultados e discussão

3.1 – Otimização de códons para expressão heteróloga da fitase 7227 de *T. pinophilus* em *P. pastoris*

A sequência proteica 7227 da fitase putativa de *T. pinophilus* foi analisada quanto à presença de peptídeo sinal, sendo predito peptídeo sinal na correspondente aos resíduos de aminoácidos de 1 a 20 na porção N-terminal com corte entre os resíduos de aa 20 e 21. O peptídeo sinal presente na sequência do gene Phy7227 foi removido uma vez que a secreção da proteína recombinante seria dirigida pelo peptídeo sinal α -*matig* factor codificado por sequência do vetor de expressão pPICZ α B-TEV (BR 10 2017 014488 7). Os códons da sequência codificadora da fitase Phy7227 de *T. pinophilus* foram alterados por meio dos softwares Optymizer e Gene Designer DNA version 2.0 para códons preferenciais de *P. pastoris* tomando como base a tabela de *códons usage* de *P. pastoris* disponível em KAZUSA (<http://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=4922>) version of CUTG (Codon Usage Tabulated from GenBank) (NAKAMURA, 2007).

A sequência de nucleotídeos foi submetida à tradução e foi realizado um alinhamento com a sequência proteica original Phy7227 para conferência. Em seguida, foram inseridos dois sítios para enzimas de restrição: um para a *NheI* (extremidade 5') e outro para *NotI* (extremidade 3') a serem utilizados durante a clonagem no vetor

pPICZ α B-TEV. A sequência otimizada foi sintetizada e clonada no vetor denominado pPICZ α B-TEV-7227.

3.2 – Amplificação do vetor pPICZ α B-TEV-7227 em *E. coli* BL21

Na Figura 2, é apresentada a eletroforese em gel de agarose 0,9% para revelação da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) das colônias de *E. coli* BL21 pPICZ α B-Phy7227 transformadas.

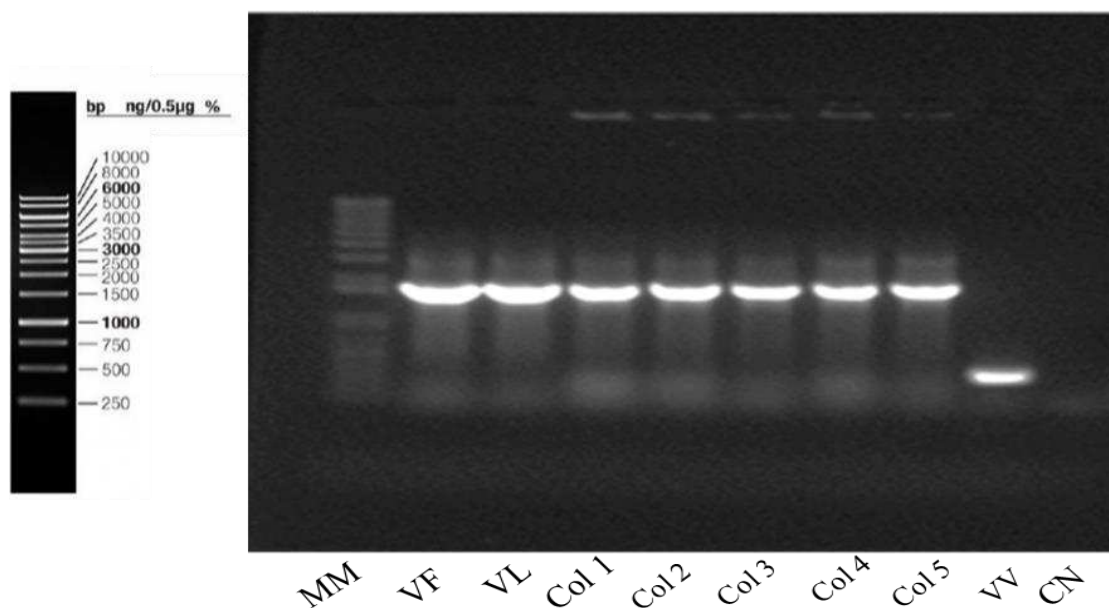


Figura 2 – Eletroforese em gel de agarose 0,9% para revelação da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) das colônias de *E. coli* BL21 pPICZ α B-TEV-Phy7227 transformadas com os primers F' α -fator e R'AOX1. MM: marcador molecular; VF: vetor pPICZ α B-TEV-Phy7227 fechado; VL: vetor pPICZ α B-TEV-Phy7227 linearizado; Col 1: colônia 1 de *E. coli* BL21; Col 2: colônia 2 de *E. coli* BL21; Col 3: colônia 3 de *E. coli* BL21; Col 4: colônia 4 de *E. coli* BL21; Col 5: colônia 5 de *E. coli* BL21; VV: vetor pPICZ α B vazio sem o gene Phy7227; CN: *E. coli* BL21 sem o vetor 11) vetor pPICZ α B-TEV-Phy7227 linearizado com SacI (sem PCR). Marcador molecular Thermo Fischer 1Kb Gene Ruler.

3.2 – Transformação de *P. pastoris* GS115 com vetor pPICZ α B-TEV-Phy7227

As colônias transformadas foram transferidas para placas de YPD ágar contendo diferentes concentrações de zeocina (100, 500 e 2000 μ g/mL).

3.3 – Ensaio de indução da expressão da fitase 7227 do *T. pinophilus* em *P. pastoris* GS115 pPICZ α B.

Os meios de cultura recomendados pelo Manual *EasySelect*TM, Invitrogen[®] podem ser tamponados ou não, nesse caso optou-se pelo tamponamento do meio com tampão fosfato de potássio para evitar a variação de pH e reduzir a atividade de proteases no sobrenadante de cultura. Os sobrenadantes utilizados para o ensaio enzimático foram produzidos em meio contendo tampão fosfato. Entretanto, não foi possível a detecção da atividade enzimática devido à presença de fosfato no meio para crescimento da levedura. O fosfato é um dos produtos gerados na reação da fitase e, por isso, pode ter inativado a enzima (SINGH *et al.*, 2018). Então, a estratégia seguinte, foi a retirada do tampão fosfato dos sobrenadantes dos clones 1, 2 e do controle. Após cada etapa de filtração, o sobrenadante foi ressuspensionado em tampão acetato, que é isento de fosfato. Depois da troca do tampão, os sobrenadantes foram submetidos aos ensaios enzimáticos utilizando o fitato de sódio como substrato e à quantificação de proteína pelo método do ácido bicinconínico (Tabela 2).

Tabela 2 – Atividade específica (U/mg) e concentração total de proteínas do sobrenadante dos clones 1 e 2/2000 µg/mL de zeocina de *P. pastoris* pPICZαB-TEV-Phy7227 sobre o fitato em diferentes tempos de cultivo.

Tempo de cultivo (h)	Controle		Clone 1		Clone 2	
	Proteínas (mg/mL)	Ativ. (U/mg)	Proteínas (mg/mL)	Ativ. (U/mg)	Proteínas (mg/mL)	Ativ. (U/mg)
0	0,047 ± 0,008	-	0,047 ± 0,002	0,052 ± 0,045	0,041 ± 0,002	0,000 ± 0,000
12	0,037 ± 0,005	-	0,058 ± 0,007	0,567 ± 0,337	0,042 ± 0,002	0,443 ± 0,160
24	0,037 ± 0,003	-	0,060 ± 0,010	1,400 ± 1,057	0,047 ± 0,003	1,878 ± 0,077
36	0,038 ± 0,001	-	0,060 ± 0,002	1,756 ± 0,079	0,043 ± 0,009	6,228 ± 0,264
48	0,039 ± 0,003	-	0,061 ± 0,002	2,896 ± 0,471	0,083 ± 0,002	3,767 ± 0,588
72	0,044 ± 0,004	-	0,082 ± 0,004	1,221 ± 0,062	0,091 ± 0,003	2,444 ± 0,086
96	0,045 ± 0,004	-	0,107 ± 0,011	1,201 ± 0,875	0,133 ± 0,009	1,986 ± 0,130
120	0,070 ± 0,006	-	0,129 ± 0,014	1,110 ± 0,786	0,114 ± 0,006	0,088 ± 0,056

Como pode ser observado, o clone 2 com 36 h de cultivo apresentou o maior valor de atividade específica (6,228 U/mg) em comparação ao clone 1 e após este tempo essa atividade diminuiu. Além disso, após a ultrafiltração para troca de tampão houve uma perda de 33,8% na concentração de proteínas, o que pode ter contribuído para a diminuição da atividade. Pode-se observar também dos dados da Tabela 2 que a concentração total proteína no sobrenadante de cultura aumenta com o avançar do tempo de ensaio, com grande contribuição do acúmulo de proteína recombinante. Os baixos níveis de secreção de proteínas nativas consistem em uma das maiores vantagens do sistema de expressão heteróloga em *Pichia pastoris* (CEREGHINO & CREGG, 2000).

As amostras do ensaio de expressão dos clones 1 e 2 de *P. pastoris* recombinantes e do controle foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e as proteínas foram reveladas com nitrato de prata (Figura 5). De acordo com o observado na Figura 5, bandas proteicas próximas à altura do padrão de 75 kDa aparecem em grande abundância no perfil eletroforético das amostras de sobrenadante dos clones recombinantes, mas não no controle GS115. Este valor de massa difere da massa molecular predita para a proteína recombinante (51,0 kDa), o que provavelmente se deve à presença de 3 sítios de N e 12 sítios O-glicosilações, respectivamente, na enzima, conforme apresentado no capítulo II.

A cauda de histidina presente na construção do vetor, pode contribuir com o aumento no tamanho da proteína, assim como as modificações pós traducionais como a N e a O-glicosilação, pode ser por isso que o valor da massa molecular observada no gel difere da predita.

O perfil de atividade específica e concentração de proteínas totais apresentado na Tabela 2 também pode ser observado nos géis representados na Figura 3. Os clones 1 e 2 apresentaram um perfil de bandas semelhante para os tempos 24 e 36h sendo a atividade específica determinante para a seleção do clone. Dessa forma, o clone 2 foi selecionado por apresentar uma maior atividade específica no tempo de 36h.

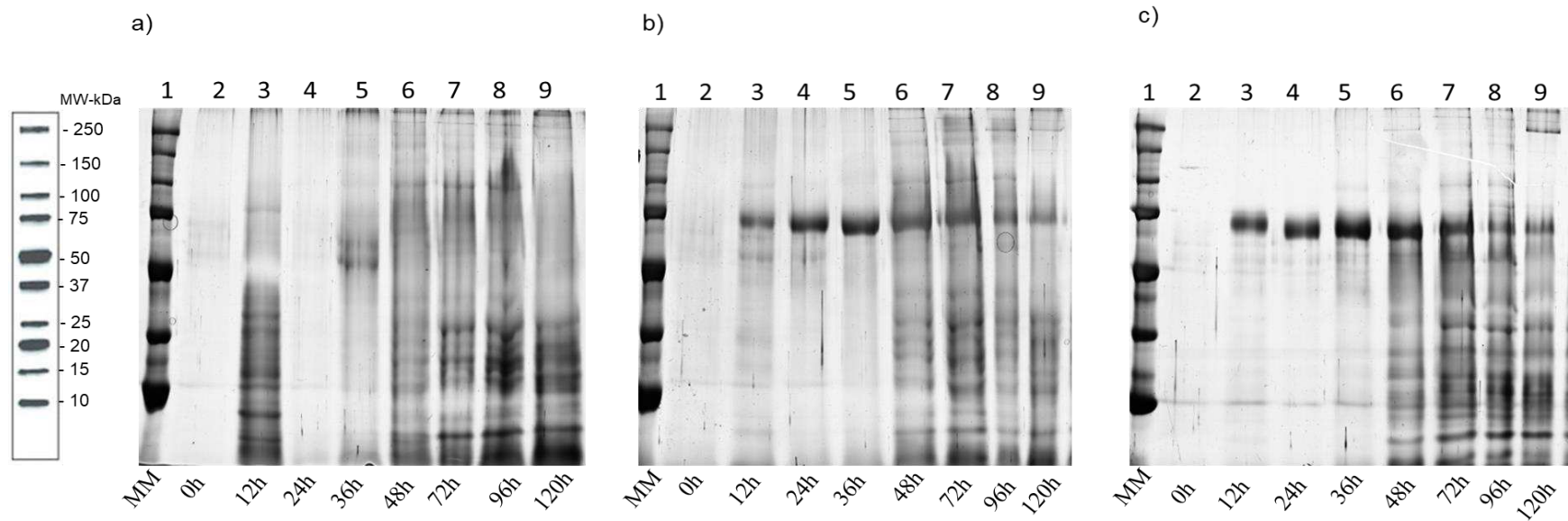


Figura 3 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) da *P. pastoris* GS115 não transformada (a) clones 1 (b) e clone 2 (c). MM: Marcador molecular e Tempos de cultivo de 0 a 120h.

As glicosilações podem ser removidas por ensaios de hidrólise enzimática utilizando β -glicosidases (NIU *et al.*, 2015). Algumas modificações pós traducionais fortalecem de tal forma a estrutura da proteína que elas não atingem o máximo de energia de ativação, sendo assim a atividade enzimática não atinge o potencial máximo da enzima e por isso é necessário a remoção de algumas dessas modificações, como é o caso das deglicosilações (NIU *et al.*, 2015).

6.3.5. Espectrometria de massas (LC-MS/MS)

A fitase 7227 do fungo *T. pinophilus*, como mostrado nas análises preditivas do capítulo II deste trabalho, pertence à família das fosfatases ácidas de histidina (HAP). Apesar da sua especificidade pelo fitato, essas enzimas também podem catalisar a hidrólise de outros substratos fosfatados. A amostra de fitase foi submetida à confirmação da identidade proteica por espectrometria de massas. As amostras foram processadas em réplicas. Após o processamento, aquisição de dados de espectrometria de massas e análise desses dados foi possível identificar a proteína Phy7227 (Tabela 3 e Figura 4).

Tabela 3 – Proteína identificada pela estratégia de LC-MS/MS e comparada com sequências depositadas no UniProt pelo software PEAKS.

Amostra	Cód. Acesso	Proteína	Cobertura	Score da proteína	MW (kDa)	pI
1	g7227.t1	Fitase EC.3.1.3.8	27%	219.22	51,0	4,44

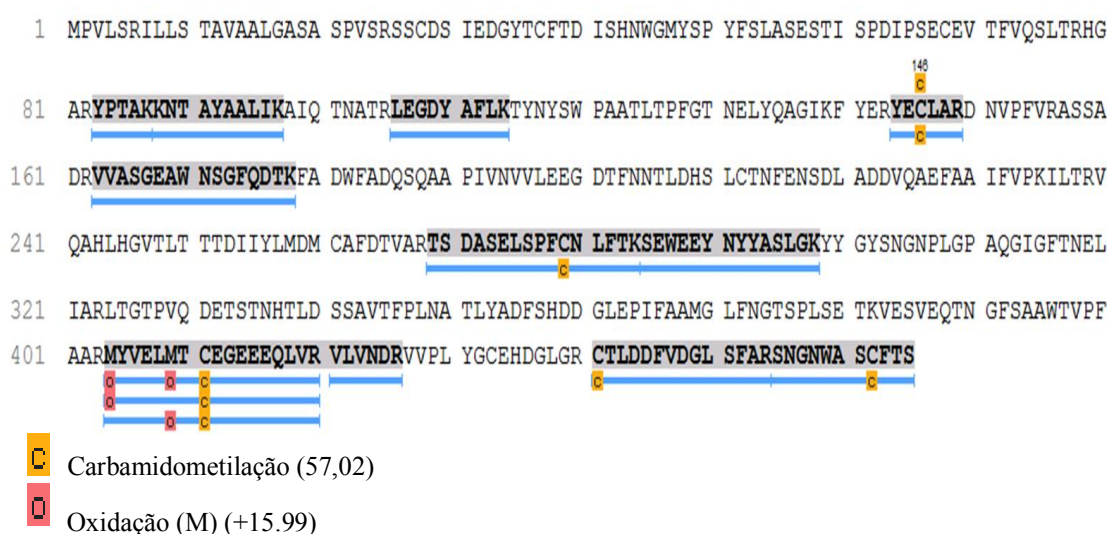


Figura 4 – Alinhamento múltiplo de sequência da proteína identificada pela estratégia de LC-MS/MS comparada com sequências depositadas no UniProt pelo software PEAKS.

O resultado confirma a hipótese de que a proteína constituinte das bandas excisadas, de massa molecular aproximada 75 kDa, corresponde à proteína recombinante 7227 produzida em *P. pastoris*. Juntamente com os dados de atividade enzimática, permite sugerir que a proteína 7227 de *T. pinophilus*, antes considerada uma fitase putativa, pode ser considerada uma fitase funcional, com potencial de ser expressa e secretada no sistema nativo.

3.6 – Caracterização parcial da fitase recombinante

3.6.1 – Efeito da pH na atividade enzimática e estabilidade ao pH

A atividade relativa (%) da fitase sobre o fitato em função do pH do ensaio e do pH de incubação podem ser observados nos gráficos da Figura 7a. e 7b., respectivamente. A fitase r-Phy7227 atingiu a máxima atividade em pH 6,0 e demonstrou-se bastante estável após incubação em diferentes pHs (Figura 5).

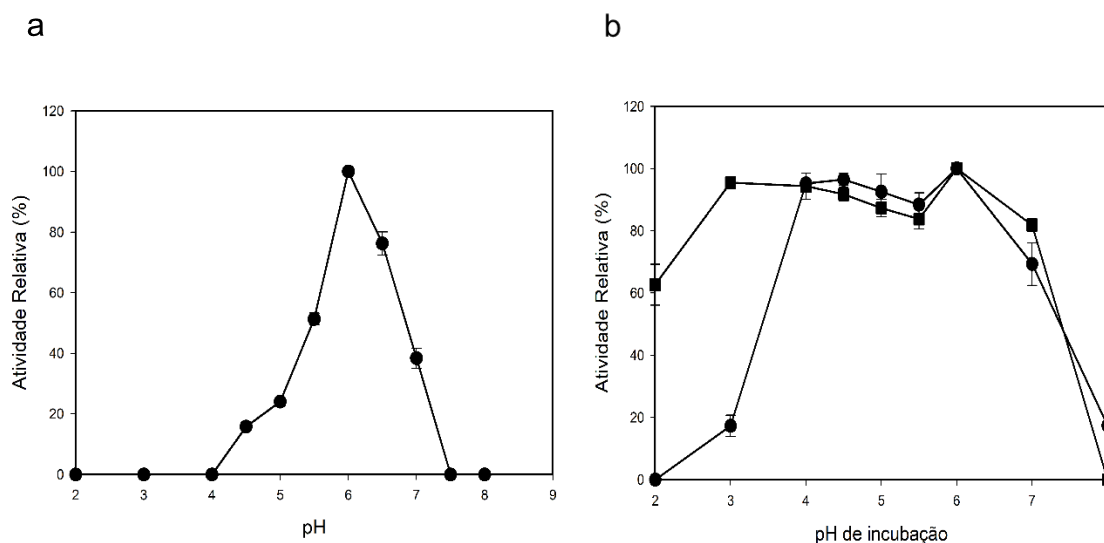


Figura 5: Atividade relativa (%) da fitase sobre o fitato de sódio em tampão acetato de sódio 100 mM em função de: a) curva de pH do ensaio e b) estabilidade em pH após incubação por (■) 60 min e (●) 90 min.

De acordo com os resultados obtidos, é possível então, inferir que se trata de uma fitase ácida da família HAP como já foi mostrado nos resultados de espectrometria de massa. Entretanto, as fitases da família HAP são divididas em três grupos de acordo com a origem e o pH de atuação (OH *et al.*, 2004; RIGDEN, 2008). Os fungos podem secretar duas fitases extracelulares da família HAP, a PhyA e a PhyB, caracterizadas por diferentes

pHs ótimos, como ocorre em *Aspergillus niger* (OH *et al.*, 2004; LEI *et al.*, 2013). Esses resultados são próximos aos encontrados por Maurya *et al.*, (2017) que obteve atividade ótima em pH 5,0 para fitase de *Sporotrichum thermophile* também expressa em *P. pastoris*.

A estabilidade ao pH é uma característica fundamental quando se fala em fitase. Isso porque o trato digestivo do animal possui dois ambientes com uma amplitude de pH 2,5 (no estômago) e 6,5 (no duodeno) de forma que uma enzima resistente a pH ácido pode ser favorável, visto que a maior parte da absorção de minerais e outros nutrientes se dá nas porções do duodeno e do jejuno no intestino delgado (ZHU *et al.*, 2014). A fitase 7227 de *T. pinophilus* demonstrou-se estável, quando incubada nos pHs de 3 a 7,0 por 60 min e 90 min, recuperando 96 % da sua atividade máxima ao ser submetida ao ensaio de atividade em pH 6,0. Enquanto os pHs 2,0 e 8,0 inativaram a enzima de forma irreversível, o que fortalece a possibilidade da fitase 7227 de *T. pinophilus* pertencer a família HAP do tipo PhyA.

3.6.2 – Efeito da temperatura na atividade enzimática e termostabilidade

A fitase recombinante de *T. pinophilus* foi mais ativa a 55°C. Esta temperatura ótima difere do valor encontrado por Ranjan *et al.*, 2016 para a fitase recombinante de *Sporotrichum thermophile* expressa em *P. pastoris*. A atividade relativa (%) da fitase sobre o fitato em função da temperatura do ensaio e da temperatura de incubação podem ser observados nos gráficos da Figura 6a. e 6b., respectivamente.

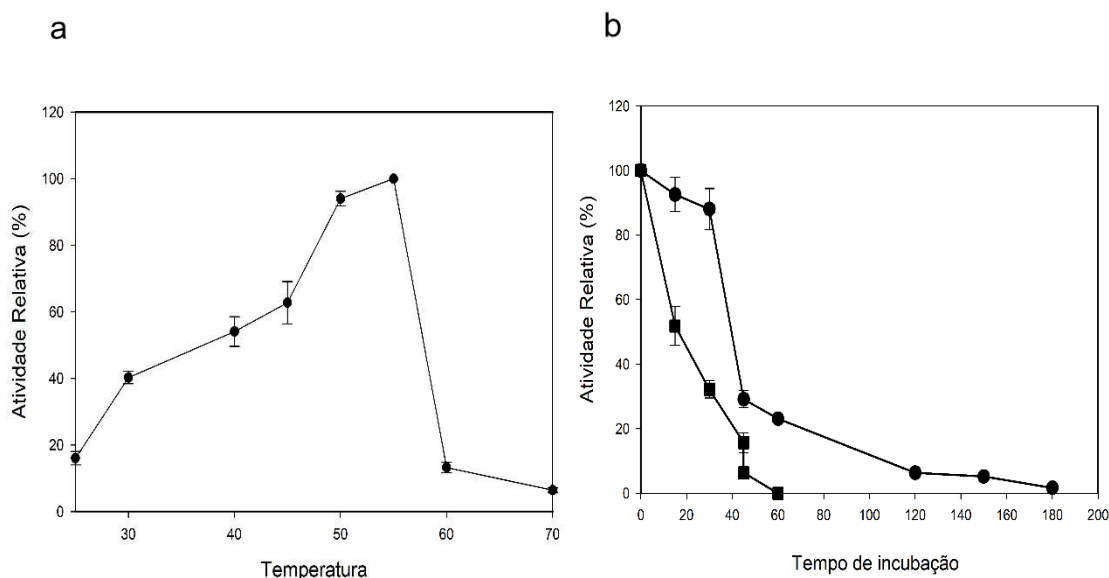


Figura 6: Atividade relativa (%) da fitase sobre o fitato de sódio em tampão acetato 100 mM pH 6,0 em função de: a) curva de temperatura de ensaio e; b) termostabilidade da fitase a (■) 60° C e (●) 50° C.

Assim como a estabilidade ao pH, a termoestabilidade é uma característica muito interessante do ponto de vista de aplicação industrial. Fitases mais termoestáveis podem resistir aos processamentos e condições de armazenamento a que são submetidas as rações na indústria. Os métodos de processamento das rações são processos rápidos, de cerca de 2 min, porém ocorrem em altas temperaturas (80 a 120° C) (USHASREE *et al.*, 2019). Sendo assim, a fitase r-Phy7227 seria desnaturada. Entretanto, pode ser amplamente utilizada em outros processos industriais, inclusive na produção de rações pré-processamento (MOSS *et al.*, 2017).

4 – Referências

- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 215, 403–410.
- Bradford Mm. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.
- Cereghino JI, Cregg Jm. 2000. Heterologous protein expression in themethylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology*. 24, 1, 45-66.
- Cregg, J. M., Vedvick, T. S., And Raschke, W. C. Recent Advances in the Expression of Foreign Genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology*. 11, 905-910.
- Fuhrmann, M.; Hausherr, A.; Ferbitz, L.; Schödl, T.; Heitzer, M.; Hegemann, P. 2004. Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene. *Plant Molecular Biology*. 55, 6, 869-81.
- Gasteiger, E.; Gattiker, A.; Hoogland, C.; Ivanyi, I.; Appel, R.D.; Bairoch, A. 2003. ExpASY: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis *Nucleic Acids Research*. 31, 3784-3788.
- Green, M.R. & Sambrook, J. 2012. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4th), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Kapust, R B.; Waugh D.S. 2000. "Controlled intracellular processing of fusion proteins by TEV protease". *Protein Expression and Purification*. 19, 2, 312–8.
- Katoh; Rozewicki; Yamada. 2017. Briefings in Bioinformatics, in press. Access the recommendation on F1000 MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.

- Lei, X.G.; Weaver, J.D.; Mullaney E.J.; Ullah A.H.; Azain, M.J. 2013. Phytase, a new life for an “old” enzyme. *Annual Review on Animal Biosciences*.1, 283-309.
- Nakamura, Y. 2007. Department of Plant Gene Research - Kazusa, NCBI-GenBank Flat File Release. 160.
- Ma, B.; Zhang, K.; Hendrie, C.; Liang, C.; Li M, Doherty-Kirby A, Lajoie G. 2003. PEAKS: powerful software for peptide *de novo* sequencing by tandem mass spectrometry. *Rapid Community Mass Spectrometry*. 17, 2337-2342.
- Meilhoc, E.; Masson, Jm.; Teissié, J. 1990. High efficiency transformation of intact yeast cells by electric field pulses. *Journal Biotechnology*. 8, 223–227.
- Moss, A. F., Chrystal, P. V., Truong, H. H., Liu, S. Y., & Selle, P. H. 2017. Effects of phytase inclusions in diets containing ground wheat or 12.5% whole wheat (pre- and post-pellet) and phytase and protease additions, individually and in combination, to diets containing 12.5% pre-pellet whole wheat on the performance of broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*. 234, 139–150.
- Niu, C.; Luo, H.; Shi, P.; Huang, H.; Wang, Y.; Yang, P.; Yao, B. 2015. N-Glycosylation improves the pepsin resistance of histidine acid phosphatase phytases by enhancing their stability at acidic pHs and reducing pepsin’s accessibility to its cleavage sites. *Applied and Environmental Microbiology*. 82, 1004–14.
- Oakley, B.R., Kirsch, D.R., Morris, N.R. 1980. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. 105, 2, 361-3.
- Puigbo, P.; Guzman, E.; Romeu, A.; And Garcia-Vallve, S. 2007. Optimizer: A web server for optimizing the codon usage of DNA sequences. *Nucleic Acids Research*. 35, W126-W131.
- Raboy, V. Myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. 2003. *Phytochemistry*. 64, 1033–1043.
- Ranjan, B., & Satyanarayana, T. 2016. Recombinant HAP Phytase of the Thermophilic Mold *Sporotrichum thermophile*: Expression of the Codon-Optimized Phytase Gene in *Pichia pastoris* and Applications. *Molecular Biotechnology*. 58, 2, 137–147.
- Shanmugam, G. 2018. Characteristics of Phytase Enzyme and its Role in Animal Nutrition. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 7, 3, 1006-1013.
- Singh, B.; Sharma, K.K.; Amit Kumari, A.; Anil Kumar, A.; Gakhar, S.K. 2018. Molecular modeling and docking of recombinant HAP-phytase of a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* reveals insights into molecular catalysis and

- biochemical properties. *International Journal of Biological Macromolecules*. 115, 501–508.
- Stothard, P. 2000. The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques*. 28, 1102-1104.
- Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen Jv, Mann M. 2006. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*. 1, 6, 2856-2860.
- Tan, H.; Wu, X.; Xie, L.; Huang, Z.; Gan, B.; Peng, W. 2015. Cloning, Overexpression, and Characterization of a Metagenome-Derived Phytase with Optimal Activity at Low pH *Journal Microbiology Biotechnology*. 25, 6, 930–935
- Ushasree, M. V.; Shyam, K., Vidya, J. & Pandey, A. 2017. Microbial phytase: Impact of advances in genetic engineering in revolutionizing its properties and applications. *Bioresource Technology*, 245, 1790–1799.
- Ushasree, M. V.; Jaiswal, A.K. Krishna, S.; Pandey, A. 2019. Thermostable phytase in feed and fuel industries. *Bioresource Technology*. 278, 400-407.
- Zhu, W.X.; Zhong, G.F.; Hua, X.M.; Ju, M.; Chen, X.M.; Du, Z.Y. 2016. The optimum active site of acidic phytase in the gastrointestinal tract of channel catfish (*Ictalurus punctatus*): in vitro and in vivo studies. *Aquaculture Nutrition*. 22, 881–889.

CONCLUSÕES GERAIS

- A análise em escala genômica permitiu identificar fungos potencialmente produtores de fitases. Este estudo resultou na distribuição das enzimas degradadoras de fitatos em diferentes grupos, mostrando as diferenças entre as famílias de fitase. Os resultados sugerem que, além das fitase HAP, alguns fungos selecionados poderiam secretar fitases β -hélice.
- A metodologia de superfície de resposta promoveu a otimização da produção da fitase do *T. pinophilus* com um aumento de 1,5x na atividade enzimática e 6,6x na atividade específica.
- O gene putativo da fitase *T. pinophilus* foi clonado e expresso em *P. pastoris* e a sua caracterização parcial mostra o potencial dessa enzima para aplicação biotecnológica.