

**ELIZABETH BÁRBARA EPALANGA PIRES**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE FITASES FÚNGICAS  
UTILIZANDO RESÍDOS AGROINDUSTRIAIS**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Tecnologia de  
Alimentos para obtenção do  
título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2016**

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

T

P667o  
2016 Pires, Elizabeth Bárbara Epalanga, 1985-  
Produção e caracterização parcial de fitases fúngicas  
utilizando resíduos agroindustriais / Elizabeth Bárbara  
Epalanga Pires. - Vicosa, MG, 2016.  
xv, 49f. : il. ; 29 cm.

Orientador : Monique Renon Eller.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Fitase. 2. Fitase para nutrição animal. 3. Fitase -  
Atividade enzimática. 4. Fósforo na nutrição animal.  
5. Suínos - Alimentação e rações. I. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos.  
Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos. II. Título.

CDD 22 ed. 572.7

**ELIZABETH BÁRBARA EPALANGA PIRES**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE FITASES FÚNGICAS  
UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciência e Tecnologia de  
Alimentos, para obtenção do  
título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de junho de 2016.

---

Luis Antônio Minim  
(Coorientador)

---

Valéria Monteze Guimarães  
(Coorientadora)

---

Rosângela de Freitas

---

Monique Renon Eller  
(Orientadora)

À Deus, o autor da vida.

A minha família em especial a minha mãe,  
Que cuidou de mim e fez de mim o que sou hoje.

**Dedico**

*“O Senhor é o meu Pastor, de nada terei falta”*

*Salmista Davi*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela presença em minha vida, por cuidar e guiar meus passos.

À minha mãe Ângela pela força e motivação durante toda caminhada e aos meus irmãos pelo carinho, admiração e confiança.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

À professora Monique Renon Eller pelo desafio e disponibilidade em me orientar, pelos ensinamentos, pela confiança, amizade, dedicação, apoio durante este processo e pela oportunidade de realização deste trabalho.

À professora Valéria Monteze Guimarães, pela grandiosa colaboração neste trabalho e por dividir seus conhecimentos e seu espaço contribuindo para o enriquecimento da pesquisa.

Ao professor Luís António Minin, pela colaboração e sugestões no desenvolvimento do trabalho.

Aos os professores que contribuíram para minha formação acadêmica.

À minha amiga Marlinda Jolomba que esteve ao meu lado dando forças, motivação, pelo companheirismo e amizade durante este processo.

A Mariana Bicalho, Rafaela e Liliam Silva Fialho por todo auxílio, atenção e pelos ensinamentos durante o desenvolvimento deste projeto.

À Maura Pinheiro, pelo carinho, atenção e disponibilidade nos momentos em que sempre precisei.

Ao Daniel Cometa, pela paciência e ajuda gentilmente oferecida quando precisei.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Processos Bioquímicos e fermentativos (LAPROBQI), pela amizade, colaboração e por estarem sempre prontos a ajudar. Agradeço em especial a Fernanda e ao Anderson, pela dedicação e eficiência durante a realização do projeto.

À empresa Agrocere, pelo apoio ao projeto e fornecimento da enzima comercial.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

**Meus sinceros agradecimentos**

## **BIOGRAFIA**

Elizabeth Bárabara Epalanga Pires, filha de Herculano Martinho Pires e de Ângela Kulembe, nasceu em Lobito-Angola, aos 22 de Março de 1985.

Em Dezembro de 2011 graduou-se em Medicina Veterinária, pela Universidade Agostinho Neto, Huambo-Angola.

Em Agosto de 2013 ingressou no curso de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais submetendo-se à defesa de dissertação no dia 28 de Junho de 2016.

## SUMÁRIO

Lista de figuras .....	viii
Lista de tabelas .....	xi
RESUMO .....	xii
ABSTRACT .....	xiv
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
CAPITULO I – REVISÃO DE LITERATURA.....	3
Panorama da produção de suínos no Brasil.....	3
O fósforo na alimentação animal .....	4
Fitases.....	8
Definição e histórico .....	8
Produção de fitases para uso industrial .....	10
Referências Bibliográficas .....	12
CAPITULO II – ARTIGO: “PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE FITASES FÚNGICAS UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS” .....	19
Resumo .....	19
Introdução .....	20
Material e Métodos.....	21
Seleção dos fungos produtores de fitases .....	21
Seleção do substrato .....	22

Caracterização dos extratos de fitase .....	24
Teste-padrão para determinação da atividade de fitases .....	25
Resultados e Discussão .....	26
Seleção do microrganismo produtor de fitase .....	26
Seleção de condições ideais para a produção de enzima .....	28
Caracterização dos extratos.....	35
Conclusões.....	42
Referências Bibliográficas .....	44
Conclusões Gerais .....	49

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1:

Figura 1.1 – Estrutura do fitato. ....	6
Figura 1.2 – Estrutura do ácido fítico formando complexos com íons metálicos, carboidratos e proteínas. ....	7
Figura 1.3 - Hidrólise do fitato pela ação da fitase, liberando fósforo e outros minerais, além do inositol.....	8

## Capítulo 2:

Figura 2.1 – Atividade de fitase nos extratos microbianos de AG: *Aspergillus glaucus*, AJ: *Aspergillus japonicus*, AT: *Aspergillus terreus*, AZA: *Acremonium zeae* A, AZB: *Acremonium zeae* B, AZC1: *Acremonium zeae* C1, PC: *Penicillium chrysogenum*, PE: *Penicillium expansum*, PC: *Penicillium citrinum*, DH: *Debaryomyces hansenii* e KM: *Kluyveromyces marxianus*. Os resultados correspondem à média de três repetições independentes. As barras correspondem aos desvios-padrão das médias..... 26

Figura 2.2 – Produção de fitases por *Acremonium zeae* B (à esquerda) e *Kluyveromyces marxianus* (à direita) cultivados em meios contendo farelo de arroz (FA), farelo de milho (FM), farelo de trigo (FT) ou farelo de soja (FS). A. zeae foi cultivado em meio semi-sólido contendo 20% (m/v) e K. marxianus em meio líquido contendo 1,0% (m/v) de cada substrato. Os resultados correspondem à média de três repetições independentes. As barras correspondem aos desvios-padrão das médias. .... 28

Figura 2.3 – Produção da fitase ao longo do tempo de incubação pelo fungo *Acremonium zeae* B (à esquerda) e pela levedura *Kluyveromyces marxianus* (à direita) via fermentação em estado sólido e fermentação submersa, respectivamente. Os resultados correspondem à média de três repetições independentes. As barras correspondem aos desvios-padrão das médias..... 31

Figura 2.4 – Produção de fitase pelo fungo *Acremonium zeae* B via fermentação em estado sólido em diferentes condições de temperatura, pH e concentração do substrato. Os resultados correspondem à média de três repetições independentes. As barras correspondem aos desvios-padrão das médias. .... 33

Figura 2.5 – Produção de fitase pela levedura *Kluyveromyces marxianus* via fermentação submersa em diferentes condições de temperatura, concentração do

substrato e pH. Os resultados correspondem à média de três repetições independentes. As barras correspondem aos desvios-padrão das médias..... 34

Figura 2.6 – Atividade de fitase nos extratos do fungo *Acremonium zeae* B em diferentes temperaturas (à esquerda) e valores de pH (à direita). Os resultados correspondem à média de três repetições independentes. As barras correspondem aos desvios-padrão das médias. .... 35

Figura 2.7 – Atividade de fitase nos extratos da levedura *Kluyveromyces marxianus* em diferentes temperaturas (à esquerda) e valores de pH (à direita). Os resultados correspondem à média de três repetições independentes. As barras correspondem aos desvios-padrão das médias. .... 36

Figura 2.8 – Termoestabilidade a 80 e 90 °C nos extratos de *Acremonium zeae* B (à direita) e da levedura *Kluyveromyces marxianus* a 80 °C (à esquerda). Os resultados correspondem à média de três repetições independentes. As barras correspondem aos desvios-padrão das médias. Dados expressos em termos de atividade residual consideram o valor de atividade do extrato no tempo zero de incubação como 100%.....38

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 2:

Tabela 2.1 – Efeito de íons na atividade de fitases no extrato de <i>Acremonium zeae</i> B e <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	40
---	----

## RESUMO

Pires, Elizabeth Bárbara Epalanga, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2016. **Produção e caracterização parcial de fitases fúngicas utilizando resíduos agroindustriais.** Orientadora: Monique Renon Eller. Coorientadores: Valéria Monteze Guimarães e Luis Antônio Minim.

O fitato é a principal forma de armazenamento de fósforo em plantas e cereais usados na formulação de rações e limita a eficiência de utilização do fósforo e outros nutrientes nesses alimentos. Fitases hidrolisam o fitato para obtenção de fósforo inorgânico e a redução dos custos de produção dessa enzima poderia desonerar o sistema de criação de suínos. Portanto, neste trabalho fitases foram produzidas utilizando resíduos agroindustriais e os extratos fúngicos foram caracterizados visando o uso em rações para suínos. O fungo filamentosso *Acremonium zeae*B (AZB) e a levedura *Kluyveromyces marxianus* (KM) apresentaram alta produtividade de fitases quando cultivados em farelo de milho e arroz, respectivamente. O fungo, cultivado via fermentação em estado sólido, produziu as maiores atividades de fitase em 5 dias com 20% (m/v) do substrato em pH 4,0 e 28 °C. O extrato produzido a partir dele apresentou atividades máximas de fitase a 50 °C e pH 7,5, além de elevada estabilidade térmica. Isso indica que o extrato de AZB é promissor para aplicação em rações, embora tenha sido sensível a diversos íons. A produtividade apresentada pela levedura KM em meio líquido foi 337 vezes maior em relação à apresentada pelo fungo, tendo a produção máxima de fitase em 48 h de produção com 2% (m/v) de substrato em pH 4,0 a 25-30°C. O extrato produzido apresentou máxima atividade de fitase a 60 e 80 °C, indicando a possibilidade da presença de pelo menos duas enzimas. O fato de o extrato ter alta estabilidade a pH ácido, com máxima atividade em pH 4,0, e manter pelo menos 40% de sua atividade após 5 minutos a 80 °C, indica

que ele pode ser ainda mais interessante para a aplicação desejada, uma vez que seria capaz de manter a atividade no estômago dos animais, ao contrário do extrato produzido por AZB. Além disso, a atividade no extrato foi amplamente estimulada na presença de diversos íons. A alta produtividade alcançada utilizando resíduos agroindustriais, aliada à estabilidade dos extratos produzidos, indicam o potencial de produção de enzimas por estes microrganismos visando aplicações industriais. Para viabilização de seu uso, os extratos deverão ser utilizados na produção de ração e fornecidos a suínos, confirmando dessa forma o emprego dessas enzimas, a baixo custo de produção, na criação animal.

## ABSTRACT

PIRES, Elizabeth Bárbara Epalanga, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June 2016. **Production and partial characterization of fungal phytases using agro-industrial waste.** Adviser: Monique Renon Eller. Coadvisers: Valéria Monteze Guimarães and Luis Antonio Minim.

Phytate is the main form for storage of phosphorus in plants and grains used for feed formulation and limits the utilization of phosphorus and other nutrients in these foods. Phytases hydrolyze phytate to obtain inorganic phosphorus and to reduce the costs of enzyme production is primordial for the sector. Therefore, in this work, phytases were produced using agricultural waste and fungal extracts generated were characterized for their use in feed. The filamentous fungus *Acremonium zeae* B (AZB) and the yeast *Kluyveromyces marxianus* (KM) showed high productivity of phytases when grown in residues of corn and rice, respectively. The fungus has produced, via solid-state fermentation, the highest phytase activity on day 5 with 20% (w/v) of substrate at pH 4.0 and 28 °C. The extract produced from it had maximal activities of phytase and at 50 °C and pH7.5, and high thermal stability. This indicates that the AZB extract is promising for use in animal feed, although it is sensitive to many ions. The productivity presented by yeast KM in liquid medium was 337 times higher than that shown by the fungus, and the maximum production of phytase was in 48 h with 2% (w/v) substrate at pH 4.0 and 25-30 °C. The extract showed maximum phytase activity at 60 and 80 °C, indicating the possible presence of two enzymes. The extract have high stability at acidic pH, with maximum activity at pH 4.0, and maintain at least 40% of its activity after 5 minutes at 80 °C. This indicates that the extract produced by KM can be even more interesting for the desired application instead of the extract produced by AZB, since KMK extract would be able to maintain activity in the stomach of animal.

Furthermore, the phytase activity in the KM extract was largely stimulated in the presence of various ions. The high productivity achieved using agroindustrial waste, combined with the stability of the extracts indicate the potential for production of enzymes by these microorganisms targeting industrial applications. For enabling its use, extracts should be added to feed and used to feed pigs, thus proving the use of these enzymes, at low production costs, for animal husbandry.

## **INTRODUÇÃO GERAL**

O fósforo é um dos elementos essenciais ao metabolismo animal e, apesar de estar presente em abundância na estrutura de vegetais como soja, milho, trigo e arroz, componentes principais na formulação da ração, precisa ser suplementado nas rações fornecidas a suínos. Isso ocorre porque nessas estruturas o fósforo é encontrado principalmente na forma de ácido fítico e não é absorvido pelos animais monogástricos, pois estes não sintetizam ou produzem apenas em pequena quantidade a enzima fitase, responsável pela hidrólise dessa molécula (SUHAIRIN et al., 2010). A suplementação da ração com fosfatos inorgânicos visa suprir quantidades essenciais de fósforo mineral requeridas pelo animal, mas aumenta o custo da produção animal e ainda eleva a quantidade de fósforo nas fezes desses animais, tornando necessário um tratamento adicional antes da disposição final. Além disso, o fitato constitui um fator antinutricional nas rações, pois complexa a proteínas e minerais, diminuindo sua biodisponibilidade.

Fitases hidrolisam o ácido fítico a fosfatos de mio-inositol e fosfatos inorgânicos e o uso desta enzima na ração tem sido uma alternativa para o aumento da eficiência da produção de suínos (BALA et al., 2014). A sua aplicação reduz os efeitos antinutricionais causados pelo fitato, melhorando a digestão e absorção de fósforo, proteínas e minerais pelo animal (SINGH; SATYANARAYANA, 2011) e diminuindo a concentração de fósforo nas fezes. Entretanto, no Brasil não existem fornecedores nacionais de fitase, o que obriga as indústrias de insumos para animais utilizarem fitases importadas. Isso

aumenta os custos de produção da carne suína, diminuindo a competitividade dos criadores frente ao mercado interno e externo.

Fitases podem ser extraídas de plantas, animais e microrganismos, sendo estes últimos as principais fontes de fitases comerciais. A produção de fitases microbianas apresenta alto rendimento e facilidade de aplicação em larga escala (KIM,2006). Entretanto, a produção industrial é frequentemente limitada devido ao preço elevado da produção das enzimas, diretamente afetado pelo alto custo dos substratos utilizados como meio de cultivo dos microrganismos, que respondem por 30 % a 40 % do custo dessas enzimas. Portanto, a substituição dos meios tradicionais por substratos alternativos é de grande importância para viabilizar a produção da enzima em larga-escala (NASCIMENTO et al., 2007). A disponibilização dessas enzimas aos produtores brasileiros diminuiria o custo desse aditivo e, conseqüentemente, da produção de carne suína no País.

Assim, este trabalho objetivou a obtenção de fitases utilizando resíduos agroindustriais e a caracterização dessas enzimas visando o seu emprego na indústria de ração para suínos. No primeiro capítulo deste documento foi contextualizado para o leitor, o estado-da-arte relacionado à produção de suínos em nível mundial e nacional, focando nas questões relativas à composição de rações e os problemas ocasionados pela presença do fitato nestes alimentos. O texto aborda, ainda, a produção, atividade e aplicações de fitases. O segundo capítulo consiste em um artigo de pesquisa que descreve a obtenção de fitases utilizando resíduos agroindustriais e a caracterização dos extratos obtidos.

## **CAPITULO I – REVISÃO DE LITERATURA**

### **Panorama da produção de suínos no Brasil**

A carne suína é a mais produzida no mundo e o Brasil é o 4º maior produtor, contribuindo com 12,4% do mercado internacional (OECD-FAO, 2015). A produção de carne suína no País cresceu em torno de 4,95% em 2015, somando 3,6 milhões de toneladas, um aumento ainda mais expressivo que em 2014, quando foi de 3,42%. Naquele mesmo ano o consumo interno dessa carne aumentou cerca de 2,5% (ABPA, 2015). Em 2016 uma baixa na produção tem sido observada, devido ao aumento dos custos de insumos, principalmente o milho, o que pode afetar a capacidade competitiva do setor (ABCS, 2016).

Os custos de produção de suínos no Brasil são altos e a alimentação corresponde a 65% desse custo, podendo chegar a até 75% (NASCIMENTO et al., 2007). O adequado planejamento da atividade é um fator primordial para sua manutenção e geração de lucro. Isso envolve a busca por ingredientes que apresentem alta digestibilidade e disponibilidade de nutrientes a preços que viabilizem a produção (EMBRAPA, 2003; ABCS, 2011). Novas tecnologias de produção têm sido desenvolvidas, visando atender as exigências nutricionais dos animais, promovendo a melhoria do desempenho e, conseqüentemente, da qualidade da carne, reduzindo os custos de produção e diminuindo a quantidade e melhorando qualidade dos resíduos gerados.

## **O fósforo na alimentação animal**

O fósforo é um mineral essencial para os sistemas biológicos e é encontrado na natureza principalmente na forma de fosfato (KRYGIER et al., 2015). Este elemento constitui a principal fonte de compostos do metabolismo energético de microrganismos, plantas e animais, tais como o ATP, participando em processos fisiológicos e formação estrutural de moléculas, membranas e tecidos celulares (TAYYAB, MCLEAN, 2015).

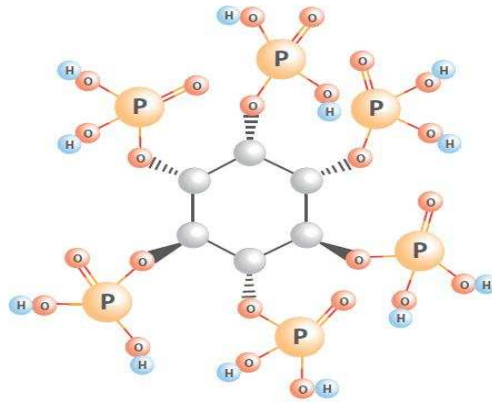
O fósforo é essencial para o crescimento animal e sua deficiência pode afetar negativamente o desempenho da produção (FERRIS et al., 2010; PUGGAARD et al., 2014). A obtenção deste por humanos e animais se dá pela ingestão diária desse composto na dieta (RODEHUTSCORD, 2008), sendo o excesso não absorvido excretado nas fezes (CHERYAN, 1980).

O fósforo inorgânico é um mineral essencial ao cultivo de grãos e outros vegetais, sendo portanto indispensável para a agricultura como fertilizante (LOTT et al., 2011). Entretanto, a reserva desse mineral no solo é limitada. Cientistas preveem que no prazo de sessenta a cem anos haverá uma diminuição das reservas atuais de fósforo inorgânico caso seja mantido o ritmo atual de exploração desse composto (KIM et al., 2006). Devido a isto, muitas vezes, resíduos ricos em fósforo são usados como fertilizantes na agricultura, mas o excesso desse componente no solo pode resultar em graves consequências para o meio ambiente, especialmente pela eutrofização de sistemas aquáticos (VATS; BANERJEE, 2004). Esses problemas têm motivado a busca por tecnologias que favoreçam a obtenção deste mineral de forma a não limitar sua presença no solo e, ao mesmo tempo, manter uma produção

animal sustentável de forma a garantir a segurança alimentar e ambiental. Para isso, busca-se por alimentos em que este componente esteja biodisponível e não seja excretado em grandes quantidades.

As rações para monogástricos são formuladas a partir de sementes de leguminosas e cereais, principalmente milho e farelo de soja, os quais representam cerca de 90% da dieta, contribuindo substancialmente para suprir as necessidades de energia, proteínas, minerais e vitaminas. Estas sementes possuem grande parte do fósforo na forma de fitato, ou ácido fítico, molécula acumulada durante o amadurecimento dos vegetais (COWIESON; WILCOCK; BEDFORD, 2011; SELLE; RAVINDRAN, 2008). O fitato pode ser armazenado na camada aleurona (trigo, cevada, arroz) ou no gérmen (milho) da semente e representa entre 60 e 80% do conteúdo total de fósforo em cereais, leguminosas, nozes e sementes oleaginosas (MONTEIRO, 2011; RABOY, 2009). A proporção de fósforo disponível no farelo de soja varia entre 23 a 31%, enquanto no milho varia de 12 a 14% (SELLE; RAVINDRAN, 2008).

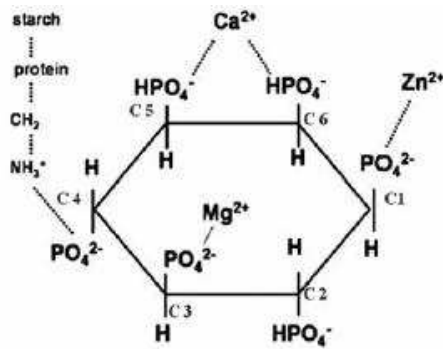
O fitato ( $C_6 H_{18} O_{24} P_6$ ), ou mio-inositol (1, 2, 3, 4, 5,6) hexaquisfosfato possui na sua estrutura seis grupos fosfato ligados a um álcool ciclohexanopoliol, o inositol (Figura 1.1) (KUMAR et al., 2010). Nessa molécula, ele se complexa com potássio, magnésio e cálcio e também a proteínas e amido (SELLE; RAVINDRAN, 2008).



Fonte: avNEWS, 2014.

Figura 1. 1– Estrutura do fitato.

As sementes também acumulam nutrientes e minerais que são utilizados pelas plantas em crescimento (RABOY, 2009). O fitato complexa-se a cátions metálicos bivalentes como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{2+}$  ou a  $\text{K}^+$  (ROOHANI et al., 2012) formando complexos que precipitam no duodeno, o que diminui a absorção destes minerais pelo animal (JONGBLOED et al., 1993). A presença do fitato também interfere na digestão de proteínas (DIAS; RAMOS; SOUSA, 2012; ESCOBIN-MOPERA et al., 2012)(Figura 1.2) de forma pH-dependente, uma vez que a interação entre essas compostas possui natureza iônica. Esse aspecto é considerado importante durante a formulação da ração devido a mudanças do pH ao longo do trato gastrointestinal dos animais (COUSINS, 1999). O fitato pode ainda se ligar ao amido diretamente via interações de hidrogênio, ou indiretamente associado a outras moléculas (THOMPSON; YOON, 1984).



Fonte: (JOSHI; SATYANARAYANA, 2015)

Figura 1. 2– Estrutura do ácido fíticoformando complexos com íons metálicos, carboidratos e proteínas.

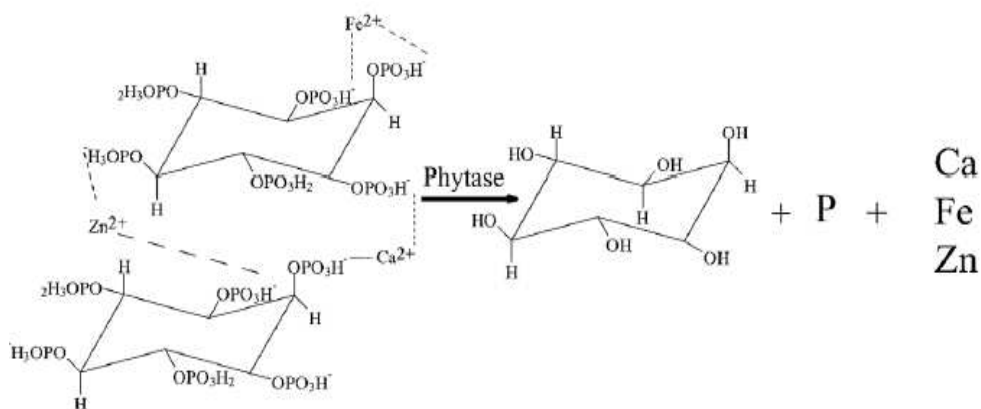
O efeito antinutricional do ácido fítico também gera graves consequências para a alimentação humana (NUOBARIENE et al., 2011), especialmente em populações onde trigo, milho e arroz são as principais fontes de nutrientes (BOHN; MEYER; RASMUSSEN, 2008a), levando a deficiências principalmente de cálcio, ferro e zinco (MANARY et al., 2002).

Na alimentação de animais monogástricos, como os suínos e aves, a presença do fósforo na forma de fitato nos componentes da ração torna necessária a suplementação com fósforo inorgânico na dieta para manutenção dos níveis adequados desse nutriente. Considerando que a alimentação representa mais de 70% do custo total de produção de suínos, este processo resulta em um aumento do preço da carne, além de elevar também a quantidade de fósforo excretado pelos animais, exigindo tratamentos adicionais dos resíduos gerados. Uma das soluções encontradas pelos produtores tem sido o uso de fitases nas rações, as quais hidrolisam o fitato e disponibilizam o fósforo e outros nutrientes aos animais.

## Fitases

### Definição e histórico

Fitases, ou mio-inositol hexaquisfosfato fosfohidrolases (EC 3.1.3), são hidrolases capazes de degradar o ácido fítico (GONTIA-MISHRA; TIWARI, 2013; JOSHI; SATYANARAYANA, 2015; TRAN et al., 2011). As fitases catalisam uma série de reações graduais de desfosforilação do ácido fítico resultando na formação de isômeros mio-inositolpentaquis-, tetraquis-, tris-, bis- e monofosfato (IP5, IP4, IP3, IP2, IP1), bem como na liberação de fósforo inorgânico e minerais complexados (BOHN; MEYER; RASMUSSEN, 2008b; SELLE; RAVINDRAN, 2008) (Figura 3).



Fonte: (LEI; PORRES, 2003).

*Figura 1.3 – Hidrólise do fitato pela ação da fitase liberando fósforo, minerais e inositol.*

Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) e a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), as fitases podem ser classificadas em duas classes:

- 3 fitases (EC 3.1.3.8), ou mio-inositol hexaquisfosfato-3-fosfohidrolases, as quais iniciam a hidrólise na posição C<sub>3</sub> do anel de mio-

inositolhexaquisfosfato. Estas representam o maior grupo de fitases geralmente encontradas em fungos e bactérias.

- b) 6 fitases (EC 3.1.3.26), ou mio-inositol hexaquisfosfato-6-fosfohidrolases, as quais liberam preferencialmente o fósforo na posição C<sub>6</sub>, (SELLE; RAVINDRAN, 2008).

Os primeiros estudos envolvendo fitases datam de 1962, mas apenas em 1991 uma fitase, originalmente obtida de *Aspergillus niger*, foi comercialmente introduzida no mercado (CONTE et al., 2002). Essa inserção se deu principalmente devido à aprovação, nos Países Baixos, de uma legislação que objetivava controlar a poluição por fosfatos em unidades de criação de suínos e aves, o que amplificou o desenvolvimento e aceitação dessa nova tecnologia devido ao reconhecimento pelos produtores dos perigos associados à eutrofização (LOTT et al., 2011)

A disseminação do uso das fitases na alimentação animal se deu principalmente, após a proibição da adição das farinhas de carne e ossos de animais na criação de monogástricos. Essas farinhas, proibidas pela UE em 2000, forneciam 57% do fósforo adicionado às rações. Essa proibição teoricamente gerou uma demanda de 110 mil toneladas de fósforo, mas a utilização das fitases microbianas reduziu essa demanda para 26 mil toneladas (SELLE; RAVINDRAN, 2008). Desde então, diversas pesquisas têm demonstrado que o uso de fitases é de fato efetivo no aumento da digestibilidade de fósforo e minerais e reduz a presença do fitato em rações utilizadas na criação de animais monogástricos, como suínos (GUGGENBUHL;

SIMÕES NUNES, 2007), aves (LIU et al., 2015) e peixes (DANWITZ et al., 2016).

A consistência e eficácia no uso de fitases em rações estão associadas às características estruturais e químicas das enzimas utilizadas e de suas condições ideais de atividade. O conhecimento dessas condições é de fundamental importância para as aplicações industriais e biotecnológicas dessas enzimas, para que não haja o comprometimento do efeito da fitase na dieta (ADEOLA; SANDS, 2003). Os principais fatores a serem considerados para a atividade dessas enzimas são as faixas de pH e temperatura nas quais atuam, atuação de possíveis inibidores, resistência a proteases (CHEN et al., 2015), origem do microrganismo e as condições de processamento às quais serão submetidas, como tempo, temperatura, umidade (BOHN; MEYER; RASMUSSEN, 2008b; COWIESON; WILCOCK; BEDFORD, 2011). Dessa forma, para que essas enzimas sejam efetivas, precisam manter a atividade após serem submetidas ao processo de peletização da ração (80 °C / 2 min) para que possam agir na hidrólise do fitato no trato gastrointestinal dos animais quando ingeridas.

#### *Produção de fitases para uso industrial*

As fitases podem ser produzidas a partir de plantas, normalmente cereais (PULSEN et al., 2007; TU et al., 2011), animais (CHI-WEI LAN; CHANG; WU, 2014) ou microrganismos (PRASAD et al., 2015). Os microrganismos representam a maior fonte de fitases comerciais e as enzimas são normalmente secretadas em resposta ao fosfato presente no substrato (GONTIA-MISHRA; TIWARI, 2013). A obtenção dessas enzimas, a partir de

fontes microbianas, apresenta vantagens como um alto rendimento e facilidade de aplicação em larga escala, o que torna os microrganismos fontes ideais para obtenção dessas enzimas para uso na indústria (KIM, 2006).

A produção de fitases já foi descrita em *Bacillus subtilis* (CHEN et al., 2015), *Lactobacillus casei* (GARCÍA-MANTRANA et al., 2016) *Penicillium purpurogenum* (AWAD et al., 2014) *Aspergillus niger* (BHAVSAR et al., 2013), *Rhizopus oligosporus* (CASEY; WALSH, 2004), *Kluyveromyces lactis* (USHASREE; VIDYA; PANDEY, 2014) e *Saccharomyces cerevisiae* (CAPUTO; VISCONTI; DE ANGELIS, 2015), dentre outros.

A produção industrial de enzimas é frequentemente limitada pelo preço elevado dos substratos utilizados como meios para o cultivo dos microrganismos. A substituição dos meios tradicionais por substratos alternativos e renováveis é de grande importância para viabilizar a produção de enzimas em larga-escala (NASCIMENTO et al., 2007). Os substratos mais estudados atualmente são os resíduos agroindustriais derivados de grãos de cereais, como os farelos e palhas. Estes formam uma matriz complexa para processos de fermentação no estado sólido, semi-sólido ou submersa e contêm considerável teor de ácido fítico, apresentando assim potencial indutor para a produção de fitases (SPIER et al., 2010).

A fermentação submersa tem sido usada principalmente para produzir fitases bacterianas (MITTAL et al., 2012) e de leveduras(USHASREE; VIDYA; PANDEY, 2014), mas já foi usada para produção por fungos (BHAVSAR et al., 2013). Entretanto, a fermentação em estado sólido constitui a principal opção de processo, pois possui vantagens para a produção de enzimas e outras

moléculas (QVIRIST; CARLSSON; ANDLID, 2015). Na fermentação em estado sólido as enzimas são produzidas diretamente sobre um substrato sólido, como cereais ou derivados, e permite ao fungo produzir um complexo natural de enzimas específico para os diferentes substratos utilizados no processo (GUNASHREE; VENKATESWARAN, 2008). Além disso, os custos associados a recuperação da enzima são menores quando comparados aos de fermentação submersa (BOGAR et al., 2003), o que aumenta as perspectivas de aplicação para produção de biomoléculas em países com abundância de resíduos agroindustriais, visto que estes podem ser utilizados como matérias-primas de baixo custo (PANDEY et al., 2001).

Dessa forma, a combinação das características de baixo custo de produção e alta estabilidade da fitase constitui uma estratégia essencial para aumentar a competitividade do setor produtivo no País, o que justifica os maciços investimentos em pesquisa na busca por novos microrganismos e tecnologias de produção que otimizem a produção dessas enzimas. A posse desses componentes e conhecimentos ajudará o País a superar os obstáculos de sua economia e a manter a estabilidade econômica no setor, o que refletirá em menores preços e maior acessibilidade para o consumidor final.

### **Referências Bibliográficas**

ABCS. **Associação Brasileira de criadores de Suínos**. 2016. Disponível em: <[http://www.abcs.org.br/informativo-abcs/2198-milho-abcs-busca-nova-reuniao](http://www.abcs.org.br/informativo-abcs/2198-milho-abcs-busca-nova-reuniao-com-mapa)com-mapa- >. Acesso em 17/06/2016.

ABCS. **Associação Brasileira de Criadores Suínos**.2011. Disponível em: <<http://www.beefpoint.com.br/cadeia-produtiva/giro-do-boi/potencialidade-do-brasil-como-produtor-de-carne-suina-73989/>>. Acesso em 12/05/2016.

ABPA.**Associação Brasileira de Proteína Animal**. 2015. Disponível em: <<http://iepec.com/producao-de-carne-suina-no-brasil-cresce-49-em-2015-e-consumo-tambem-aumenta/>>. Acesso em 12/05/2016.

ADEOLA, O.; SANDS, J.S. Does supplemental dietary microbial phytase improve amino acid utilization? A perspective that it does not. **Journal of Animal Science**, v.81, p.78–85, 2003.

ALVES, N. M. et al. Production and Partial Characterization of an Extracellular Phytase Produced by *Mucodora* sp . under Submerged Fermentation. n. January, p. 23–32, 2016.

AVNEWS. **Avicultura** informação .Disponível em: <<http://avicultura.info/degradacion-eficaz-del-fitato-una-innovadora-aplicacion-para-una-nueva-fitasa-2/>>. Acessado em: 27/04/2016.

AWAD, G. E. A et al. Optimization of phytase production by *Penicillium purpurogenum* GE1 under solid state fermentation by using Box-Behnken design. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 1, p. 81–88, 2014.

BALA, A. et al. Production of an extracellular phytase from a thermophilic mould *Humicola nigrescens* in solid state fermentation and its application in dephytinization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2014.

BEDFORD, M. R. Mechanism of action and potential environmental benefits from the use of feed enzymes. *Animal Feed Science and Technology*, v. 53, n. 2, p. 145–155, jun. 1995.

BHAVSAR, K. et al. Phytase isozymes from *Aspergillus niger* NCIM 563 under solid state fermentation: Biochemical characterization and their correlation with submerged phytases. **Process Biochemistry**, 2013.

BISCHOFF, K. M. et al. Extracellular hemicellulolytic enzymes from the maize endophyte *Acremonium zeae*. **Current Microbiology**, v. 58, n. 5, p. 499–503, 2009.

BOGAR, B. et al. Optimization of phytase production by solid substrate

fermentation. **Journal of industrial microbiology and biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 183–9, 2003.

BOHN, L.; MEYER, A. S.; RASMUSSEN, S. K. Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 9, n. 3, p. 165–91, mar. 2008.

BOYCE, A.; WALSH, G. Purification and characterisation of an acid phosphatase with phytase activity from *Mucor hiemalis* Wehmer. **Journal of Biotechnology**, v. 132, n. 1, p. 82–87, 2007.

CAPUTO, L.; VISCONTI, A.; DE ANGELIS, M. Selection and use of a *Saccharomyces cerevisiae* strain to reduce phytate content of wholemeal flour during bread-making or under simulated gastrointestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 400–407, 2015.

CASEY, A.; WALSH, G. Identification and characterization of a phytase of potential commercial interest. **Journal of Biotechnology**, v. 110, n. 3, p. 313–322, 2004.

CHEN, W. et al. Enhanced activity of an alkaline phytase from *Bacillus subtilis* 168 in acidic and neutral environments by directed evolution. **Biochemical Engineering Journal**, 2015.

CHERYAN, M. Phytic acid interactions in food systems. *Critical Reviews in Food Science*, v. 13, p. 297–336. 1980.

CHI-WEI LAN, J.; CHANG, C.-K.; WU, H.-S. Efficient production of mutant phytase (phyA-7) derived from *Selenomonas ruminantium* using recombinant *Escherichia coli* in pilot scale. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 118, n. 3, p. 305–10, set. 2014.

COWIESON, A. J.; WILCOCK, P.; BEDFORD, M. R. Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics. **World's Poultry Science Journal**, v. 67, n. 02, p. 225–236, 20 jun. 2011.

DANWITZ, A. VON et al. Dietary phytase supplementation in rapeseed protein based diets in fl uences growth performance , digestibility and nutrient utilisation in turbot ( *Psetta maxima* L .). **Aquaculture**, v. 450, p. 405–411, 2016.

DE ALMEIDA, M. N. et al. Cellulases and hemicellulases from endophytic *acremonium* species and its application on sugarcane bagasse hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, n. 2, p. 594–610, 2011.

DIAS, G.; RAMOS, M.; SOUSA, G. F. DE. Stability of the phytase from *Aspergillus niger* 11T53A9 to storage and its application in the hydrolysis of

phytic acid in sorghum flour. **Revista Brasileira de Agrociências**, v. 18, n. 2-4, p. 95–106, 2012.

EMBRAPA (2003). Empresa brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em:

[https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Suinos/SPSuinos\\_nutricao.html](https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Suinos/SPSuinos_nutricao.html). Acessado em: 12/05/2016.

ESCOBIN-MOPERA, L. et al. Purification and characterization of phytase from *Klebsiella pneumoniae* 9-3B. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 113, n. 5, p. 562–7, maio 2012.

ESPOSITO-POLESI, N. P. Microrganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 4, p. 533–541, 2011.

GAIND, S.; SINGH, S. International Biodeterioration & Biodegradation Production, purification and characterization of neutral phytase from thermotolerant *Aspergillus flavus* ITCC 6720. v. 99, 2015.

Ferris, C. P., Patterson, D. C., McCoy, M. A., Kilpatrick, D. J. Effect of offering dairy cows diets differing in phosphorus concentration over four successive lactations: 1. Food intake, milk production, tissue changes and blood metabolites. *Animal*. 4:4, p.545–559, 2010

GARCÍA-MANTRANA, I. et al. Expression of bifidobacterial phytases in *Lactobacillus casei* and their application in a food model of whole-grain sourdough bread. **International Journal of Food Microbiology**, v. 216, p. 18–24, 2016.

GONTIA-MISHRA, I.; TIWARI, S. Molecular characterization and comparative phylogenetic analysis of phytases from fungi with their prospective applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 51, n. 3, p. 313–326, 2013.

GUGGENBUHL, P.; SIMÕES NUNES, C. Effects of two phytases on the ileal apparent digestibility of minerals and amino acids in ileo-rectal anastomosed pigs fed on a maize–rapeseed meal diet. **Livestock Science**, v. 109, n. 1-3, p. 261–263, 2007.

GUNASHREE, B. S.; VENKATESWARAN, G. Effect of different cultural conditions for phytase production by *Aspergillus niger* CFR 335 in submerged and solid-state fermentations. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 35, n. 12, p. 1587–96, dez. 2008.

GUPTA, R. K.; GANGOLIYA, S. S.; SINGH, N. K. Screening and characterization of wheat germplasms for phytic acid and iron content. **Journal**

**of Agricultural Science and Technology**, 2015.

JOSHI, S.; SATYANARAYANA, T. Heterologous expression of yeast and fungal phytases: Developments and future perspectives. v. 14, n. July, p. 293–311, 2015.

KIM, T.; MULLANEY, E. J.; PORRES, J. M. Shifting the pH profile of *Aspergillus niger* phy A phytase to match the stomach pH enhances its effectiveness as an animal feed additive. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 4397–4403, 2006.

KRYGIER, S. et al. Safety evaluation of phytase 50104 enzyme preparation (also known as VR003), expressed in *Pseudomonas fluorescens*, intended for increasing digestibility of phytate in monogastrics. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 70, n. 2, p. 545–554, 2015.

KUMAR, V. et al. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. **Food Chemistry**, v. 120, n. 4, p. 945–959, jun. 2010.

LANE, M. M.; MORRISSEY, J. P. *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. **Fungal Biology Reviews**, v. 24, n. 1-2, p. 17–26, 2010.

LEMES, A. C.; ÁLVARES, G. T.; KALIL, S. J. Extração de B-galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 por método ultrassônico. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 2, p. 7–13, 2013.

LIU, S. Y. et al. 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**, v. 207, p. 159–167, 2015.

LOTT, J. N. A. et al. The critical role of phosphorus in world production of cereal grains and legume seeds. **Food Security**, v. 3, n. 4, p. 451–462, 2011.

MARLIDA, Y. et al. Isolation, characterization and production of phytase from endophytic fungus its application for feed. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 9, n. 5, p. 471–474, 2010.

MELOROSE, J.; PERROY, R.; CAREAS, S. No Title No Title. **Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015**, v. 1, 2015.

MITTAL, A., SINGH, G., GOYAL, V., YADAV, A., AGGARWAL, N. K. Production of phytase by acidophilic strain of *Klebsiella* sp. DB-3FJ711774.1 using orange peel flour under submerged fermentation, Innovative Rom. **Food Biotechnol.** V10, p. 18-27, 2012.

MONTEIRO, P. S. Produção e caracterização bioquímica de fitases

deRhizopus stolonifer e Aspergillus niger UFV-1 e suas aplicações em ração animal. Dissertação de Mestrado em Bioquímica Agrícola. Universidade Federal de Viçosa. 2011.

NASCIMENTO, W. C. A. & SILVA, C. R. Otimização de um meio de cultura de produção de proteases por um *Bacillus sp.* **Ciência e tecnologia de alimentos**. v. 27, 2007.

NASCIMENTO, J.C.S. Produção, caracterização bioquímica e purificação de fitase produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924. Dissertação de Mestrado em Biociência Animal. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 115p. 2011.

NUOBARIENE, L. et al. Phytase-active yeasts from grain-based food and beer. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 6, p. 1370–1380, 2011.

PANDEY, A. et al. Production, purification and properties of microbial phytases. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 3, p. 203–214, 2001.

**PUGGAARD, L., LUND, P., LIESEGANG, A., SEHESTED, J. LONG TERM EFFECT OF REDUCED DIETARY PHOSPHORUS ON FEED INTAKE AND MILK YIELD IN DRY AND LACTATING DAIRY COWS. LIVESTOCK SCIENCE.V. 159, P, 18-28, 2014.**

**PRASAD, C.S., MANDAL, A.B., GOWDA, N.K.S., SHARMA, K., PATTANAIK, A.K., TYAGI, P.K., ELANGOVA, A.V. ENHANCING PHOSPHORUS UTILIZATION FOR BETTER ANIMAL PRODUCTION AND ENVIRONMENT SUSTAINABILITY. CURRENT SCIENCE. V. 108, P 1315-1319, 2015.**

QUAN, C. et al. Production of phytase in a low phosphate medium by a novel yeast *Candida krusei*. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 92, n. 2, p. 154–160, 2001.

QVIRIST, L.; CARLSSON, N.-G.; ANDLID, T. Assessing phytase activity—methods, definitions and pitfalls. **Journal of Biological Methods**, v. 2, n. 1, p. 16, 2015.

RABOY, V. Approaches and challenges to engineering seed phytate and total phosphorus. **Plant Science**, v. 177, n. 4, p. 281–296, 2009.

RANI, R.; GHOSH, S. Production of phytase under solid-state fermentation using *Rhizopus oryzae*: Novel strain improvement approach and studies on purification and characterization. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10641–10649, 2011.

ROOHANI, N. et al. Zinc and phytic acid in major foods consumed by a rural and a suburban population in central Iran. **Journal of Food Composition and**

**Analysis**, v. 28, n. 1, p. 8–15, 2012.

SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V. Phytate-degrading enzymes in pig nutrition. **Livestock Science**, v. 113, n. 2-3, p. 99–122, fev. 2008.

SILVA VIVAS, J. M.; VIVAS, M.; DA SILVEIRA, S. F. Efeito da temperatura sobre o crescimento e esporulação in vitro de fungos hiperparasitas de *Asperisporium caricae*. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v. 45, n. 1, p. 73–81, 2015.

SINGH, B.; SATYANARAYANA, T. Characterization of a HAP-phytase from a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile*. **Bioresource technology**, v. 100, n. 6, p. 2046–51, mar. 2009.

SINGH, B.; SATYANARAYANA, T. Phytases from thermophilic molds: Their production, characteristics and multifarious applications. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 7, p. 1391–1398, 2011.

SUHAIRIN, A. et al. Phytase: Application in food industry. *Int. Food Res*, v. 17, p. 13–21, 2010.

THOMPSON, L. U.; YOON, J. H. Starch digestibility as affected by polyphenols and phytic acid. *Journal of Food Science*, v. 49, n. 4, p. 1228-1229, 1984.

TRAN, T. T. et al. A simple and fast kinetic assay for phytases using phytic acid-protein complex as substrate. **Analytical Biochemistry**, 2011.

USHASREE, M. V.; VIDYA, J.; PANDEY, A. Extracellular expression of a thermostable phytase (phyA) in *Kluyveromyces lactis*. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 9, p. 1440–1447, set. 2014.

VATS, P.; BANERJEE, U. C. **Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): An overview** *Enzyme and Microbial Technology*, 2004.

WICKLOW, D. T.; POLING, S. M. Antimicrobial activity of pyrrocidines from *Acremonium zeae* against endophytes and pathogens of maize. **Phytopathology**, v. 99, n. 1, p. 109–115, 2009.

WU, W. H. et al. Bioethanol production from taro waste using thermo-tolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* K21. **Bioresource Technology**, v. 201, p. 27–32, 2016.

## **CAPITULO II – ARTIGO: “PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE FITASES FÚNGICAS UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS”**

### **Resumo**

A suplementação de rações com fitases aumenta a disponibilidade de fósforo e outros minerais, diminui os custos da produção animal e os danos ao meio ambiente. Neste trabalho, microrganismos foram selecionados para estudos de produção e caracterização do extrato de fitase a partir de resíduos agroindustriais. Dentre os fungos filamentosos avaliados, *Acremonium zeae* B (AZB) produziu maior rendimento via fermentação em estado sólido utilizando farelo de milho como substrato após 5 dias de incubação. A levedura *Kluyveromyces marxianus* (KM) cultivada por fermentação submersa utilizando farelo de arroz durante 48 h apresentou rendimentos 10 vezes maiores que o fungo. A otimização do processo aumentou essa diferença para mais de 300 vezes. O sobrenadante do fungo AZB apresentou maior atividade de fitase em pH neutro e a 50 °C e foi altamente termoestável, mas a atividade foi inibida em pH 2,5 e na presença de diversos íons. No conteúdo extracelular da levedura, as condições de atividade indicaram a possibilidade da presença de duas enzimas, uma vez que o mesmo apresentou atividade em ampla faixa de pH e temperatura com dois picos a 60 e 80 °C. A alta estabilidade dos extratos de fitase, associada ao baixo custo de produção, confirma o potencial desses microrganismos para produção de fitases e seu emprego em rações para suínos com baixos custos para o produtor.

## **Introdução**

As rações para monogástricos são formuladas a partir de sementes de leguminosas e cereais, principalmente milho e farelo de soja, os quais representam cerca de 90% da dieta de suínos e contribuem substancialmente para suprir suas necessidades de energia, proteínas, minerais e vitaminas. Entretanto, estas sementes possuem grande parte do fósforo indisponível na forma de fitato (SELLE; RAVINDRAN, 2008), o qual constitui um importante fator antinutricional que diminui a absorção de cátions e nutrientes essenciais pelos animais (PALLAUF; RIMBACH 1996). A suplementação do fósforo nas rações fornecidas aos suínos aumenta os custos da produção e pode causar danos ambientais devido ao excesso de fósforo excretado nas fezes dos animais (SUHAIRIN et al; 2010). Nesse contexto, a adição de fitases à ração é essencial para disponibilizar o fósforo e demais nutrientes no alimento e diminuir a necessidade de suplementação deste mineral na dieta dos animais. Entretanto, o alto custo dessa enzima limita seu uso pelos produtores.

Os substratos utilizados como meios de cultivo dos microrganismos representam de 30% a 40% do preço final dos custos de produção de enzimas (NASCIMENTO et al., 2007). Devido a isto, resíduos agroindustriais têm sido cada vez mais empregados como substratos de baixo custo para produção desta e de outras biomoléculas. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo a obtenção de fitases a partir de resíduos agroindustriais e a caracterização dos extratos visando o seu uso para hidrólise de fitato em rações para suínos.

## Material e Métodos

### *Seleção dos fungos produtores de fitases*

Onze cepas previamente identificados, foram cedidos pelo Laboratório de Análises Bioquímicas do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (Bioagro) da Universidade Federal de Viçosa. São eles: *Aspergillus glaucus* (AG), *Aspergillus japonicus* (AJ), *Aspergillus terreus* (AT), *Acremonium zeae* A (AZA), *Acremonium zeae* B (AZB), *Acremonium zeae* C1 (AZC1), *Penicillium chrysogenum* (PCry), *Penicillium expansum* (PE), *Penicillium citrinum* (PC), *Debaryomyces hansenii* (DH) e *Kluyveromyces marxianus* (KM). Os microrganismos utilizados foram mantidos em Ágar Batata Dextrose (BDA).

As placas foram incubadas em estufa a 28 °C durante 7 dias, os esporos foram recuperados e diluídos em solução salina a 0,85% (m/v) e contados em microscópio óptico. A suspensão de esporos foi mantida a -20 °C até que eles fossem utilizados para inoculação em cada teste para uma concentração final de aproximadamente 10<sup>4</sup> esporos (fungos filamentosos) ou 10<sup>6</sup> células viáveis (leveduras) por mililitro de meio, em cada tratamento.

Para a seleção dos microrganismos com maior potencial para produção de fitases, os extratos de cada microrganismo foram obtidos a partir de meio de cultura líquido (infusão de batata (200 g·L<sup>-1</sup>); sacarose (10 g·L<sup>-1</sup>); peptona (5 g·L<sup>-1</sup>); Tween-20 (2,5 mL·L<sup>-1</sup>) e CaCl<sub>2</sub> (0,10 g·L<sup>-1</sup>)), pH 5,5 a 28 °C e 150 rpm (GUNASHREE; VENKATESWARAN, 2008). Após 72h o extrato foi clarificado por centrifugação (5000 x g por 15 min) a 4 °C e o sobrenadante usado para o ensaio de atividade enzimática, segundo o teste-padrão de atividade de fitases. O experimento foi realizado três vezes, de forma independente, e os dados

comparados utilizando o software Graph Pad PRISM (versão 6.0) por ANOVA seguido de teste de Tukey para comparação das médias que apresentaram diferentes significativas a  $P < 0,05$ . O fungo filamentoso e a levedura que apresentaram extratos com a maior atividade enzimática foram selecionados para produção de fitase via fermentação em estado sólido e fermentação submersa, respectivamente.

### *Seleção do substrato*

Para seleção do substrato a ser utilizado na produção das fitases, o fungo filamentoso e a levedura selecionados foram ativados e inoculados em meios contendo farelo de arroz, farelo de milho, farelo de trigo e farelo de soja.

O fungo foi cultivado via fermentação em estado sólido (FES) em meio mineral ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\text{MgSO}_4$  ( $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\text{CuSO}_4$  ( $0,25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\text{ZnSO}_4$  ( $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  ( $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\text{FeSO}_4$  ( $18,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\text{KCl}$  ( $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\text{CaCl}_2$  ( $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ )) acrescido de 20% (m/v) de cada substrato a ser testado. Os frascos foram incubados em estufa a  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  por 7 dias. Após a fermentação o sobrenadante da cultura contendo as enzimas foi recuperado utilizando uma solução de  $\text{CaCl}_2$  2% (m/v) em agitação por 2h a 150 rpm e posteriormente centrifugado ( $5000 \times g$  por 15 min) a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . O sobrenadante foi usado para o ensaio de atividade enzimática segundo o teste-padrão de atividade de fitases.

A levedura foi cultivada via fermentação submersa em meio Yeaster Extract Peptone Glucose (peptona 1% (m/v), glicose 2% (m/v) e extrato de levedura 0,5% (m/v)),  $\text{KCl}$  ( $3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), sulfato de amônio ( $7,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), acrescidos de 1% (m/v) de cada substrato, a 200 rpm e  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 48h. Após este processo o sobrenadante foi recuperado por centrifugação ( $5000 \times g$

por 15 min) a 4 °C e usado para o ensaio de atividade enzimática segundo o teste-padrão de atividade de fitases.

#### *Padronização das condições de cultivo dos fungos para produção de fitases*

A avaliação das condições de cultivo teve como objetivo estabelecer uma condição padrão para cultivo. Dessa forma, foram avaliados separadamente os fatores tempo de cultivo, temperatura de incubação, concentração do substrato e pH do meio.

Os tempos de cultivo para o fungo AZB foram 4, 5, 6, 7 e 8 dias, em meio contendo 10% de farelo de milho a 28 °C e pH 5. Para a levedura foram testados os dias 1, 2, 3 e 4 de fermentação, em meio contendo 1% de farelo de milho a 28 °C e pH 6,4.

As temperaturas de incubação avaliadas tanto para o fungo como para a levedura foram de 20, 25, 30, 35, 40, 45 °C), durante 5 dias para o fungo e 2 dias para a levedura, cultivadas em farelo de milho 10 e 1% respectivamente.

O substrato farelo de milho foi testado nas concentrações de 20, 30, 40 e 50% (m/v) para produção de fitase pelo fungo e a levedura KM foi cultivada em farelo de arroz nas concentrações de 1, 2, 3 e 4% (m/v) e nas condições tempo e temperaturas anteriormente padronizadas para cada microrganismo.

Por fim, foram avaliados meios com os valores de pH ajustados para 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 para ambos os microrganismos, sendo AZB cultivado em farelo de milho durante 5 dias a temperatura de 28°C e KM em farelo de arroz, durante 2 dias e 28 °C.

As fermentações foram realizadas em duplicata. Após cada tratamento, os sobrenadantes eram recuperados e testados quanto à atividade de fitase de acordo com o teste-padrão de atividade de fitases. As análises de atividade enzimática foram realizadas em triplicata. Os dados foram comparados utilizando o software Graph Pad PRISM (versão 6.0) por ANOVA seguido de teste de Tukey para comparação das médias que apresentaram diferentes significativas  $P < 0,05$ .

#### *Caracterização dos extratos de fitase*

Após a padronização das condições de cultivo, os extratos brutos foram caracterizados quanto às condições extrínsecas que favorecessem maior atividade ou estabilidade da(s) fitase(s) presente(s). Foram elas:

Efeito do pH na atividade das fitases: Os extratos foram incubados por 1 h a 4 °C em meios cujos valores de pH foram de 2,5 e 4,5 (ajustados com tampão citrato de sódio 0,1 M); 5,0 e 6,5 (ajustados utilizando tampão acetato de sódio 0,1 M) e 7,0 e 10,0 (ajustados com tampão Tris-HCl 0,1 M). Posteriormente cada extrato foi submetido ao teste-padrão de atividade de fitases com a substituição do pH do teste-padrão pelos valores de pH descritos, respectivamente.

Efeito da temperatura na atividade das fitases: O efeito da temperatura na atividade enzimática foi avaliado por meio da substituição da temperatura de incubação do teste-padrão de atividade de fitases pelas temperaturas de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 °C para avaliação da temperatura de maior atividades de fitase em cada extrato.

Termoestabilidade das fitases nos extratos: Os extratos enzimáticos foram diluídos em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,5 e pré-incubados a 80 e 90 °C. Alíquotas foram retiradas nos tempos de 5, 15, 30, 60 e 80 min e testadas quanto à manutenção da atividade enzimática usando as condições do teste-padrão de atividade de fitases. Os dados obtidos foram expressos em termos de atividade relativa, considerando-se o valor de atividade do extrato não incubado como 100%. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Efeito de íons metálicos na atividade da fitase: O efeito de diferentes íons metálicos sobre a atividade da fitase foi avaliado em soluções de extrato enzimático contendo a concentração final de 2 e 5 mM dos seguintes sais: CaCl<sub>2</sub>, CaCO<sub>3</sub>, AgSO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, CaSO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>Cl e a 50 °C.

#### *Teste-padrão para determinação da atividade de fitases*

A atividade de fitases foi determinada segundo HEINONEN e LAHTI, (1981) com algumas modificações. Para isso, 200 µL fitato de sódio 5 mM foram adicionados em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) e 150 µL de extrato enzimático. A reação foi conduzida em banho-maria a 50 °C durante 30 minutos, seguida da paralisação pela adição de 250 µL de solução de ácido tricloroacético a 10% (v/v). Na sequência foram adicionados aos tubos de ensaio 1000 µL do reativo colorimétrico, preparado a partir de solução de molibdato de amônio 10% (m/v), em solução de ácido sulfúrico 5 M. O reativo foi preparado no momento do uso, misturando-se 10% (v/v) desta solução a 5% (m/v) de sulfato ferroso e água deionizada. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 700 nm, e os valores de absorvância correlacionados com uma curva padrão feita com KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Todas

as análises de atividade enzimática foram realizadas em triplicata. Uma unidade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para a liberação de 1  $\mu\text{mol}$  de fosfato inorgânico por minuto, sob as condições de ensaio.

## Resultados e Discussão

### Seleção do microrganismo produtor de fitase

Microrganismos representam a principal fonte de enzimas e outros compostos de interesse biotecnológico (GUPTA; GANGOLIYA; SINGH, 2015). Assim, a escolha deste é um passo importante na pesquisa visando uma produção viável de biomoléculas com aplicação industrial. Todos os microrganismos estudados foram confirmados como produtores de fitase (Figura 2.1). Entretanto, para este trabalho os fungos selecionados foram AZB que apresentou atividade de  $0,05 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$  e KM com aproximadamente  $0,06 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

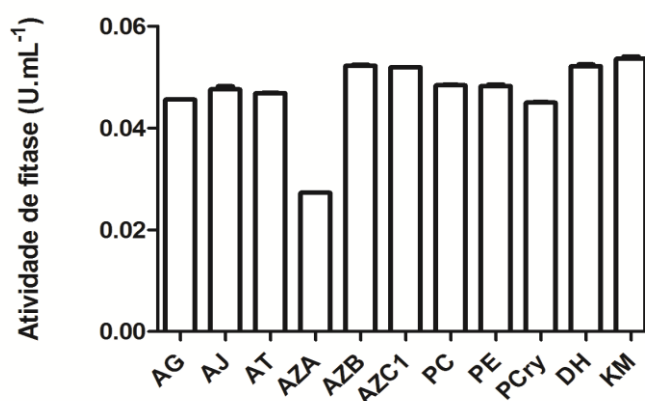


Figura 2. 1– Atividade de fitase nos extratos microbianos de AG: *Aspergillus glaucus*, AJ: *Aspergillus japonicus*, AT: *Aspergillus terreus*, AZA: *Acremonium zeae* A, AZB: *Acremonium zeae* B, AZC1: *Acremonium zeae* C1, PC: *Penicillium chrysogenum*, PE: *Penicillium expansum*, PC: *Penicillium citrinum*, DH: *Debaryomyces hansenii* KM: *Kluyveromyces marxianus* cultivados em meio líquido. Os resultados correspondem à média de três repetições independentes. As barras correspondem aos desvios-padrão das médias.

O gênero *Aspergillus* é um dos principais gêneros produtores de fitases, tendo como seu principal representante a espécie *A.niger* (AWAD et al., 2014). Entretanto, os extratos gerados pelos fungos AG e AT apresentaram, juntamente com AZA e PC, atividades de fitases significativamente inferiores às dos demais. Entre os sete fungos com maior capacidade de produção não foi observada diferença significativa na atividade de fitase nos extratos, o que significa que, entre eles, a seleção poderia se dar com bases em outras características de interesse, como por exemplo a capacidade de crescimento em diferentes condições de cultivo.

Vários estudos relatam a produção de fitases e outras enzimas por fungos do gênero *Penicillium* (BAHVSAR 2014), enquanto são raros aqueles que abordam o gênero *Acremonium*. Fungos do gênero *Acremonium* são endofíticos e podem ser encontrados no interior de tecidos animais e vegetais (ESPOSITO-POLESI, 2011). Estes microrganismos têm sido relatados como produtores de compostos de interesse biotecnológico, incluindo enzimas (DE ALMEIDA et al., 2011) mas principalmente antibióticos (BISCHOFF et al., 2009; WICKLOW; POLING, 2009). Algumas publicações relatam a produção de fitases por fungos endofíticos como os dos gêneros *Mucosodor sp.* (ALVES et al., 2016) e *Rhizoctonia sp.* (MARLIDA et al., 2010), mas nenhuma, até o nosso conhecimento, relatao uso de espécies de *Acremonium*. O fungo filamentoso AZB pode ser usado para produção de fitases, representando assim uma fonte alternativa para a produção industrial dessa enzima e com potencial para obtenção de características distintas das encontradas até então.

A espécie *Kluyveromyces marxianus* (KM) também foi selecionada pois, além de produzir fitases em grande quantidade, é uma levedura e tem sido estudada por sua alta velocidade de multiplicação (LANE; MORRISSEY, 2010), capacidade de uso de substratos alternativos na produção de bioetanol (WU et al., 2016), e de  $\beta$ -galactosidase (LEMES; ÁLVARES; KALIL, 2013) e potencial probiótico (MELOROSE; PERROY; CAREAS, 2015). As leveduras têm grande importância industrial pois são responsáveis pela produção de diversos produtos de fermentação (PRETORIUS; TOIT; RENSBURG, 2003) e oferecem facilidade de aplicação em larga escala (LANE; MORRISSEY, 2010).

#### *Seleção de condições ideais para a produção de enzima*

A seleção de substratos adequados para a produção de enzimas é um fator fundamental uma vez que eles têm o papel de fornecer energia e nutrientes para o crescimento do microrganismo e podem induzir ou reprimir a produção de metabólitos (PANDEY et al., 2001). Resíduos agroindustriais contêm a maioria dos componentes essenciais ao crescimento microbiano, tais como carbono, nitrogênio e fontes de aminoácidos. Além disso, eles são considerados substratos de baixo custo (AWAD et al., 2014) e podem ser a solução para a viabilização da produção industrial de várias enzimas.

O fungo AZB foi capaz de assimilar os diferentes resíduos fornecidos e produzir, a partir deles, fitases (Figura 2.2). A produção a partir de farelo de milho apresentou maior produtividade já que neste meio a atividade máxima nos extratos foi obtida após 120 h de fermentação, enquanto nos meios contendo farelo de trigo e soja a atividade máxima ocorreu após 144 h (Figura

2.3). Em meio contendo farelo de arroz o fungo AZB não foi capaz de produzir atividades semelhantes àsquelas obtidas com os demais farelos.

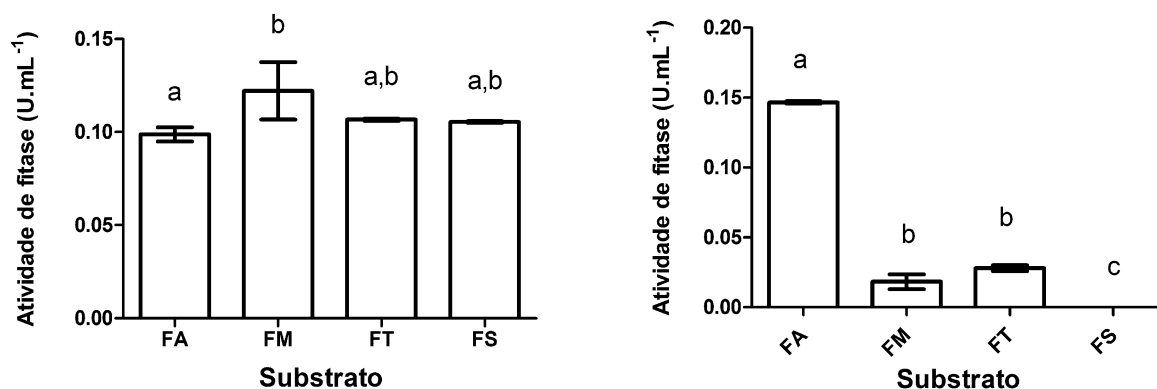


Figura 2.2 – Produção de fitases por *Acremonium zeae* B (à esquerda) e *Kluyveromyces marxianus* (à direita) cultivados em meios contendo farelo de arroz (FA), farelo de milho (FM), farelo de trigo (FT) ou farelo de soja (FS). *A. zeae* foi cultivado em meio semi-sólido contendo 20% (m/v) e *K. marxianus* em meio líquido contendo 1,0% (m/v) de cada substrato. Os resultados correspondem à média de três repetições independentes. As barras correspondem aos desvios-padrão das médias e as letras indicam diferenças estatísticas. Letras iguais não diferem entre si.

O milho apresenta entre 0,72 e 2,22% (m/m) de ácido fítico, enquanto o trigo possui até 6,39% (m/m). O fato de o fungo AZB ter se multiplicado e produzido fitase de forma mais eficiente no farelo de milho poderia ser explicado pelo fato de a espécie *A. zeae* ter sido isolada a partir deste substrato e, dessa forma, este microrganismo está adaptado para assimilar de forma mais efetiva os nutrientes presentes nesse alimento. O rendimento em fitases a partir de resíduos agroindustriais é variada e depende do microrganismo cultivado. As espécies *Humicola nigrescens* (BALA et al., 2014) e *Schizophyllum commune* (NAOMI; SALMON, 2011), por exemplo, foram mais

efetivos em produzir fitases em farelo de trigo, enquanto *Penicillium funiculosum* NRC467 (AWAD et al., 2014) apresentou maior produção fava. A alta produtividade de fitase obtida pelo AZB em farelo de milho e trigo indica a possibilidade de utilização destes como fontes alternativas para produção de fitase, aspecto considerado vantajoso quando considerados os custos de produção, uma vez que estes substratos apresentam menores custos se comparados aos farelos de soja e arroz. A diminuição da atividade de fitase com o aumento do tempo de incubação poderia ser devido à presença de proteases no meio e consequente perda na concentração da enzima. NASCIMENTO (2011) observou melhor produção de fitases por fermentação submersa com *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 após 84 horas de incubação. Por outro lado, SILVA et al., (2000) obtiveram fitases fúngicas por cultivo em estado sólido utilizando *A.niger* e polpa cítrica em 48 horas.

A levedura KM, ao contrário, produziu fitases em quantidades significativas apenas quando utilizado o farelo de arroz (Figura 2.2). Neste caso, a atividade total de fitase obtida pelo extrato foi maior que a obtida pelo extrato do fungo AZB e o tempo utilizado para fermentação (48 h), foi pelo menos duas vezes menor (Figura 2.3), o que levou a uma produtividade 10 vezes maior para a levedura ( $3,525\text{U}\cdot\text{dia}^{-1}$  contra apenas  $0,3\text{U}\cdot\text{dia}^{-1}$  produzida pelo fungo AZB), justificando possíveis gastos adicionais pelo uso do farelo de maior custo.

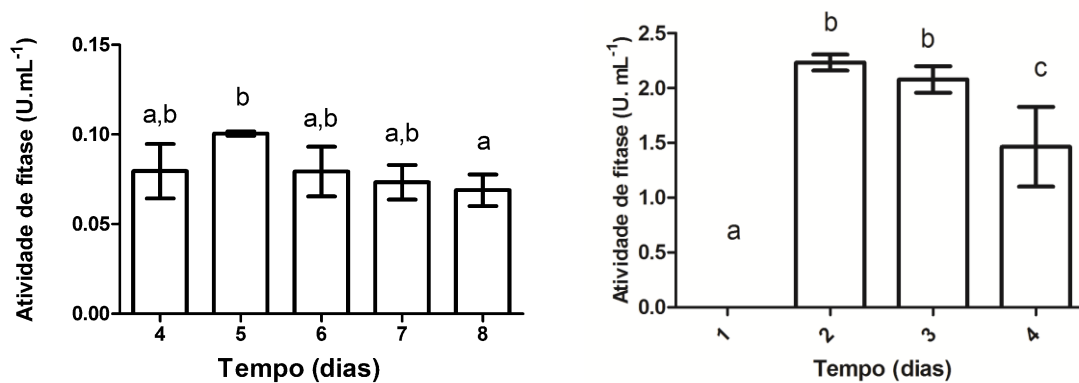


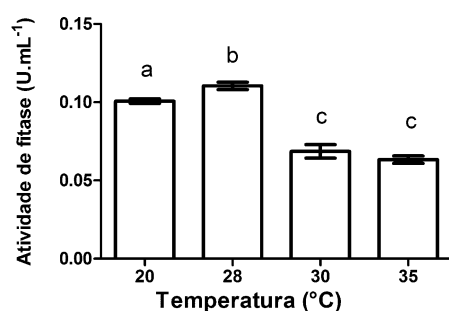
Figura 2. 3 – Produção da fitase ao longo do tempo de incubação pelo fungo *Acremonium zeae B* (à esquerda) a partir do farelo de milho e pela levedura *Kluyveromyces marxianus* (à direita) a partir do farelo de arroz, via fermentação em estado sólido e fermentação submersa, respectivamente. Os resultados correspondem à média de três repetições independentes. As barras correspondem aos desvios-padrão das médias e as letras indicam diferenças estatísticas. Letras iguais não diferem entre si.

A síntese de fitase por leveduras é determinada pela concentração de fosfato no meio de cultivo e, em casos particulares, a presença desse composto pode inclusive reprimir a síntese da enzima (QUAN et al., 2001). Segundo CONTE et al., (2002), o farelo de arroz apresenta 5,1 a 8,6% (m/m) de ácido fítico na sua composição. A alta concentração deste componente no arroz pode ter influenciado a alta produtividade da fitase neste farelo (0,14 U.mL<sup>-1</sup>) (Figura 2.2). Apesar disso, a atividade significativamente inferior ( $P < 0,05$ ) nos demais resíduos pode indicar a dificuldade da levedura no uso dos nutrientes presentes nesses farelos ou até mesmo a repressão da síntese da enzima por compostos presentes. LAN et al., (2002), produziram fitase via fermentação submersa a partir de *Mitsuokella jalaludini* e observaram um aumento da produção de (10,69 U/g) utilizando farelo de arroz como substrato.

A literatura realça a importância do tempo de cultivo para a eficiência e economia do processo de produção enzimática. O excesso de fosfato nas horas iniciais de fermentação pode reprimir a síntese de fitase por

microrganismos (QUAN, 2002), o que poderia explicar a ausência de atividade observada em 24 h de incubação da levedura KM. SHAH et al., (2009) observaram atividade de 6,18 U.mL<sup>-1</sup> na produção de fitase de *A. niger* NCM563 por fermentação submersa utilizando 1% (m/v) de farelo de arroz em 144 h de incubação, tempo maior ao observado neste trabalho que foi de 48 h. *Candida krusei* produziu fitases na fase de desaceleração do crescimento exponencial, e a atividade foi aumentada gradualmente com o aumento do tempo de incubação, apresentando também máxima produção em 48 h (QUAN et al.,2001). MARLIDA et al., (2010) também encontraram atividade de fitase em *Rhizoctonia sp.* e *Fusarium verticillioides* somente após a fase exponencial de crescimento.

Além do tipo de substrato, outros fatores extrínsecos, como a temperatura, composição e pH do meio, influenciam na produção de enzimas por microrganismos. A temperatura de incubação é um dos principais parâmetros que afetam o crescimento microbiano e a produção de metabólitos pela célula (BALA et al., 2014). As condições ideais para a produção de fitase pelo fungo AZB foram a 28 °C em meio com pH 4,0 e 20% (m/v) de substrato.



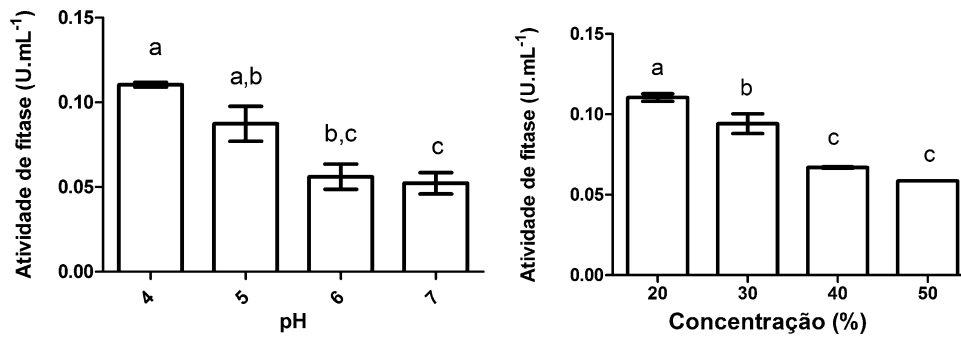


Figura 2. 4 – Produção de fitase pelo fungo *Acremonium zeae B* via fermentação em estado sólido em diferentes condições de temperatura, pH e concentração do substrato. Os resultados correspondem à média de três repetições independentes. As barras correspondem aos desvios-padrão das médias e as letras indicam diferenças estatísticas. Letras iguais não diferem entre si.

A produção máxima da enzima pelo fungo AZB se deu em condição de temperatura pouco superior à considerada ideal para seu crescimento, entre 20 e 25 °C (SILVA VIVAS; VIVAS; DA SILVEIRA, 2015), cessando a 45 °C, quando também não houve crescimento do fungo (dado não mostrado). Este resultado indica que, as condições ideais para multiplicação de um microrganismo não estão necessariamente relacionadas à produção de uma enzima, enquanto as condições ideais para atividade desta também não se relacionam, necessariamente, às condições ideais para sua produção pelo microrganismo.

A diminuição da produção da enzima com o aumento da concentração do substrato (Figura 2.4), poderia estar relacionada à limitação desse microrganismo em se desenvolver em meios contendo menor atividade de água, mas nenhuma alteração significativa nesse parâmetro foi constatada nos meios com diferentes concentrações de farelos (dados não mostrados). É possível que o fungo apresente maior produtividade se meios contendo

menores concentrações do substrato forem utilizados, o que permanece a ser testado.

O crescimento do microrganismo e produção máxima de fitase por KM se deu a 25-30 °C, em meio com pH 4,0 e 2% (m/v) de substrato (figura 2.5). Essas condições foram distintas daquelas originalmente utilizadas para cultivo da levedura (1% (m/v) de substrato, pH 5,8).

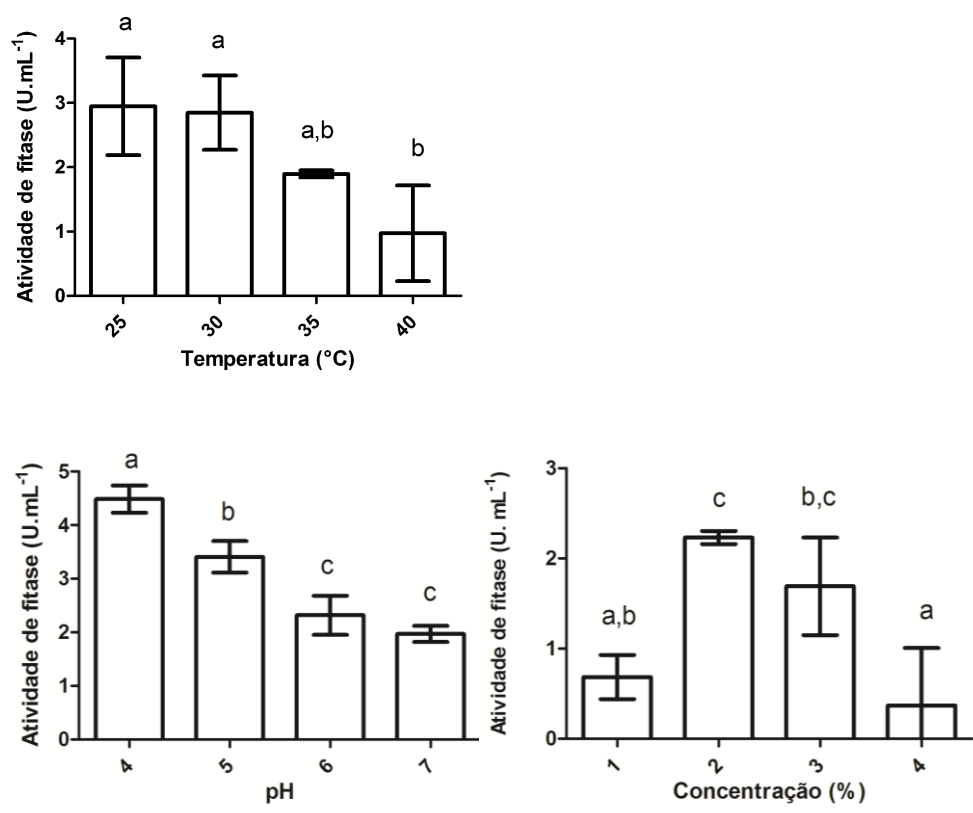


Figura 2. 5 – Produção de fitase pela levedura *Kluyveromyces marxianus* via fermentação submersa em diferentes condições de temperatura, concentração do substrato e pH. Os resultados correspondem à média de três repetições independentes. As barras correspondem aos desvios-padrão das médias e as letras indicam diferença estatística. Letras iguais não diferem entre si.

Quando combinadas as melhores condições para a síntese de fitase pela levedura, a produtividade alcançada chegou a 101,25 U.dia<sup>-1</sup>, índice 30

vezes superior ao original. Estes resultados demonstram a importância da padronização do processo visando à produção de um metabólito de interesse em detrimento das condições ideais de cultivo para multiplicação celular. Este resultado demonstra que a levedura KM pode produzir um rendimento elevado de fitases, usando um meio barato e condições ambientais facilmente adaptáveis para a produção de fitases em larga escala.

### Caracterização dos extratos

As condições ideais para atividade de fitases nos extratos do fungo AZB foram de 50 °C e pH neutro (Figura 2.6), condições comumente encontradas para fitases microbianas (BALA et al., 2014; BOYCE; WALSH, 2007). Em valores de pH ácidos ( $\leq 4,0$ ) o extrato perdeu completamente a atividade de fitase, indicando não ser ideal para as condições do trato gastrointestinal de suínos, onde os valores de pH variam de 2,0 a 4,5 (ESCOBIN-MOPERA et al., 2012).

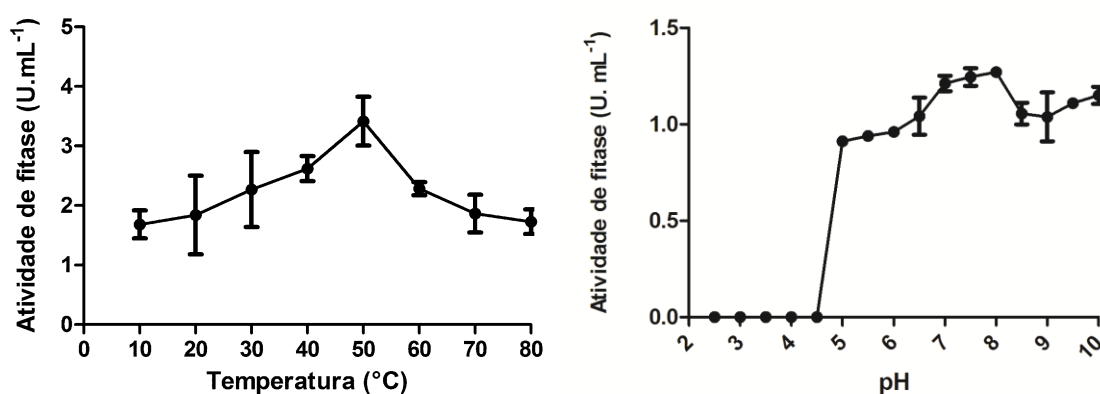


Figura 2.6 – Atividade de fitase nos extratos do fungo *Azobrevulva zeae* B em diferentes temperaturas (à esquerda) e valores de pH (à direita). Os resultados correspondem à média de três repetições independentes. As barras correspondem aos desvios-padrão das médias.

Os extratos obtidos a partir de KM apresentaram dois picos de atividade máxima nas temperaturas de 60 e 80 °C (Figura 2.7), mantendo, de modo geral, elevada atividade na faixa de temperatura de 50 a 80 °C, faixa superior à obtida pela maioria das fitases fúngicas, de até 70 °C (SINGH; SATYANARAYANA, 2011). Da mesma forma, o extrato apresentou grande estabilidade ao longo de toda a faixa de pH testada (2,5 a 10,0), com atividade significativamente superior às demais no valor de pH 4,0, com uma diminuição moderada em pH neutro.

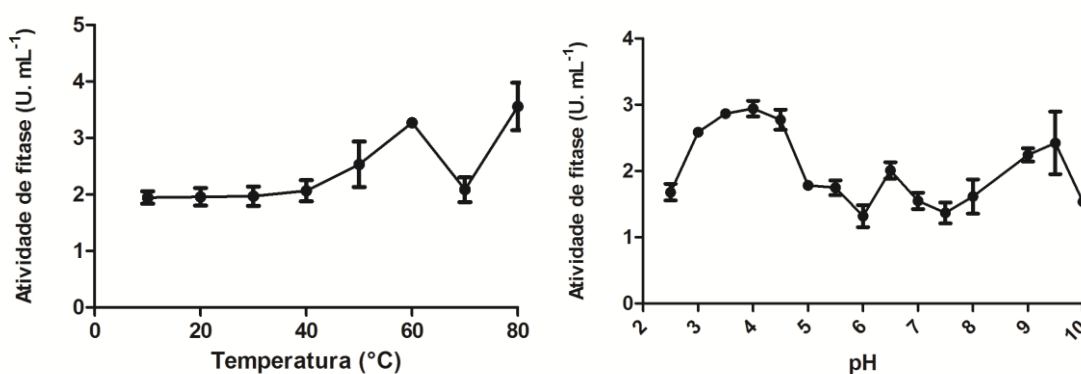


Figura 2.7 – Atividade de fitase nos extratos da levedura *Kluyveromyces marxianus* em diferentes temperaturas (à esquerda) e valores de pH (à direita). Os resultados correspondem à média de três repetições independentes. As barras correspondem aos desvios-padrão das médias.

Geralmente, as condições ideais para atividade de enzimas dependem da fonte da qual são obtidas e do ambiente em que atuam. Fitases bacterianas costumam atuar em meios com pH neutro ao alcalino, enquanto fungos geralmente produzem enzimas com pH ótimo na faixa de 2,5 a 6,0. Nesse caso, essas enzimas são normalmente relativamente instáveis em meios com pH superior a 7,5 e inferior a 3,0 (VATS, BANERJEE 2004). Fitases com pH ideal de 2,0 (MONTEIRO et al., 2012, 2,5 (PANDEY 2014) e 1,5

(RANI;GHOSH, 2011) já foram isoladas. No entanto, até o momento pouco era conhecido sobre a estabilidade ao pH das fitases sintetizadas por leveduras do gênero *Kluyveromyces*. Os nossos resultados indicam que extratos dessa levedura possuem atividade de fitase ao longo de toda a faixa de pH testada, o que pode indicar alta estabilidade da fitase ou sugerir a presença de mais de uma fitase no extrato de KM. A purificação dos componentes do extrato poderá esclarecer essa questão.

De qualquer forma, a capacidade do extrato em manter a atividade hidrolítica em meios com pH 2,0 e 6,5, necessários para facilitar a degradação de fitato nas glândulas salivares, estômago e parte superior do duodeno dos animais, sugere uma característica adequada para degradação prolongada do fitato ao longo do sistema digestivo e eficiência na ação catalítica de substratos no estômago. Posteriormente, deverá ser avaliada a capacidade da manutenção da atividade catalítica frente a enzimas digestivas e condições específicas do trato gastrointestinal de suínos.

O extrato enzimático de AZB foi capaz de manter sua atividade praticamente intacta após 10 min de incubação a 80 °C, demonstrando grande estabilidade térmica (Figura 2.8). Para fitases utilizadas na alimentação animal, é essencial a manutenção da atividade enzimática após a exposição do extrato às condições de processamento da ração. A etapa de granulação, por exemplo, ocorre a temperaturas entre 65 e 95 °C (BEDFORD, 1995), com tempos de retenção que vão desde alguns segundos a vários minutos. Tratamentos térmicos são também usados como medidas para o controle de patógenos na indústria. A submissão do extrato a esses processos poderia

inativar completamente enzimas que não fossem capazes de recuperar sua atividade após a desnaturação. Uma fitase purificada de *A. flavus* ITCC 6720 apresentou atividade relativa de 32, 10 e 0% quando incubada a 50 °C durante 10, 20 e 30 min, respectivamente (GAIND; SINGH, 2015), enquanto uma fitase recombinante (phyA) expressa em *Kluyveromyces lactis* reteve 69 e 37% de atividade quando submetida a 90 °C (USHASREE; PANDEY, 2014).

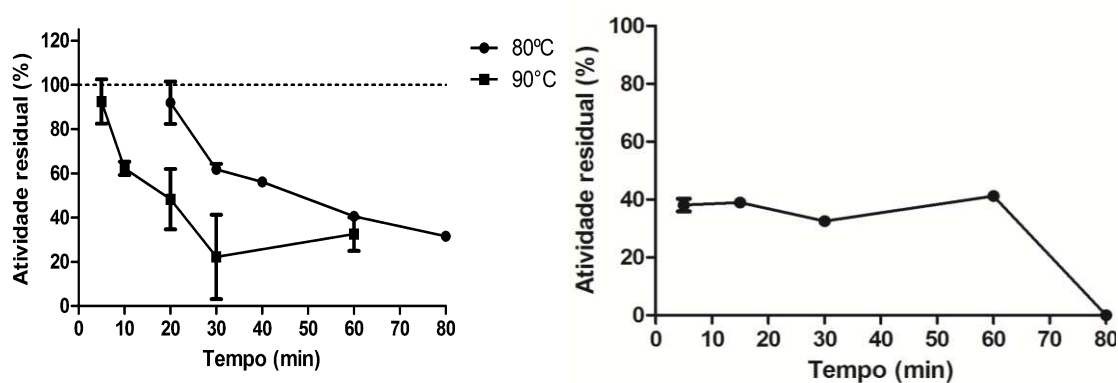


Figura 2.8 – Termoestabilidade a 80 e 90°C nos extratos de *Acremonium zeae* B (à direita) e da levedura *Kluyveromyces marxianusa* 80 °C (à esquerda). Os resultados correspondem à média de três repetições independentes. As barras correspondem aos desvios-padrão das médias. Dados expressos em termos de atividade residual consideram o valor de atividade do extrato no tempo zero de incubação como 100%.

Este extrato ainda manteve grande estabilidade térmica a 90 °C durante 5 min e a inativação completa ocorreu apenas aos 30 min de incubação. A elevada estabilidade térmica apresentada pelo extrato de AZB indica que esse microrganismo poderia ser utilizado como fonte de fitases na fabricação de alimentos pois mantém a capacidade hidrolítica após as condições de processamento. Essa estabilidade foi muito superior à apresentada pela enzima comercial Natuphos (dados não mostrados), normalmente utilizada na fabricação de rações. Essa enzima apresentou apenas 60% de atividade residual quando incubada por apenas 5 min a 80 °C, valor reduzido para

menos de 20 % após 15 min de incubação. A atividade desta enzima foi ainda completamente inibida após 15 min a 90 °C.

Por outro lado, o extrato obtido a partir de KM apresentou menor estabilidade térmica, apesar da atividade elevada encontrada para as temperaturas testadas. Mesmo assim, 40% de atividade residual foi mantida após o extrato ser submetido por 20 min a 80 °C (Figura 2.8), mas foi completamente inibida a 90 °C (dados não mostrados). Testes realizados a 60 e 70 °C mostraram que o extrato de KM foi capaz de manter até 80 e 60% de sua atividade original após 120 min de incubação, respectivamente (dados não mostrados), classificando-o como de estabilidade moderada a condições de processamento térmico. As fitases, em geral, exibem elevada atividade em temperaturas na faixa de 50 °C a 70 °C (VATS; BANERJEE, 2004). ZHANG et al. (2010) mostraram que a perda total da atividade da fitase purificada de *Aspergillus ficcum* NTG-23 ocorreu quando esta foi mantida a 80 °C durante 10 min. A fitase purificada de *Rhizopus oligosporus* ATCC 22959 manteve apenas 20% de atividade residual durante 5 minutos a 80 °C (CASEY; WALSH, 2004).

Íons metálicos são comumente presentes em rações para animais, portanto o estudo sobre a influência de cada um deles sobre a atividade da fitase é potencialmente significativo e útil para aplicação industrial. A influência de vários íons metálicos sobre a atividade dos extratos de KM e AZB é apresentada na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Efeito de íons na atividade de fitases no extrato de *Acremonium zeae B* e *Kluyveromyces marxianus*.

Sal	Atividade relativa (%)			
	<i>Acremoniumzeae B</i>		<i>Kluyveromycesmarxianus</i>	
	2 mM	5 mM	2 mM	5 mM
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	89,5±0,04	115,0 ±4,6	116,0 ±2,8	273,0 ±3,1
<b>CaCO<sub>3</sub></b>	91,1±0,0	ND	144,0 ±3,1	203,0 ±1,8
<b>AgSO<sub>4</sub></b>	79,0 ±0,3	ND	116,7±12,1	289,0 ±20,6
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	95,6±1,0	119,2±1,0	217,0 ±3,87	268,0 ±4,6
<b>ZnSO<sub>4</sub></b>	62,0±0,0	49,8±0,06	60,6±1,4	32,8±2,5
<b>CuSO<sub>4</sub></b>	98,0± 0,0	ND	310,0 ±31,3	135,6±3,0
<b>CaSO<sub>4</sub></b>	99,3±0,02	123,0 ±0,1	204,0 ±0,5	387,0 ±9,5
<b>NH<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub></b>	98,0 ±0,0	2,0 ±0,0	127,0 ±4,8	238,0 ±14,1
<b>FeSO<sub>4</sub></b>	97,0 ±0,3	ND	96,0 ±0,3	52,0 ±1,0

ND = atividade não detectada na condição testada. Os desvios correspondem à média de triplicatas. Dados expressos em termos de atividade relativa considerando o valor de atividade do extrato sem adição de íons como 100%.

O efeito de íons na atividade de fitase varia de enzima para enzima, mas a maioria das fitases tem demonstrado forte inibição por Zn<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup> (SINGH; SATYANARAYANA, 2009). Uma fitase purificada de *Aspergillus niger* UFV-1 foi inibida em diferentes níveis por Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup> na concentração de 5 mM (MONTEIRO et al., 2012).

O extrato de AZB apresentou maior sensibilidade em relação a presença de íons no meio, sendo fortemente inibido por CaCO<sub>3</sub>, Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub> e CuSO<sub>4</sub> e, em menor grau, por ZnSO<sub>4</sub>. Esse comportamento foi oposto ao apresentado pelo extrato de KM, que teve a atividade aumentada em até 3,87 vezes na presença de íons Ca<sup>2+</sup>, independente do sal pelo qual o íon era disponibilizado. Da mesma forma, a presença de apenas 2 mM de CuSO<sub>4</sub> aumentou a atividade enzimática em 300 vezes. Outros íons capazes de

aumentar a atividade no extrato são  $\text{AgSO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2$  e  $\text{NH}_4\text{Cl}_2$ , enquanto  $\text{ZnSO}_4$  e  $\text{FeSO}_4$  causaram inibição parcial da atividade no extrato. A manutenção da atividade de fitase em presença de  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  é potencialmente significativo do ponto de vista de aplicação com relação a fitase nas rações animais e a estabilidade variada para íons metálicos pode fornecer várias aplicações para a utilização combinada de isoenzimas. O efeito antagônico observado para a atividade enzimática na presença das diferentes concentrações de  $\text{CuSO}_4$  nos extratos de KM (Tabela 2.2), entretanto, deve ser investigado.

A capacidade de utilização de diversos substratos agroindustriais, associada à alta estabilidade térmica demonstrada pelas enzimas do extrato de AZB, indica que este fungo é um candidato em potencial para produção de fitases para a indústria. O sistema de fermentação em estado sólido possui vantagens como o baixo custo, poucos controles e facilidade de oxigenação para manutenção de fungos. A otimização de condições adicionais do processo poderia aumentar ainda mais o rendimento em fitase obtido. Embora as atividades no extrato tenham sido máximas em pH neutro e inibidas em pH ácido, algumas alternativas poderiam viabilizar seu uso para alimentação de monogástricos. Por exemplo, o uso de biomoléculas encapsuladas permite a liberação seletiva de compostos no corpo e, conseqüentemente, as cápsulas seriam capazes de proteger as enzimas no pH estomacal para que elas possam agir no intestino e liberar o fósforo para ser absorvido. Outra alternativa seria a hidrólise do fitato previamente à alimentação, ou seja, o fornecimento no alimento do fósforo livre gerado por essas enzimas.

O uso de leveduras produtoras de fitase também é visado do ponto de vista da alta produtividade desses organismos, o que está diretamente relacionado aos menores tempos de geração associados a este organismo. O sistema de fermentação submersa possui resultados mais reprodutíveis e utiliza menos espaço para a fermentação o que, associado a produtividade observada, elevaria as quantidades final de fitase obtida e, conseqüentemente, reduziria os custos de produção. Além disso, leveduras como KM poderiam ser produzidas nesses sistemas e adicionadas ainda viáveis a rações úmidas, agindo como produtoras de fitases e também outros compostos benéficos aos animais, ou mesmo como probióticos.

De maneira geral, a viabilização da tecnologia estudada aqui é essencial para a redução dos custos de importação dessas enzimas e aumento da competitividade da indústria nacional de insumos.

## **Conclusões**

O fungo filamentosso *Acremonium zeae* B e a levedura *Kluyveromyces marxianus* são microrganismos produtores de fitases com características adequadas à aplicação industrial. O uso de resíduos agroindustriais como substratos induziu a produção de fitases por esses microrganismos e pode ser uma alternativa para redução dos custos de produção desta enzima. Numa perspectiva a longo prazo, as enzimas estudadas aqui poderim ser utilizadas em rações animais. Pode-se particularizar as seguintes conclusões:

Os extratos do fungo *A.zeae* B e a levedura *K. Marxianus* apresentaram maior atividade de fitases em relação aos onze organismos avaliados neste

trabalho. O baixo tempo de crescimento da levedura contribuiu para que a produtividade desse microrganismo tenha sido superior à do fungo, este via fermentação em estado sólido e aquele via fermentação submersa.

Os extratos de fitases produzidos apresentaram diferentes perfis de atividade e poderiam ser utilizados para diferentes aplicações industriais. O extrato de KM apresentou características ideais para o emprego em rações para suínos, como estabilidade em meios contendo diferentes valores de pH e ativação por uma variada gama de íons, especialmente  $\text{Ca}^{2+}$ , embora tenha demonstrado menor estabilidade térmica. Já o extrato de AZB atua idealmente em pH neutro e é inativada em pH ácido e por uma variada gama de íons, o que cria obstáculos ao seu emprego na formulação de rações visando a atuação da enzima no trato gastrointestinal dos animais. Entretanto, a alta estabilidade térmica mostrada por esse extrato sugere que algumas adaptações poderiam viabilizar seu uso industrial, seja pela administração da enzima em cápsulas ou mesmo pela hidrólise do fitato previamente à administração do alimento ao animal.

Permanece a ser avaliada a possível presença de enzimas distintas no extrato de KM. A purificação dessas enzimas poderá esclarecer alguns dos comportamentos observados, uma vez que as características das enzimas puras, na ausência dos componentes do extrato, podem ser distintas das obtidas nesse trabalho. Entretanto, processos de purificação poderiam onerar o emprego dessas enzimas, tornando necessário o estudo de viabilidade econômica desses processos objetivando possíveis transferências da tecnologia.

## Referências Bibliográficas

ALVES, N. M. et al. Production and Partial Characterization of an Extracellular Phytase Produced by *Muscodor* sp . under Submerged Fermentation. n. January, p. 23–32, 2016.

AWAD, G. E. A et al. Optimization of phytase production by *Penicillium purpurogenum* GE1 under solid state fermentation by using Box-Behnken design. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 1, p. 81–88, 2014.

BALA, A. et al. Production of an extracellular phytase from a thermophilic mould *Humicola nigrescens* in solid state fermentation and its application in dephytinization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2014.

BHAVSAR, K. et al. Phytase isozymes from *Aspergillus niger* NCIM 563 under solid state fermentation: Biochemical characterization and their correlation with submerged phytases. **Process Biochemistry**, 2013.

BISCHOFF, K. M. et al. Extracellular hemicellulolytic enzymes from the maize endophyte *acremonium zeae*. **Current Microbiology**, v. 58, n. 5, p. 499–503, 2009.

BOGAR, B. et al. Optimization of phytase production by solid substrate fermentation. **Journal of industrial microbiology and biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 183–9, 2003.

BOHN, L.; MEYER, A. S.; RASMUSSEN, S. K. Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 9, n. 3, p. 165–91, mar. 2008.

BOYCE, A.; WALSH, G. Purification and characterisation of an acid phosphatase with phytase activity from *Mucor hiemalis* Wehmer. **Journal of Biotechnology**, v. 132, n. 1, p. 82–87, 2007.

CAPUTO, L.; VISCONTI, A.; DE ANGELIS, M. Selection and use of a *Saccharomyces cerevisiae* strain to reduce phytate content of wholemeal flour during bread-making or under simulated gastrointestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 400–407, 2015.

CASEY, A.; WALSH, G. Identification and characterization of a phytase of potential commercial interest. **Journal of Biotechnology**, v. 110, n. 3, p. 313–322, 2004.

CHEN, W. et al. Enhanced activity of an alkaline phytase from *Bacillus subtilis* 168 in acidic and neutral environments by directed evolution. **Biochemical Engineering Journal**, 2015.

CHI-WEI LAN, J.; CHANG, C.-K.; WU, H.-S. Efficient production of mutant phytase (phyA-7) derived from *Selenomonas ruminantium* using recombinant *Escherichia coli* in pilot scale. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 118, n. 3, p. 305–10, set. 2014.

COWIESON, A. J.; WILCOCK, P.; BEDFORD, M. R. Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics. **World's Poultry Science Journal**, v. 67, n. 02, p. 225–236, 20 jun. 2011.

DANWITZ, A. VON et al. Dietary phytase supplementation in rapeseed protein based diets influences growth performance, digestibility and nutrient utilisation in turbot (*Psetta maxima* L.). **Aquaculture**, v. 450, p. 405–411, 2016.

DE ALMEIDA, M. N. et al. Cellulases and hemicellulases from endophytic *Ascomycota* species and its application on sugarcane bagasse hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, n. 2, p. 594–610, 2011.

DIAS, G.; RAMOS, M.; SOUSA, G. F. DE. Stability of the phytase from *Aspergillus niger* 11T53A9 to storage and its application in the hydrolysis of phytic acid in sorghum flour. **Revista Brasileira de Agrociências**, v. 18, n. 2-4, p. 95–106, 2012.

ESCOBIN-MOPERA, L. et al. Purification and characterization of phytase from *Klebsiella pneumoniae* 9-3B. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 113, n. 5, p. 562–7, maio 2012.

ESPOSITO-POLESI, N. P. Microrganismos endofíticos e a cultura de tecidos vegetais: quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 9, n. 4, p. 533–541, 2011.

GAIND, S.; SINGH, S. International Biodeterioration & Biodegradation Production, purification and characterization of neutral phytase from thermotolerant *Aspergillus flavus* ITCC 6720. v. 99, 2015.

GARCÍA-MANTRANA, I. et al. Expression of bifidobacterial phytases in *Lactobacillus casei* and their application in a food model of whole-grain sourdough bread. **International Journal of Food Microbiology**, v. 216, p. 18–24, 2016.

GONTIA-MISHRA, I.; TIWARI, S. Molecular characterization and comparative phylogenetic analysis of phytases from fungi with their prospective applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 51, n. 3, p. 313–326, 2013.

GUGGENBUHL, P.; SIMÕES NUNES, C. Effects of two phytases on the ileal apparent digestibility of minerals and amino acids in ileo-rectal anastomosed pigs fed on a maize–rapeseed meal diet. **Livestock Science**, v. 109, n. 1-3, p.

261–263, 2007.

GUNASHREE, B. S.; VENKATESWARAN, G. Effect of different cultural conditions for phytase production by *Aspergillus niger* CFR 335 in submerged and solid-state fermentations. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 35, n. 12, p. 1587–96, dez. 2008.

GUPTA, R. K.; GANGOLIYA, S. S.; SINGH, N. K. Screening and characterization of wheat germplasms for phytic acid and iron content. **Journal of Agricultural Science and Technology**, 2015.

JOSHI, S.; SATYANARAYANA, T. Heterologous expression of yeast and fungal phytases: Developments and future perspectives. v. 14, n. July, p. 293–311, 2015.

HEINONEN, J.K.; LAHTI, R.J. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. **Analytical Biochemistry**. v. 113, p.313–317, 1981.

KRYGIER, S. et al. Safety evaluation of phytase 50104 enzyme preparation (also known as VR003), expressed in *Pseudomonas fluorescens*, intended for increasing digestibility of phytate in monogastrics. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 70, n. 2, p. 545–554, 2015.

KUMAR, V. et al. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. **Food Chemistry**, v. 120, n. 4, p. 945–959, jun. 2010.

LAN, G. Q.; ABDULLAH, S.; JALALUDINI, S.; HO, Y. W. Optimization of carbon and nitrogen sources of phytase production by *Mitsuokella jalaludini*, a new rumen bacterial species. *Letters in Applied Microbiology*, v. 35, p. 157-161, 2002.

LANE, M. M.; MORRISSEY, J. P. *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. **Fungal Biology Reviews**, v. 24, n. 1-2, p. 17–26, 2010.

LEI, X. G.; PORRES, J. M. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. *Biotechnology Letters*, v. 25, n. 21, p. 1787-1794, 2003.

LEMES, A. C.; ÁLVARES, G. T.; KALIL, S. J. Extração de B-galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 por método ultrassônico. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 2, p. 7–13, 2013.

LIU, S. Y. et al. 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**, v. 207, p. 159–167,

2015.

LOTT, J. N. A. et al. The critical role of phosphorus in world production of cereal grains and legume seeds. **Food Security**, v. 3, n. 4, p. 451–462, 2011.

MARLIDA, Y. et al. Isolation, characterization and production of phytase from endophytic fungus its application for feed. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 9, n. 5, p. 471–474, 2010.

MELOROSE, J.; PERROY, R.; CAREAS, S. No Title No Title. **Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015**, v. 1, 2015.

MONTEIRO, P. S. Produção e caracterização bioquímica de fitases de *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus niger* UFV-1 e suas aplicações em ração animal. Dissertação de Mestrado em Bioquímica Agrícola. Universidade Federal de Viçosa. 2011.

NUOBARIENE, L. et al. Phytase-active yeasts from grain-based food and beer. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 6, p. 1370–1380, 2011.

PANDEY, A. et al. Production, purification and properties of microbial phytases. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 3, p. 203–214, 2001.

QUAN, C. et al. Production of phytase in a low phosphate medium by a novel yeast *Candida krusei*. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 92, n. 2, p. 154–160, 2001.

QVIRIST, L.; CARLSSON, N.-G.; ANDLID, T. Assessing phytase activity—methods, definitions and pitfalls. **Journal of Biological Methods**, v. 2, n. 1, p. 16, 2015.

RABOY, V. Approaches and challenges to engineering seed phytate and total phosphorus. **Plant Science**, v. 177, n. 4, p. 281–296, 2009.

RANI, R.; GHOSH, S. Production of phytase under solid-state fermentation using *Rhizopus oryzae*: Novel strain improvement approach and studies on purification and characterization. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 22, p. 10641–10649, 2011.

ROOHANI, N. et al. Zinc and phytic acid in major foods consumed by a rural and a suburban population in central Iran. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 28, n. 1, p. 8–15, 2012.

SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V. Phytate-degrading enzymes in pig nutrition. **Livestock Science**, v. 113, n. 2-3, p. 99–122, fev. 2008.

SILVA VIVAS, J. M.; VIVAS, M.; DA SILVEIRA, S. F. Efeito da temperatura sobre o crescimento e esporulação in vitro de fungos hiperparasitas de

*Asperisporium caricae*. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v. 45, n. 1, p. 73–81, 2015.

SINGH, B.; SATYANARAYANA, T. Characterization of a HAP-phytase from a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile*. **Bioresource technology**, v. 100, n. 6, p. 2046–51, mar. 2009.

SINGH, B.; SATYANARAYANA, T. Phytases from thermophilic molds: Their production, characteristics and multifarious applications. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 7, p. 1391–1398, 2011.

SHAH, P.; BHAVSAR, K.; SONI, S.K.; KHIRE, MJ. Strain improvement and up scaling of phytase production by *Aspergillus niger* NCM 563 under submerged conditions. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**. V, 36, p.373-380, 2009.

TRAN, T. T. et al. A simple and fast kinetic assay for phytases using phytic acid-protein complex as substrate. **Analytical Biochemistry**, 2011.

USHASREE, M. V.; VIDYA, J.; PANDEY, A. Extracellular expression of a thermostable phytase (phyA) in *Kluyveromyces lactis*. **Process Biochemistry**, 2014.

VATS, P.; BANERJEE, U. C. **Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): An overview** **Enzyme and Microbial Technology**, 2004.

WICKLOW, D. T.; POLING, S. M. Antimicrobial activity of pyrrocidines from *Acremonium zeae* against endophytes and pathogens of maize. **Phytopathology**, v. 99, n. 1, p. 109–115, 2009.

WU, W. H. et al. Bioethanol production from taro waste using thermo-tolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* K21. **Bioresource Technology**, v. 201, p. 27–32, 2016.

ZHANG, G. Q., Dong, X. F., Wang, Z. H., Zhang, Q., Wang, H. X., Tong, J. M. Purification, characterization, and cloning of a novel phytase with low pH optimum and strong proteolysis resistance from *Aspergillus ficuum* NTG-23. **Bioresource Technology**, V. 101, p. 4125-4131, 2010.

## CONCLUSÕES GERAIS

As fitases são enzimas capazes de hidrolisar o fitato, um importante fator antinutricional de rações fornecidas a animais. O uso dessas enzimas já é uma realidade, pois aumenta a disponibilidade de fósforo e outros nutrientes e reduz a contaminação ambiental pelo excesso de fósforo nas fezes. Entretanto, seu alto custo diminui a competitividade do setor, o que estimula a busca por novas enzimas e tecnologias. O uso de resíduos agroindustriais como substratos de fermentação na produção dessas enzimas são uma alternativa para reduzir os custos e maximizar a produção.

As duas metodologias de fermentação (estado sólido e submersa) foram eficazes para a produção de fitases microbianas pelo fungo filamentoso *Acremonium zeae* B e pela levedura *Kluyveromyces marxianus*, respectivamente. Os extratos produzidos por esses microrganismos apresentaram características muito distintas, mas ambos com grande potencial para emprego industrial. Seu emprego isoladamente dependerá das condições de processamento a serem empregadas, mas o uso combinado desses extratos poderia fornecer ao processo as vantagens de cada um.