

ELIZABETH BÁRBARA EPALANGA PIRES

**ESTUDO ESTRUTURAL E DE CONSERVAÇÃO DE SEQUÊNCIAS E PRODUÇÃO
DE FITASE POR *Pichia pastoris* VISANDO SUA APLICAÇÃO PARA O AUMENTO
DA DIGESTIBILIDADE DE RAÇÕES PARA MONOGÁSTRICOS**

Tese 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 *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Monique Renon Eller

Coorientadores: Gabriel Cipriano Rocha
Pedro Marcus Pereira Vidigal
Valéria Monteze Guimarães

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

P667e
2022

Pires, Elizabeth Bárbara Epalanga, 1985-
Estudo estrutural e de conservação de sequências e
produção de fitase por *Pichia pastoris* visando sua aplicação
para o aumento da digestibilidade de rações para monogátricos /
Elizabeth Bárbara Epalanga Pires. – Vicososa, MG, 2022.
1 tese eletrônica (126 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndices.

Orientador: Monique Renon Eller.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.668>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Enzimas - Conservação. 2. Ácido fítico. 3. Fitase
- Aplicações industriais. 4. Enzimas - Estabilidade. 5. *Pichia
pastoris*. I. Eller, Monique Renon, 1986-. II. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Ciência e Tecnologia de
Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos. III. Título.

CDD 22. ed. 664.028

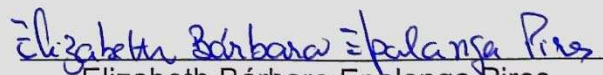
ELIZABETH BÁRBARA EPALANGA PIRES


**ESTUDO ESTRUTURAL E DE CONSERVAÇÃO DE SEQUÊNCIAS E PRODUÇÃO
DE FITASE POR *Pichia pastoris* VISANDO SUA APLICAÇÃO PARA O AUMENTO
DA DIGESTIBILIDADE DE RAÇÕES PARA MONOGÁSTRICOS**

Tese 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 *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 23 de agosto de 2022

Assentimento:


Elizabeth Bárbara Epalanga Pires
Autora


Monique Renon Eller
Orientadora

"O Senhor é Meu Pastor, de nada terei falta"

AGRADECIMENTOS

A Deus, o Autor e Provedor de todas as coisas.

À minha orientadora, Prof.a Monique Renon Eller, por toda paciência durante esses anos, por acreditar em mim quando não acreditei e fazer desse momento uma realidade.

Aos meus coorientadores, Prof.s Valéria Monteze Guimarães, Marcos Pedro Vidigal e Gabriel Cipriano Rocha, pela disponibilidade.

Ao Marcelo Pôleto, e Pedro Vidigal, pelo apoio incansável e disponibilidade manifestada para os estudos de bioinformática.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, e seus colaboradores, pelo apoio e pela oportunidade de estudo e pesquisa.

Ao Matheus Aragão, por toda ajuda e aprendizado partilhados ao longo dessa pesquisa.

À minha filha Luísa, cuja presença foi fundamental e desde pequena soube apoiar e compreender as minhas dificuldades e ausências.

À minha família, especialmente minha mãe e irmãos, pela força e apoio.

À minha amiga Nancy, pela amizade, carinho e cuidado, pelo apoio e incentivo durante toda a minha trajetória.

Aos amigos da Igreja, pela fé e crescimento partilhados, pela amizade, amor e carinho, por me fazer sentir em casa mesmo estando tão longe.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Processos Bioquímicos e Fermentativos, Neuza, Letícia, Lorena Ribeiro, Pedro Oliveira, Arthur, Marcela, Gabriel, Brenda, Lorena Pena, pelos bons momentos e apoio partilhados ao longo desse processo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela bolsa ofertada durante parte deste Doutorado.

À Agrocerec Multimix Nutrição Animal LTDA., pela confiança e pelos recursos disponibilizados.

Enfim, agradeço a todos que estiveram ao meu lado e que direta ou indiretamente contribuíram para este momento. Muito obrigada.

BIOGRAFIA

Elizabeth Bárbara Epalanga Pires, filha de Herculano Martinho Pires e de Ângela Kulembe, nasceu em Lobito-Angola, a 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 Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais, na área de concentração de Biotecnologia e Microbiologia Industrial, submetendo-se à defesa de dissertação no dia 28 de junho de 2016.

Em março de 2017 ingressou no doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais na mesma área.

Em fevereiro de 2020 submeteu-se ao exame de qualificação do doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, Minas Gerais.

RESUMO

PIRES, Elizabeth Bárbara Epalanga, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2022. **Estudo estrutural e de conservação de sequências e produção de fitase por *Pichia pastoris* visando sua aplicação para o aumento da digestibilidade de rações para monogástricos.** Orientadora: Monique Renon Eller. Coorientadores: Gabriel Cipriano Rocha, Pedro Marcus Pereira Vidigal e Valéria Monteze Guimarães.

A utilização eficiente dos nutrientes pelos animais é fator de grande relevância para indústria de nutrição animal. Esse resultado depende da eficiência da fitase sobre o complexo fitato-minerais, o qual representa, nos alimentos, um fator antinutricional pelo aprisionamento de nutrientes essenciais requeridos para o bom desempenho dos animais. No entanto, a pouca resistência a altas temperaturas e ao ambiente gástrico dos animais podem comprometer a aplicação dessa enzima, reduzindo assim a eficiência de utilização de nutrientes, com conseqüente problemas econômicos e ambientais. Para tal efeito, torna-se necessário a obtenção de uma fitase que seja capaz de hidrolisar o fitato nestas condições. Assim, entender o mecanismo de ação das fitases permitiria a obtenção de fitases com características adequadas requeridas para sua aplicação. Este trabalho teve como objetivos análise estrutural e estudos de conservação de fitases para otimização de uma fitase para aplicação industrial. Dessa forma, a primeira parte deste trabalho compreende a formação de um banco de dados de fitases e análises comparativas estruturais em relação às propriedades bioquímicas destas enzimas, a fim de compreender fatores que influenciam na estabilidade dessas enzimas. Outra etapa da pesquisa, consistiu no estudo de expressão e caracterização da fitase de *Dendroctonus frontalis*, selecionada entre as fitases estudadas por apresentar estabilidade térmica satisfatória. Foram também avaliados estudos de secagem dos extratos de fitase obtidos a partir desta, pelos métodos de liofilização e Spray Dryer. Com base nas propriedades bioquímicas e no alinhamento de sequências de aminoácidos, observamos alta variabilidade entre as fitases estudadas, com propriedades bioquímicas bastante distintas, apesar destas apresentarem semelhança estrutural. No entanto, na análise estrutural comparativa, o número de interações de Van der Waals, interações iônicas, hidrogênio e ligações dissulfeto que constituem essas fitases não explicaram as

diferenças nas suas propriedades bioquímicas. A sequência codificadora da fitase selecionada foi sintetizada no plasmídeo pPICZαB e expressa em *Pichia pastoris*. Após a clonagem e seleção dos transformantes, a expressão da fitase foi avaliada em diferentes composições de meios de cultivo e pHs. O uso dos meios mBMMH e BMMY em pH 5,0 promoveram um aumento de 3 vezes no nível de expressão da fitase em relação à expressão realizada em BMMH. A enzima expressa possuiu maior atividade em pH 4,0 e temperatura de 42 °C. Entretanto, sua estabilidade foi drasticamente reduzida quando submetida a temperaturas de 70 e 80 °C, por apenas 1 min. A secagem dos extratos por liofilização preservou 62 % da atividade enzimática, na presença de maltodextrina a 5 %. Na ausência desse composto, apenas 41 % de atividade foi recuperada. Os extratos submetidos a secagem por Spray Dryer, apresentaram maior atividade residual a 100 °C e 5 % de maltodextrina, acima desta condição a atividade reduziu significativamente. Embora a secagem dos extratos por Spray Dryer tenha causado redução significativa na atividade enzimática, o seu uso permitiu que o pó seja armazenado por pelo menos 240 dias à temperatura ambiente, sem perda de atividade. A partir deste estudo podemos concluir que o mecanismo de ação de uma fitase está intimamente relacionada a sua estrutura e sua eficiência precisa ser analisada individualmente de acordo ao sistema de expressão escolhido. Este trabalho pode auxiliar para uma melhor compreensão do mecanismo de ação das fitases e obtenção de novas fitases para aplicação comercial.

Palavras-chave: Ácido fítico. Fitase. Conservação de sequências enzimáticas. Aplicação industrial. Estabilidade enzimática.

ABSTRACT

PIRES, Elizabeth Bárbara Epalanga, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August 2022. **Structural and sequence conservation analysis and production of a phytase by *Pichia pastoris* aiming its application for improving the digestibility of feed for monogastrics.** Advisor: Monique Renon Eller. Co-advisors: Gabriel Cipriano Rocha, Pedro Marcus Pereira Vidigal and Valéria Monteze Guimarães.

The efficient use of nutrients by animals is a factor of great relevance for the animal nutrition industry. This result depends on the efficiency of phytase on the phytate-mineral complex, which represents an anti-nutritional factor in food, by trapping essential nutrients required for good animal performance. However, the low resistance to high temperatures and to the gastric environment of animals can compromise the application of this enzyme, thus reducing the efficiency of nutrient use, with consequent economic and environmental problems. For this purpose, it is necessary to obtain a phytase that is capable of hydrolyzing phytate under these conditions. Thus, understanding the mechanism of action of phytases would allow obtaining phytases with adequate characteristics required for their application. This work aimed at structural analysis and conservation studies of phytases to optimize a phytase for industrial application. Thus, the first part of this work comprises the formation of a phytase database and structural comparative analysis in relation to their biochemical properties, in order to understand factors that influence the stability of these enzymes. Another stage of the research consisted in the study of expression and characterization of phytase from *Dendroctonus frontalis*, selected among the phytases studied for presenting satisfactory thermal stability. Drying studies of phytase extracts obtained from phytase by lyophilization and Spray Dryer methods were also evaluated. Based on the biochemical properties and the alignment of amino acid sequences of the phytases studied, we observed high variability among the phytases studied, with very different biochemical properties, despite their structural similarity. However, in the comparative structural analysis, the number of Van der Waals interactions, ionic interactions, hydrogen and disulfide bonds that constitute these phytases did not explain the differences in their biochemical properties. The coding sequence of selected phytase was synthesized in plasmid pPICZαB and expressed in

Pichia pastoris. After cloning and selection of transformants, phytase expression was evaluated in different compositions of culture media and pH. The use of mBMMH and BMMY media at pH 5.0 promoted a 3-fold increase in the level of phytase expression in relation to the expression performed in BMMH. The expressed enzyme had higher activity at pH 4.0 and temperature of 42 °C. However, its stability was affected when submitted to temperatures of 70 and 80 °C, for only 1 min. Drying extracts by lyophilization preserved 62 % of the enzymatic activity, compared to the presence of 5% maltodextrin. In the absence of this compound, only 41 % of activity was recovered. The extracts subjected to drying by Spray Dryer, showed higher residual activity at 100 °C and 5 % maltodextrin, above this condition the activity was significantly reduced. Although drying the extracts by Spray Dryer caused a significant reduction in enzymatic activity, its use allowed the powder to be stored for at least 240 days at room temperature, without loss of activity. From this study we can conclude that the mechanism of action of a phytase is closely related to its structure and its efficiency needs to be analyzed individually according to the chosen expression system. This work can help to better understand the mechanism of action of phytases and obtain new phytases for commercial application.

Keywords: Phytase. Phytic acid. Enzyme sequence conservation. Industrial application. Enzyme stability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do ácido fítico.....	21
Figura 2: Hidrólise do ácido fítico pela fitase.	23
Figura 3: Regiões de hidrólise do ácido fítico por fitases no percurso do trato digestivo de aves	24
Figure 4: Clustering of phytase amino acid sequences using the Neighbor-Joining method.....	61
Figure 5: Structure of modeled phytases illustrating the conserved RHGVRAP/HD active site.....	62
Figure 6: Multiple alignment of the 17 phytase sequences from cluster 3.....	64
Figure 7: Structural alignment between cluster 3 sequences, highlighting the structural similarity between them.....	68
Figure 8: Number of predict interactions and the ideal temperature and pH of the phytases from cluster 3.....	68
Figure 9: Overlay of predicted structures highlighting the location of disulfide bonds.....	70
Figure 10: Activity of the KM873028 phytase expressed in <i>Pichia pastoris</i>	72
Figura 11: Confirmação da linearização do plasmídeo pPICZ α B extraído.....	109
Figura 12: Confirmação da recombinação e inserção do gene em <i>Pichia pastoris</i>	110
Figura 13: Eletroforese do sobrenadante dos cultivos dos transformantes, após processo de indução.....	111
Figura 14: Indução da expressão de fitase por <i>Pichia pastoris</i> em meio BMMY (A) e BMMH (B).....	112
Figura 15: Influência do pH na produção de fitase recombinante por <i>Pichia pastoris</i> por 48 (A) e 72 h (B) de indução em diferentes composições de meio.....	113
Figura 16: Atividade da fitase KM873028 expressa em <i>Pichia pastoris</i>	115
Figura 17: Estabilidade do extrato enzimático ao longo do armazenamento à temperatura ambiente. A: Extrato seco a 100 °C; B: Extrato seco a 130 °C; C: Extrato seco a 140 °C.....	119

LISTA DE TABELAS

Table 1. Biochemical characteristics available in the literature about the 17 phytases from cluster 3.....	65
Tabela 2: Meios testados para produção da fitase recombinante por <i>Pichia pastoris</i>	105
Tabela 3: Atividade residual dos extratos de fitases submetidos a secagem por Spray dryer.....	118

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 – Produção de aves e suínos no Brasil	18
2.2 – O fitato como componente antinutricional em rações	20
2.3 – Fitases: atividade e classificação	22
2.3 – Fitase: aplicações	26
2.3.1 – Aplicação de fitases para alimentação animal	26
2.3.2 – Outras aplicações das fitases	28
2.4 – Fatores que influenciam na eficiência das fitases	30
2.5 – Estabilizadores enzimáticos para aplicação comercial	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
CAPITULO I	53
SEQUENCE DIVERSITY AND CATALYTIC PROPERTIES OF PHYTASES	53
Artigo publicado pela revista Research, Society and Development em 06 de agosto de 2022.	53
Abstract	54
1 – INTRODUCTION	55
2 – METHODOLOGY	56
2.1 – Generating a phytase sequence database	56
2.2 – Sequence grouping based on similarity	56
2.3 – Generation of three-dimensional models, quantification and analysis of intramolecular interactions	57
2.4 – Phytase selection and expression	58
3 – RESULTS AND DISCUSSION	59
3.1 – Phylogenetic analysis and sequence similarity	59
3.2 – Multiple Sequence Alignment	62
3.3 – Quantification and analysis of interactions of the structural models	67
3.4 – Selection and expression of the phytase KM873028, from <i>Dendroctonus frontalis</i>	71
4 – CONCLUSION	72
REFERENCES	74

APÊNDICE	80
CAPITULO II	99
PRODUÇÃO E CONSERVAÇÃO DE UMA FITASE VISANDO A APLICAÇÃO PARA AUMENTO DA DIGESTIBILIDADE DE RAÇÕES PARA MONOGÁSTRICOS	99
RESUMO	99
1. INTRODUÇÃO	100
2. MATERIAL E MÉTODOS	101
2.1 – Seleção e síntese do gene	101
2.3 – Transformação em <i>Pichia pastoris</i> (<i>Komagataella phaffii</i>)	103
2.4 – Reação de amplificação	104
2.5 – Indução de expressão do gene produtor da fitase por <i>Pichia pastoris</i>	104
2.6 – Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida	105
2.7 – Determinação da concentração de proteínas	106
2.8 – Teste de atividade de fitase	106
2.9 – Determinação do efeito do pH e temperatura sobre a atividade enzimática	107
2.10 – Determinação estabilidade térmica e ao pH	107
2.11 – Testes de secagem	107
2.11.1 – Secagem do extrato por Spray Dryer	107
2.11.2 – Secagem do extrato por liofilização	108
2.12 – Estabilidade do extrato enzimático seco	108
3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	109
3.1 – Clonagem e produção da enzima em sistema heterólogo	109
3.2 – Expressão de fitases recombinante por <i>P. pastoris</i> em diferentes composições e condições de cultivo	111
3.3 – Caracterização bioquímica da fitase	114
3.4 – Testes de secagem e estabilização dos extratos de fitase	117
4 – CONCLUSÃO	120
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
CONSIDERAÇÕES FINAIS	126

1. INTRODUÇÃO GERAL

O fósforo desempenha um papel fundamental no desenvolvimento dos animais (WANG *et al.*, 2018; VILLAMIZAR, *et al.*, 2019; VERARDI *et al.*, 2019) e é obtido pela dieta principalmente a partir de cereais como milho e soja, os quais também são fontes de outros nutrientes essenciais. No entanto, nesses vegetais grande parte do fósforo inorgânico está presente na forma de sais insolúveis de ácido fítico (ABD EL-HACK *et al.*, 2018; CHHABRA, 2019; KUMAR *et al.*, 2019; CORRÊA e ARAÚLO, 2020; FABARODRIGUEZ *et al.*, 2022). O ácido fítico é uma molécula formada por um anel mio inositol ligado a seis moléculas de fósforo (mioinositol-1,2,3,4,5,6-hexaquisfosfatos) (MUKHAMETZYANOVA *et al.*, 2012). Entretanto, animais monogástricos não conseguem assimilar o fósforo presente nestes alimentos devido à presença limitada ou ausência de fitases no trato digestivo. Além disso, quando em solução, o ácido fítico se liga a outros minerais (Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+}) (NIÑO-GÓMEZ *et al.*, 2017; VASUDEVAN *et al.*, 2019; SUN *et al.*, 2021), proteínas e aminoácidos formando o fitato. Assim, esse composto atua como um componente antinutricional, impedindo a absorção desses nutrientes essenciais ao desempenho produtivo (JORQUERA *et al.* 2008; GESSLER *et al.*, 2018; SARKHEL e ROY 2022).

Na produção de suínos e aves, a baixa disponibilidade de fosfatos livres nas rações leva à necessidade de suplementação da dieta com fosfato bicálcico, um mineral não renovável e de alto custo, para suprir a demanda desses nutrientes pelos animais (CHEN *et al.*, 2019; ARREDONDO *et al.*, 2019; ATTIA *et al.*, 2020). Isso leva a um excesso de excreção de fósforo, com conseqüente necessidade de tratamentos do esterco para redução das concentrações desse composto o qual, se despejado nos solos, poderia contribuir para poluição ambiental (GILES *et al.* 2011; GESSLER, 2018; MKUMBE *et al.*, 2022).

Vários métodos têm sido usados na tentativa de minimizar o efeito do fitato e assim aumentar a disponibilidade de minerais e outros nutrientes nas rações, como moagem, cozimento, germinação, fermentação e processamento térmico (SARKHEL e ROY 2022; KUMAR *et al.*, 2022; CHAUHAN *et al.*, 2022). O uso de preparações enzimáticas contendo fitases é uma estratégia eficiente para esse problema. Estas

enzimas hidrolisam o fitato e permitem a liberação de fósforo, além de proteínas e outros minerais, tornando-os disponíveis para a nutrição dos animais (MCCORMICK *et al.*, 2017; ARREDONDO *et al.*, 2019; TAKAGI *et al.*, 2019; HONG e KIM, 2021; SUN *et al.*, 2021; WU *et al.*, 2021; DERSJANT-LI *et al.*, 2022; ZHAI *et al.*, 2022; ZHANG *et al.*, 2022). O uso dessa enzima reduz também os custos de alimentação e ainda a contaminação do solo e reservas de água pelo excesso de nutrientes eliminados nas fezes dos animais resultantes da não digestão desses elementos (HELIAN *et al.*, 2020; JING *et al.*, 2021).

Fitases podem ser obtidas de plantas, animais e microrganismos, sendo estes últimos o grupo mais conhecido e estudado para fitases de interesse comercial, representando cerca de 85 % das fitases estudadas (GRAND VIEW RESEARCH, 2022). Entretanto, os custos de produção das fitases comercialmente disponíveis, além de suas características bioquímicas, restringem sua aplicação pela indústria. Por isso, a busca pelo aprimoramento de processos industriais e biotecnológicos são incentivados, visando principalmente a melhoria de propriedades importantes para aplicações industriais, como pH de atuação, atividade específica e estabilidade térmica, além da redução dos custos de produção (SHIVANGE *et al.*, 2016, NIU *et al.*, 2017, ZHANG *et al.*, 2020).

Atualmente o Brasil está entre os principais produtores e exportadores de carne de frango e suínos, porém, até ao momento, as fitases adicionadas às rações são importadas, especialmente da China. Considerando que 75 % dos custos de produção animal estão relacionados à alimentação, somado ao aumento do preço de insumos e da cotação da moeda estrangeira frente ao real, o uso de fitases na alimentação de monogástricos no Brasil compromete a rentabilidade da produção e se torna inviável para diversos produtores. Além disso, a redução do impacto ambiental por criações animais é uma questão social significativa, por isso desenvolver tecnologias que aumentem a produtividade e que tornem os sistemas de produção ambientalmente sustentáveis é de fundamental importância. Assim, considera-se estratégico o desenvolvimento de uma tecnologia nacional para a produção de fitases para alimentação animal.

Dessa forma, uma parceria foi estabelecida em 2014 pelo Laboratório de Processos Bioquímicos e Fermentativos (LAPROBQI), da Universidade Federal de Viçosa, e a empresa Agrocerec Multimix® Nutrição Animal LTDA., para realização de pesquisas com enzimas visando aumento da digestibilidade de rações para

monogástricos. Inicialmente, optou-se pela busca por microrganismos naturalmente produtores de fitase e otimização do processo produtivo, sendo selecionada a levedura *Kluyveromyces marxianus* como candidata potencial (PIRES, 2016; PIRES *et al.*, 2019). Entretanto, observou-se instabilidade na expressão da enzima em ambiente de laboratório, o que levou à necessidade de estudos aprofundados sobre as enzimas já caracterizadas pela literatura visando a seleção de uma enzima com potencial para aplicação industrial e seu melhoramento para expressão em sistema recombinante. Sendo assim, o objetivo geral desse trabalho foi criar um banco de dados com as sequências de fitases disponíveis na literatura e já caracterizadas, a fim de selecionar uma candidata em potencial para produção e aplicação biotecnológica (Capítulo 1); e clonar, expressar e caracterizar a fitase selecionada, visando a avaliação de sua produtividade em sistema recombinante, e avaliar suas características bioquímicas visando a aplicação pretendida (Capítulo 2). A obtenção de uma fitase expressa com alta produtividade e que mantivesse sua atividade após o processamento da ração (80 °C por 2 min) poderia minimizar a dependência do país frente ao mercado externo para aquisição dessas, aumentando a rentabilidade da produção de aves e suínos e a competitividade dos produtores brasileiros.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – *Produção de aves e suínos no Brasil*

A suinocultura e a avicultura no Brasil ocupam posição de destaque no cenário mundial, no qual o Brasil é o 4º maior produtor e exportador de carne suína, contribuindo com 12,4 % do mercado internacional. A produção de aves se mantém concentrada nos últimos anos em países como China, Brasil e Estados Unidos, sendo este último o líder do ranking mundial, enquanto China e Brasil competem pelo segundo lugar. Essa disputa foi acarretada primeiramente pelo surto de Influenza Aviária em 2016 na China, que levou à interrupção da expansão da sua produção. No entanto, o País voltou a ter expressivo crescimento, atingindo uma produção de 13,8 milhões de toneladas em 2019, deixando o Brasil na terceira posição. Atualmente, o Brasil ocupa a segunda posição em produção, sendo o líder em exportação (EMBRAPA, 2022).

No relatório anual realizado pela Associação Brasileira de Produtores de Aves (ABPA, 2022), é possível observar uma oscilação na taxa de produção de aves no Brasil nos últimos anos, sendo mantido um crescimento em torno de 3 % em 2021 em relação a 2020 e, em relação à exportação, um aumento de 8,96 %. Em junho de 2022 os dados de exportação superaram em 8,8 % devido à forte demanda externa, quando comparado ao mesmo período do ano anterior.

Apesar do crescimento constante da produção de aves e suínos observado nos últimos anos, a produção animal como um todo tem sido afetada expressivamente pelo encarecimento das matérias-primas para produção das rações. Segundo o relatado por Cowieson (2022), as limitações desencadeadas pelo período de pandemia de Covid-19, associadas ao conflito entre Rússia e Ucrânia (em curso), geraram uma grave escassez de matérias-primas como trigo, farelo de girassol, óleo e milho, levando à instabilidade no preço dos insumos (Feed and Additive, 2022). Esta situação vem sendo agravada pela escassez de mão-de-obra especializada, além da crise no fornecimento de energia e derivados do petróleo. Como a ração representa cerca de 75 % do custo total de produção animal (ARAUJO, 2005; FERREIRA *et al.*, 2013), prevê-se uma fragilidade

deste setor por eventos associados principalmente ao elevado preço destes insumos, impactando assim nos custos de produção.

Embora o Brasil ocupe um lugar de destaque no ranking mundial de produção animal, a oscilação na produção e no preço pago pela carne, associada ao aumento expressivo nos preços dos insumos para ração animal, observado desde 2016 (ABCS, 2016; EMBRAPA, 2018) e agravada a partir de 2019, reduziram a lucratividade do setor. Segundo a EMBRAPA (2022), no início do ano de 2022 foi observado um aumento de 6,50 % e 5,13 % nos custos de produção de suínos e frangos, respectivamente, em relação a dezembro de 2021. Este aumento é influenciado, principalmente, pelas variações nos custos de insumos, especialmente milho, o qual aumentou mais de 200 %, o que tem preocupado bastante os produtores de suínos e aves brasileiros, visto que este é um dos principais componentes da alimentação desses animais.

Visando mitigar este problema, um adequado planejamento da atividade é fator primordial para sua manutenção e geração de lucro para, conseqüentemente, manter ou aprimorar a capacidade competitiva do País frente ao mercado externo. Para isso a produção precisa estar associada a técnicas que maximizem e promovam a eficiência do uso de nutrientes e minimizem a perda de ingredientes. 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. Dentre estas tecnologias, está a adição de enzimas exógenas à ração.

O mercado global de enzimas movimenta cerca de US\$ 12,28 bilhões de dólares por ano, com uma estimativa de crescimento de até 6,5 % até 2030 (GRAND VIEW RESEARCH, 2022). As enzimas industriais correspondem a aproximadamente 60% do mercado total de enzimas. Elas estão divididas em três grupos: enzimas técnicas, destinadas à indústria têxtil e de produtos de limpeza; enzimas para alimentos e bebidas; e enzimas para ração animal, em grande crescimento devido ao interesse dos criadores de aves e suínos em maximizar a produtividade pelo aumento do valor nutricional da ração, reduzindo a adição de ingredientes para produção. As principais enzimas usadas

como esse objetivo são proteases, amilases, lipases, celulasas, xilanases e fitases (KIRK *et al.*, 2002; MACCABE, 2007; SINGH *et al.*, 2016),

Em se tratando especificamente da indústria de enzimas para alimentação animal, a receita gerada a partir da comercialização desses aditivos foi de US \$ 1,3 bilhões em 2020, com perspectivas de um aumento de 8,1 % até 2027. Dentre as diferentes enzimas do mercado para alimentação animal, a fitase constitui o mercado em maior crescimento (ANIMAL FEED PHYTASE MARKET, 2022). Entretanto, o fornecimento dessas enzimas para produtores brasileiros é feito por empresas de países como China, Japão e Estados Unidos, o que torna seu custo alto e, muitas vezes, inviabiliza sua aplicação, apesar dos benefícios associados à sua adição às rações.

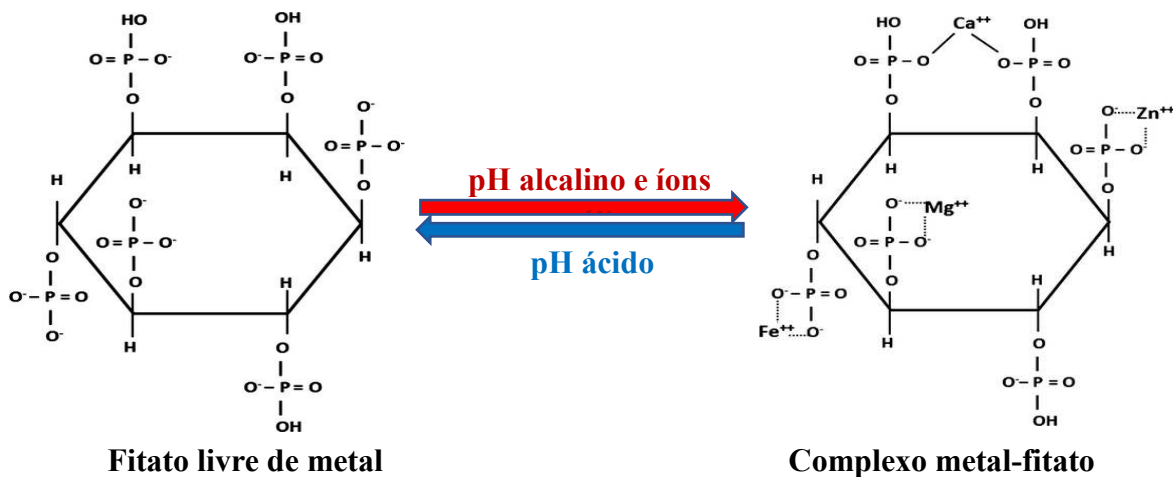
2.2 – O fitato como componente antinutricional em rações

O fitato (hexafosfato de mio-inositol), também conhecido como fitina e ácido fítico, é uma molécula encontrada naturalmente na maioria dos vegetais utilizados na alimentação de animais monogástricos (ABD EL-HACK *et al.*, 2018; CHHABRA, 2019; KUMAR *et al.*, 2019; CORRÊA; ARAÚLO, 2020). Ele localiza-se na camada celular de aleurona de sementes e é acumulado durante o desenvolvimento da planta (BEDFORD; SCHULZE, 1998; KUMAR *et al.*, 2010). Dessa forma, a maioria dos alimentos vegetais como por exemplo cereais, leguminosas, castanhas e oleaginosas constituem uma reserva de fósforo na forma de ácido fítico, representando cerca de 60 % a 90 % do teor total de fósforo nestes alimentos (CORRÊA e ARAÚJO 2020).

O ácido fítico é um ácido carboxílico com um pKa menor que 3,5, e que possui em sua estrutura seis grupos fosfatos ao redor do anel Inositol. Cada fosfato possui dois grupos OH dissociáveis, possuindo assim 12 prótons ou sítios reativos que podem ser substituídos ou totalmente ligados a uma faixa de pKa que varia de 4,6 a 10 (HUMER; SCHWARZ; SCHEDULE 2015). Essa característica confere a esta molécula um forte potencial de quelação com cátions divalentes, principalmente Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} e Fe^{2+} (Figura 1), o qual é mais intensa em meios com pH neutro a básico, nos quais a eletronegatividade é aumentada. Nesses ambientes, o fitato forma complexos insolúveis

e, conseqüentemente, torna esses nutrientes indisponíveis para serem absorvidos pelo animal (VOHRA *et al.*, 1965; SUN *et al.*, 2021).

Figura 1: Estrutura do ácido fítico mostrando sua afinidade para diversos íons. O ácido fítico forma complexos com cátions divalentes pH-dependente e limita a absorção de micronutrientes.



Fonte: Adaptado de Oh *et al.*, (2004); Humer; Schwarz e Schedle, (2014).

O fitato também pode dificultar a absorção de algumas proteínas, o que ocorre de forma pH-dependente, uma vez que a interação entre fitato-proteínas possui natureza iônica. A proteína tem uma carga líquida positiva quando o seu pI excede o pH da solução. Nessas circunstâncias, os seis grupos fosfatos carregados negativamente se conectam diretamente à cadeia lateral de aminoácidos básicos por interação eletrostática, formando uma rede ou complexo insolúvel. A ligação fitato-proteína pode acarretar no bloqueio do sítio ativo das enzimas digestivas, resultando assim na redução da atividade enzimática, solubilidade das proteínas e digestibilidade (RAVINDRAN *et al.*, 1999; COWIESON *et al.*, 2006; BYE *et al.*, 2013; DARBY *et al.*, 2017).

O fitato forma sabões metálicos no lúmen intestinal resultante da reação do fitato com ácidos graxos durante o processo de digestão de gorduras, limitando o aproveitamento energético das fontes lipídicas (LIMA *et al.*, 2007).

A pouca disponibilidade de nutrientes leva a uma redução do desempenho do animal como crescimento retardado, diminuição da fertilidade, entre outros, o que se traduz em menor produção e rentabilidade do sistema de criação (HAN *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 2006). Além disso, para suprir as exigências nutricionais requeridas pelo organismo, o fosfato bicálcico precisa ser adicionado à dieta (VIEIRA *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2019), o que é oneroso e leva à excreção de grandes quantidades de fósforo e componentes orgânicos pelos animais, gerando despesas com o tratamento dos rejeitos e contaminando solos e cursos d'água, principalmente em áreas de intensa criação. O fósforo acumulado no solo é transportado pelos mananciais. Esse processo a longo prazo pode levar a problemas ambientais graves como a eutrofização, (DAHIYA, 2016), que leva ao consumo de oxigênio dos corpos de água pelos microrganismos para decomposição do excesso de nutrientes, provocando assim, a morte da fauna aquática devido à hipóxia (ROSTAMI; GIRI, 2013; COBAN; DEMIRCI, 2014).

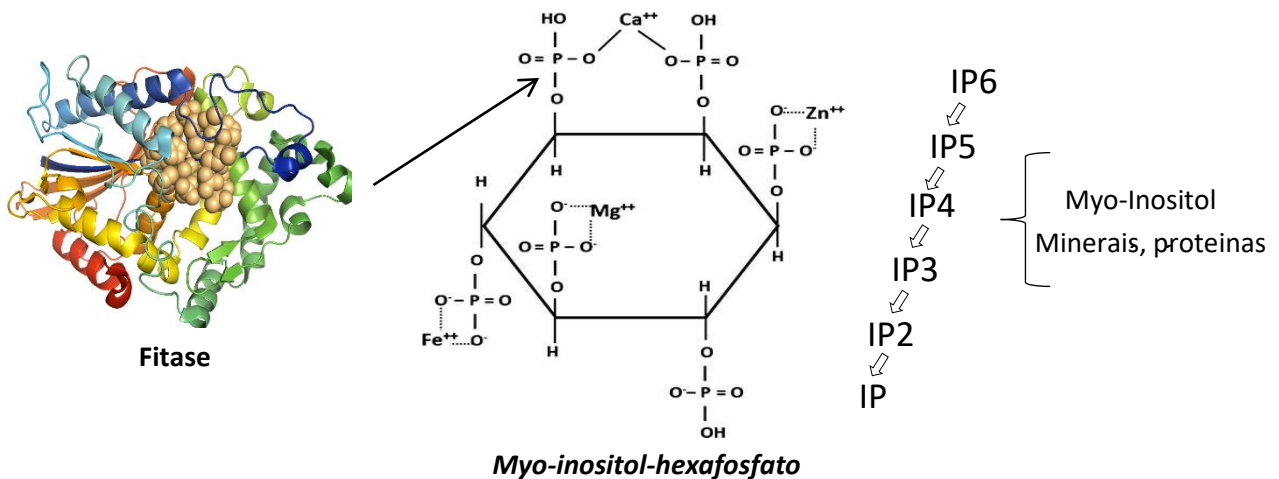
Considerando, portanto, o grave efeito do fitato sobre a digestibilidade dos nutrientes presentes na ração, percebe-se que a sua hidrólise é essencial não somente para a disponibilização do fósforo aos animais, mas também para ganho generalizado de desempenho por meio da melhoria na absorção de nutrientes pelos animais (KUMAR, SINHA, KAJBAF, 2019). Entretanto, animais monogástricos, não possuem em seu sistema digestivo enzimas capazes de eficientemente realizar esse processo (NIU *et al.*, 2017), portanto elas precisam ser adicionadas à ração.

2.3 – Fitases: atividade e classificação

Fitases são enzimas fosfolitolíticas que fazem a remoção gradual dos fosfatos até fósforo orgânico (Figura 2). A hidrólise do ácido fítico pela fitase aumenta a disponibilidade e aproveitamento de fósforo pelo animal (HUBER; ZELLER, 2015; MKUMBE *et al.*, 2022). Além disso, esta hidrólise resulta também em um aumento de disponibilidade dos minerais ligados à molécula como cálcio, ferro, zinco, magnésio, nitrogênio e melhora a utilização de energia, disponibilidade de aminoácidos, bem como lípidos, proteínas e carboidratos. O aumento da disponibilidade destes nutrientes pode favorecer o desempenho dos animais, proporcionando ganho de peso e eficiência

alimentar (TEJEDOR *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2011; TAKAGI *et al.*, 2019; ZHAI *et al.*, 2022).

Figura 2 – Representação esquemática da hidrólise do ácido fítico pela fitase. A fitase hidrolisa o fitato de forma gradual até inositol livre e permite a liberação de micronutrientes e proteínas, aumentando a disponibilidade desses para absorção pelos animais.



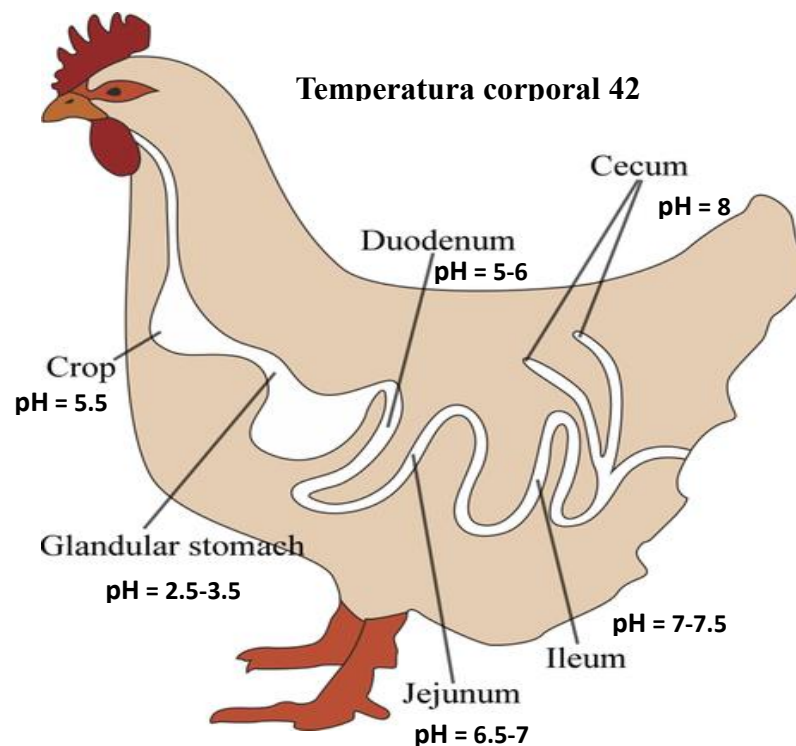
Fonte: Oh *et al.*, (2004)

As fitases foram descobertas em farelo de arroz por SUZUKI *et al.*, (1907) e sua comercialização data de 1991 (HAEFNER *et al.*, 2005) como uma resposta à necessidade de reduzir da dieta de animais a farinha de carne e ossos e a suplementação com fósforo inorgânico (VIEIRA *et al.*, 2019). Uma fitase produzida por *Aspergillus ficuum* foi adicionada à dieta de aves pela primeira vez em 1993. Isso levou ao aumento no ganho de peso (desempenho) dos animais e no teor de cinzas ósseo, indicando que as aves foram capazes de absorver eficientemente o fósforo fítico (KUMAR; SINHA; KAJBAF, 2019). Desde então, as fitases têm sido isoladas de plantas (ERPEL, RESTOVIC e ARCE-JONHSON 2016), mucosa intestinal (TROUILLEFOU *et al.*, 2015) e principalmente de microrganismos, como fungos (TARIQ *et al.*, 2017), bactérias (SANTOS *et al.*, 2019) e leveduras (PROMDONKOY *et al.*, 2008; USHASREE *et al.*, 2014).

As fitases atuam de forma distinta e, de acordo com a estabilidade térmica e gástrica, afinidade ao substrato e variação do pH, levam à liberação de diferentes nutrientes. Sua ação no trato gastrointestinal depende da habilidade da enzima

desenvolver sua atividade catalítica em diferentes valores de pH, que variam entre 2,5-8,0, distribuídos nos diferentes compartimentos do trato gastrointestinal (Figura 3). Portanto, dependendo do tipo de fitase adicionada, sua atividade poderá ocorrer em locais diferentes do trato gastrointestinal e, conseqüentemente, haverá diferenças na efetividade do processo (KONIETZNY; GREINER, 2002; RAVINDRAN 2013; NEZHAD *et al.*, 2020).

Figura 3: Regiões de hidrólise do ácido fítico por fitases no percurso do trato digestivo de aves



Fonte: Adaptado de Ravindran (2013) e Zeng *et al.*, (2018)

Com base nas diferenças estruturais e mecanismo de ação, as fitases podem ser agrupadas em fitases ácidas (fosfatases ácidas de histidina - HAPs), fitases alcalinas (β -propeller - β PP), cisteína fosfatases e fosfatases ácidas roxas (metalloenzyme-PAP).

As HAPs são as fitases mais estudadas e utilizadas para ração animal. Atuam em meios com pH na faixa de 2,5 a 5 (SULEIMANOVA *et al.*, 2015) e possuem em sua

estrutura uma sequência conservada de heptapeptídeo (RHGVRAP) e um dipeptídeo (HD) em seu sítio ativo para sua atividade catalítica (NIU *et al.*, 2017; GORDEEVA *et al.*, 2020; TKACHENKO *et al.*, 2021). Devido à sua ótima atividade em pH ácido, possuem grande potencial para serem aplicadas na alimentação de aves devido às características do trato gastrointestinal destes animais. Além disso, estas enzimas apresentam eficiência sobre ampla variedade de substratos (SATO, 2015).

As β PP, descritas como fitases alcalinas, são encontradas principalmente em bactérias, particularmente, espécies de *Bacillus* spp. e, menos comumente em fungos (SANANGELANTONI *et al.*, 2018; HOU *et al.*, 2020). Este grupo de fitases possui ótima atividade em pH neutro (6-8) e alta termoestabilidade quando comparadas às HAPs. Por este motivo, têm sido consideradas como candidatas à aplicação industrial. Sua atividade é muitas vezes dependente de íons cálcio, na interação entre a enzima e os resíduos do substrato, carregados negativamente (JANG *et al.*, 2018; SANANGELANTONI *et al.*, 2018; HOU *et al.*, 2020). No entanto, essa classe de fitases é unicamente específica para ácido fítico, especialmente fitato de cálcio, não apresentando atividade em outros substratos (IDRISS *et al.*, 2002), além de apresentarem baixa atividade específica, ainda que em condições ótimas de reação (CHEN; YU; YE, 2016).

As fitases ainda podem ser classificadas de acordo com a localização em que a enzima inicia a hidrólise na molécula do anel hexafosfato de mio inositol para liberação do fósforo, como descrito pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) e a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB). Nesse caso, elas são divididas em 3-fitase (EC 3.1.3.8 ou mio-inositol hexacifosfato 3-fosfo-hidrolase), 5-fitase (CE 3.1.3.72 ou mio-inositol hexacisfosfato 5-fosfo-hidrolase) e 6-fitase (EC 3.1.3.26 ou mio-inositol hexacifosfato 6-fosfo-hidrolase), as quais iniciam a hidrólise no carbono 3, 5 e 6 do anel, respectivamente. Conforme o pH da atividade, temos ainda as fosfatases ácidas (pH 5,0), neutras (pH 7,0) ou alcalinas (pH 8,0).

2.3 – Fitase: aplicações

2.3.1 – Aplicação de fitases para alimentação animal

A principal atuação da fitase é ainda a indústria de rações para animais, representando esta cerca de 70 % de sua aplicação (SINGH; SATYANARAYANA, 2015). Muitos trabalhos fornecem evidências de que a suplementação da ração com fitase como substituição ao fósforo inorgânico aumenta a utilização de fósforo fítico e outros nutrientes pelo animal (HUBER e ZELLER, 2015; MCCORMICK *et al.*; ARREDONDO *et al.*, 2019; TAKAGI *et al.*, 2019; SUN *et al.*, 2021; WU *et al.*, 2021; DERSJANT-LI *et al.*, 2022; ZHAI *et al.*, 2022; ZHANG *et al.*, 2022; BECKER *et al.*, 2022), assim como reduzem a excreção de fósforo (JING *et al.*, 2021) por diferentes espécies animais.

Em frangos, a suplementação das rações com fitase favoreceu o aumento da disponibilidade do cálcio e fósforo, bem como melhoria significativa na digestibilidade de carboidratos e proteínas (TEGEDOR *et al.*, 2001); e reduziu significativamente a excreção de aminoácidos endógenos e de minerais como cálcio, sódio, fósforo fítico e ácido siálico (COWIESON *et al.*, 2004). A adição de uma fitase bacteriana na ração melhorou o desempenho de frangos de corte em função da maior disponibilidade dos minerais, com maior deposição de cinzas na tíbia (SANTOS, 2016) e pelo aumento da digestibilidade do amido e disponibilidade da proteína (KNUCKLES; BETSCHAT, 1987; TRONG *et al.*, 2015). A aplicação de 1000 unidades de fitases (FTU) bacteriana na ração de frango de corte deficiente em fósforo e aminoácidos resultou em um aumento da retenção de fósforo, nitrogênio, aminoácidos e energia, além do teor de cinzas na tíbia (DERSJANT-LI *et al.*, 2022). A adição de até 4000 FTU permitiu a hidrólise de 96 % do ácido fítico e resultou em maior desempenho das aves (TAKAGI *et al.*, 2019).

Zhai *et al.* (2022) observaram um aumento significativo sobre a digestibilidade ileal de fósforo e melhoria na produção e qualidade dos ovos em aves de postura após a adição da fitase na dieta. Arredondo *et al.* (2019) observaram que o aumento crescente da concentração de fitase de *Escherichia coli* na dieta base de farelo de milho e soja aumentou a disponibilidade de cálcio, fósforo, potássio, sódio, magnésio e zinco e digestibilidade total aparente do trato digestivo. Níveis crescentes de fitase também

promoveram o desempenho e mineralização óssea de frangos em crescimento (HAMDI *et al.*, 2018), digestibilidade ileal de energia, proteína (WOYENGO e WILSON, 2019), nitrogênio (LEE *et al.*, 2020), aminoácidos, lipídios e amido (CAMDEN *et al.*, 2001). Patos Cherry Valley alimentados com dietas à base de milho, farelo de soja e farelo de colza também apresentaram melhoria na utilização de fósforo, desempenho de crescimento e desempenho ósseo (WU *et al.*, 2021).

Para suínos, a adição de fitase exógena aumentou a biodisponibilidade de fósforo em 38 %, 12 % e 15 % em rações contendo milho, trigo e triticales, respectivamente (DUNGELHOEF *et al.*, 1994). Também possibilitou a redução da adição de zinco em, aproximadamente, 30 % em uma dieta à base de milho e soja (REVY *et al.*, 2006). McCormick *et al.* (2017) observaram que a suplementação de rações com fitases melhorou linearmente a digestibilidade e retenção de fósforo, cálcio, nitrogênio, digestibilidade e retenção energética em suínos, além de ganho de peso, eficiência no consumo de ração e digestibilidade ileal aparente em frangos.

A morfologia intestinal, como altura de vilosidades, fornece dados importantes para medição da capacidade absorptiva da mucosa intestinal. O aumento do tamanho das vilosidades aumenta a área de contato dos enterócitos com o alimento, e conseqüentemente a área de absorção dos nutrientes. Além disso, o ganho de peso está diretamente relacionado com a integridade morfofuncional do sistema digestivo (GOPINGER *et al.*, 2014). Devido a isto, a utilização de fitase na dieta animal está indiretamente relacionada com a melhora da saúde intestinal (PTAK *et al.*, 2015), uma vez que também atua na produção de mucina intestinal (BEDFORD e COWIESON, 2012), elemento importante como suprimento para saúde ou modulação da microbiota intestinal. Isso pode ser observado por meio do aumento na altura das vilosidades do duodeno das aves que consomem rações suplementadas com fitases (WU *et al.*, 2004), ou pelo aumento de peso e do comprimento do trato intestinal de aves que consomem dieta rica em fitase (AKYUREK *et al.*, 2011).

Em porcos, a disponibilidade de fósforo no intestino favoreceu o aumento do número ileal de bactérias estritamente anaeróbias dos grupos *Clostridium coccoides*, *Clostridium leptum* e *Bacteroides-Prevotella-Porphyrmonas* (METZLER-ZEBELI *et al.*, 2010). Os autores ainda observaram uma redução na concentração fecal de butirato e

uma tendência para redução de ácidos graxos de cadeia curta, isovalerato e isobutirato das fezes resultantes da dieta suplementada com fitase, sugerindo um aumento no consumo desses ácidos graxos pelo hospedeiro ou uma redução no intestino grosso Ptak *et al.* (2015) confirmaram a eficiência da fitase como modulador da microbiota intestinal por meio do aumento significativo de *Lactobacillus spp.*, gênero bacteriano normalmente associados ao desenvolvimento de uma correta modulação de microbiota intestinal. O uso da fitase também incrementou a presença de ácidos graxos de cadeia curta e ácido acético no íleo.

2.3.2 – Outras aplicações das fitases

Além dos conhecidos benefícios sobre a aplicação de fitases em rações para animais, vários estudos têm demonstrado e considerado a possibilidade de atuação da fitase em outras áreas, as quais serão detalhadas a seguir.

O fitato também é considerado um fator antinutricional na dieta humana (SONG *et al.*, 2018), principalmente em dietas vegetarianas e veganas, e aquelas à base de cereais, comprometendo a saúde do organismo pela deficiência oculta de minerais (World Health Organisation, 2008). Assim, o uso de fitases na alimentação poderia favorecer a disponibilidade de nutrientes e reduzir a ocorrência de doenças associadas à deficiência de minerais essenciais. A adição de fitases também poderia contribuir para melhoria do processamento de alimentos, conforme relatado para tratamento de cereais (SAXENA *et al.*, 2020), no processamento de pão (IGLESIAS-PUIG; MONEDERO; HAROS, 2015; KARAMAN; SAGDIC; DURAK, 2018), isolamento de proteínas vegetais (FREDRIKSON *et al.*, 2001; XIANG *et al.*, 2021), fracionamento de cereais (KVIST *et al.*, 2005) e produção de cerveja (DULINSKI *et al.*, 2020) e formulações infantis (LEI *et al.*, 2013).

Fitases são também antioxidantes naturais e podem ser usadas em produtos alimentares visando minimizar as consequências da oxidação para os componentes da matriz (SILVA e BRACARENSE, 2016; SONG *et al.*, 2019; BHAGYAWANT *et al.*, 2018). A oxidação causa perda do valor nutricional dos alimentos, além da alteração de sabor e cor, sendo ainda prejudicial à saúde em alimentos com alto teor de ácidos graxos insaturados e ferro, os quais são mais propensos a esse processo.

Fitases comerciais podem também ser usadas na indústria farmacêutica e de saúde, para o fortalecimento da estrutura muscular, no tratamento de indivíduos predispostos à perda óssea, como osteoporose, caquexia e outros tratamentos médicos, devido aos seus benefícios de captação ou utilização adequada de nutrientes (PAGANO *et al.*, 2007). Recentemente, foi avaliado o potencial do consumo de fitases sobre os efeitos tóxicos e inflamatórios de infecções induzidas por bactérias gram-negativas patogênicas e doenças inflamatórias mediadas por lipopolissacarídeos. Os autores observaram uma redução de 54% da toxicidade inicial após 3 h de atividade, demonstrando o potencial desta enzima como candidato para controle terapêutico e agente profilático destas doenças (AN; CHO, 2021).

Outras propriedades farmacêuticas de fitases incluem seu uso como agente antineoplásico, uma vez que essas enzimas foram capazes de reduzir a multiplicação de células cancerígenas do cólon humano, especificamente a linha celular HT-29 (VUCENIK; SHAMSUDDIN, 2006), além de células relacionadas ao câncer de mama, câncer cervical e câncer de próstata em humanos (SHAMSUDDIN *et al.*, 2002). Novas perspectivas para o uso de fitases se baseiam no uso dessas enzimas para o controle do diabetes mellitus, aterosclerose, doença cardíaca coronária e cessação da formação de cálculos nos rins, inibição do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e toxicidade por metais pesados (SHARMA *et al.*, 2019).

Fitases podem ser úteis na produção industrial de biocombustíveis e na conversão de biomassa (LEI *et al.*, 2013), promovendo, inclusive, a recuperação de óleo no processo de moagem do milho a seco (LUANGTHONGKAM *et al.*, 2015). Além disso, elas podem ser utilizadas para a biorremediação de solos contaminados com fitato, uma maneira de reduzir os custos de receita que se tornam altos devido à adição de fertilizantes com fósforo (BALWANI *et al.*, 2017; CANGUSSU *et al.*, 2018). Nesse caso, considerando a essencialidade que o fósforo é um nutriente essencial para as plantas, microrganismos produtores de fitase têm sido inoculados no solo visando a melhoria do desempenho produtivo. Nesse caso, as culturas vegetais apresentaram uma melhor capacidade de usar fósforo a partir do solo contendo fitato (VALEEVA *et al.*, 2018; QIN *et al.*, 2022).

2.4 – Fatores que influenciam na eficiência das fitases

O estudo das fitases se encontra em constante crescimento devido aos inúmeros benefícios conhecidos. Atualmente, maior atenção tem sido dada devido ao benefício ecológico que ela oferece, principalmente devido às maiores restrições impostas ao tratamento de resíduos em indústrias em todo o planeta. Além disso, sua aplicação é eficiente na redução de custos de produção e pode ser uma resposta ao aumento de preços observado para os insumos. Entretanto, a sua aplicação industrial, principalmente para fitases destinadas à indústria de ração animal, requer que essas enzimas possuam propriedades bioquímicas especiais para que possam realizar a atividade esperada de forma eficiente. Isso envolve a resistência a temperaturas de peletização (70-90 °C), atividade em meios contendo uma ampla faixa de pH e habilidade de suportar a digestão enzimática em condições fisiológicas, além de, idealmente, alta atividade específica e estabilidade durante o armazenamento.

A termoestabilidade de fitases é um dos requisitos mais importantes para sua aplicação industrial. Ela é definida como a capacidade da enzima em manter a sua estrutura nativa e atividade após tratamento térmico, o qual é etapa essencial durante o processamento industrial da ração (McCORMIK *et al.*, 2017; REBELLO *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2022; ABBASI KHEIRABADI *et al.*, 2022). A peletização, por exemplo, é uma etapa essencial que ocorre normalmente a 80 °C por 2 min. Durante esse processo, ocorre a melhoria da digestibilidade e palatabilidade da ração por meio da desagregação dos grânulos de amilose e amilopectinas, facilitando a ação enzimática. Essa etapa também permite a remoção de microrganismos, aumentando assim o tempo de prateleira do produto (TILLMAN, JONES; PACHECO, 2019; WANG *et al.*, 2019). Entretanto, a temperatura normalmente empregada no processo de peletização é um dos fatores que podem interferir sobre a atividade da enzima, levando à desnaturação e inativação enzimática (POPE; BRAKE; FAHRENHOLZ, 2020; NEZHAD *et al.*, 2020).

As características encontradas para diferentes fitases variam de temperaturas ideais de atividade entre 37 e 80 °C. A fitase *Aspergillus fumigatus* possui atividade ótima a 37 °C, mas resiste a temperaturas de até 100 °C por um período de 20 min, com perda de apenas 10 % da atividade enzimática inicial (PASAMONTES *et al.*, 1997). A

temperatura ótima da fitase produzida por *Streptomyces sp.* US42 é de 65 °C. Quando a temperatura aumenta para 75 °C, essa enzima ainda permanece com 80 % de sua atividade original durante 15 min (BOUKHRIS *et al.*, 2016). Por outro lado, algumas fitases perdem sua atividade em temperaturas a partir de 40 °C (GONTIA-MISHRA *et al.*, 2013). A fitase de *Pantoea sp.* possui temperatura ótima de 37 °C, com perda de atividade a partir de 45 °C (SULEIMANOVA *et al.*, (2015).

Além da termoestabilidade, a capacidade das enzimas em se manterem ativas nas condições do trato digestivo é característica essencial à sua aplicação. A temperatura média do trato digestório destes animais é em torno de 37-42 °C, com pHs que variam de 2,5 a 8,0 (RAVINDRAN, 2013; ABBASI KHEIRABADI *et al.*, 2022). As fitases ácidas são ativas na faixa de pH de 4,0 a 5,5 e a estabilidade diminui quando o valor de pH é menor que 3,0 ou maior que 6,0, o que corresponde as fitases de origem fúngicas na sua maioria. Já as fitases alcalinas apresentam um perfil ótimo em pH acima de 6,0. A eficiência da fitase de *Aspergillus* na hidrólise de vários metais, foi dependente do pH, obtendo uma hidrólise quase completa de complexos de fitato de Ca, Mn, Mg, Zn e Cd em pH 2,5, enquanto que em pH 5,0 a hidrólise foi de 83-84% para Ca, Mn e Mg, 23% para Zn e 44% para Cd (SUN *et al.*, 2021).

Vários trabalhos têm sido realizados com o objetivo de investigar os determinantes estruturais/moleculares da estabilidade térmica e ao pH das fitases (TAN, *et al.*, 2016; SHIVANGE *et al.*, 2016; NIU *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2020; ACQUISTAPACE *et al.*, 2022). No entanto, a variabilidade das estruturas e características de fitases encontradas na literatura, das mais diversas fontes, a obtenção de uma fitase que seja capaz de alcançar todas estas características se revela um pouco mais complexa. Assim, além das abordagens convencionais de fermentação, técnicas de clonagem, expressão e engenharia genética têm sido utilizadas para alcançar estes objetivos. A engenharia de proteínas tem permitido aumentar a eficiência destas, como no caso dos estudos realizado por Niu *et al.* (2017) e Zhou *et al.* (2019), os quais obtiveram melhorias na resistência de fitases a meios em maiores faixas de pH, chegando a obterem atividades em meios com pH de 2,0 a 9,0. A análise metagenômica de sequências de fitase em vários ambientes e sua expressão em *E. coli* resultaram na geração de fitase termoestável (TAN *et al.*, 2016), a qual manteve sua atividade após

incubação a 100 ° C por 27 min e 80 ° C por 2,1 h, relatado como a meia-vida mais longa até o momento. Ela também apresentou boa resistência em ampla faixa de pH com atividade ótima em pH ácido.

2.5 – Estabilizadores enzimáticos para aplicação comercial

A viabilização do emprego de enzimas em processos industriais depende de os produtos apresentarem estabilidade por longos períodos, sob as condições de armazenamento indicadas. Em extratos enzimáticos líquidos, a presença da água facilita uma série de reações físicas e/ou químicas, além de dificultar o transporte e armazenamento devido ao grande volume (NAMALDI *et al.*, 2006; HAMIN NETO *et al.*, 2017). Dessa forma, para enzimas cuja aplicação se dá em grandes volumes, como é o caso das fitases aplicadas em rações para animais, faz-se necessário a obtenção do produto de forma que garanta a sua estabilidade e comercialização. Para isso, é necessário que o teor de água livre seja reduzido, gerando compostos sólidos, que proporcionam maior estabilidade para o produto, mesmo quando em temperatura ambiente, além de facilitar o transporte, armazenamento e aplicação (DE PAZ, 2002; LIAO *et al.*, 2003; COSTA-SILVA, 2010).

Para obtenção de um produto enzimático na forma sólida, faz-se necessário o uso de técnicas que permitam a desidratação e, ao mesmo tempo, garantam a conservação da estrutura proteica, para garantir a manutenção da atividade. Em processos de secagem, a microencapsulação da enzima pode auxiliar esse objetivo (SHAHIDI e HAN, 1993; OKADA *et al.*, 2021). A microcápsula pode ser feita de diversos materiais e possuir diversos tamanhos, a fim de revestir uniformemente o produto, facilitar o armazenamento e prolongar a vida útil sem influenciar negativamente em suas propriedades químicas ou funcionais.

A microencapsulação pode ser feita durante o processo de secagem, e as técnicas mais comuns que têm sido usadas incluem métodos mecânicos, como a pulverização (Spray Dryer) (NAMALDI *et al.*, 2006; OKADA *et al.*, 2021) e liofilização (STARCIUC *et al.*, 2020; ROCKINGER; FUNK; WINTER, 2021), além dos métodos

químicos, especialmente a polimerização e coacervação (GEORGES; SELOMULYA, 2018).

A secagem de enzimas por Spray Dryer é normalmente a mais empregada desde que não promova a perda da atividade enzimática. Este método se baseia na secagem por atomização em uma corrente de ar quente e em câmara de secagem. Seu uso é bastante difundido por ser uma técnica de custo relativamente baixo, rápida e de fácil reprodução. Além disso, seu baixo custo permite o escalonamento de processo quando comparado com outras técnicas de secagem (AGHBASHLO *et al.*, 2012; MISHRA; KUMAR; BHAINSA, 2022). Devido a isso, tem sido muito utilizada na indústria de alimentos para encapsular compostos bioativos, probióticos e enzimas (CAVALCANT *et al.*, 2020; BUSTO *et al.*, 2022). Por esse método, a preparação líquida contendo a enzima é estabilizada com aditivos (estabilizadores ou protetores), sendo o estado do produto final, um sólido, com maior estabilidade que a forma em solução (TZANNIS *et al.*, 1999; GIBBS *et al.*, 1999; NAMALDI *et al.*, 2006).

Vários materiais podem ser utilizados como estabilizadores nos processos de secagem, dependendo do tipo de produto requerido. Para enzimas, os mais comumente utilizados são a maltodextrina, glicose, celobiose, trealose, lactose, sacarose e os polímeros, dentre os quais destacam-se a carboximetilcelulose, celulose microcristalina, dextrana e goma arábica. Soma-se a este grupo os polióis como glicerol, glicol, manitol, propileno, sorbitol e xilitol (BELGHITH, CHAABOUNI e GARGOURI, 2001; DePAZ *et al.*, 2002; SELIVANOV, 2005; NAMALDI, *et al.*, 2006; DOMINGUES *et al.*, 2008; COSTA-SILVA, 2010; SATO *et al.*, 2013; SHIOTA, 2014; DELMASCHIO *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2016; STARCIUC *et al.*, 2020). Essas moléculas devem, idealmente, impedir o desdobramento ou a degradação da enzima (ser amorfo), ter baixa viscosidade em concentrações elevadas; ser de fácil manipulação durante o processo; ter baixa higroscopicidade para facilitar a manipulação e evitar aglomeração; transformar líquidos em sólidos para uso em sistemas secos; deve ter habilidade para dispersar ou emulsificar e estabilizar o ingrediente ativo; não ser reativo com o material a ser estabilizado; ser de baixo custo (DE PAZ 2002; SILVA *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2016; GEORGES; SELOMULYA, 2018).

Dentre os materiais citados acima, os polissacarídeos têm sido os mais usados por apresentarem baixo custo, alta solubilidade e estabilidade, como a maltodextrina, goma arábica e ciclodextrina. A maltodextrina e a goma arábica possuem baixa viscosidade com alto teor de sólidos e em solução aquosa, respectivamente, bem como boa capacidade de emulsificação. A incorporação de maltodextrina e goma arábica foram bem relatados quanto à conservação da atividade de endoglucanase e xilanase (SHIOTA, 2014) e lipase (COSTA-SILVA *et al.*, 2014) após o processo de secagem por Spray Dryer, ao contrário da celulose, que foi menos eficiente na conservação da enzima (SHIOTA, 2014).

Shiota (2014) explica que maltodextrina e a goma arábica formam uma solução quando adicionados ao meio líquido, o que está possivelmente associado à capacidade dos grupos hidroxila desses polímeros formarem ligações de hidrogênio com a molécula da proteína, substituindo a água, que é rompida durante a secagem. Por outro lado, a celulose microcristalina resulta em suspensão quando adicionada ao extrato, motivo que pode estar relacionado à estabilidade da sua estrutura que não permite ligações suficientes da proteína com o meio. Logo, a baixa solubilidade desse material expõe a proteína aos efeitos do processo de secagem, ao contrário da maltodextrina e goma arábica, que protegem fisicamente o extrato enzimático contribuindo para manutenção da estabilidade.

Farelo de milho e farelo de soja também foram usados como aditivos para a secagem de fitases (SATO *et al.*, 2013) e xilanas (DELMASCHIO *et al.*, 2015). Sato *et al.* (2013) avaliou a utilização de vários aditivos como estabilizadores no processo de secagem e a maior atividade de fitase residual foi observada em todas as concentrações dos extratos formulados com farelo de soja (média de 59,7 %), bem como farelo de milho (59 %)

A liofilização por outro lado, se baseia no método de desidratação a partir da utilização de dois processos, o congelamento do produto em baixas temperaturas e a remoção da água através da etapa de secagem, onde ocorre a sublimação da água e consequente desidratação do produto, podendo ser implementada a vácuo (BHATTA *et al.*, 2020; KARAM *et al.*, 2016; ASSEGEHEGN *et al.*, 2019; RATTI, 2013). A liofilização possibilita o aumento da qualidade do produto, proporcionando a diminuição de reações

de deteriorações, químicas, bioquímicas e microbiológicas, que são facilitadas pela presença da água nos alimentos (KARAM *et al.*, 2016; RATTI, 2001). É comumente aplicada na produção de alimentos em pó e sólidos (KARAM *et al.*, 2016; BHATTA *et al.*, 2020), na indústria farmacêutica (TANG; PIKAL, 2004) e secagem de células e enzimas (STARCIUC *et al.*, 2020; ROCKINGER; FUNK; WINTER, 2021).

Esta técnica é indicada para compostos termicamente sensíveis e propensos à oxidação, possibilitando a maior conservação das características e compostos bioativos presentes nos alimentos, em comparação com outros métodos de secagem (BHATTA *et al.*, 2020; RATTI, 2001; KHALLOUFI; RATTI, 2003). Além disso, o processo minimiza o custo com armazenamento e transporte (AFOLABI, 2014; ROCKINGER; FUNK; WINTER, 2021).

A partir dessa técnica, os produtos aumentam o tempo de vida de prateleira. No entanto, a liofilização é uma técnica cara, pelo gasto excessivo de energia, e tempo longo requerido no processo, fazendo com que os produtos oriundos dela sejam também de alto custo. Além disso, pode ocorrer a mudança de textura, forma, viscosidade, densidade, estabilidade e outras características do produto, além de acarretar o encolhimento do produto a partir do rompimento da estrutura do alimento durante a sublimação (TANG; PIKAL, 2004; BHATTA *et al.*, 2020).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASI, K. M.; SAFFAR, B. H. R.; MORTAZAVI, M. Thermally stable and acidic pH tolerant mutant phytases with high catalytic efficiency from *Yersinia intermedia* for potential application in feed industries. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 29, n. 22, p. 33713-33724, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-022-18578-4>.
- ABD E. M. E.; ALAGAWANY, M. A. M.; EMAM, M.; SAEED, M.; ARAIN, M. A. The uses of microbial phytase as a feed additive in poultry nutrition – A review. **Annals of Animal Science**. v. 18, n. 3, p. 639-658, 2018. DOI: <https://doi.org/10.2478/aoas-2018-0009>.
- ACQUISTAPACE, I. M.; THOMPSON, E. J.; KÜHN, I.; BEDFORD, M. R.; BREARLEY, C. A.; HEMMINGS, A. M. Insights to the Structural Basis for the Stereospecificity of the Escherichia coli Phytase, AppA. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 11, p. 6346, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23116346>.
- AFOLABI, I. S. Moisture migration and bulk nutrients interaction in a drying food system: a review. **Food and Nutrition Sciences**, v. 2014, 2014. DOI: [10.4236/fns.2014.58080](https://doi.org/10.4236/fns.2014.58080).
- AGHBASHLO, M.; MOBLI, H.; RAFIEE, S.; MADADLOU, A. Energy and exergy analyses of the spray drying process of fish oil microencapsulation. **Biosystems Engineering**, v. 111, n. 2, p. 229-241, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2011.12.001>.
- AKYUREK, H.; OZDUVEN, M. L.; OKUR, A. A. The effect of supplementing an organic acid blend and/or microbial phytase to a corn-soybean based diet fed to broiler chickens. **African Journal of Agricultural Research**, v. 6, n. 3, p. 642-649. 2011. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJAR10.469>.
- AN, J.; CHO, J. Wheat phytase can alleviate the cellular toxic and inflammatory effects of lipopolysaccharide. **Journal of Animal Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 114-124, 2021. DOI: [10.5187/jast.2021.e12](https://doi.org/10.5187/jast.2021.e12).
- ANIMAL FEED PHYTASE MARKET: Information by types (granular phytases, powder phytases and thermostable phytases) application (swine, poultry, aquatic animals), and region — forecast till 2026. Straits research, 2022. Disponível em: <https://straitsresearch.com/report/animal-feed-phytase-market/> . Acesso em: 27 de julho de 2022.
- ARREDONDO, M. A.; CASAS, G. A.; STEIN, H. H. Increasing levels of microbial phytase increases the digestibility of energy and minerals in diets fed to pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 248, p. 27-36, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.01.001>.
- ASSEGEHEGN, G.; BRITO-DE LA FUENTE, E.; FRANCO, J. M.; GALLEGOS, C. The importance of understanding the freezing step and its impact on freeze-drying process

performance. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 108, n. 4, p. 1378-1395, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2018.11.039>.

ATTIA, Y. A.; BOVERA, F.; IANNACCONE, F.; AL-HARTHI, M. A.; ALAQIL, A. A.; ZEWEIL, H. S.; MANSOUR, A. E. Microbial and fungal phytases can affect growth performance, nutrient digestibility and blood profile of broilers fed different levels of non-phytic phosphorous. **Animals**, v. 10, n. 4, p. 580, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani10040580>.

BALWANI, I.; CHAKRAVARTY, K.; GAUR, S. Role of phytase producing microorganisms towards agricultural sustainability. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 12, p. 23-29, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.08.010>.

BECKER, L. L.; WENSLEY, M. R.; DEROUCHÉY, J. M.; WOODWORTH, J. C.; TOKACH, M. D.; GOODBAND, R. D.; LESSARD, P. A. Determining the phosphorus release of GraINzyme phytase in diets for nursery pigs. **Translational Animal Science**, v. 5, n. 3, p. txab105, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/tas/txab105>.

BEDFORD, M. R.; COWIESON, A. J. Exogenous enzymes and their effects on intestinal microbiology. **Animal Feed Science and Technology**, v. 173, n. 1-2, p. 76-85, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.018>.

BELGHITH, H.; CHAABOUNI, S. E.; GARGOURI, A. Stabilization of *Penicillium occitanis* cellulases by spray drying in presence of Maltodextrin. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, n. 2-3, p. 253–258, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00322-7](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00322-7).

BHAGYAWANT, S. S.; BHADKARIA, A.; GUPTA, N.; SRIVASTAVA, N. Impact of phytic acid on nutrient bioaccessibility and antioxidant properties of chickpea genotypes. **Journal of Food Biochemistry**, v. 42, n. 6, p. e12678, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfbc.12678>.

BHATTA, S.; STEVANOVIC, T. J.; RATTI, C. Freeze-drying of plant-based foods. **Foods**, v. 9, n. 1, p. 87, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods9010087>.

BOUKHRIS, I.; FARHAT-KHEMAKHEM, A.; BOUCHAALA, K.; VIROLLE, M. J.; CHOUAYEKH, H. Cloning and characterization of the first actinomycete β -propeller phytase from *Streptomyces* sp. US42. **Journal of Basic Microbiology**, v. 56, n. 10, p. 1080-1089, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/jobm.201500760>.

BUSTO, M. D.; GONZÁLEZ-TEMIÑO, Y.; ALBILLOS, S. M.; RAMOS-GÓMEZ, S.; PILAR-IZQUIERDO, M. C.; PALACIOS, D.; ORTEGA, N. Microencapsulation of a Commercial Food-Grade Protease by Spray Drying in Cross-Linked Chitosan Particles. **Foods**, v. 11, n. 14, p. 2077, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods11142077>.

BYE, J. W.; COWIESON, N. P.; COWIESON, A. J.; SELLE, P. H.; FALCONER, R. Dual effects of sodium phytate on the structural stability and solubility of proteins. **Journal of**

Agricultural and Food Chemistry, v. 61, n. 2, p. 290-295, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf303926v>.

CAMDEN, B. J.; MOREL, P. C. H.; THOMAS, D. V.; RAVINDRAN, V.; BEDFORD, M. R. Effectiveness of exogenous microbial phytase in improving the bioavailabilities of phosphorus and other nutrients in maize-soya-bean meal diets for broilers. **Animal Science**, v. 73, n. 2, p. 289-297, 2001. DOI: [10.1017/S1357729800058264](https://doi.org/10.1017/S1357729800058264).

CANGUSSU, A. S. R.; AIRES ALMEIDA, D.; AGUIAR, R. W. D. S.; BORDIGNON-JUNIOR, S. E.; VIANA, K. F.; BARBOSA, L. C. B.; LIMA, W. J. N. Characterization of the catalytic structure of plant phytase, protein tyrosine phosphatase-like phytase, and histidine acid phytases and their biotechnological applications. **Enzyme Research**, v. 2018, p. 1-12, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/8240698>.

CAVALCANTI, R. M. F.; MARTINEZ, M. L. L.; OLIVEIRA, W. P.; GUIMARÃES, L. H. S. Stabilization and application of spray-dried tannase from *Aspergillus fumigatus* CAS21 in the presence of different carriers. **3 Biotech**, v. 10, n. 4, p. 1-14, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s13205-020-2164-z>.

CHAUHAN, D.; KUMAR, K.; AHMED, N.; THAKUR, P.; RIZVI, Q. U. E. H.; JAN, S.; YADAV, A. N. Impact of soaking, germination, fermentation, and roasting treatments on nutritional, anti-nutritional, and bioactive composition of black soybean (*Glycine max* L.). **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 186-192, 2022. DOI: [10.7324/JABB.2022.100523](https://doi.org/10.7324/JABB.2022.100523).

CHEN, W.; YU, H.; YE, L. Comparative study on different expression hosts for alkaline phytase engineered in *Escherichia coli*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 179, n. 6, p. 997-1010, 2016. DOI: [10.1007/s12010-016-2046-3](https://doi.org/10.1007/s12010-016-2046-3).

CHEN, X.; GAO, M.; LI, Y.; ZHANG, X.; ZHANG, F.; HU, B. Effects of freeze-thaw cycles on the physicochemical characteristics of animal manure and its phosphorus forms. **Waste Management**, v. 88, n. 1, p. 160-169, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.03.039>.

CHHABRA, S. Phosphorus management in agroecosystems and role and relevance of microbes in environmental sustainability. In: SHAH, S *et al.* (eds.), Sustainable Green Technologies for Environmental Management. **Springer Nature Singapore Pte Ltd**, p.53-66, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-981-13-2772-8>.

COBAN, H. B.; DEMIRCI, A. Screening of phytase producers and optimization of culture conditions for submerged fermentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, n. 4, p. 609-616, 2014. DOI: [10.1007/s00449-013-1028-x](https://doi.org/10.1007/s00449-013-1028-x).

CORRÊA, T. L. R.; DE ARAÚJO, E. F. Fungal phytases: from genes to applications. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 3, p. 1009-1020, 2020. DOI: [10.1007/s42770-020-00289-y](https://doi.org/10.1007/s42770-020-00289-y).

COSTA-SILVA, T. A.; SAID, S.; FERNANDES SOUZA, C. R.; OLIVEIRA, W. P. Stabilization of Endophytic Fungus *Cercospora kikuchii* lipase by Spray Drying in the Presence of Maltodextrin and β -Cyclodextrin. **Drying Technology**, v. 28, n. 11, p. 1245-1254, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1080/07373937.2010.498068>.

COWIESON, A. International Magazine for Animal Feed & Additives Industry: **Managing feed cost with exogenous enzymes in a volatile market**. Feed additive, 11 jun 2022. Disponível em: <https://www.feedandadditive.com/managing-feed-cost-with-exogenous-enzymes-in-a-volatile-market/> . Acesso em: 24 de julho de 2022.

COWIESON, A. J.; ACAMOVIC, T.; BEDFORD, M. R. The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous amino acids and minerals from broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 45, n. 1, p. 101-108, 2004. DOI: [10.1080/00071660410001668923](https://doi.org/10.1080/00071660410001668923).

DAHIYA, S. Industrial applications of phytases. **International Journal of Applied Research**, v. 2, n. 2, p. 95-98, 2016.

DARBY, S. J.; PLATTS, L.; DANIEL, M. S.; COWIESON, A. J.; FALCONER, R. J. An isothermal titration calorimetry study of phytate binding to lysozyme. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 127, n. 2, p. 1201-1208, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10973-016-5487-6>.

DELMASCHIO, I. B.; LAURITO, R.; GOMES, E.; GREINER, R.; THOMÉO, J. C. Secagem por spray-drying de fitases e xilanases produzidas por fungos filamentosos em cultivo em estado sólido. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 2, n. 1, p. 1776-1785, 2015. DOI: [10.5151/ENEMP2015-SE-662](https://doi.org/10.5151/ENEMP2015-SE-662).

DEPAZ, R. A.; DALE, D. A.; BARNETT, C. C.; CARPENTER, J. F.; GAERTNER, A. L.; RANDOLPH, T. W. Effects of drying methods and additives on the structure, function, and storage stability of subtilisin: Role of protein conformation and molecular mobility. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 6, p. 765-774, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00173-4](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00173-4).

DERSJANT-LI, Y.; ABDOLLAHI, M. R.; BELLO, A.; WALLER, K.; MARCHAL, L.; RAVINDRAN, V. Effects of a novel consensus bacterial 6-phytase variant on the apparent ileal digestibility of amino acids, total tract phosphorus retention, and tibia ash in young broilers. **Journal of Animal Science**, v. 100, n. 2, p. 1-9, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1093/jas/skac037>.

DOKUZPARMAK, E.; SIRIN, Y.; CAKMAK, U.; SAGLAM ERTUNGA, N. Purification and characterization of a novel thermostable phytase from the thermophilic *Geobacillus* sp. TF16. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 5, p. 1104-1116, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1203930>.

DOMINGUES, G. S.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R. Micropartículas nanorrevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação

em etapa única e caracterização biofarmacêutica. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1966-1972, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000800009>.

DULIŃSKI, R.; ZDANIEWICZ, M.; PATER, A.; PONIEWSKA, D.; ŻYŁA, K. The impact of phytases on the release of bioactive inositols, the profile of inositol phosphates, and the release of selected minerals in the technology of buckwheat beer production. **Biomolecules**, v. 10, n. 2, p. 166, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom10020166>.

DÜNGELHOEF, M.; RODEHUTSCORD, M.; SPIEKERS, H.; PFEFFER, E. Effects of supplemental microbial phytase on availability of phosphorus contained in maize, wheat and triticale to pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 49, n. 1-2, p. 1-10, 1994. DOI: [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90076-0](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90076-0).

EMBRAPA SWINE AND POULTRY. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), 2022. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/suinos-e-aves/cias/estatisticas/frangos/mundo>, acesso em: 24 de julho de 2022.

Enzymes market size, share and trends analysis report by product (lipases, polymerases and nucleases, carbohydrase), by type (industrial, specialty), by source (plants, animals), by region, and segment forecasts, 2022 – 2030. Grand View Research, 2022. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry> . Acesso em: 28 de julho de 2022.

ERPEL, F.; RESTOVIC, F.; ARCE-JONHSON, P. Development of phytase-expressing *Chlamydomonas reinhardtii* for monogastric animal nutrition. **BMC Biotechnology**, v. 16, n.29, 2016. DOI: [10.1186/s12896-016-0258-9](https://doi.org/10.1186/s12896-016-0258-9).

EXPORTAÇÕES DE CARNE DE FRANGO CRESCEM 8,8% EM JUNHO. Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), 2022. Disponível em: <https://gazetadetoledo.com.br/exportacoes-de-carne-de-frango-crescem-88-em-junho/> . Acesso em: 24 de julho de 2022.

FABA-RODRIGUEZ, R.; GU, Y.; SALMON, M.; DIONISIO, G.; BRINCH-PEDERSEN, H.; BREARLEY, C. A.; HEMMINGS, A. M. Structure of a cereal purple acid phytase provides new insights to phytate degradation in plants. **Plant Communications**, v. 3, n. 2, p. 100305, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2022.100305>.

FREDRIKSON, M.; BIOT, P.; ALMINGER, M. L.; CARLSSON, N. G.; SANDBERG, A. S. Production process for high-quality pea-protein isolate with low content of oligosaccharides and phytate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 1208-1212, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf000708x>.

GESSLER, N. N.; SERDYUK, E. G. ISAKOVA, E. P.; DERYABINA, Y. I. Phytases and the prospects for their application (review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 352-360, 2018. DOI: [10.1134/S0003683818040087](https://doi.org/10.1134/S0003683818040087).

BERNARD, F. G.; SELIM, K.; INTEAZ A.; CATHERINE, N.; M. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 50, n. 3, p. 213-224, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1080/096374899101256>.

GILES, C.; CADE-MENUN, B.; HILL, J. The inositol phosphates in soils and manures: Abundance, cycling, and measurement. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 91, n. 3, p. 397-416, 2011. DOI: <https://doi.org/10.4141/cjss09090>.

Global Animal Feed Enzymes Market size study, by product type (phytase, carbohydrase, proteases, non-starch polysaccharide, others), by livestock (poultry, swine, aquaculture, ruminant, others), by form (liquid, dry) and regional forecasts 2021-2027. Market Research Report, 2021. Disponível em: <https://www.giiresearch.com/report/bzc1027617-global-animal-feed-enzymes-market-size-study-by.html> . Acesso em 27 de julho de 2022.

GONTIA-MISHRA, I.; DESHMUKH, D.; TRIPATHI, N.; BARDIYA-BHURAT, K.; TANTWAI, K.; TIWARI, S. Isolation, morphological and molecular characterization of phytate-hydrolysing fungi by 18S rDNA sequence analysis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 317-323, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822013005000021>.

GORDEEVA, T. L.; BORSHCHEVSKAYA, L. N.; KALININA, A. N.; BULUSHOVA, N. V.; SYNEOKY, S. P.; VORONIN, S. P.; KASHIRSKAYA, M. D. New Recombinant Phytase from *Kosakoniasacchari*: Characteristics and Biotechnological Potential. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 56, n. 7, p. 779-786, 2020. DOI: [10.1134/S0003683820070042](https://doi.org/10.1134/S0003683820070042).

HAEFNER, S.; KNIETSCH, A.; SCHOLTEN, E.; BRAUN, J.; LOHSCHIEDT, M.; ZELDER, O. Biotechnological production and applications of phytases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 5, p. 588-597, 2005. DOI: [10.1007/s00253-005-0005-y](https://doi.org/10.1007/s00253-005-0005-y).

HAMDI, M.; PEREZ, J. F.; LÉTOURNEAU-MONTMINY, M. P.; FRANCO-ROSSELLÓ, R.; ALIGUE, R.; SOLÀ-ORIOLO, D. The effects of microbial phytases and dietary calcium and phosphorus levels on the productive performance and bone mineralization of broilers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 243, p. 41-51, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.07.005>.

HAMIN NETO, Y. A. A.; COITINHO, L. B.; DE FREITAS, L. A. P.; CABRAL, H. Box- Behnken analysis and storage of spray-dried collagenolytic proteases from *Myceliophthora thermophila* submerged bioprocess. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, n. 5, p. 473-480, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/10826068.2017.1292289>.

HAMIN-NETO, Y. A. A.; FREITAS, L. A. P. de; CABRAL, H. Multivariate analysis of the stability of spray-dried *Eupenicillium javanicum* peptidases. **Drying Technology**, v. 32, n. 5, p. 614-621, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1080/07373937.2013.853079>.

HAN, Y. M.; YANG, F.; ZHOU, A. G.; MILLER, E. R.; KU, P. K.; HOGBERG, M. G.; LEI, X. G. Supplemental phytases of microbial and cereal sources improve dietary phytate phosphorus utilization by pigs from weaning through finishing. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 4, p. 1017-1025, 1997. DOI: <https://doi.org/10.2527/1997.7541017x>.

HELIAN, Y.; GAI, Y.; FANG, H.; SUN, Y.; ZHANG, D. A multistrategy approach for improving the expression of *E. coli* phytase in *Pichia pastoris*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 47, n. 12, p. 1161-1172, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10295-020-02311-6>.

HONG, B.; KIM, B. G. Supplemental phytase increases phosphorus digestibility in pigs regardless of phytase source or feed pelleting. **Animal Feed Science and Technology**, v. 276, p. 114901, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.114901>.

HOU, X.; SHEN, Z.; LI, N.; KONG, X.; SHENG, K.; WANG, J.; WANG, Y. A novel fungal beta-propeller phytase from nematophagous *Arthrobotrys oligospora*: characterization and potential application in phosphorus and mineral release for feed processing. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 1-13, 2020. DOI: [10.1186/s12934-020-01346-9](https://doi.org/10.1186/s12934-020-01346-9).

HUBER, K.; ZELLER, E.; RODEHUTSCORD, M. Modulation of small intestinal phosphate transporter by dietary supplements of mineral phosphorus and phytase in broilers. **Poultry Science**, v. 94, n. 5, p. 1009-1017, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps/pev065>.

HUMER, E.; SCHWARZ, C.; SCHEDULE, K. Phytate in pig and poultry nutrition. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 99, n. 4, p. 605-625, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/jpn.12258>.

IDRISS, E. E.; MAKAREWICZ, O.; FAROUK, A.; ROSNER, K.; GREINER, R.; BOCHOW, H.; BORRIS, R. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. **Microbiology**, v. 148, n. 7, p. 2097-2109, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1099/00221287-148-7-2097>.

IGLESIAS-PUIG, E.; MONEDERO, V.; HAROS, M. Bread with whole quinoa flour and bifidobacterial phytases increases dietary mineral intake and bioavailability. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 1, p. 71-77, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.045>.

ISAEV, N.; STEINHOFF, H. J. Protein and solutes freeze-concentration in water/glycerol mixtures revealed by pulse EPR. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 169, p. 44-51, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.08.017>.

JANG, W. J.; LEE, J. M.; PARK, H. D.; CHOI, Y. B.; KONG, I. S. N-terminal domain of the beta-propeller phytase of *Pseudomonas* sp. FB15 plays a role for retention of low-temperature activity and catalytic efficiency. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 117, p. 84-90, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2018.06.008>.

JING, M.; ZHAO, S.; ROGIEWICZ, A.; SLOMINSKI, B. A.; HOUSE, J. D. Effects of phytase supplementation on production performance, egg and bone quality, plasma biochemistry and mineral excretion of layers fed varying levels of phosphorus. **Animal**, v. 15, n. 1, p.100010, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.animal.2020.100010>.

JORQUERA, M.; MARTÍNEZ, O. S. C. A. R.; MARUYAMA, F.; MARSCHNER, P.; DE LA LUZ MORA, M. Current and future biotechnological applications of bacterial phytases and phytase-producing bacteria. **Microbes and Environments**, v. 23, n. 3, p. 182-191, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1264/jsme2.23.182>.

KARAM, M. C.; PETIT, J.; ZIMMER, D.; DJANTOU, E. B.; SCHER, J. Effects of drying and grinding in production of fruit and vegetable powders: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 188, p. 32–49, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.05.001>.

KARAMAN, K.; SAGDIC, O.; DURAK, M. Z. Use of phytase active yeasts and lactic acid bacteria isolated from sourdough in the production of whole wheat bread. **Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie**, v. 91, p. 557–567, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.05.001>.

KHALLOUFI, S.; RATTI, C. Quality deterioration of freeze-dried foods as explained by their glass transition temperature and internal structure. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 3, p. 892-903, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb08262.x>.

KIM, T.; MULLANEY, E. J.; PORRES, J. M.; RONEKER, K. R.; CROWE, S.; RICE, S.; LEI, X. G. Shifting the pH profile of *Aspergillus niger* PhyA phytase to match the stomach pH enhances its effectiveness as an animal feed additive. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 6, p. 4397-4403, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.02612-05>.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 345-351, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00328-2](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00328-2).

KNUCKLES, B. E.; BETSCHART, A. A. Effect of phytate and other myo-inositol phosphate esters on α -amylase digestion of starch. **Journal of Food Science**, v. 52, n. 3, p. 719-721, 1987. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1987.tb06710.x>

KONIETZNY, U.; GREINER, R. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). **International Journal of Food Science & Technology**, v. 37, n. 7, p. 791-812, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00617.x>.

KUMAR, Y.; BASU, S.; GOSWAMI, D.; DEVI, M.; SHIVHARE, U. S.; VISHWAKARMA, R. K. Anti-nutritional compounds in pulses: Implications and alleviation methods. **Legume Science**, v. 4, n. 2, p. e111, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/leg3.111>.

KVIST, S.; CARLSSON, T.; LAWTHOR, J. M.; DECASTRO, F. B. **Process for the fractionation of cereal brans**. U.S. Patent n. 7,709,033, 4 maio 2010.

LEE, S. A.; LUPATSCH, I.; GOMES, G. A.; BEDFORD, M. R. An advanced *Escherichia coli* phytase improves performance and retention of phosphorus and nitrogen in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed low phosphorus plant-based diets, at 11° C and 15° C. **Aquaculture**, v. 516, p. 734549, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734549>.

LEI, X. G.; WEAVER, J. D.; MULLANEY, E.; ULLAH, A. H.; AZAIN, M. J. Phytase, a new life for an “old” enzyme. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 1, p.283-309, 2013. DOI: [10.1146/annurev-animal-031412-103717](https://doi.org/10.1146/annurev-animal-031412-103717).

LIAO, Y. H.; BROWN, M. B.; QUADER, A.; MARTIN, G. P. Investigation of the physical properties of spray-dried stabilised lysozyme particles. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 55, n. 9, p. 1213-1221, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1211/0022357021611>.

DE LIMA, M. R.; DA SILVA, J. H. V.; DE ARAUJO, J. A.; LIMA, C. B.; DE OLIVEIRA, E. R. A. Enzimas exógenas na alimentação de aves. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 1, n. 4, p. 99- 110, 2007. DOI: <https://doi.org/10.21708/avb.2007.1.4.485>.

LUANGTHONGKAM, P.; FANG, L.; NOOMHORM, A.; LAMSAL, B. Addition of cellulolytic enzymes and phytase for improving ethanol fermentation performance and oil recovery in corn dry grind process. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 803–808, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.060>.

MCCORMICK, K.; WALK, C. L.; WYATT, C. L.; ADEOLA, O. Phosphorus utilization response of pigs and broiler chickens to diets supplemented with antimicrobials and phytase. **Animal Nutrition**, v. 3, n. 1, p. 77-84, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.11.004>.

METZLER-ZEBELI, B. U.; VAHJEN, W.; BAUMGÄRTEL, T.; RODEHUTSCORD, M.; MOSENTHIN, R. Ileal microbiota of growing pigs fed different dietary calcium phosphate levels and phytase content and subjected to ileal pectin infusion. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 1, p. 147-158, 2010. DOI: <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1560>.

MISHRA, A.; KUMAR, J.; BHAINSA, K. C. Applicability of Spray Drying Technique to Prepare Nano-Micro Carriers: A Review. **Nanoarchitectonics**, p. 33-45, 2022. DOI: <https://doi.org/10.37256/nat.3120221198>.

MKUMBE, B. S.; SAJIDAN, S.; PANGASTUTI, A.; SUSILOWATI, A.; GREINER, R. Production, Characterization, and Molecular Phylogenetic Analysis of Phytase from *Aspergillus niger* Isolates of an Indonesia Origin. **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 29, n. 4, p. 468-478, 2022. DOI: <https://doi.org/10.4308/hjb.29.4.468-478>.

NAMALDI, A.; ÇALIK, P.; ULUDAG, Y. Effects of spray drying temperature and additives on the stability of serine alkaline protease powders. **Drying Technology**, v. 24, n. 11, p. 1495-1500, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1080/07373930600961108>.

NEZHAD, N. G.; RAJA ABD RAHMAN, R. N. Z.; NORMI, Y. M.; OSLAN, S. N.; SHARIFF, F. M.; LEOW, T. C. Integrative structural and computational biology of phytases for the animal feed industry. **Catalysts**, v. 10, n. 8, p. 844, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/catal10080844>.

NIÑO-GÓMEZ, D. C.; RIVERA-HOYOS, C. M.; MORALES-ÁLVAREZ, E. D.; REYES-MONTAÑO, E. A.; VARGAS-ALEJO, N. E.; RAMÍREZ-CASALLAS, I. N.; ARÉVALO-GALVIS, A. "In silico" characterization of 3-phytase A and 3-phytase B from *Aspergillus niger*. **Enzyme Research**, v. 2017, 2017. DOI: [10.1155/2017/9746191](https://doi.org/10.1155/2017/9746191).

NIU, C.; YANG, P.; LUO, H.; HUANG, H.; WANG, Y.; YAO, B. Engineering the residual side chains of HAP phytases to improve their pepsin resistance and catalytic efficiency. **Scientific Report**, v. 7, n. 42133, p. 1-14, 2017. DOI: [10.1038/srep46871](https://doi.org/10.1038/srep46871).

OH, B. C.; CHOI, W. C.; PARK, S.; KIM, Y. O.; OH, T. K. Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n. 4, p. 362-372, 2004. DOI: [10.1007/s00253-003-1345-0](https://doi.org/10.1007/s00253-003-1345-0).

OKADA, S.; OHSAKI, S.; NAKAMURA, H.; WATANO, S. Numerical Study on Spray Drying Process: Effect of Nonuniform Temperature Field and Interaction between Droplets on Evaporation Rates of Individual Droplets. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 69, n. 2, p. 203-210, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1248/cpb.c20-00788>.

PAGANO, A. R.; YASUDA, K.; RONEKER, K. R.; CRENSHAW, T. D.; LEI, X. G. Supplemental *Escherichia coli* phytase and strontium enhance bone strength of young pigs fed a phosphorus-adequate diet. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 7, p. 1795-1801, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1093/jn/137.7.1795>.

PASAMONTES, L.; HAIKER, M.; WYSS, M.; TESSIER, M.; VAN LOON, A. Gene cloning, purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 5, p. 1696-1700, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.63.5.1696-1700.1997>.

PATEL, D. K.; PATEL, K.; PATEL, D.; DAVE, G. Engineering of thermostable phytase-xylanase for hydrolysis of complex biopolymers. **Biotech**, v. 11, n. 8, p. 1-9, 2021. DOI: [10.1007/s13205-021-02936-z](https://doi.org/10.1007/s13205-021-02936-z).

PIRES, E. B. E.; DE FREITAS, A. J.; SALGADO, R. L.; GUIMARÃES, V. M.; PEREIRA, F. A.; ELLER, M. R. Production of fungal phytases from agroindustrial byproducts for pig diets. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2019. DOI: [10.1038/s41598-019-45720-z](https://doi.org/10.1038/s41598-019-45720-z).

PIRES, E. B. E. **Produção e caracterização parcial de fitases fúngicas utilizando resíduos agroindustriais**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de

Alimentos) – Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, p. 66, 2016.

PISANO, R.; RASETTO, V.; BARRESI, A. A.; KUNTZ, F.; AOUDE-WERNER, D.; REY, L. Freeze-drying of enzymes in case of water-binding and non-water-binding substrates. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 85, n. 3, p. 974-983, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.02.008>.

POPE, J. T.; BRAKE, J.; FAHRENHOLZ, A. C. Parameters monitored during the pelleting process and their relationship to xylanase activity loss. **Animal Feed Science and Technology**, v. 259, p. 114-344, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114344>.

PROMDONKOY, P.; TANG, K.; SORNLAKE, W.; HARNPICHARNCHAI, P.; KOBAYASHI, R. S.; RUANGLEK, V.; TANAPONGPIPAT, S. Expression and characterization of *Aspergillus* thermostable phytases in *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 290, n. 1, p.18-24, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01399.x>.

PTAK, A.; BEDFORD, M. R.; ŚWIĄTKIEWICZ, S.; ŻYŁA, K.; JOZEFIAK, D. Phytase modulates ileal microbiota and enhances growth performance of the broiler chickens. **PloS One**, v. 10, n. 3, p. e0119770, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119770>.

QIN, X.; PAN, H.; XIAO, J.; TANG, L.; ZHENG, Y. Increased nodular P level induced by intercropping stimulated nodulation in soybean under phosphorus deficiency. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2022. DOI: [10.1038/s41598-022-05668-z](https://doi.org/10.1038/s41598-022-05668-z).

RATTI, C. Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. **Journal of Food Engineering**, v. 49, n. 4, p. 311-319, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(00\)00228-4](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(00)00228-4).

RATTI, C. Freeze drying for food powder production. **Handbook of Food Powders: Processes and Properties**, Woodhead Publishing. p. 57–58, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1533/9780857098672.1.57>.

RAVINDRAN, V.; CABAHUG, S.; RAVINDRAN, G.; BRYDEN, W. L. Influence of microbial phytase on apparent ileal amino acid digestibility of feedstuffs for broilers. **Poultry Science**, v. 78, n. 5, p. 699-706, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1093/ps/78.5.699>.

RAVINDRAN, V. Feed enzymes: The science, practice, and metabolic realities. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 22, n. 3, p. 628-636, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3382/japr.2013-00739>.

REBELLO, S.; JOSE, L.; SINDHU, R.; ANEESH, E. M. Molecular advancements in the development of thermostable phytases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 7, p. 2677-2689, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8195-7>.

REVVY, P. S.; JONDREVILLE, C.; DOURMAD, J. Y.; NYS, Y. Assessment of dietary zinc requirement of weaned piglets fed diets with or without microbial phytase. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 90, n. 1-2, p. 50-59, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2005.00576.x>.

ROCKINGER, U.; FUNK, M.; WINTER, G. Current approaches of preservation of cells during (freeze-) drying. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 110, n. 8, p. 2873-2893, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.04.018>.

RODRIGUES, V. V.; CANTARELLI, V. D. S.; AMARAL, N. D. O.; ZANGERONIMO, M. G.; BRITO, J. Á. G. D.; FIALHO, E. T. Nutrient reduction in rations with phytase for growing pigs. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 2, p. 370-376, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982011000200019>.

ROSTAMI, H.; GIRI, A. An overview on microbial phytase and its biotechnological applications. **International Journal of Advanced Biotechnology and Research**, v. 4, n. 1, p. 62-71, 2013.

SANANGELANTONI, A. M.; MALATRASI, M.; TRIVELLONI, E.; VISIOLI, G.; AGRIMONTI, C. A novel β -propeller phytase from the dioxin-degrading bacterium *Sphingomonas wittichii* RW-1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 19, p. 8351-8358, 2018. DOI: [10.1007/s00253-018-9248-2](https://doi.org/10.1007/s00253-018-9248-2).

SANTOS, K. O.; COSTA-FILHO, J.; RIET, J.; SPAGNOL, K. L.; NORBERG, B. F.; KÜTTER, M. T.; MARINS, L. F. Probiotic expressing heterologous phytase improves the immune system and attenuates inflammatory response in zebrafish fed with a diet rich in soybean meal. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 93, p. 652-658, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.08.030>.

SANTOS, T. S. **Efeito de fitases de origem bacteriana no desempenho e qualidade óssea de frangos de corte**. 2016. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, SP, 2016.

SARKHEL, S.; ROY, A. Phytic acid and its reduction in pulse matrix: Structure–function relationship owing to bioavailability enhancement of micronutrients. **Journal of Food Process Engineering**, v. 45, n. 5, p. e14030, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfpe.14030>.

SATO, V. S.; JORGE, J. A.; OLIVEIRA, W. P.; SOUZA, C. R. F.; GUIMARÃES, L. H. S. Phytase production by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* biofilm: characterization of enzymatic activity after spray drying in presence of carbohydrates and nonconventional adjuvants. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 177-187, 2014. DOI: [10.4014/jmb.1308.08087](https://doi.org/10.4014/jmb.1308.08087).

SATO, V. S. **Produção de fitase por *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*: Purificação, Caracterização Bioquímica e Aplicação**. 2015. 122 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015.

SAXENA, A.; VERMA, M.; SINGH, B.; SANGWAN, P.; YADAV, A. N.; DHALIWAL, H. S.; KUMAR, V. Characteristics of an acidic phytase from *Aspergillus aculeatus* APF1 for dephytinization of biofortified wheat genotypes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 191, n. 2, p. 679-694, 2020. DOI: [10.1007/s12010-019-03205-9](https://doi.org/10.1007/s12010-019-03205-9).

SHAHIDI, F.; HAN, X. Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 501-547, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408399309527645>.

SHAMSUDDIN, A. M. Anti-cancer function of phytic acid. **International journal of food science and technology**, v. 37, n. 7, p. 769-782, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.2002.00620.x>.

SHARMA, A. AHLUWALIA, O.; TRIPATHI, A. D.; SINGH, G.; ARYA, S. K. Phytases and their pharmaceutical applications: Mini-review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 23, p. 101439, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101439>.

SHIOTA, V. M. **Secagem de celulases de origem fúngica por spray-drying**. 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP, 2014.

SHIVANGE, A. V.; ROCCATANO, D.; SCHWANEBERG, U. Iterative key-residues interrogation of a phytase with thermostability increasing substitutions identified in directed evolution. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 1, p. 227-242, 2016. DOI: [10.1007/s00253-015-6959-5](https://doi.org/10.1007/s00253-015-6959-5).

SILVA, E. O.; BRACARENSE, A. Phytic acid: From anti-nutritional to multiple protection factor of organic systems. **Journal Food Science**, v. 81, n. 6, p. 1357-1362, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13320>.

SILVA, P. I.; STRINGHETA, P. C.; TEÓFILO, R. F.; DE OLIVEIRA, I. R. N. Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 538-544, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.08.039>.

SINGH, B.; SATYANARAYANA, T. Fungal phytases: characteristics and amelioration of nutritional quality and growth of non-ruminants. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 99, n. 4, p. 646-660, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/jpn.12236>.

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, P. K. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 1-15, 2016. DOI: [10.1007/s13205-016-0485-8](https://doi.org/10.1007/s13205-016-0485-8).

SONG, H.Y.; EL SHEIKHA, A. F.; DIAN-MING, H. The positive impacts of microbial phytase on its nutritional applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 86, p. 553-562, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.12.001>.

STARCIUC, T.; MALFAIT, B.; DANEDE, F.; PACCOU, L.; GUINET, Y.; CORREIA, N. T.; HEDOUX, A. Trehalose or sucrose: which of the two should be used for stabilizing proteins in the solid state? A dilemma investigated by in situ micro-Raman and dielectric relaxation spectroscopies during and after freeze-drying. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 109, n. 1, p. 496-504, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2019.10.055>.

SULEIMANOVA, A. D.; BEINHAUER, A.; VALEEVA, L. R.; CHASTUKHINA, I. B.; BALABAN, N. P.; SHAKIROV, E. V.; SHARIPOVA, M. R. Novel glucose-1-phosphatase with high phytase activity and unusual metal ion activation from soil bacterium *Pantoea* sp. strain 3.5. 1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 19, p. 6790-6799, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.01384-15>.

SUN, M.; HE, Z.; JAISI, D. P. Role of metal complexation on the solubility and enzymatic hydrolysis of phytate. **Plos One**, v. 16, n. 8, p. e0255787, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0255787>.

SUZUKI, U.; YOSHIMURA, K.; TAKAISHI, M. Ueber ein Enzym "Phytase" das "Anhydrooxy-methylen diphosphorsäure" Spaltet. **Bull. Coll. Agric. Tokyo Imp. Univ**, v. 7, p. 503-512, 1907.

TAKAGI, S.; TSUTSUMI, N.; TERUI, Y.; KONG, X.; YURIMOTO, H.; SAKAI, Y. Engineering the expression system for *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*): an attempt to develop a methanol-free expression system. **FEMS Yeast Research**, v. 19, n. 6, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsyr/foz059>.

TAN, H.; WU, X.; XIE, L.; HUANG, Z.; PENG, W.; GAN, B. Identification and characterization of a mesophilic phytase highly resilient to high-temperatures from a fungus-garden associated metagenome. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 5, p. 2225-2241, 2016. DOI: [10.1007/s00253-015-7097-9](https://doi.org/10.1007/s00253-015-7097-9).

TANG, X. C.; PIKAL, M.; J. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. **Pharmaceutical research**, v. 21, n. 2, p. 191-200, 2004. DOI: [10.1023/b:pham.0000016234.73023.75](https://doi.org/10.1023/b:pham.0000016234.73023.75).

TARIQ, M.; NAWAZ, M.; ANJUM, A. A.; SANA, S.; HAFEEZ, M. A.; NAZIR, J.; NAJEEB, M. I. Production and Characterization of Phytase From Indigenous *Aspergillus niger* Isolates. **Pakistan Journal of Agricultural Research**, v. 54, n. 4, p. 799-806, 2017. DOI: [10.21162/PAKJAS/17.5517](https://doi.org/10.21162/PAKJAS/17.5517).

TEJEDOR, A. A.; ALBINO, L. F. T.; ROSTAGNO, H. S.; VIEITES, F. M. Effect of phytase supplementation on the performance and ileal digestibility of nutrients. **Revista Brasileira**

de Zootecnia, v. 30, n. 3, p. 802-808, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982001000300027>.

TILLMAN, N. S.; JONES, M. K.; PACHECO, W. J. Influence of feed ingredients, conditioning temperature, and a dacitic tuff breccia (AZOMITE) on pellet production rate and pellet quality. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 29, n. 1, p. 162-170, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.japr.2019.10.003>.

TKACHENKO, A. A.; KALININA, A. N.; BORSHCHEVSKAYA, L. N.; SINEOKY, S. P.; GORDEEVA, T. L. A novel phytase from *Citrobacter gillenii*: characterization and expression in *Pichia pastoris* (*Komagataella pastoris*). **FEMS Microbiology Letters**, v. 368, n. 2, p. fnaa217, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa217>.

TROUILLEFOU, C. M.; LE CADRE, E.; CACCIAGUERRA, T.; CUNIN, F.; PLASSARD, C.; BELAMIE, E. Protected activity of a phytase immobilized in mesoporous silica with benefits to plant phosphorus nutrition. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 74, n. 1, p. 55-65, 2015. DOI: [10.1007/s10971-014-3577-0](https://doi.org/10.1007/s10971-014-3577-0).

TRUONG, H. H.; BOLD, R. M.; LIU, S. Y.; SELLE, P. H. Standard phytase inclusion in maize-based broiler diets enhances digestibility coefficients of starch, amino acids and sodium in four small intestinal segments and digestive dynamics of starch and protein. **Animal Feed Science and Technology**, v. 209, p. 240-248, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.08.012>.

TZANNIS, S. T.; PRESTRESLKY, S. J. Moisture effects on protein excipient interactions in spray-dried powders: Nature of destabilizing effects of sucrose. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 88, n. 3, p. 360-370, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1021/js9800127>.

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, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.05.010>.

VALEEVA, L. R.; NYAMSUREN, C.; SHARIPOVA, M. R.; SHAKIROV, E. V. Heterologous expression of secreted bacterial BPP and HAP phytases in plants stimulates *Arabidopsis thaliana* growth on phytate. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 186, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00186>.

VASUDEVAN, U. M.; JAISWAL, A. K.; KRISHNA, S.; PANDEY, A. Thermostable phytase in feed and fuel industries. **Bioresource Technology**, v. 278, p. 400-407, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.065>.

VERARDI, A. D.; SCHNEIDER, A. F.; MAYER, J. K.; YURI, F. M.; OLIVEIRA, V.; GEWEHR, C. E. True phosphorus digestibility and total endogenous phosphorus losses associated with canola meal for brown laying hens 17 and 32 weeks old. **Livestock Science**, v. 222, p. 49-53, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2019.02.005>.

VIEIRA, B. S.; CARAMORI JUNIOR, J. G.; CORREA, G. S.; COLVARA, I. G.; BRUSAMARELO, E.; PEREIRA, T. V.; OLIVEIRA, C. F. Combination of phytase and citric acid, but not phytase alone, ensures regular rates of growth and bone mineralization in quails under severe phosphorus restriction. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 103, n. 2, p. 555-563, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/jpn.13074>.

VILLAMIZAR, G. A. C.; NACKE, H.; BOEHNING, M.; HERZ, K.; DANIEL, R. Functional metagenomics reveals an overlooked diversity and novel features of soil-derived bacterial phosphatases and phytases. **Applied and Environmental Science**, v. 10, n. 1, p. e01966-18, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.01966-18>.

VOHRA, P.; GRAY, G. A.; KRATZER, F. H. Phytic acid-metal complexes. **Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine**, v. 120, n. 2, p. 447-449, 1965. DOI: <https://doi.org/10.3181/00379727-120-30559>.

VUCENIK, I.; SHAMSUDDIN, A. M. Protection against cancer by dietary IP₆ and inositol. **Nutrition and Cancer**, v. 55, n. 2, p. 109-125, 2006. DOI: https://doi.org/10.1207/s15327914nc5502_1.

WANG, Q.; LIU, X.; TIAN, J.; WANG, Y.; ZHANG, H.; WANG, Y.; LUO, H.; YAO, B.; HUANG, H.; TU, T. Enhancing the Thermostability of Phytase to Boiling Point by Evolution-Guided Design. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 88, n. 11, p. e00506-22, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.00506-22>.

WANG, T.; HUANG, Y.; YAO, W.; HE, Q.; SHAO, Y.; LI, H.; HUANG, F. Effect of conditioning temperature on pelleting characteristics, nutrient digestibility and gut microbiota of sorghum-based diets for growing pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 254, p. 114227, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114227>.

WANG, X.; DU, J.; ZHANG, Z. Y.; FU, Y. J.; WANG, W. M.; LIANG, A. H. A rational design to enhance the resistance of *Escherichia coli* phytase appA to trypsin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 22, p. 9647-9656, 2018. DOI: [10.1007/s00253-018-9327-4](https://doi.org/10.1007/s00253-018-9327-4).

WOYENGO, T. A.; WILSON, J. Enhancing nutrient utilization in maize for broiler chickens by superdosing phytase. **Animal Feed Science and Technology**, v. 252, p. 34-40, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.04.005>.

WU, Y. B.; RAVINDRAN, V.; THOMAS, D. G.; BIRTLES, M. J.; HENDRIKS, W. H. Influence of phytase and xylanase, individually or in combination, on performance, apparent metabolisable energy, digestive tract measurements and gut morphology in broilers fed wheat-based diets containing adequate level of phosphorus. **British Poultry Science**, v. 45, n. 1, p. 76-84, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1080/00071660410001668897>.

WU, Y.; XU, S.; WANG, X.; XU, H.; LIU, P.; XING, X.; QI, Z. Phosphorus equivalency of phytase with various evaluation indicators of meat duck. **Poultry Science**, v. 100, n. 11, p. 101216, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101216>.

XIANG, H.; LI, Q.; SUN-WATERHOUSE, D.; LI, J.; CUI, C.; WATERHOUSE, G. I. Improving the color and functional properties of seabuckthorn seed protein with phytase treatment combined with alkaline solubilization and isoelectric precipitation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 102, n. 3, p. 931-939, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.11425>.

YE, Q.; GEORGES, N.; SELOMULYA, C. Microencapsulation of active ingredients in functional foods: From research stage to commercial food products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 78, p. 167-179, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.025>.

ZENG, Y.; ZENG, D.; ZHANG, Y.; NI, X. Q.; WANG, J.; JIAN, P.; JING, B. *Lactobacillus plantarum* BS 22 promotes gut microbial homeostasis in broiler chickens exposed to aflatoxin B1. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 102, n. 1, p. e449-e459, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/jpn.12766>.

ZHAI, H. X.; WANG, J. P.; ZHANG, Q.; AURELI, R.; TSCHAMBSER, A.; FARUK, M. U. Evaluation of the efficacy of a novel phytase in short-term digestibility and long-term egg production studies with laying hens. **Poultry Science**, v. 101, n. 6, p. 101894, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.101894>.

ZHANG, Q.; WALK, C.; SORBARA, J. O. B.; COWIESON, A. J.; STAMATOPOULOS, K. Comparative effects of two phytases on growth performance, bone mineralization, nutrient digestibility and phytate-P hydrolysis of broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 31, n. 2, p. 100247, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.japr.2022.100247>.

ZHANG, Z.; YANG, J.; XIE, P.; GAO, Y.; BAI, J.; ZHANG, C.; GAO, X. Characterization of a thermostable phytase from *Bacillus licheniformis* WHU and further stabilization of the enzyme through disulfide bond engineering. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 142, p. 109679, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109679>.

ZHANG, Z.; ZHANG, R.; CHEN, L.; MCCLEMENTS, D. J. Encapsulation of lactase (β -galactosidase) into κ -carrageenan-based hydrogel beads: Impact of environmental conditions on enzyme activity. **Food Chemistry**, v. 200, p. 69-75, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.014>.

ZHOU, S.; LIU, Z.; XIE, W.; YU, Y.; NING, C.; YUAN, M.; MOU, H. Improving catalytic efficiency and maximum activity at low pH of *Aspergillus neoniger* phytase using rational design. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 131, p. 1117-1124, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.140>.

CAPITULO I

SEQUENCE DIVERSITY AND CATALYTIC PROPERTIES OF PHYTASES

Elizabeth Bárbara Epalanga Pires – Department of Food Technology, Universidade Federal de Viçosa – Elizabeth.pires@ufv.br;

Marcelo Depólo Polêto – Department of Biochemistry, Virginia Tech, Blacksburg, VA 24061, United States – <mailto:mdpoleto@vt.edu>;

Matheus Ítalo Bomfim Aragão – Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universidade Federal de Viçosa – Matheus.aragao@ufv.br;

Pedro Marcus Pereira Vidigal – Nucleus of Biomolecules, Universidade Federal de Viçosa – Pedro.vidigal@ufv.br;

Tarley Araujo Barros–Agroceres Multimix Nutrição Animal Ltda. – tarley.barros@agroceres.com;

Rafael Locatelli Salgado – Universidade Federal de Viçosa, Brazil – E-mail: rafael.salgado@ufv.br;

Valéria Monteze Guimarães – Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universidade Federal de Viçosa – vmonteze@ufv.br;

Monique Renon Eller (Corresponding author) – Department of Food Technology, Universidade Federal de Viçosa –E-mail: monique.eller@ufv.br.

Cite this article: PIRES, E. B. E.; POLÊTO, M. D.; VIDIGAL, P. M. P.; ARAGÃO, M. Ítalo B.; BARROS, T. A.; SALGADO, R. L.; GUIMARÃES, V. M.; ELLER, M. R. Sequence diversity and catalytic properties of phytases. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 11, n. 10, p. e427111032765, 2022. DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i10.32765>.

Artigo publicado pela revista Research, Society and Development em 06 de agosto de 2022.

Abstract

Phytic acid is an antinutritional factor in cereal feeds, and the use of phytases increases the bioavailability of nutrients bound to this molecule. However, the application of these enzymes depends on their thermal stability and activity at acidic pH. Therefore, in this study we created a database composed of 59 phytase sequences and analyzed the interactions that stabilize their structures in order to understand whether they contribute to the biochemical properties observed. The sequences were aligned and grouped at 30 % similarity, generating 5 clusters, which highlights the high variability among them. A comparative structural analysis of the cluster 3 phytases revealed conserved catalytic domains, as well as eight cysteine residues along the primary sequence, forming disulfide bonds for stabilizing the three-dimensional structure. However, the number of Van der Waals, ionic, and hydrogen interactions, and disulfide bonds was not determinant for the biochemical characteristics presented by these enzymes. The phytase KM873028, from cluster 3, was selected for characterization studies, but its expression in *Pichia pastoris* generated a protein with properties distinct from those derived from the same sequence expressed in a prokaryotic system. It is likely that the differences observed are associated with the location of the interactions in the structures, non-conserved amino acid residues found around the catalytic site, and post-translational modifications inherent to the expression systems. These possibilities highlight the relevance of strategic choices related to enzyme expression aiming at its production and industrial feasibility.

Keywords: Enzyme sequence conservation; Phytic acid; Animal feed; Enzyme stability; Enzyme structure.

1 – INTRODUCTION

Phytic acid is a natural constituent of cereals, such as soybeans and corn, used to produce feed for monogastric animals, such as poultry and swine. These animals do not efficiently metabolize phosphorus from those foods, thus supplementation is necessary to obtain better performance (Haefner *et al.*, 2005), which generates an excess of phosphorus in the excreta of the animals and, consequently, in the environment. In addition, phytic acid forms complexes with proteins and other minerals, interfering with the absorption of these nutrients. The addition of exogenous phytases has been considered the most efficient strategy to reduce the need for phosphorus supplementation in pig diets (Huber and Zeller, 2015; McCormick *et al.*, 2017; Pramanik *et al.*, 2018; Arredondo *et al.*, 2019; Kryukov *et al.*, 2021; Mulvenna *et al.*, 2022; Selim *et al.*, 2022), in addition to reducing phosphorus released into the environment through excretion (Korgenay *et al.*, 1996). Some phytase-based products available on the market include: PHYZYME (DuPont); QUANTUM and FINASE (AB Vista, AB Enzymes); NATUPHOS (BASF); RONOZYME and ROXAZYNE (Novozyme-Novo Nordisk); AVIZYME (Finffeds International); ALLZYME SSF (Alltech); Bio-Feed phytase (DSM); AMAFERM (Biozyme); OPTIPHOS (Enzyvia, Phytex, Cornell); and ROVABIO (Genecour International). Each of these products has different production yields, stability, specific activity and dosage requirements.

Microbial phytases are the most widely phytases used in the industry main due to the high production yield. However, the biochemical characteristics of most of the phytases that have already been characterized limit their application (Pires *et al.*, 2019), since they must maintain their activity after pelleting process (80 °C/2 min) and be active during the passage through the gastrointestinal system of monogastric animals (BOHN *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010; Cowieson *et al.*, 2011). Due to this, commercially available enzymes are expensive, especially for Brazilian producers, where these products are imported. Therefore, there is a great demand for enzymes with high thermal stability and ability to act in acidic environments, either by prospecting new enzymes or by improving enzymes already characterized.

The association between the structure and the biochemical properties of enzymes can provide relevant information about factors that affect stability and catalytic activity. Several methods have been used for this purpose, including comparative sequence, structure analysis, molecular dynamics studies, or even the evaluation of random or rational mutations on enzyme activity (Zhang 2007; Liao, *et al.*, 2013; Fei *et al.*, 2013; Hesampour *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2015; Tan *et al.*, 2016; Han *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020; Acquistapace *et al.*, 2022). In this study, we report a comparative approach between sequences, three-dimensional structures and biochemical characteristics of phytases already characterized and described in the literature, adopting factors such as: hydrogen, ionic and Van der Waals (VdW) interactions and disulfide bonds. The study of these factors aims to search for markers responsible for characteristics such as thermal stability and performance in a wide pH spectrum, and then propose strategies for improving the enzyme application in industry.

2 – METHODOLOGY

2.1 – Generating a phytase sequence database

Phytases which sequences were available in the NCBI GenBank database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) by April 2020 were selected. From there, research in scientific articles for information about their biochemical characteristics was performed, especially those related to their ideal temperature, pH and thermostability. From the collected data, a database was generated relating these characteristics, as well as their respective access codes in Genbank (Supplementary Material S1). These sequences were then used as a basis for further comparative analyses.

2.2 – Sequence grouping based on similarity

Amino acid sequences were generated and used for clustering based on the sequence identity of the respective proteins. For this, the phytase sequences were aligned using the MAFFT software (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) (Kato *et al.*, 2019)

using the “auto” alignment strategy settings. A pairwise distance matrix (p-distance) was calculated from the alignment of the proteins, which were then grouped using the Neighbor joining (NJ) method and the Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) version 11 software (<https://www.megasoftware.net/>) (Tamura *et al.*, 2021). The consistency of the clusters obtained was verified by means of 1000 bootstrap repetitions. Subsequently, the proteins were regrouped using the algorithm implemented in the CD-Hit software (<http://weizhong-lab.ucsd.edu/cdhit-web-server/>) (Huang *et al.*, 2010), from sequences with identity $\geq 30\%$. The representative sequence of each group (clusters 1-5) was then identified and compared to a reference phytase (4arv), considering the high degree of dissimilarity between the phytase sequences present in the database. This stage was performed with the help of the BLASTp tool of the BLAST software version 2.13 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul, *et al.*, 1990) and aimed to identify the cluster representative among the generated groups, being selected for structural study of the cluster that presented greater similarity to the structure of the reference phytase. A pairwise matrix of identity and similarity between the proteins was also obtained to identify the level of variation between the sequences.

2.3 – Generation of three-dimensional models, quantification and analysis of intramolecular interactions

The comparison of the three-dimensional structures was performed only among the cluster 3 phytase sequences, which presented greater similarity with the phytase reference (4arv). For this, the models were initially built with the help of the AlphaFold server (<https://colab.research.google.com/github/deepmind/alphafold/blob/main/notebooks/AlphaFold.ipynb#scrollTo=VzJ5iMjTtoZw>) (Jumper *et al.*, 2021) and these structures were aligned using the PyMOL tool (<https://pymol.org/2/>). The model structure was extracted from the RCSB software (<https://www.rcsb.org/structure/4ARV>) (Ariza *et al.*, 2013). Each model generated in the previous step was submitted to the server RING - Residue Interaction Network Generator (<http://old.protein.bio.unipd.it/ring/>) (Piovesan *et al.*, 2016) to identify the number and type of interactions that compose protein structures. The

objective of this step was to verify the existence of a connection between the interactions present in the generated structures and their respective biological characteristics in terms of enzymatic activity, supporting a possible rational design of the modifications, aiming at the generation of a more stable phytase.

2.4 – Phytase selection and expression

A phytase sequence was selected based on the biochemical characteristics of the phytases in cluster 3, the group considered as the most representative of the sequences in the database. Therefore, the selected enzyme sequence KM873028 was shown to be expressed with high productivity in prokaryotic system and presented characteristics of heat resistance and performance at acidic pH. It was identified from a metagenomics study, being derived from a garden fungus (*Dendroctonus frontalis*), but originally expressed in *Escherichia coli* (BL21) by Tan *et al.*, 2016). The gene encoding this enzyme was optimized for expression in *P. pastoris* and synthesized by GenOne Biotech (Rio de Janeiro, Brazil), inserted into the pPICZ α B vector (Invitrogen) under the AOX promoter. The vector was multiplied in DH5alpha cells and the extracted plasmids were linearized and used for transformation of competent *P. pastoris* GS115 cells by electroporation, according to the recommendations of the manufacturer (Invitrogen). Recombinant cells were selected from plates with YPD agar (Yeast Extract - Peptone - Dextrose) supplemented with 100 μ g/mL zeocin. The induction took place in BMMHY medium (Buffered Methanol-Complex Medium) containing 0.5% (v/v) of methanol for up to 72 h and the phytase activity was evaluated from the extract obtained from the supernatant culture.

Enzyme activity was determined by using sodium phytate (Sigma-Aldrich) as substrate, as described by Pires *et al.* (2019). The ideal pH of activity was evaluated in medium containing 200 mM of glycine-HCl (pH 2.0–3.5); sodium acetate (pH 4.0-6.0); or Tris-HCl (6.5-7.5). For this, an aliquot of 275 μ L of a 1.5 mM substrate solution was added to 100 μ L of the extract. The mixture was incubated at 37 °C for 15 min and the reaction interrupted with the addition of 125 μ L of 10 % (m/v) trichloroacetic acid. Then, 500 μ L of the colorimetric reagent containing 10 % (v/v) of ammonium molybdate in 5 M sulfuric acid

and 5 % (m/v) of ferrous sulfate was added to the reaction (Tausky and Skorr 1953). The blank consisted of a mixture under the same conditions, stopping the reaction before starting the incubation.

The absorbance of the solution was measured at 700 nm and the values compared to a standard curve of sodium phosphate. An activity unit was defined as the amount of enzyme capable of releasing 1 μmol of inorganic phosphate per minute of reaction.

3 – RESULTS AND DISCUSSION

The search for phytase sequences in the Genbank database revealed the existence of 62 enzyme sequences from different organisms, 59 of which could be associated with information about their biochemical characteristics (Supplementary Material S1). The described phytases present a great diversity of properties, being able to act in temperatures between 37 °C and 60 °C, and environments with pH of 2.5 to 11 (Supplementary material S1).

3.1 – Phylogenetic analysis and sequence similarity

The grouping of the primary amino acid sequences of the phytases present in the database showed a great diversity in the existing phytase sequences, with few conserved regions between the enzymes, and no conserved sequence among all the enzymes. The alignment led to the clustering of the sequences in 5 clusters (Figure 4), which was also confirmed by clustering on CD-Hit using an identity threshold of 30 % (Figure 4). Despite the low index adopted, the clustering in CD-Hit showed the same pattern as the clustering in the distance matrix, proving the high diversity between them.

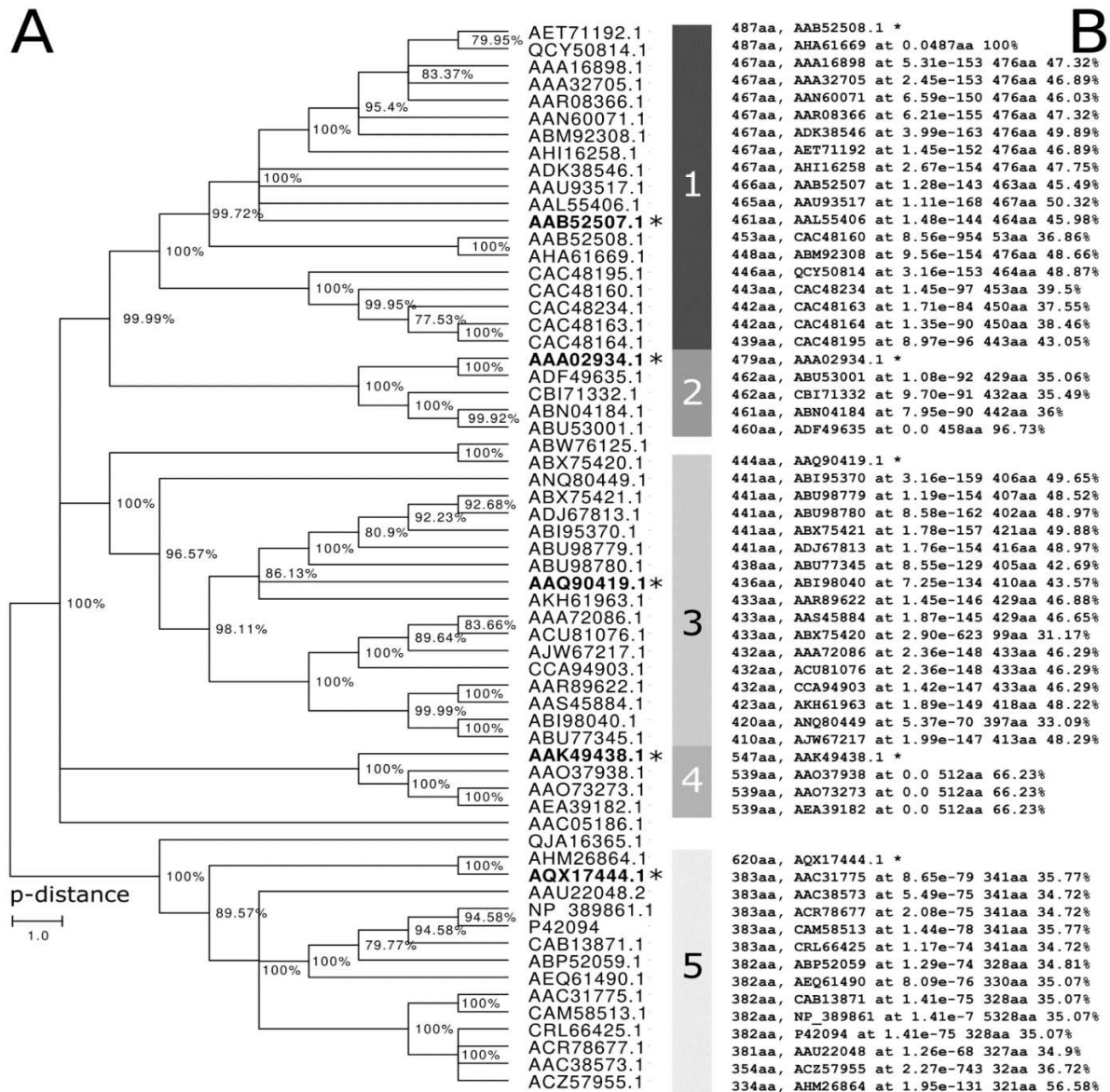
To determine the level of variation in identity and similarity between the sequences, a pairwise matrix was generated from the obtained alignments using MAFFT.

For clusters 1, 2, 4 and 5, the identity between the sequences of each cluster ranged from (33 to 99) %, (17 to 99) %, (64 to 100) %, and (20 to 99) %, respectively. The similarity ranged from (47 to 99) %, (29 to 99) %, (77 to 100) %, and (29 to 99) %. In

cluster 3, the identity ranged from (26 to 99) % and the similarity from (43 to 99) % (Supplementary Material S2).

In the analysis carried out between the representative sequences of each group, it was observed that among the models representing the five clusters, the phytase belonging to cluster 3 (AAQ90419) has greater similarity to the phytase 4arv, from *Yersinia kristeensenii*, identified as the reference sequence. In this case, 49.6% of identity and 65.7% of similarity were observed, while the sequences of the other clusters did not show significant similarity and identity (Supplementary Material S2). This result indicates that the sequences which belong to cluster 3 are the most representative among all the phytase sequences contained in the database. Because of this, this cluster was selected for associative analysis of the biochemical and structural characteristics of the 17 sequences that compose it.

Figure 4: Clustering of phytase amino acid sequences using the Neighbor-Joining method. The bootstrap consensus tree was inferred from 10,000 replicates from a p-distance matrix. The percentages of bootstrap is shown beside each node and branches reproduced in less than 75% bootstrap replicates were collapsed. (B) Clustering of phytase sequences using CD-HIT. The representative sequence of each cluster is highlighted in bold and marked with an asterisk.

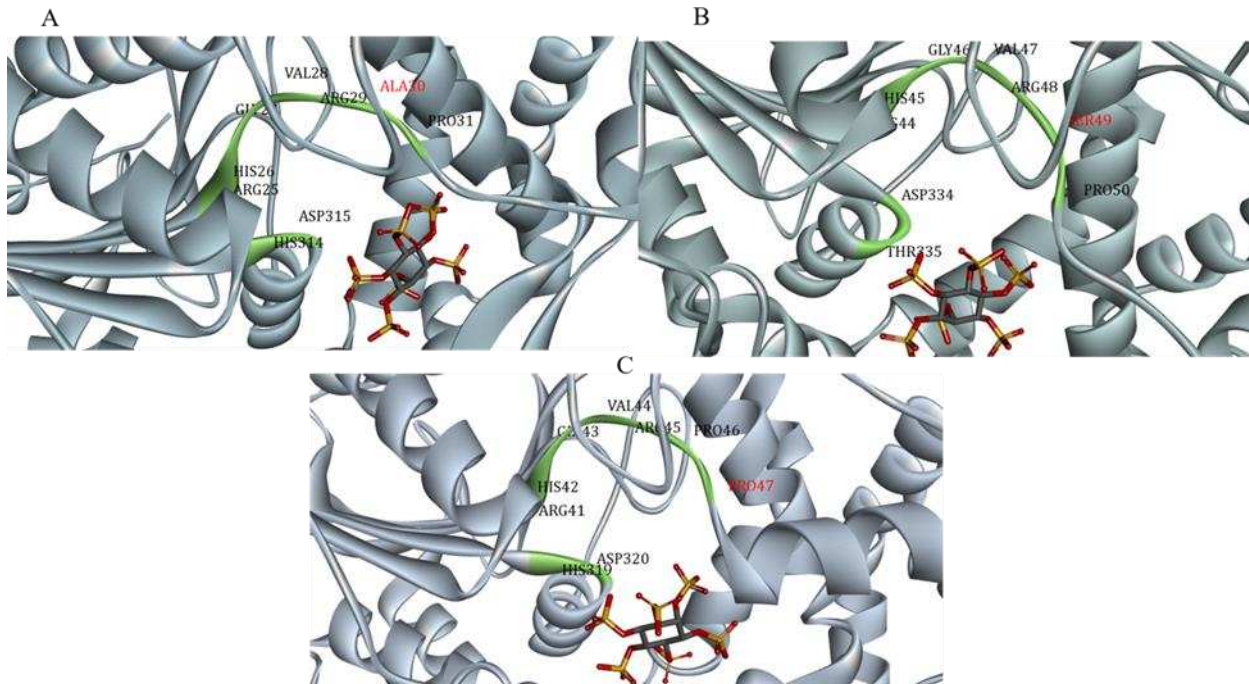


Source: Authors' elaboration.

3.2 – Multiple Sequence Alignment

Concerning the 17 sequences that encode phytases grouped and aligned as the cluster 3, three are identical (AAA72086, ACU81076 and AJW67217) (Figure 6), while the others present distinct residues with few conserved regions with an average of 46% identity. Among the conserved regions, there is the catalytic motif RHGVRAP/HD, except for some A49S mutations, and one A46P mutation (Figure 5). This sequence comprises the amino acids that form the ligand binding site and has been pointed out in several studies as characteristic of the histidine phosphatase superfamily (HAPs), that share a conserved catalytic core centered on a histidine that is phosphorylated during the course of the reaction (Zinin *et al.*, 2004; Wada *et al.*, 2019; Isabella *et al.*, 2020).

Figure 5: Structure of modeled phytases illustrating the conserved RHGVRAP/HD active site. The active site loop is shown in green and the substrate (phytic acid) in red. A: AKH61963; B: ABX75421 (A49S); and C: ABX75420 (A46P).



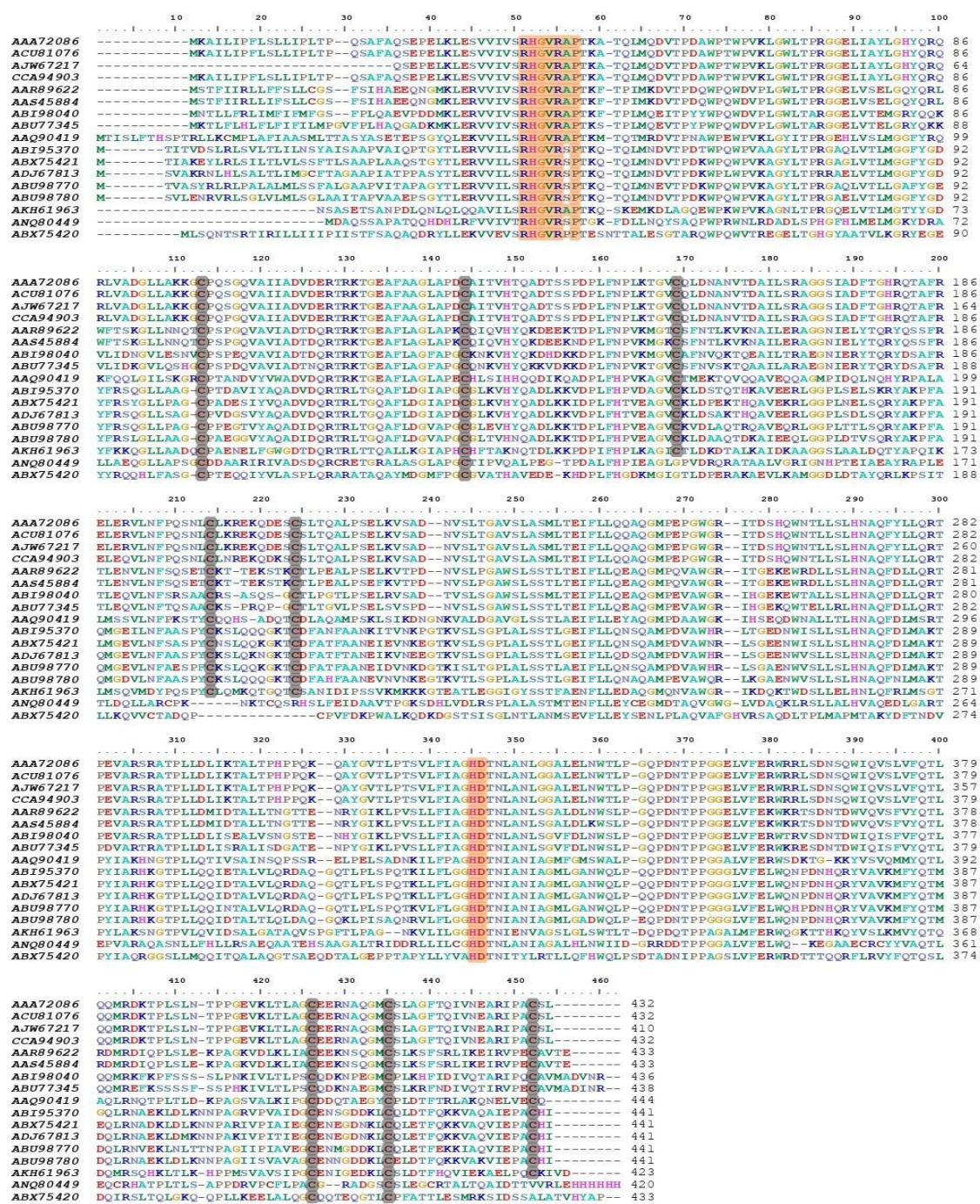
Source: Authors' elaboration.

Wada *et al.* (2019), evaluated the contribution of each amino acid from the active site in the AppA activity, and observed a drastic change in activity when the mutation involved charged residues within the conserved motif. Non-polar residues such as Ala and Gly did not influence the catalytic characteristics of the enzyme. In another study, when a residue near or within the conserved site of a phosphatase was replaced by bulky residues (Tyr and Phe), the specific activity, thermal stability and tolerance were significantly changed (Fu *et al.*, 2011). In our study, variations within the active site involved smaller residues (Ser and Pro) substituting Ala and do not seem to have influenced the enzymatic characteristics, since this substitution was observed for both, a thermostable (ABX75421) as well as a less stable (ABX75420) phytase (Table 1 and Supplementary material S3).

Although the phytases presented a conserved active motif, the residues located near to the active site showed a low degree of conservation. The influence of these changes needs to be deeply explored to effectively evaluate their impact on the interaction with the substrate (activity) and stability of these enzymes. Moreover, eight cysteine residues were also found in conserved regions along the primary protein sequence, which formed disulfide bonds in the predicted tertiary structure for these enzymes. There were also observed other additional cysteine residues, but which do not maintain the same conservation pattern (Figure 6). Conserved residues normally have functions related to protein activity (Shivange *et al.*, 2016) and alterations of residues close to or within the active site of an enzyme can alter substrate binding capacity and enzyme activity depending on the charge and size of the residues (Nayeem *et al.*, 2009).

Pearson (2013) points out that sequences with more than 40 % identity tend to be homologous and have functional similarity, although changes in a small number of residues can lead to significant changes in enzyme activity. Consequently, associating functional characteristics based only on significant local similarity is not as reliable as inferences based on global similarity and conserved active site residues.

Figure 6: Multiple alignment of the 17 phytase sequences from cluster 3: The orange lines highlight the amino acid residues forming the catalytic site; The grey lines show the eight conserved cysteine residues along the cysteine sequences.



Source: Authors' elaboration.

Table 1. Biochemical characteristics available in the literature about the 17 phytases from cluster 3.

Acession number	Reference	Original source	Ideal pH or pH range	Theoretical pl	Ideal temperature	Thermostability
ABI95370	Vieira <i>et al.</i> , 2019	<i>Yersinia</i> sp.	8.0	7.60	40 °C	-
ABU98779	Huang <i>et al.</i> , 2008	<i>Yersinia rohdei</i>	1.5 – 6.0	6.79	55 °C	50 % of residual activity after 80 °C for 4 min
ABU98780	Huang <i>et al.</i> , 2008	<i>Yersinia intermeda</i>	1.5 – 6.0	6.01	55 °C	70 % of residual activity after 80 °C for 4 min.
ABX75421	Fu <i>et al.</i> , 2008	<i>Yersinia kristeensenii</i>	4.5 1.5 – 11	6.32	55 °C	46 % of residual activity after 80 °C for 10 min.
ADJ67813	Niu <i>et al.</i> , 2017	<i>Yersinia enterocolitica</i>	2.0 – 9.0	6.60	60 °C	-
ABI98040	Luo <i>et al.</i> , 2007	<i>Citrobacter amalonaticus</i> CGMCC 1696	2.5 - 10.0	6.27	55 °C	-
AAR89622	Zhao <i>et al.</i> , 2010	<i>Citrobacter freundii</i>	2.5 – 4.5 At least 80 % of residual activity between 1.5 and 8.0	6.29	50 °C	
AAS45884	Kim <i>et al.</i> , 2006	<i>Citrobacter braakii</i>	4.0	6.96	37 °C	66 % of residual activity after 70 °C for 10 min.
ABX75420	Shao <i>et al.</i> , 2008	<i>Pectobacterium wasabiae</i> DSMZ	4.0 - 5.5	5.72	50 °C	

		18074				
AAA72086	Dassa <i>et al.</i> , 1990	<i>Escherichia coli</i>	2.5	6.26		
ACU81076	Yao <i>et al.</i> , 2013	Synthetic construct	4,5	-	50 °C	75 % of residual activity after 85 °C for 5 min.
CCA94903	Paul Roy <i>et al.</i> , 2016	<i>Shigella sp.</i> CD2	5.5	6.26	60 °C	More than 50 % of residual activity at 70 °C
AKH61963	Tan <i>et al.</i> , 2016a	<i>Dendroctonus</i> <i>frontalis</i>	3.9 3.5 - 5.5	-	52.5 °C	93 % of residual activity after 15 min for 100 °C
ANQ80449	Tan <i>et al.</i> , 2016b	Synthetic construc	2.5	-	55 °C	-
AJW67217	Akbarzadeh <i>et al.</i> , 2015	Synthetic construc	4.5	-	60 °C	70 % of residual activity at 70 °C
AAB52508	Mitchell <i>et al.</i> , 1997	<i>Myceliophthora</i> <i>thermophila</i>	3.5 – 6.0	5.05	-	-
AAQ90419	Zinin <i>et al.</i> , 2004	<i>Obesumbacteriu</i> <i>m proteus</i>	1.5 - 6.5	6.67	50 °C	-
ABW76125	Gu <i>et al.</i> , 2009	<i>Dickeya</i> <i>paradisiaca</i>	4.5 - 7.5	6.16	55 °C	No activity at 60 °C after 5 min.

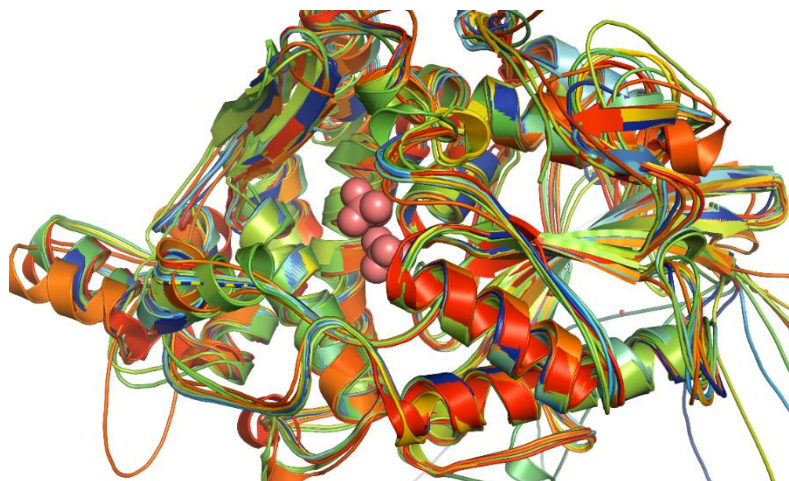
Source: Authors' elaboration

3.3 – Quantification and analysis of interactions of the structural models

The 17 sequences comprising cluster 3 were submitted to the AlphaFold server (Jumper *et al.*, 2021) to predict their three-dimensional structures. The predicted structures of this group are composed of two domains: a major α/β domain and an α smaller domain. The catalytic motif is found in a cavity between the two domains, where they form a loop that integrates the active site. In general, the phytases presents 8 longer α -helices and 4 short α -helices, beyond 7 large β -sheets and 3 short β -sheets. These structural features are well conserved in many bacterial and fungal phytases that have already been studied (Ariza *et al.*, 2013; Bohm *et al.*, 2010). From these structures, the interactions that form and stabilize each structure were quantified using of the RING server, which allows the identification and enumeration of intra and intermolecular covalent and non-covalent bonds: i) number of hydrogen bond interactions, ii) salt bridges, iii) van der Waals interactions (VdW), and iv) disulfide bridges (Piovesan *et al.*, 2016) (Supplementary material S3). Then, the biochemical characteristics of the phytases that constitute this group were correlated with these structural characteristics.

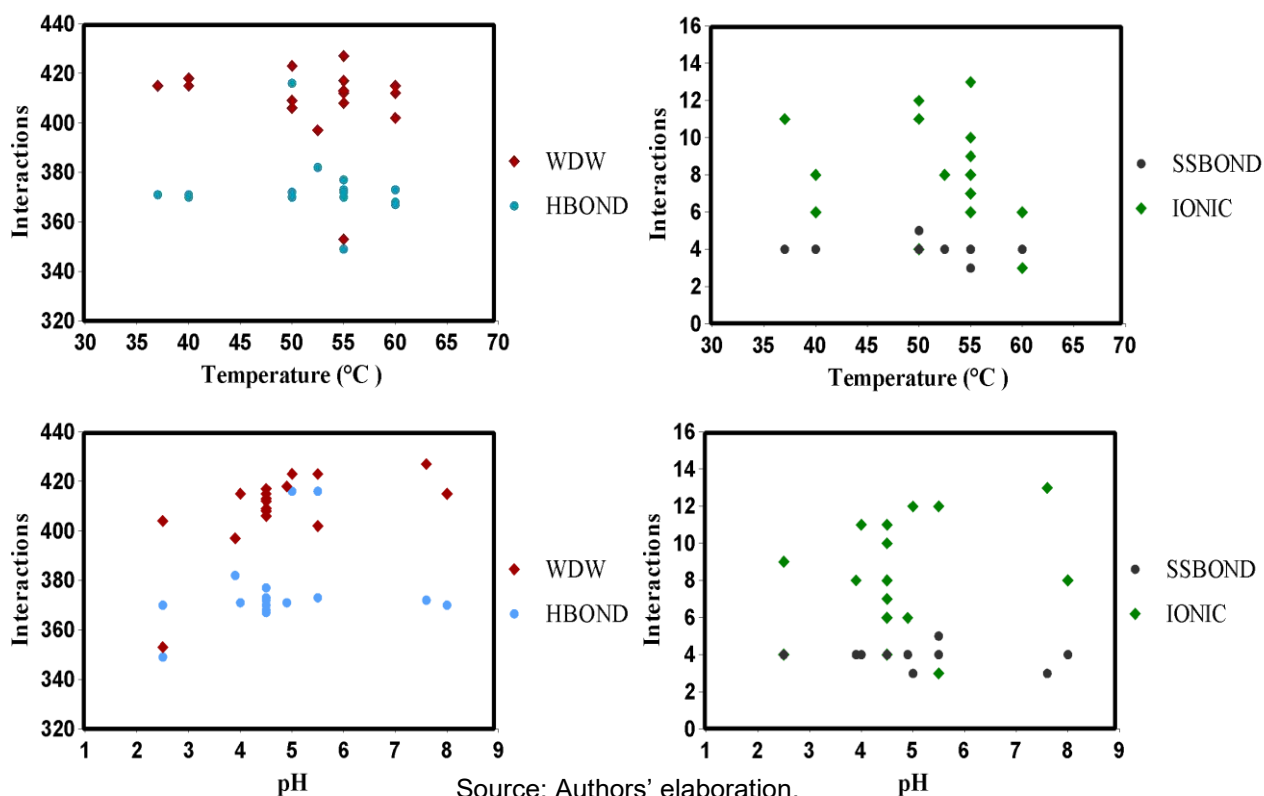
Despite the low identity between them, the three-dimensional structures of cluster 3 phytases presented great structural similarity to each other (Figure 7), which resulted in a low variation in the number of predicted hydrogen (349-416) and VdW interactions (353-427) and disulfide bonds (4-5) (Figure 8). This constancy evidences the non-relevance of the number of these interactions for the biochemical characteristics of these enzymes. On the other hand, the number of predicted ionic interactions varied among the evaluated structures (Figure 5), but has not yet been determinant for the different characteristics observed for each enzyme. In other words, the number of those interactions did not influence the catalytic behavior of these phytases.

Figure 7: Structural alignment between cluster 3 sequences, highlighting the structural similarity between them. The spheres in the center represent the substrate (phytic acid).



Source: Authors' elaboration.

Figure 8: Number of predict interactions and the ideal temperature and pH of the phytases from cluster 3. The blue, red, yellow and black dots represent hydrogen, Van der Waals and ionic interactions and disulfide bonds, respectively.



Source: Authors' elaboration.

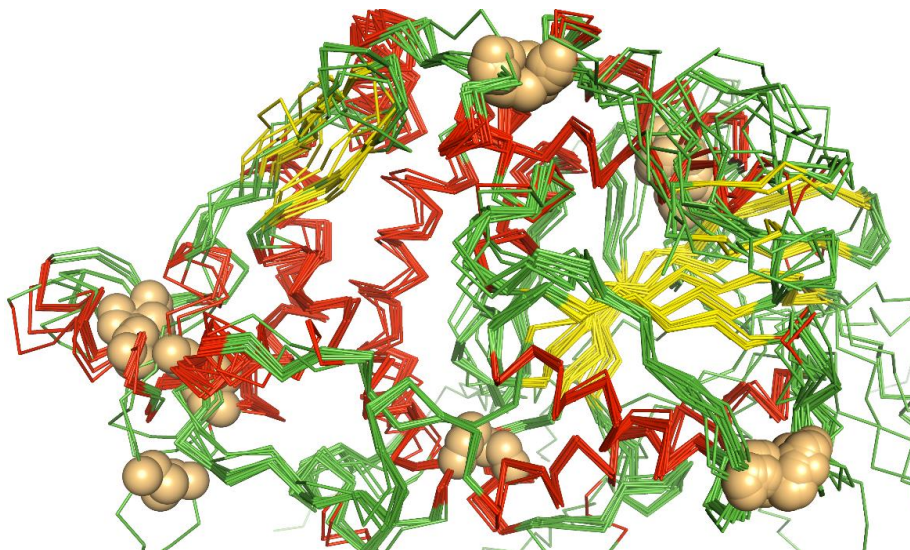
The number of hydrogen, ionic and disulfide bond interactions is believed to have a strong correlation with thermostability (Zhang 2007; Liao, *et al.*, 2013; Fei *et al.*, 2013; Hesampour *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2015; Tan *et al.*, 2016; Han *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020). However, here we show that, for these enzymes, this is not true.

Studies involving one specific enzyme indicate that substitutions of specific amino acid residues are relevant for the catalytic behavior of phytases, depending on the modifications they cause on the interactions that stabilize the enzyme structure. For example, Fei *et al.*, (2013) found a relation between thermostability and ionic interactions. They showed that the Q307D mutation constituted an additional salt bridge and led to a 9.15% increase in phytase thermostability, whereas the loss of this interaction (E31Q) reduced its thermostability in 13.96 %. The same behavior was described by Tan *et al.* (2016), who observed that the thermal resistance of a phytase was lower with the reduction of the number of ionic interactions. Other studies also describe a relation between the number of hydrogen bonds and the thermostability of individual phytases (Zhang 2007; Hesampour *et al.*, 2015). The thermostability of a *E. coli* phytase increased from 20 to 75 % due to increased electrostatic interactions related to the formation of hydrogen bonds resulting from the replacement of charged residues by hydrophobic and aromatic ones (Li *et al.*, 2019). However, those studies describe isolated analysis and could not be used for general considerations. Our study considered not only one phytase sequence, but the more representative group of phytases among those described, and is according to Noorbachta *et al.* (2013) and Kumar *et al.* (2016), who affirm that the number of interactions does not influence the phytase thermostability, but their location in the three-dimensional structure.

The disulfide bond, due to its well-known stabilization potential, also plays a key role in the conformational stability of the enzyme (Cheng *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2017). It promotes higher binding energy when compared to the other interactions in enzyme structure, leading to a more rigid and stable enzyme (Wang *et al.*, 2022). For this reason, inducing the formation of new disulfide bonds has been a mechanism to improve the thermostability of many enzymes, including phytases (Ebrahimi *et al.*, 2016; Tan *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2017; Navone *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2022).

On the other hand, although the disulfide bond has a stabilizing effect, in many cases the effect is not significant and may even produce the opposite effect. Cheng *et al.* (2015), successfully introduced a disulfide bond, but without any change in the biochemical properties of the enzyme. This can be attributed to negative effects on flexibility or the already rigidly packed hydrophobic core (Zhang *et al.*, 2020). As previously mentioned, the position of the bonds seems to be more related to stability efficiency. This strategy has been proposed by several authors as a strategy to be considered in order to obtain stability, with the exposed loop regions on the surface of the protein normally prioritized, due to its high mobility and flexibility in the structure (Noorbatcha *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2020). Some studies have revealed greater thermostability in most mutations found in the loop or surface regions (Kim and Lei 2008; Shivange 2016).

Figure 9: Overlay of predicted structures highlighting the location of disulfide bonds. Lines highlighted in green, red and yellow indicate loop, helix and beta sheets, respectively. Disulfide bonds are shown in spheres and can be seen mainly in the loop region.



Source: Authors' elaboration.

In the structural comparison between the phytases studied, it was observed that they mostly contain four disulfide bonds, but with very different thermal stability between them (Table 1). However, the disulfide bonds were mostly located in the loop regions or at the point of connection with the helix for some of them (Figure 9). Therefore, although

satisfactory results have been observed in the thermal stability of phytases in the cited studies, this method alone does not seem to be decisive in the stability of phytases. This result is confirmed by Zhang *et al.* (2020) that observed that when evaluating the introduction of disulfide bond in the stability of phytase of *Bacillus licheniformis* WHU, of all the variants analyzed, only one variant had a positive effect on the stability of phytases and all the others had a opposite effect on phytase stability or negative effect despite all of them being located in the loop region.

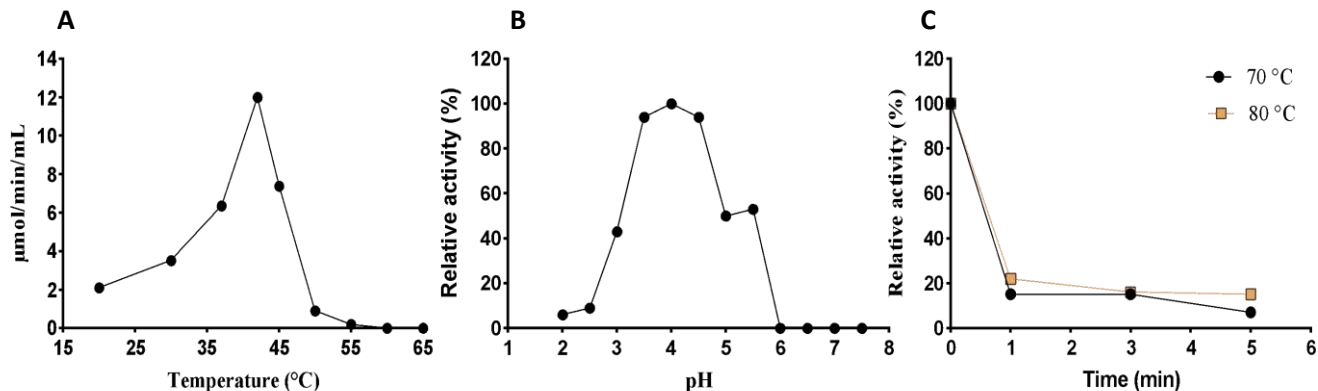
The relationship between the three-dimensional structure of proteins and their biological function is very complex and several factors may be involved to be carefully studied individually or in combination (Shivange *et al.*, 2016). Although some studies have been successful in evaluating single or multiple factors, the final effect of residue substitutions on enzyme stability is varied and sometimes undesirable (Navone *et al.*, 2021).

3.4 – Selection and expression of the phytase KM873028, from *Dendroctonus frontalis*

The rPhyXT52 gene, isolated from the metagenome of *Dendroctonus frontalis* (Tan *et al.*, 2016), was selected among the component sequences of cluster 3 due to the high productivity achieved in a heterologous system, its thermostability (93 % at 100 °C for 15 min) and ability to act in a medium with acidic pHs (3.5 - 5.5). In the present research, the gene was cloned and the protein was expressed in *P. pastoris*, originating a phytase with an ideal pH of activity between 3.5 and 4.5 and an optimal temperature of 42 °C.

However, temperatures above 45 °C drastically reduced the activity of this enzyme, maintaining a residual activity of only 22 % after just one minute of exposure at 70 and 80 °C (Figure 10). The phytase selected from the database also lacked stability in a wide pH range to be ideal for application in the animal industry (1,2 to 7,8) (Hamed, 2018). The significant differences observed for this enzyme expressed in a prokaryotic (Tan *et al.*, 2016) and a eukaryotic system highlight the need for a deeper understanding about the synthesis and post-translational processing of these enzymes, beyond the influences of the composition of the induction medium, in order to allow rational choices for better production and catalysis.

Figure 10: Activity of the KM873028 phytase expressed in *P. pastoris*. A: temperature; B: pH and C: thermostability at 70 and 80 °C.



Source: Authors' elaboration.

4 – CONCLUSION

The design of new, improved phytases demands a deep knowledge on the relation between their structure and function. For this, one strategy relies on the analysis of sequence homology and the development of 3D models in order to find critical points of mutations and interactions. In this work, we showed that phytases are very heterogeneous in relation to their primary sequence, but share similar structures. They were grouped in 5 clusters, where cluster 3 comprises HAPs as the most representative sequences. They share a conserved catalytic motif, beyond eight cysteine residues, which are predicted to form disulfide bonds. However, amino acids around the catalytic site were not conserved. On the other hand, contrary to what was believed, the number of interactions was not determinant for the catalytic behavior of these enzymes. Even the primary structure could not be directly related to their function, since phytase activity differed when expressed in prokaryotic or eukaryotic systems.

Future studies on sequence functions and 3D structure, associated with post-translational processing, and the extracellular environment in which they are inserted, are essential for better understanding the determinants of phytase activity. A deeper understanding about the correlation between the structure and function of these enzymes

will allow the development of new, improved catalysts with properties ideal for industrial processes.

Declaration of interest

This research was supported by the company Agroceres Multimix Nutrição Animal Ltda and results from a technical cooperation agreement for the development of technology of interest to the company. The author Tarley Araujo Barros is an employee of the company and actively participates in the strategic decisions related to this study.

Acknowledgements

The authors would like to thank the company Agroceres Multimix Nutrição Animal Ltda for funding the research and granting a scholarship to Elizabeth B. E. Pires and Matheus I. B. Aragão. The experiments were carried out in laboratories with equipment acquired through the financing of projects by the entities CAPES, CNPq and FAPEMIG, to which the authors acknowledge.

We are grateful to the Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol) of the Universidade Federal de Viçosa (UFV) for providing the facilities for the conduction of the experiments and data analysis. NuBioMol is financially supported by the following Brazilian agencies: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (Finep) and Sistema Nacional de Laboratórios em Nanotecnologias (SisNANO)/Ministério da Ciência, Tecnologia e Informação (MCTI).

Supplementary Information

All supplementary files are temporarily available here: <https://figshare.com/s/0b9714bd022b8c65a5c8>; and will be publish under the following: <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.20371791>.

References

- Abdulla, J. M., Rose, S. P., Mackenzie, A. M., & Pirgozliev, V. R. (2017). Feeding value of field beans (*Vicia faba* L. var. minor) with and without enzyme containing tannase, pectinase and xylanase activities for broilers. *Archives of Animal Nutrition*, 71(2), 150-164.
- Acquistapace, I. M., Thamopson, E. J., Kuhn, I., Bedford, M. R., Brearley, C. A., & Hemmings, A. M. (2022) Insights to the structural basis for the stereospecificity of the *Escherichia coli* phytase, AppA. *International journal of molecular science*. 23(11):6346.
- Akbarzadeh, A., Dehnavi, E., Aghaeepoor, M., & Amani, J. (2015). Optimization of recombinant expression of synthetic bacterial phytase in *Pichia pastoris* using response surface methodology. *Jundishapur journal of microbiology*, 8(12), e27553.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
- Arredondo, M. A., Casas, G. A., & Stein, H. H. (2019). Increasing levels of microbial phytase increases the digestibility of energy and minerals in diets fed to pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 248, 27-36.
- Azeke, M. A., Egielewa, S. J., Eigbogbo, M. U., & Ihimire, I. G. (2011). Effect of germination on the phytase activity, phytate and total phosphorus contents of rice (*Oryza sativa*), maize (*Zea mays*), millet (*Panicum miliaceum*), sorghum (*Sorghum bicolor*) and wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of food science and technology*, 48(6), 724-729.
- Bohn, L., Meyer, A. S., & Rasmussen, S. (2008). Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *Journal of Zhejiang University Science B*, 9(3), 165-191.
- Böhm, K., Herter, T., Müller, J. J., Borriss, R., & Heinemann, U. (2010). Crystal structure of *Klebsiella* sp. ASR1 phytase suggests substrate binding to a preformed active site that meets the requirements of a plant rhizosphere enzyme. *The FEBS Journal*, 277(5), 1284-1296.
- Cowieson, A. J., Wilcock, P., & Bedford, M. R. (2011). Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics. *World's Poultry Science Journal*, 67(2), 225-236.
- Dassa, J., Marck, C., & Boquet, P. L. (1990). The complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* gene appA reveals significant homology between pH 2.5 acid phosphatase and glucose-1-phosphatase. *Journal of Bacteriology*, 172(9), 5497-5500.
- Fu, D., Huang, H., Luo, H., Wang, Y., Yang, P., Meng, K. & Yao, B. (2008). A highly pH-stable phytase from *Yersinia kristeensenii*: cloning, expression, and characterization. *Enzyme and Microbial Technology*, 42(6), 499-505.

- Fu, D., Li, Z., Huang, H., Yuan, T., Shi, P., Luo, H., Meng, K., Yang, P & Yao, B. (2011). Catalytic efficiency of HAP phytases is determined by a key residue in close proximity to the active site. *Applied microbiology and biotechnology*, 90(4), 1295-1302.
- Gu, W., Huang, H., Meng, K., Yang, P., Fu, D., Luo, H., & Zhan, Z. (2009). Gene cloning, expression, and characterization of a novel phytase from *Dickeya paradisiaca*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 157(2), 113-123.
- Haefner, S., Knietsch, A., Scholten, E., Braun, J., Lohscheidt, M., & Zelder, O. (2005). Biotechnological production and applications of phytases. *Applied microbiology and biotechnology*, 68(5), 588-597.
- Hamed, R. (2018). Physiological parameters of the gastrointestinal fluid impact the dissolution behavior of the BCS class IIa drug valsartan. *Pharmaceutical Development and Technology*, 23(10), 1168-1176.
- Han, N., Miao, H., Yu, T., Xu, B., Yang, Y., Wu, Q., Zhang, R & Huang, Z. (2018). Enhancing thermal tolerance of *Aspergillus niger* PhyA phytase directed by structural comparison and computational simulation. *BMC Biotechnology*, 18(1), 1-8.
- Hesampour, A., Siadat, S. E. R., Malboobi, M. A., Mohandesi, N., Arab, S. S., & Ghahremanpour, M. M. (2015). Enhancement of thermostability and kinetic efficiency of *Aspergillus niger* PhyA phytase by site-directed mutagenesis. *Applied biochemistry and biotechnology*, 175(5), 2528-2541.
- Huber, K., Zeller, E., & Rodehutscord, M. (2015). Modulation of small intestinal phosphate transporter by dietary supplements of mineral phosphorus and phytase in broilers. *Poultry Science*, 94(5), 1009-1017.
- Huang, Y., Niu, B., Gao, Y., Fu, L., & Li, W. (2010). CD-HIT Suite: a web server for clustering and comparing biological sequences. *Bioinformatics*, 26(5), 680-682.
- Huang, H., Luo, H., Wang, Y., Fu, D., Shao, N., Wang, G. & Yao, B. (2008). A novel phytase from *Yersinia rohdei* with high phytate hydrolysis activity under low pH and strong pepsin conditions. *Applied microbiology and biotechnology*, 80(3), 417-426.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., & Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596 (7873), 583-589.
- Katoh, K., Rozewicki, J., & Yamada, K. D. (2019). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in bioinformatics*, 20(4), 1160-1166.
- Kim, Y. O., Kim, H. W., Lee, J. H., Kim, K. K., & Lee, S. J. (2006). Molecular cloning of the phytase gene from *Citrobacter braakii* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology letters*, 28(1), 33-38.

- Kryukov, V. S., Glebova, I. V., & Zinoviev, S. V. (2021) Reevaluation of phytase action mechanism in animal nutrition. *Biochemistry (Mosc.)*, 86(1), S152-S165.
- Kumar, K., Patel, K., Agrawal, D. C., & Khire, J. M. (2015). Insights into the unfolding pathway and identification of thermally sensitive regions of phytase from *Aspergillus niger* by molecular dynamics simulations. *Journal of Molecular Modeling*, 21(6), 1-13.
- Li, J., Li, X., Gai, Y., Sun, Y., & Zhang, D. (2019). Evolution of *E. coli* phytase for increased thermostability guided by rational parameters. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(3): 419-428.
- Liao, Y., Li, C. M., Chen, H., Wu, Q., Shan, Z., & Han, X. Y. (2013). Site-directed mutagenesis improves the thermostability and catalytic efficiency of *Aspergillus niger* N25 phytase mutated by I44E and T252R. *Applied biochemistry and biotechnology*, 171(4), 900-915.
- Luo, H., Huang, H., Yang, P., Wang, Y., Yuan, T., Wu, N., ... & Fan, Y. (2007). A novel phytase appA from *Citrobacter amalonaticus* CGMCC 1696: gene cloning and overexpression in *Pichia pastoris*. *Current Microbiology*, 55(3), 185-192.
- McCormick, K., Walk, C. L., Wyatt, C. L., & Adeola, O. (2017). Phosphorus utilization response of pigs and broiler chickens to diets supplemented with antimicrobials and phytase. *Animal Nutrition*, 3(1), 77-84.
- Mitchell, D. B., Vogel, K., Weimann, B. J., Pasamontes, L., & van Loon, A. P. (1997). The phytase subfamily of histidine acid phosphatases: isolation of genes for two novel phytases from the fungi *Aspergillus terreus* and *Myceliophthora thermophila*. *Microbiology*, 143(1), 245-252.
- Mulvenna, C. C., McCormack, U. M., Magowan, E., McKillen, J., Bedford, M. R., Walk, C. L., Oster, M., Reyer, H., Wimmers, K., Fornara, D. A., & Ball, M. E. E. (2022) The growth performance, nutrient digestibility, gut bacteria and bone strength of broilers offered alternative, sustainable diets varying in nutrient specification and phytase dose. *Animals (Basel.)*, 12(13):1669.
- Noorbach, I. A., Sultan, A. M., Salleh, H. M., & Amid, A. (2013). Understanding thermostability factors of *Aspergillus niger* PhyA phytase: a molecular dynamics study. *The protein journal*, 32(4), 309-316.
- Navone, L., Vogl, T., Luangthongkam, P., Blinco, J. A., Luna-Flores, C. H., Chen, X., Hellens, J. V., Mahler, S & Speight, R. (2021). Disulfide bond engineering of AppA phytase for increased thermostability requires co-expression of protein disulfide isomerase in *Pichia pastoris*. *Biotechnology for biofuels*, 14(1), 1-14.

- Nayeem, A., Chiang, S. J., Liu, S. W., Sun, Y., You, L., & Basch, J. (2009). Engineering enzymes for improved catalytic efficiency: a computational study of site mutagenesis in epothilone-B hydroxylase. *Protein Engineering, Design & Selection*, 22(4), 257-266.
- Niu, C., Yang, P., Luo, H., Huang, H., Wang, Y., & Yao, B. (2017). Engineering of *Yersinia* phytases to improve pepsin and trypsin resistance and thermostability and application potential in the food and feed industry. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(34), 7337-7344.
- Pal Roy, M., Mazumdar, D., Dutta, S., Saha, S. P., & Ghosh, S. (2016). Cloning and expression of phytase appA gene from *Shigella* sp. CD2 in *Pichia pastoris* and comparison of properties with recombinant enzyme expressed in *E. coli*. *PloS one*, 11(1), e0145745.
- Pearson, W. R. (2013). An introduction to sequence similarity (“homology”) searching. *Current protocols in bioinformatics*, Cap3, Unid 3.1.
- Piovesan, D., Minervini, G., & Tosatto, S. C. (2016). The RING 2.0 web server for high quality residue interaction networks. *Nucleic acids research*, 44(1), 367-374.
- Pires, E. B. E., de Freitas, A. J., Salgado, R. L., Guimarães, V. M., Pereira, F. A., & Eller, M. R. (2019). Production of fungal phytases from agroindustrial byproducts for pig diets. *Scientific Reports*, 9(1), 1-9.
- Pramanik, K., Kundu, S., Banerjee, S., Ghosh, P. K., & Maiti, T. K. (2018). Computational-based structural, functional and phylogenetic analysis of *Enterobacter* phytases. *3 Biotech*, 8(6), 1-12.
- Selim, S., Abdel-Megeid, N. S., Khalifa, H. K., Fakiha, K. G., Majrashi, K. A., & Hussein, E. (2022) Efficacy of various feed additives on performance, nutrient digestibility, bone quality, blood constituents, and phosphorus absorption and utilization of broiler chickens fed low phosphorus diet. *Animals (Basel.)*, 12(14):1742.
- Shao, N., Huang, H., Meng, K., Luo, H., Wang, Y., Yang, P., & Yao, B. (2008). Cloning, expression, and characterization of a new phytase from the phytopathogenic bacterium *Pectobacterium wasabiae* DSMZ 18074. *Journal of microbiology and biotechnology*, 18(7), 1221-1226.
- Shivange, A. V., Hoeffken, H. W., Haefner, S., & Schwaneberg, U. (2016). Protein consensus-based surface engineering (ProCoS): a computer-assisted method for directed protein evolution. *BioTechniques*, 61(6), 305-314.
- Shivange, A. V., Roccatano, D., & Schwaneberg, U. (2016). Iterative key-residues interrogation of a phytase with thermostability increasing substitutions identified in directed evolution. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(1), 227-242.
- Singh, B., Sharma, K. K., Kumari, A., Kumar, A., & Gakhar, S. K. (2018). Molecular modeling and docking of recombinant HAP-phytase of a thermophilic mould *Sporotrichum*

thermophile reveals insights into molecular catalysis and biochemical properties. *International journal of biological macromolecules*, 115, 501-508.

Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, 38(7), 3022-3027.

Tan, H., Wu, X., Xie, L., Huang, Z., Peng, W., & Gan, B. (2016a). Identification and characterization of a mesophilic phytase highly resilient to high-temperatures from a fungus-garden associated metagenome. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(5), 2225-2241.

Tan, H., Miao, R., Liu, T., Cao, X., Wu, X., Xie, L., & Gan, B. (2016b). Enhancing the Thermal Resistance of a Novel Acidobacteria-Derived Phytase by Engineering of Disulfide Bridges S. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(10), 1717-1722.

Vieira, M. S., Pereira, V. V., da Cunha Morales Álvares, A., Nogueira, L. M., Lima, W. J., Granjeiro, P. A., & Galdino, A. S. (2019). Expression and Biochemical Characterization of a *Yersinia intermedia* Phytase Expressed in *Escherichia coli*. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 10(2), 131-139.

Tausky, H. H., & Skorr, E. (1953). A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *The Journal of Biological Chemistry*, 202(2), 675–685.

Wang, H., Chen, H., Li, Q., Yu, F., Yan, Y., Liu, S., & Tan, J. (2022). Enhancing the thermostability of transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* based on the rational design of a disulfide bond. *Protein Expression and Purification*, 195, 106079.

Yang, W., Yang, Y., Zhang, L., Xu, H., Guo, X., Yang, X., & Cao, Y. (2017). Improved thermostability of an acidic xylanase from *Aspergillus sulphureus* by combined disulphide bridge introduction and proline residue substitution. *Scientific reports*, 7(1), 1-9.

Yao, M. Z., Wang, X., Wang, W., Fu, Y. J., & Liang, A. H. (2013). Improving the thermostability of *Escherichia coli* phytase, appA, by enhancement of glycosylation. *Biotechnology letters*, 35(10), 1669-1676.

Yi, Z., & Kornegay, E. T. (1996). Sites of phytase activity in the gastrointestinal tract of young pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 61(1-4), 361-368.

Zhang, G. Q., Dong, X. F., Wang, Z. H., Zhang, Q., Wang, H. X., & Tong, J. M. (2010). Purification, characterization, and cloning of a novel phytase with low pH optimum and strong proteolysis resistance from *Aspergillus ficuum* NTG-23. *Bioresource technology*, 101(11), 4125-4131.

Zhang, Z., Yang, J., Xie, P., Gao, Y., Bai, J., Zhang, C., Liu, L., Wang, Q & Gao, X. (2020). Characterization of a thermostable phytase from *Bacillus licheniformis* WHU and further stabilization of the enzyme through disulfide bond engineering. *Enzyme and Microbial Technology*, 142, 109679.

Zhao, W., Xiong, A., Fu, X., Gao, F., Tian, Y., & Peng, R. (2010). High level expression of an acid-stable phytase from *Citrobacter freundii* in *Pichia pastoris*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 162(8), 2157-2165.

Zinin, N. V., Serkina, A. V., Gelfand, M. S., Shevelev, A. B., & Sineoky, S. P. (2004). Gene cloning, expression and characterization of novel phytase from *Obesumbacterium proteus*. *FEMS microbiology letters*, 236(2), 283-290.

APÊNDICE

Supplementary material S1**Table:** Data compilation - phytases

Acession number	ID. Protein sequence	Microorganism	Ideal pH or pH range	Ideal temperature or thermostability	Metal ions	References
GQ304756	ADF49635	<i>Aspergillus ficuum</i> NTG-23	1.3	67 °C Loss activity at 80 °C / 10'	Not affected by Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Mn ²⁺ and Zn ²⁺ Stimulated by EDTA	Zhang, G. Q., Dong, X. F., Wang, Z. H., Zhang, Q., Wang, H. X., & Tong, J. M. (2010). Purification, characterization, and cloning of a novel phytase with low pH optimum and strong proteolysis resistance from <i>Aspergillus ficuum</i> NTG-23. <i>Bioresource Technology</i> , 101(11), 4125-4131.
EF608456; EF608455	ABU98780 ABU98779	<i>Yersinia rohdei</i>	1.5-6.0	55 °C Retains 50 % of activity at 80 °C / 4'	No information	Huang, H., Luo, H., Wang, Y., Fu, D., Shao, N., Wang, G., & Yao, B. (2008). A novel phytase from <i>Yersinia rohdei</i> with high phytate hydrolysis activity under low pH and strong pepsin conditions. <i>Applied Microbiology and Biotechnology</i> , 80(3), 417-426.
AY378096	AAQ90419	<i>Obesumbacterium proteus</i>	1.5-6.5	50 °C	No information	Zinin, N. V., Serkina, A. V., Gelfand, M. S., Shevelev, A. B., & Sineoky, S. P. (2004). Gene cloning, expression and characterization of novel phytase from <i>Obesumbacterium proteus</i> . <i>FEMS Microbiology Letters</i> , 236(2), 283-290.
AY150806.1	AAN60071	<i>Aspergillus niger</i> 113	2.0 and 5.0	60 °C	No information	Xiong, A. S., Yao, Q. H., Peng, R. H., Li, X., Fan, H. Q., Guo, M. J., & Zhang, S. L. (2004). Isolation, characterization, and molecular cloning of the cDNA encoding a novel phytase from <i>Aspergillus</i>

						<i>niger</i> 113 and high expression in <i>Pichia pastoris</i> . <i>BMB Reports</i> , 37(3), 282-291.
JQ045381		<i>Bacillus subtilis</i> MJA	2.0-8.0	37 °C	Affected by Cu ²⁺ and Fe ²⁺ Stimulated Mg ²⁺ or Ca ²⁺	El-Toukhy, N. M., Youssef, A. S., & Mikhail, M. G. (2013). Isolation, purification and characterization of phytase from <i>Bacillus subtilis</i> MJA. <i>African Journal of Biotechnology</i> , 12(20).
M58708	AAA72086	<i>Escherichia coli</i>	2.5	No information	No information	Dassa, J., Marck, C., & Boquet, P. L. (1990). The complete nucleotide sequence of the <i>Escherichia coli</i> gene appA reveals significant homology between pH 2.5 acid phosphatase and glucose-1-phosphatase. <i>Journal of Bacteriology</i> , 172(9), 5497-5500.
KX096887	ANQ80449	Synthetic construction	2.5	55 °C	No information	Tan, H., Miao, R., Liu, T., Cao, X., Wu, X., Xie, L., & Gan, B. (2016). Enhancing the thermal resistance of a novel <i>Acidobacteria</i> -derived phytase by engineering of disulfide bridges. <i>Journal of Microbiology and Biotechnology</i> , 26(10), 1717-1722.
L20567	AAA02934	<i>Aspergillus niger</i>	2.5	No information	No information	Ehrlich, K. C., Montalbano, B. G., Mullaney, E. J., Dischinger, H. C., & Ullah, A. H. (1993). Identification and cloning of a second phytase gene (phyB) from <i>Aspergillus niger</i> (ficcum). <i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i> , 195(1), 53-57.
L02421	AAA16898	<i>Aspergillus ficuum</i>	2.5	No information	No information	Piddington, C. S., Houston, C. S., Paloheimo, M., Cantrell, M., Miettinen-Oinonen, A., Nevalainen, H., & Rambosek, J. (1993). The cloning and

						sequencing of the genes encoding phytase (phy) and pH 2.5-optimum acid phosphatase (aph) from <i>Aspergillus niger</i> var. <i>awamori</i> . <i>Gene</i> , 133(1), 55-62.
HQ337903	AEA39182	<i>Oryza sativa</i> (PHY1)	3.5 2.5-4.5	57 °C	No information	Li, R. J., Lu, W. J., Guo, C. J., Li, X. J., Gu, J. T., & Kai, X. I. A. O. (2012). Molecular Characterization and Functional Analysis of OsPHY1, a Purple Acid Phosphatase (PAP)-Type Phytase Gene in Rice (<i>Oryza sativa</i> L.). <i>Journal of Integrative Agriculture</i> , 11(8), 1217-1226.
AY390262.1	AAR89622	<i>Citrobacter freundii</i>	2.5 and 4.5	50 °C	Stimulated by K ⁺ , Ca ²⁺ and Mg ²⁺	Zhao, W., Xiong, A., Fu, X., Gao, F., Tian, Y., & Peng, R. (2010). High level expression of an acid-stable phytase from <i>Citrobacter freundii</i> in <i>Pichia pastoris</i> . <i>Applied Biochemistry and Biotechnology</i> , 162(8), 2157-2165.
JN196454.1	AET71192	<i>Aspergillus niger</i> NII 08121	2.5-5.0	55 °C Retained 37 % of activity at 100 °C / 10'	No information	Ushasree, M. V., Vidya, J., & Pandey, A. (2014). Extracellular expression of a thermostable phytase (phyA) in <i>Kluyveromyces lactis</i> . <i>Process Biochemistry</i> , 49(9), 1440-1447.
AY426977.1	AAR08366	<i>Aspergillus niger</i> N14	2.5 and 5.5	55 °C Retained 70 % activity at 90 °C / 5'	No information	Zhao, D. M., Wang, M., Mu, X. J., Sun, M. L., & Wang, X. Y. (2007). Screening, cloning and overexpression of <i>Aspergillus niger</i> phytase (phyA) in <i>Pichia pastoris</i> with favourable characteristics. <i>Letters in Applied Microbiology</i> , 45(5), 522-528.
M94550.1	AAA32705	<i>Aspergillus niger</i>	2.0-6.0	55 and 60 °C Retained 50 % activity at 80 °C / 5'	No information	Han, Y., Wilson, D. B., & Lei, X. G. (1999). Expression of an <i>Aspergillus niger</i> phytase gene (phyA) in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . <i>Applied and</i>

						<i>Environmental Microbiology</i> , 65(5), 1915-1918.
AB675600		<i>Klebsiella pneumoniae</i> 9-3B	4.0 2.0-7.0	50 °C Loses activity at 70 °C	stimulated by Ca ²⁺ and EDTA Affected by Zn ²⁺ and Fe ²⁺	Escobin-Mopera, L., Ohtani, M., Sekiguchi, S., Sone, T., Abe, A., Tanaka, M., & Asano, K. (2012). Purification and characterization of phytase from <i>Klebsiella pneumoniae</i> 9-3B. <i>Journal of Bioscience and Bioengineering</i> , 113(5), 562-567.
KT267224		<i>Lactobacillus NKN51</i>	2.0-8.0	60 °C	Unaffected by Ca ²⁺ , Hg ²⁺ , Mg ²⁺ and Co ²⁺ Stimulated by Ag ¹⁺	Sharma, R., Kumar, P., Kaushal, V., Das, R., & Navani, N. K. (2018). A novel protein tyrosine phosphatase like phytase from <i>Lactobacillus fermentum</i> NKN51: cloning, characterization and application in mineral release for food technology applications. <i>Bioresource Technology</i> , 249, 1000-1008.
MK164398	QCY50814	<i>Aspergillus neoniger</i> CBS 115656	3.0 and 5.0 2.0-9.0	45 °C Retained 90 % at 70 °C / 10'	Affected by Zn ²⁺ , Fe ²⁺ , Fe ³⁺ and Al ³⁺	Zhou, S., Liu, Z., Xie, W., Yu, Y., Ning, C., Yuan, M., & Mou, H. (2019). Improving catalytic efficiency and maximum activity at low pH of <i>Aspergillus neoniger</i> phytase using rational design. <i>International Journal of Biological Macromolecules</i> , 131, 1117-1124.
GU936684	ADJ67813	<i>Yersinia enterocolitica</i>	2.0-9.0	60 °C	No information	Niu, C., Yang, P., Luo, H., Huang, H., Wang, Y., & Yao, B. (2017). Engineering of <i>Yersinia</i> phytases to improve pepsin and trypsin resistance and thermostability and application potential in the food and feed industry. <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> , 65(34), 7337-7344.
DQ975370	ABI98040	<i>Citrobacter amalonaticus</i> CGMCC 1696	2.5-10.0	55 °C	Stimulated by Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Co ²⁺ and Mn ²⁺	Luo, H., Huang, H., Yang, P., Wang, Y., Yuan, T., Wu, N., & Fan, Y. (2007). A novel phytase

					Affected by Zn ²⁺ , Ag ⁺ and Fe ²⁺	appA from <i>Citrobacter amalonaticus</i> CGMCC 1696: gene cloning and overexpression in <i>Pichia pastoris</i> . <i>Current Microbiology</i> , 55(3), 185-192.
U59805.1 U59806.1	AAB52507 AAB52508	<i>Aspergillus terreus</i> 9A1 <i>Myceliophthora thermophila</i>	2.5-7.5 3.5 and 6.0	No information	No information	Mitchell, D. B., Vogel, K., Weimann, B. J., Pasamontes, L., & van Loon, A. P. (1997). The phytase subfamily of histidine acid phosphatases: isolation of genes for two novel phytases from the fungi <i>Aspergillus terreus</i> and <i>Myceliophthora thermophila</i> . <i>Microbiology</i> , 143(1), 245-252.
KX865278.1	KX865278	<i>Aspergillus aculeatus</i> APF1	3.0	50 °C 0 % activity at 80 °C/ 5'	Affected by Mg ²⁺ , Al ³⁺ , Ca ²⁺ and Fe ²⁺	Saxena, A., Verma, M., Singh, B., Sangwan, P., Yadav, A. N., Dhaliwal, H. S., & Kumar, V. (2019). Characteristics of an acidic phytase from <i>Aspergillus aculeatus</i> APF1 for dephytinization of biofortified wheat genotypes. <i>Applied Biochemistry and Biotechnology</i> , 191(2), 679-694.
AM946981.2	CAM58513	<i>Lactobacillus salivarius</i> e <i>Lactobacillus lactis cremoris</i> MG 1363	3.0	No information	No information	Majidzadeh Heravi, R., Sankian, M., Kermanshahi, H., Nassiri, M. R., Heravi Moussavi, A., Roozbeh Nasiraii, L., & Varasteh, A. R. (2016). Construction of a probiotic lactic acid bacterium that expresses acid-resistant phytase enzyme. <i>Journal of Agricultural Science and Technology</i> , 18(4), 925-936.
EU203664	ABX75421	<i>Yersinia kristeensenii</i>	3.0-5.5	55 °C Retained 46 % activity at 80 °C / 5'	Affected by Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Pd ²⁺ , Hg ²⁺ , Fe ³⁺	Fu, D., Huang, H., Luo, H., Wang, Y., Yang, P., Meng, K., & Yao, B. (2008). A highly pH-stable phytase from <i>Yersinia kristeensenii</i> : cloning, expression, and characterization. <i>Enzyme and</i>

						<i>Microbial Technology</i> , 42(6), 499-505.
KF591676.1	AHA61669	<i>Mitsuokella jalaludinii</i> ATCC BAA-307	4.5 3.5-5.5	55 °C	Affected by Cu ²⁺ , Fe ³⁺ and Zn ²⁺ Stimulated by Ca ²⁺ , Mg ²⁺ and K ⁺	Tan, W. Q., Yee, P. C., Chin, S. C., Chin, Y. B., Vui, L. C. M. W., Abdullah, N., & Wan, H. Y. (2015). Cloning of a novel phytase from an anaerobic rumen bacterium, <i>Mitsuokella jalaludinii</i> , and its expression in <i>Escherichia coli</i> . <i>Journal of Integrative Agriculture</i> , 14(9), 1816-1826.
LN864510	CRL66425	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> US573	7.5 4.0-10.0	70 °C Retained 62 % activity at 90 °C / 10'	Stimulated by Ca ²⁺	Boukhris, I., Farhat-Khemakhem, A., Blibech, M., Bouchaala, K., & Chouayekh, H. (2015). Characterization of an extremely salt-tolerant and thermostable phytase from <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> US573. <i>International Journal of Biological Macromolecules</i> , 80, 581-587.
AY071824	AAL55406	<i>Penicillium oxalicum</i>	4.5	55 °C	Affected by Ca ²⁺ , Cu ²⁺ and Zn ²⁺	Lee, S. H., Cho, J., Bok, J., Kang, S., Choi, Y., & Lee, P. C. (2015). Characterization, gene cloning, and sequencing of a fungal phytase, PhyA, from <i>Penicillium oxalicum</i> PJ3. <i>Preparative Biochemistry and Biotechnology</i> , 45(4), 336-347.
AF236107	AF236107	<i>Ipomoea batatas</i>	No information	No information	No information	Schenk, G., Guddat, L. W., Ge, Y., Carrington, L. E., Hume, D. A., Hamilton, S., & De Jersey, J. (2000). Identification of mammalian-like purple acid phosphatases in a wide range of plants. <i>Gene</i> , 250 (1-2), 117-125.
KP159621	AJW67217	Construção sintética	3.5-5.0	60 °C Retained 70 % activity at 70 °C	No information	Akbarzadeh, A., Dehnavi, E., Aghaeepoor, M., & Amani, J. (2015). Optimization of recombinant expression of synthetic bacterial phytase in

						<i>Pichia pastoris</i> using response surface methodology. <i>Jundishapur Journal of Microbiology</i> , 8(12), e27553.
KJ879951.1	KJ879951.1	<i>Bacillus aryabhatai</i> RS1	6.5 3.5-9.5	40 °C Loses activity above 40 °C	Stimulated by Ca ²⁺ and Mg ²⁺ Affected by Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Mn ²⁺ , Co ²⁺ and Fe ²⁺	Pal Roy, M., Datta, S., & Ghosh, S. (2017). A novel extracellular low-temperature active phytase from <i>Bacillus aryabhatai</i> RS1 with potential application in plant growth. <i>Biotechnology Progress</i> , 33(3), 633-641.
GU120223	ADK38546	<i>Aspergillus sp.</i> A25	5.5 3.0-6.0	37 °C Retained 86 % at 90 C / 10'	No information	Ma, Z. Y., Pu, S. C., Jiang, J. J., Huang, B., Fan, M. Z., & Li, Z. Z. (2011). A novel thermostable phytase from the fungus <i>Aspergillus aculeatus</i> RCEF 4894: gene cloning and expression in <i>Pichia pastoris</i> . <i>World Journal of Microbiology and Biotechnology</i> , 27(3), 679-686.
FN641803.1	FN641803	<i>Pichia anomala</i>	4.0	60 °C	No information	Kaur, P., Singh, B., Böer, E., Straube, N., Piontek, M., Satyanarayana, T., & Kunze, G. (2010). Pphy—a cell-bound phytase from the yeast <i>Pichia anomala</i> : molecular cloning of the gene PPHY and characterization of the recombinant enzyme. <i>Journal of Biotechnology</i> , 149(1-2), 8-15.
KM873028	AKH61963	<i>fungus-garden</i>	3.9	52,5 °C Retained 93 % activity at 100 °C / 10'	Stimulated by Ca ²⁺ Affected by Pb ²⁺ , Co ²⁺ , Cd ²⁺ and Cr ³⁺	Tan, H., Wu, X., Xie, L., Huang, Z., Peng, W., & Gan, B. (2016). Identification and characterization of a mesophilic phytase highly resilient to high-temperatures from a fungus-garden associated metagenome. <i>Applied Microbiology and Biotechnology</i> , 100(5), 2225-2241.

JE0369	JE0369	<i>Arabidopsis thaliana</i> F21M12.26	Histidine acid phosphatase	No information	No information	Mullaney, E. J., & Ullah, A. H. (1998). Identification of a Histidine Acid Phosphatase (phyA)-like Gene in <i>Arabidopsis thaliana</i> . <i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i> , 251(1), 252-255.
U75531	U75531	<i>Zea mays</i>	Histidine acid phosphatase	No information	No information	Maugenest, S., Martinez, I., & Lescure, A. M. (1997). Cloning and characterization of a cDNA encoding a maize seedling phytase. <i>Biochemical Journal</i> , 322(2), 511-517.
EU203663	ABX75420	<i>Pectobacterium wasabiae</i> DSMZ 18074	4.0-5.5	50 °C	Affected by Fe ³⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Cr ³⁺ and Ag ⁺	Shao, N., Huang, H., Meng, K., Luo, H., Wang, Y., Yang, P., & Yao, B. (2008). Cloning, expression, and characterization of a new phytase from the phytopathogenic bacterium <i>Pectobacterium wasabiae</i> DSMZ 18074. <i>Journal of Microbiology and Biotechnology</i> , 18(7), 1221-1226.
AY471611	AAS45884	<i>Citrobacter braakii</i>	4.0	37 °C Retained 66 % activity at 70 °C/10'	No information	Kim, Y. O., Kim, H. W., Lee, J. H., Kim, K. K., & Lee, S. J. (2006). Molecular cloning of the phytase gene from <i>Citrobacter braakii</i> and its expression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . <i>Biotechnology Letters</i> , 28(1), 33-38.
EF121003	ABN04184	<i>Debaryomyces castellii</i> CBS 2923	4.0-4.5	60 °C 65 °C / 1 h	No information	Ragon, M., Neugnot-Roux, V., Chemardin, P., Moulin, G., & Boze, H. (2008). Molecular gene cloning and overexpression of the phytase from <i>Debaryomyces castellii</i> CBS 2923. <i>Protein Expression and Purification</i> , 58(2), 275-283.
AF272346	AAK49438	<i>Soybean</i>	4.0-5-5	58 °C	No information	Hegeman, C. E., & Grabau, E. A. (2001). A novel phytase with

				Loses activity above 60 °C		sequence similarity to purple acid phosphatases is expressed in cotyledons of germinating soybean seedlings. <i>Plant Physiology</i> , 126(4), 1598-1608.
KF939525.1	AHI16258	<i>Aspergillus japonicus</i>	4.0-6.5	50 °C Loses activity at 40' / 50 °C	No information	Fonseca-Maldonado, R., Maller, A., Bonneil, E., Thibault, P., Botelho-Machado, C., Ward, R. J., & de Moraes, M. D. L. T. (2014). Biochemical properties of glycosylation and characterization of a histidine acid phosphatase (phytase) expressed in <i>Pichia pastoris</i> . <i>Protein Expression and Purification</i> , 99, 43-49.
KY471463	AQX17444	<i>Pseudomonas sp. FB15</i>	4.0-7.0	40 °C 55 % activity at 80 °C / 20' with Ca ²⁺	Stimulated by Ca ²⁺	Jang, W. J., Lee, J. M., Park, H. D., Choi, Y. B., & Kong, I. S. (2018). N-terminal domain of the beta-propeller phytase of <i>Pseudomonas sp. FB15</i> plays a role for retention of low-temperature activity and catalytic efficiency. <i>Enzyme and Microbial Technology</i> , 117, 84-90.
AB469851	AB469851	<i>Hansenula fabianii J640</i>	4.5	50 °C Less 40 % activity at 60°C / 20'	Stimulated by Zn ²⁺ Unaffected by Ca ²⁺ , K ⁺ , Na ⁺ and Mg ²⁺	Watanabe, T., Ikeda, H., Masaki, K., Fujii, T., & Iefuji, H. (2009). Cloning and characterization of a novel phytase from wastewater treatment yeast <i>Hansenula fabianii J640</i> and expression in <i>Pichia pastoris</i> . <i>Journal of bioscience and bioengineering</i> , 108(3), 225-230.
EU159561	EU159561	<i>Buttiauxella sp. GC21</i>	4.5	55 °C Lost activity above 55 °C	Affected by Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Hg ²⁺ and Fe ³⁺	Shi, P., Huang, H., Wang, Y., Luo, H., Wu, B., Meng, K., & Yao, B. (2008). A novel phytase gene <i>appA</i> from <i>Buttiauxella sp. GC21</i> isolated from grass carp intestine. <i>Aquaculture</i> , 275(1-4), 70-75.

GQ369735	ACU81076	<i>Construção sintética</i>	4.5	50 °C Retained 75 activity at 85 °C / 5'	No information	Yao, M. Z., Wang, X., Wang, W., Fu, Y. J., & Liang, A. H. (2013). Improving the thermostability of <i>Escherichia coli</i> phytase, appA, by enhancement of glycosylation. <i>Biotechnology letters</i> , 35(10), 1669-1676.
EU086595	ABW76125	<i>Dickeya paradisiaca</i> .	4.5-7.5	55 °C Lost activity at 60 °C / 5'	Affected by Cr ³⁺ , Cu ²⁺ , Fe ³⁺ , Zn ²⁺ , Ni ²⁺ and Mn ²⁺	Gu, W., Huang, H., Meng, K., Yang, P., Fu, D., Luo, H., & Zhan, Z. (2009). Gene cloning, expression, and characterization of a novel phytase from <i>Dickeya paradisiaca</i> . <i>Applied biochemistry and biotechnology</i> , 157(2), 113-123.
AJ310696 AJ310697 AJ310698 AJ310699 AJ310700	CAC48195 CAC48160 CAC48163 CAC48164 CAC48234	<i>Peniophora lycii</i> <i>Agrocybe pediades</i> <i>Ceriporia sp.</i> <i>PhyA1</i> <i>Ceriporia sp.</i> <i>PhyA2</i> <i>Trametes pubescens</i>	4.0-4.5 5.0-6.0 5.5-6.0 5.0-6.0 5.0-5.5	40 and 60°C	No information	Lassen, S. F., Breinholt, J., Østergaard, P. R., Brugger, R., Bischoff, A., Wyss, M., & Fuglsang, C. C. (2001). Expression, gene cloning, and characterization of five novel phytases from four basidiomycete fungi: <i>Peniophora lycii</i> , <i>Agrocybe pediades</i> , a <i>Ceriporia sp.</i> , and <i>Trametes pubescens</i> . <i>Applied and environmental microbiology</i> , 67(10), 4701-4707.
NC_012971.2	NC_012971	<i>Escherichia coli</i> <i>BL21 (DE3)</i>	5.0	No information	No information	Pakbaten, B., Majidzadeh Heravi, R., Kermanshahi, H., Sekhavati, M. H., Javadmanesh, A., & Mohammadi Ziarat, M. (2018). Production of phytase enzyme by a bioengineered probiotic for degrading of phytate phosphorus in the digestive tract of poultry. <i>Probiotics and antimicrobial proteins</i> , 11(2), 580-587.
KF535924.1	AHA61669	<i>Myceliophthora thermophila</i> <i>BJTLR50</i>	5.0	60 °C	Affected by Ca ²⁺ , Co ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ³⁺ , Zn ²⁺ and Al ³⁺	Ranjan, B., & Satyanarayana, T. (2016). Recombinant HAP phytase of the thermophilic mold

						Sporotrichum thermophile: expression of the codon-optimized phytase gene in Pichia pastoris and applications. Molecular biotechnology, 58(2), 137-147.
EU082006	ABU53001	<i>Kodamaea ohmeri</i> BG3	5.0	65 °C Stable at 65 °C / 1h	No informatin	Li, X., Liu, Z., Chi, Z., Li, J., & Wang, X. (2009). Molecular cloning, characterization, and expression of the phytase gene from marine yeast Kodamaea ohmeri BG3. mycological research, 113(1), 24-32.
AY745738.1	AAU93517	<i>Aspergillus fumigatus</i> WY-2.	5.0-6.5	55 43 % activity at 90 °C / 15'	Affected by Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ³⁺ , and Al ³⁺	Wang, Y., Gao, X., Su, Q., Wu, W., & An, L. (2007). Cloning, expression, and enzyme characterization of an acid heat-stable phytase from Aspergillus fumigatus WY-2. Current microbiology, 55(1), 65-70.
CWYCQ02	CWYCQ02	<i>Bacillus</i>	5.0-10.0	55 °C 55 % activity at 80 °C / 15'	No information	Li, Z., Zhao, A., Wang, X., Jin, X., Li, J., & Yu, M. (2013). Cloning, overexpression, and functional characterization of a phytase from the genus Bacillus. Microbial Physiology, 23(3), 193-202.
LN831294.1	CRL66425	<i>Streptomyces sp.</i> US42	5.0-10.0	65 °C Retained 80 % activity at 75 °C / 15'	Stimulated by Ca ²⁺	Boukhris, I., Farhat-Khemakhem, A., Bouchaala, K., Viroille, M. J., & Chouayekh, H. (2016). Cloning and characterization of the first actinomycete β-propeller phytase from Streptomyces sp. US42. Journal of Basic Microbiology, 56(10), 1080-1089.
JQ012799 JQ012801			5.5	37 °C and 40 °C Lost activity above 40 °C	No information	Gontia-Mishra, I., Deshmukh, D., Tripathi, N., Bardiya-Bhurat, K., Tantai, K., & Tiwari, S. (2013). Isolation, morphological and molecular characterization of phytate-hydrolysing fungi by 18S rDNA sequence analysis.

						Brazilian Journal of Microbiology, 44, 317-323.
FR865899	CCA94903	<i>Shigella sp. CD2</i>	5.5	60 °C More than 50 % at 70 °C	Affected by Cu ²⁺ , Fe ²⁺ and Zn ²⁺ Stimulated by Ca ²⁺ , Mg ²⁺ and Mn ²⁺	Pal Roy, M., Mazumdar, D., Dutta, S., Saha, S. P., & Ghosh, S. (2016). Cloning and expression of phytase appA gene from <i>Shigella sp. CD2</i> in <i>Pichia pastoris</i> and comparison of properties with recombinant enzyme expressed in <i>E. coli</i> . <i>PloS one</i> , 11(1), e0145745.
U92439		<i>Enterobacter cloacae</i>	5.5	40 °C Lost 50 % activity at 55°C	Affected by Al ³⁺ , Ca ²⁺ , Mn ²⁺ , Zn ²⁺ , Cd ²⁺ and Mg ²⁺ Stimulated by Cu ²⁺	Kang, S. H., Cho, K. K., Bok, J. D., Kim, S. C., Cho, J. S., Lee, P. C. W., & Choi, Y. J. (2006). Cloning, sequencing and characterization of a novel phosphatase gene, <i>pho1</i> , from soil bacterium <i>Enterobacter sp. 4</i> . <i>Current microbiology</i> , 52(4), 243-248.
JF958129	AEQ61490	<i>Bacillus subtilis GYPB06</i>	5.5-6.5	60°C Retained 26 % at 80 °C	No information	Miao, Y., Xu, H., Fei, B., Qiao, D., & Cao, Y. (2013). Expression of food-grade phytase in <i>Lactococcus lactis</i> from optimized conditions in milk broth. <i>Journal of bioscience and bioengineering</i> , 116(1), 34-38.
CP000699.1	CP000699	<i>Sphingomonas wittichii RW1</i>	6.0	55 °C Retained 68 % activity at 80 °C / 10'	Affected by Cu ²⁺ , Fe ³⁺ , and Zn ²⁺ Stimulated by Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Li ⁺ , and K ⁺	Sanangelantoni, A. M., Malatrasi, M., Trivelloni, E., Visioli, G., & Agrimonti, C. (2018). A novel β-propeller phytase from the dioxin-degrading bacterium <i>Sphingomonas wittichii RW-1</i> . <i>Applied microbiology and biotechnology</i> , 102(19), 8351-8358.
EF206311	ABM92308	<i>Aspergillus ficuum</i>	6.0	70 °C Lost activity above 80 °C	No information	Zuo, R., Chang, J., Yin, Q., Chen, L., Chen, Q., Yang, X., & Feng, H. (2010). Phytase gene expression in <i>Lactobacillus</i> and analysis of its

						biochemical characteristics. Microbiological research, 165(4), 329-335.
AF236109	AAK49438		6.0	No information	No information	Mullaney, E. J., & Ullah, A. H. (1998). Conservation of the Active Site Motif in <i>Aspergillus niger</i> (ficcum) pH 6.0 Optimum Acid Phosphatase and Kidney Bean Purple Acid Phosphatase. Biochemical and biophysical research communications, 243(2), 471-473.
GU143090	ACZ57955	<i>Bacillus sp. MD2</i>	6.0-7.0	67–73 °C Retained 40 % activity at 100 °C / 10'	Stimulated by Ca ²⁺	Tran, T. T., Mamo, G., Mattiasson, B., & Hatti-Kaul, R. (2010). A thermostable phytase from <i>Bacillus sp. MD2</i> : cloning, expression and high-level production in <i>Escherichia coli</i> . Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 37(3), 279-287.
AAU22048.2	AAU22048	<i>B. licheniformis</i> ATCC 14580	6.0-7.5	70–75 °C Retained 40 % activity at 90 °C	Affected by Mn ²⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺ and Zn ²⁺ Stimulated by Ca ²⁺	Borgi, M. A., Boudebouze, S., Aghajari, N., Szukala, F., Pons, N., Maguin, E., & Rhimi, M. (2014). The attractive recombinant phytase from <i>Bacillus licheniformis</i> : biochemical and molecular characterization. Applied microbiology and biotechnology, 98(13), 5937-5947.
KF953809	AHM26864	<i>Bacillus cereus</i> SPC09	6.0-8.0	60 °C Lost activity above 60 °C	No information	Zhang, S., Liao, S. A., Yu, X., Lu, H., Xian, J. A., Guo, H., & Xie, J. (2015). Microbial diversity of mangrove sediment in Shenzhen Bay and gene cloning, characterization of an isolated phytase-producing strain of SPC09 <i>B. cereus</i> . Applied microbiology and biotechnology, 99(12), 5339-5350.

AF029053	AAC31775	<i>Bacillus subtilis</i> VTTE-68013	7.0	55 °C Retained 20 % activity at 75 °C	No information	Kerovuo, J., Lauraeus, M., Nurminen, P., Kalkkinen, N., & Apajalahti, J. (1998). Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from <i>Bacillus subtilis</i> . <i>Applied and environmental microbiology</i> , 64(6), 2079-2085.
FJ422960.1		<i>Pedobacter</i> <i>nyackensis</i> MJ11	7.0	45 °C Lost >65 % activity at 50 °C / 5' absence of Ca ²⁺	Affected by Zn ²⁺ , and Pb ²⁺	Huang, H., Shao, N., Wang, Y., Luo, H., Yang, P., Zhou, Z., & Yao, B. (2009). A novel beta-propeller phytase from <i>Pedobacter nyackensis</i> MJ11 CGMCC 2503 with potential as an aquatic feed additive. <i>Applied microbiology and biotechnology</i> , 83(2), 249-259.
EF536824	ABP52059	<i>Bacillus</i> <i>sp.DECSR1</i>	7.0	55 °C Retained 37 % activity at 95 °C / 10' with Ca ²⁺	Affected by Cu ²⁺ , Fe ²⁺ , Mg ²⁺ , Co ²⁺ , Zn ²⁺ and Mn ²⁺	Rao, D. E. C. S., Rao, K. V., & Reddy, V. D. (2008). Cloning and expression of <i>Bacillus</i> phytase gene (phy) in <i>Escherichia coli</i> and recovery of active enzyme from the inclusion bodies. <i>Journal of Applied Microbiology</i> , 105(4), 1128-1137.
CAB13871	CAB13871	<i>B. subtilis</i> 168	7.0	No information	No information	Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G. O., Azevedo, V., & Yoshikawa, H. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium <i>Bacillus subtilis</i> . <i>Nature</i> , 390(6657), 249-256.
HQ234325.1	AEA39182	<i>Bacillus subtilis</i> B.S.46	7.30	56.5 °C Retained 60 % activity at 60 °C / 2h	Affected by Cu ²⁺ , Mg ²⁺ , Fe ²⁺ , Zn ²⁺ , Hg ²⁺ and Mn ²⁺ Stimulated by Ca ²⁺ and Li ⁺	Rocky-Salimi, K., Hashemi, M., Safari, M., & Mousivand, M. (2016). A novel phytase characterized by thermostability and high pH tolerance from rice phyllosphere isolated <i>Bacillus subtilis</i> BS 46. <i>Journal of</i>

						advanced research, 7(3), 381-390.
U85968	AAC38573	<i>B. subtilis</i> DS11	7.0-8.0	70 °C Retained 50 % activity at 90 °C / 10' with Ca ²⁺	Affected by Cd ²⁺ and Mn ²⁺ Stimulated by Ca ²⁺	Kim, Y. O., Lee, J. K., Kim, H. K., Yu, J. H., & Oh, T. K. (1998). Cloning of the thermostable phytase gene (phy) from <i>Bacillus</i> sp. DS11 and its overexpression in <i>Escherichia coli</i> . <i>FEMS Microbiology Letters</i> , 162(1), 185-191.
FJ986327	ACR78677	<i>B. subtilis</i> WYCQ02	7.0 e 8.0	55 °C Retained 62 % at 70 °C / 10'	No information	Li, Z., Zhao, A., Wang, X., Jin, X., Li, J., & Yu, M. (2013). Cloning, overexpression, and functional characterization of a phytase from the genus <i>Bacillus</i> . <i>Microbial Physiology</i> , 23(3), 193-202.
KF305767		<i>Thermomyces lanuginosus</i> DSM 10635	7.0-9.0	60 °C Retained 53 % activity at 70 °C / 1h	Affected by Fe ³⁺ , Ni ²⁺ and Cu ⁺ Stimulated by Ca ²⁺ and Ba ²⁺	Li, X. J., Zheng, R. C., Wu, Z. M., Ding, X., & Zheng, Y. G. (2014). Thermophilic esterase from <i>Thermomyces lanuginosus</i> : molecular cloning, functional expression and biochemical characterization. <i>Protein Expression and Purification</i> , 101, 1-7.
AM501550.1	CAM58513	<i>B. subtilis</i> US417	7.5	55 °C Retained 22 % activity at 60 °C / 10' without Ca ²⁺	Affected by others mettalic ions Stimulated by Ca ²⁺	Farhat, A., Chouayekh, H., Ben Farhat, M., Bouchaala, K., & Bejar, S. (2008). Gene cloning and characterization of a thermostable phytase from <i>Bacillus subtilis</i> US417 and assessment of its potential as a feed additive in comparison with a commercial enzyme. <i>Molecular Biotechnology</i> , 40(2), 127-135.
MN688990	QJA16365	<i>Arthrotrrys oligospora</i>	7.5	50 °C	Affected by Fe ³⁺ , Ni ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ and Mn ²⁺	Hou, X., Shen, Z., Li, N., Kong, X., Sheng, K., Wang, J., & Wang, Y. (2020). A novel fungal beta-propeller phytase from nematophagous <i>Arthrotrrys</i>

					Stimulated by Ca ²⁺ , Na ⁺ , K ⁺ and Mg ²⁺	<i>oligospora</i> : characterization and potential application in phosphorus and mineral release for feed processing. <i>Microbial Cell Factories</i> , 19(1), 1-13.
DQ986462.1	ABI95370	<i>Yersinia intermedia</i>	8.0	40 °C Lost 40 % activity at 40 °C / 1h	Affected by Mn ²⁺ , Cr ²⁺ , Ca ²⁺ , and K ⁺ Stimulated by Cu ²⁺	Vieira, M. S., Pereira, V. V., da Cunha Morales Álvares, A., Nogueira, L. M., Lima, W. J., Granjeiro, P. A., & Galdino, A. S. (2019). Expression and Biochemical Characterization of a <i>Yersinia intermedia</i> Phytase Expressed in <i>Escherichia coli</i> . <i>Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture</i> , 10(2), 131-139.
JMRT00000000.2		<i>Pantoea sp. 3.5.1</i>	No information	No information	No information	Suleimanova, A. D., Toymontseva, A. A., Boulygina, E. A., Kazakov, S. V., Mardanova, A. M., Balaban, N. P., & Sharipova, M. R. (2015). High-quality draft genome sequence of a new phytase-producing microorganism <i>Pantoea sp. 3.5.1</i> . <i>Standards in Genomic Sciences</i> , 10(1), 1-9.
JX406744.1		<i>Bacillus licheniformis</i> PB-13	No information	No information	No information	Kumar, V., Singh, G., Sangwan, P., Verma, A. K., & Agrawal, S. (2014). Cloning, sequencing, and in silico analysis of β-propeller phytase <i>Bacillus licheniformis</i> strain PB-13. <i>Biotechnology Research International</i> , 2014.
EU938135			2.5	45 °C Retained 90 % activity at 40 °C / 4 h	No information	Xie, Z., Fong, W. P., & Tsang, P. W. K. (2020). Engineering and optimization of phosphate-responsive phytase expression in <i>Pichia pastoris</i> yeast for phytate hydrolysis. <i>Enzyme and Microbial Technology</i> , 137, 109533.

Source: Authors' elaboration.

Supplementary material S3

Table: Correlation analysis between interactions and thermostability of cluster 3 phytases.

ID PROTEIN	INTERACTION				RELATIVE ACTIVITY		
	HBOND	WDW	IONIC BOND	SSBOND	%	T(°C)	t (min)
ABI95370 ^b	370	415	8	4	40	40	60
ABU98779 ^b	373	413	8	4	50	80	4
ABU98780 ^a	373	412	6	4	70	80	4
ABX75421 ^a	370	408	7	4	46	80	10
ADJ67813 ^b	367	415	6	4	60	60	30
ABI98040 ^b	377	417	10	4	0	60	-
AAR89622 ^b	370	409	11	4	60	80	3
AAS45884 ^b	371	415	11	4	66	70	10
ABX75420 ^b	416	423	12	5	10	70	2
AAA72086 ^b	370	404	4	4	-	-	-
ACU81076 ^a	372	406	4	4	75	85	5
CCA94903 ^b	373	402	3	4	50	70	-
AKH61963 ^a	382	397	8	4	93	100	15
ANQ80449 ^a	349	353	9	4	80	80	7
AJW67217 ^a	368	412	6	4	70	70	-
AAB52508 ^b	416	423	12	5	-	-	-
AAQ90419 ^b	371	418	6	4	0	50	-
ABW76125 ^b	372	427	13	3	0	60	5

^a: More thermostable phytases; ^b: Less stable phytases; -: No information.

Source: Authors' elaboration.

CAPITULO II

PRODUÇÃO E CONSERVAÇÃO DE UMA FITASE VISANDO A APLICAÇÃO PARA AUMENTO DA DIGESTIBILIDADE DE RAÇÕES PARA MONOGÁSTRICOS

RESUMO

O fitato constitui um importante fator antinutricional em rações fornecidas a animais monogástricos, pois dificulta a absorção de fósforo, minerais, proteínas, gorduras e amido devido à ausência ou atividade limitada da fitase em seu trato digestivo. Dessa forma, fitases exógenas têm sido amplamente adicionadas para aumentar o desempenho dos animais. Entretanto, as enzimas comerciais disponíveis apresentam elevados custos e nem sempre podem ser submetidas ao processo de peletização durante o processamento das rações, por não possuírem termoestabilidade suficiente. Assim, o objetivo deste trabalho foi clonar e expressar uma fitase termorresistente em sistema heterólogo e padronizar um processo para a secagem do extrato enzimático obtido. Nesse caso, foram testados os métodos de secagem por liofilização e por Spray Dryer, este utilizando diferentes concentrações de maltodextrina. A fitase originada do fungo *Dendroctonus frontalis* foi selecionada entre todas as fitases já descritas devido à alta termoestabilidade apresentada quando expressa em *Escherichia coli*. A sequência codificadora foi otimizada em códons para expressão em *Pichia pastoris* GS115 e sintetizada no plasmídeo pPICZαB. Após a clonagem e seleção dos transformantes, a expressão da fitase foi avaliada em diferentes composições de meios de cultivo e pHs. O uso dos meios mBMMH e BMMY em pH 5,0 promoveram um aumento significativo no nível de expressão da fitase em relação à expressão realizada em BMMH com tampão fosfato (pH 6.0). A enzima expressa apresentou maior atividade em pH 4,0 e temperatura de 42 °C, na qual se manteve estável por mais de 120 min. Entretanto, sua estabilidade foi gravemente afetada quando submetida a temperaturas de 70 e 80 °C, por apenas 1 min. A secagem dos extratos por liofilização preservou 62 % da atividade enzimática, na presença de maltodextrina a 5 %. Na ausência desse composto, apenas 41 % de atividade foi recuperada. Embora a secagem dos extratos por Spray Dryer tenha causado

redução significativa na atividade enzimática, o seu uso permitiu que o pó seja armazenado por pelo menos 240 dias à temperatura ambiente, sem perda de atividade.

1. INTRODUÇÃO

O fitato é a principal fonte de fósforo presente nos cereais que compõem a alimentação de monogástricos. A presença desse composto influencia negativamente na absorção de outros nutrientes como minerais e proteínas, por formarem entre si complexos insolúveis. Logo, a presença do fitato nas rações reduz a biodisponibilidade desses nutrientes para animais monogástricos, como suínos e aves, uma vez que estes animais não possuem em seu sistema digestivo a enzima fitase, ou seja, não são capazes de hidrolisar esta molécula. Este problema gera a necessidade de suplementação da ração com fósforo inorgânico para atender à demanda nutricional dos animais (SUN *et al.*, 2021; ABD EL-HACK *et al.*, 2018; CHHABRA, 2019; KUMAR *et al.*, 2019; CORRÊA e ARAÚLO, 2020; FABIA-RODRIGUEZ *et al.*, 2022; SARKHEL e ROY 2022), levando ao aumento nos custos de produção e ao aumento das concentrações de fósforo e compostos orgânicos nas fezes, como resultado da excreção daquilo que não foi absorvido (GESSLER, 2018; CHEN *et al.*, 2019; ARREDONDO *et al.*, 2019; ATTIA *et al.*, 2020).

Dessa forma, a adição de fitases exógenas permite a hidrólise do ácido fítico, com consequente liberação de fosfatos e nutrientes que estavam anteriormente complexados a esta molécula e gerando melhor desempenho do animal (ZHAI *et al.*, 2022; ZHANG *et al.*, 2022). No entanto, além dos altos custos das enzimas comerciais, a sua aplicação na indústria apresenta limitações, uma vez que o processo de peletização, necessário à produção de rações secas, ocorre a 80 °C durante 2 min, inativando parte significativa das enzimas adicionadas. Além disso, é necessário que a enzima utilizada atue em uma ampla faixa de pH, o que permitiria que ela atuasse ao longo de todo o trato digestivo animal.

Dessa forma, a obtenção de uma fitase com tais características permitiria sua aplicação pela indústria (SHIVANGE *et al.*, 2016; NIU *et al.*, 2017). Deste modo, foi gerado um banco de dados com sequências de fitases disponíveis e foi realizado um

estudo de literatura sobre as propriedades bioquímicas dessas enzimas (Capítulo 1). A partir disto, foi observado que a fitase KM873028 expressa em *E. coli*, apresenta excelente estabilidade térmica (93 % a 100 °C por 15 min) e atividade em pH ácido. Neste trabalho, descrevemos o processo de clonagem dessa enzima e testes para sua expressão por *P. pastoris* em diferentes composições de meios de cultivo recomendados na literatura. Além disso, verificamos como os processos de secagem por liofilização e por spray dryer influenciam na manutenção da atividade enzimática.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Seleção e síntese do gene

O gene que codifica a fitase recombinante de *D. frontalis* expresso em *E. coli* (KM873028 - Tan *et al.*, 2016) foi selecionado com base na alta produtividade e características gerais da fitase gerada a partir dele, principalmente em relação a sua termorresistência (Capítulo 1). Posteriormente, os códons da sequência original foram otimizados usando como referência a tabela de uso de códons da levedura *P. pastoris*, novo organismo hospedeiro escolhido para a expressão. Este processo foi realizado utilizando o GenSmart Codon Optimization (Versão Beta 1.0) <https://www.genscript.com/tools/gensmart-codon-optimization>. O gene otimizado foi sintetizado pela empresa GenOne e inserido no vetor pPICZαB (Invitrogen) contendo o promotor AOX1, região de terminação de transcrição AOX1TT e o gene de resistência a Zeocina (Invitrogen) para seleção dos transformantes. As tags Myc e HIS foram removidas.

2.2 – Transformação em *Escherichia coli*

Inicialmente, células competentes DH5α foram utilizadas para manutenção e multiplicação do plasmídeo antes de sua inserção nas células da levedura. Uma cultura foi inoculada em 50 mL de meio Luria-Bertani (LB) (Extrato de levedura 0,5 % m/v; Peptona de caseína 1 % m/v; NaCl 1 % m/v) durante 16 h a 37 °C e sob agitação. Em

seguida, 1 mL da cultura anterior foi transferida para novo Erlenmeyer contendo 500 mL de LB e incubada nas mesmas condições até atingir uma DO A₆₀₀ de 0,5. Uma alíquota de 250 mL desta suspensão foi centrifugada a 5000 g por 15 min e o *pellet* obtido foi ressuspensionado em 30 mL de solução gelada de CaCl₂ 100 mM e incubado no gelo por 30 min. A cultura foi novamente centrifugada a 5000 g e a célula ressuspensionada em 5 mL de solução CaCl₂ 100 mM, e 15 % de glicerol gelados.

Para a transformação, 3 µL de DNA, 50 µL de tampão de transformação e 200 µL de suspensão de células competentes foram incubados no gelo por 30 min com posterior choque térmico a 42 °C por 5 min. Após 2 min no gelo foi acrescentado 800 µL de LB para recuperação das células por 1 h a 37 °C e 180 rpm. As células então transformadas foram semeadas em placas de LB sólido contendo 100 µg/mL de zeocina e deixadas a 37 °C, por 24 h para crescimento dos transformantes. As colônias que se mostraram resistentes ao antibiótico caracterizaram os possíveis clones. As colônias que conseguiam crescer nesse meio eram aquelas que internalizaram o plasmídeo, que conferia a elas resistência ao antibiótico utilizado. As células bacterianas foram então cultivadas em meio LB nas condições citadas anteriormente para multiplicação dos plasmídeos contendo o gene.

A extração plasmidial procedeu-se de acordo com Sambrook e Russell (1989). As células contendo o plasmídeo (clones) foram cultivadas em 20 mL de meio LB + zeocina por 16 h a 37 °C. Após este período, alíquotas foram distribuídas em microtubos de 1,5 mL, os quais foram centrifugados por 5 min a 4 °C e 14000 g. O *pellet* resultante desse processo foi ressuspensionado em 250 µL de Solução I gelada (glicose 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8) e posteriormente, misturado por inversão com 250 µL de Solução II (NaOH 0,2 N e SDS 1% v/v) para lise das células. Em seguida, 150 µL de Solução III (acetato de potássio 5 M, ácido acético glacial e água destilada) foram adicionados para precipitação de proteínas e DNA genômico. Após isto, realizou-se uma centrifugação a 14000 g por 10 min e 4 °C e o sobrenadante transferido em um novo tubo. Um total de dois volumes de etanol absoluto foram acrescentados aos tubos e estes foram centrifugados novamente a 14000 g por 10 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e 100 µL de etanol 70 % v/v gelado foi adicionado ao *pellet* para lavagem, seguido de centrifugação por 5 min. Após este processo, o *pellet* foi seco à temperatura

ambiente e ressuspenso em 50 μ L de água MilliQ contendo RNase (20 μ g/mL), incubado por 15 min a 37 °C. O estoque do material extraído foi realizado a -20 °C.

2.3 – Transformação em *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*)

Os plasmídeos (20 μ g do material extraído) foram linearizados por digestão com a enzima *Bst*XI, segundo especificações do fabricante (Invitrogen) e inseridos nas células da levedura que produziram a enzima. Para isso, inicialmente uma colônia de GS115 (Invitrogen) foi cultivada em 10 mL de YPD (Yeast Extract - Peptone - Dextrose) e multiplicada sob agitação a 30 °C até uma DO_{600} igual a 1,5. Desse total, 5 mL foram adicionados a 200 mL de meio YPD para crescimento até uma D_{600} igual 1,5. Em seguida, a suspensão de leveduras foi centrifugada (3000 g por 5 min, a 4 °C) para sedimentação das células e o *pellet* lavado duas vezes com água deionizada (autoclavada) gelada, em 100 mL e em 50 mL, respectivamente, seguida de centrifugação e descarte do sobrenadante. Finalmente o *pellet* foi lavado com 20 mL de sorbitol 1 M gelado e, após nova centrifugação, as células foram ressuspenso em 0,5 mL de sorbitol 1 M e mantidas no gelo.

Posteriormente, 10 μ g de DNA previamente linearizado foram homogeneizados a 80 μ L de células anteriormente preparadas e submetidas a um impulso elétrico. Para isso, a mistura contendo as células e os plasmídeos foi transferida para uma cubeta de 2 mm pré-resfriada e incubada no gelo por 5 min. A cubeta foi inserida no eletroporador (Multiporator Eppendorf) para transformação, seguindo os parâmetros determinados pelo fabricante: 2500 V por 5 ms. Imediatamente após o pulso elétrico, 1 mL de sorbitol 1 M gelado foi adicionado à cubeta. Em seguida, esse material foi transferido para um tubo esterilizado de 15 mL e incubado por uma hora a 30 °C, sem agitação. Para aumentar o rendimento da transformação, foi adicionado 1 mL de YPD ao tubo, o qual foi incubado por mais duas horas a 30 °C, sob agitação. Alíquotas de 10, 25 e 100 μ L foram semeadas em placas de meio YPDA (Yeast Extract - Peptone – Dextrose- Ágar) contendo 100 μ g/mL de Zeocina e incubadas a 30 °C por 3 dias para seleção de possíveis transformantes.

2.4 – Reação de amplificação

As células que foram capazes de formar colônias nas placas contendo zeocina (transformantes) foram avaliadas para a presença do gene codificante da fitase pela integração do plasmídeo no em seu material genético. Para essa análise, foi usada a metodologia de amplificação por PCR (Reação em Cadeia de Polimerase), diretamente de cada colônia (LINDER *et al.*, 1996). Para isso, cada colônia foi coletada, novamente plaqueada para sua manutenção e dissolvida em 10 µL de água deionizada. A suspensão foi então submetida a uma temperatura de 95 °C por cinco minutos para extravasamento do material genético. As reações de amplificação de DNA foram realizadas em volume de 25 µL, contendo PCR SuperMix, sendo 3 µL correspondente ao DNA e 5 µL correspondente aos primers (Forward AOX1: 5` GACTGGTTCCAATTGACAAGC 3`; Reverse AOX1: 5` CAAATGGCATTCTGACATCC 3`). As condições da amplificação foram: pré-desnaturação a 94 °C por 2 min; desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 47 °C por 30 s, extensão a 72 °C por 2,5 min e extensão final a 72 °C por 5 min; para um total de 35 ciclos. A confirmação da presença do inserto se deu pela observação das bandas de DNA amplificadas em gel de agarose 0,8 % m/v.

2.5 – Indução de expressão do gene produtor da fitase por *Pichia pastoris*

A fim de encontrar uma composição de meio de cultivo que levasse à maior atividade de fitase no sobrenadante, diferentes meios e condições de cultivo foram avaliados para os clones positivamente transformantes (Tabela 2). Os meios foram selecionados a partir de diferentes trabalhos da literatura sobre expressão de genes por *P. pastoris*, e utilizados conforme metodologia descrita a seguir:

As colônias dos transformantes foram inicialmente cultivadas em 10 mL de YPD sob agitação (250 rpm) durante 24 h e 30 °C. O pré-inóculo foi centrifugado e adicionado em 40 mL de meio de crescimento (contendo glicerol a 1 % v/v como fonte de carbono) em frasco Erlenmayer de 250 mL e incubado na mesma condição para formação de biomassa (até DO₆₀₀ igual a 2,0). Após o cultivo, as células foram recuperadas por centrifugação a 3000 g por cinco minutos à temperatura ambiente e ressuspendidas em

50 mL de meio de indução, no qual o glicerol é substituído por metanol a 0,5 % (v/v) como fonte de carbono e agente indutor de expressão (Tabela 2). Nesse caso, nova adição de metanol foi realizada a cada 24 h para uma concentração final de 0,5 % durante 4 dias (120 h). A expressão da enzima foi avaliada por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE), quantificação de proteínas (Bradford) e avaliação da atividade de fitase no sobrenadante. Um controle negativo de expressão foi sempre realizado, usando células da levedura sem o gene (não transformada).

Tabela 2: Meios testados para produção da fitase recombinante por *Pichia pastoris*.

Teste	Composição dos meios de crescimento (1 % v/v glicerol) e de indução (0,5 % v/v metanol)	Fonte
1	BMGH e BMMH YNB* 1,34 % m/v Histidina 0,004 % m/v Biotina 4×10^{-5} %	Invitrogen
2	BMGY e BMMY YE* 1 % m/v Peptona 2 % m/v YNB 1,34 % m/v Biotina 4×10^{-5} %	Invitrogen
3	mBMGH e mBMMH Peptona 1 % m/v YNB 1,34 % m/v Biotina 4×10^{-5} % Histidina 0,004 % m/v	Adaptado

*YNB (Yeast Nitrogen Base w/o amino acids and ammonium sulfate); YE (Yeast Extrat).

Cada composição de meio foi ainda avaliada dissolvida em tampão a 100 mM de citrato de sódio (pH de 3-5) e fosfato (pH 6), e cada tratamento foi avaliado em triplicata.

2.6 – Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida

As proteínas presentes no sobrenadante das alíquotas coletadas nos testes de expressão foram separadas em 12 % SDS-PAGE para confirmação da expressão. As proteínas foram coradas por nitrato de prata para visualização (BLUM *et al.*, 1987). Para isso, o gel foi incubado em solução fixadora (50 mL de metanol 95%, 12 mL de ácido acético, 38 mL de água) por duas horas. Logo após, a solução foi descartada e o gel

lavado com etanol a 50 % (v/v) três vezes, cada uma com duração de 10 min. Após a lavagem, o gel foi incubado com solução 0,02 % (m/v) de tiosulfato de sódio por um minuto seguida de três lavagens com água destilada. Posteriormente, o gel foi incubado por 20 min em solução de nitrato de prata (0,2 g de nitrato de prata, 0,037 mL de formaldeído 37 % em 100 mL de água). O próximo passo consistiu na lavagem do gel por 20 s com água destilada três vezes. A seguir, aplicou-se a solução reveladora (2 g de carbonato de sódio, 1 mL de solução de tiosulfato de sódio 0,02 % (m/v), 0,025 mL de formaldeído 37 %, q.s.p. 50 mL) sobre o gel e paralisou-se a reação pela adição de três mililitros de ácido acético.

2.7 – Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). O preparo do reagente de Bradford (5X) foi feito da seguinte maneira: 100 mg de Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL de etanol 95 % (v/v) e 100 mL de ácido fosfórico 85 % (v/v). Após solubilização, o volume foi completado para 200 mL, agitado por 30 min e filtrado em papel Whatman nº1. O ensaio foi realizado com 200 µL de extrato enzimático diluído, 600 µL de água destilada e 200 µL de reagente de Bradford 5X. A mistura foi incubada por 10 minutos a temperatura ambiente, e a leitura realizada a 595 nm. Os valores de absorvância foram convertidos em valores de massa proteica através de uma curva padrão variando entre 2,0 a 28,0 µg de proteína, usando albumina sérica bovina (BSA) como padrão (0,2 mg/mL).

2.8 – Teste de atividade de fitase

A atividade enzimática foi determinada no sobrenadante das alíquotas retiradas em cada tratamento, usando fitato de sódio (Sigma-Aldrich) como substrato, conforme descrito por Pires *et al.* (2019) com algumas modificações. Para isso, uma alíquota de 275 µL de solução de substrato a 1,5 mM (filtrado) foi adicionada a 100 µL do extrato enzimático. A mistura foi incubada a 37 °C por 15 min e a reação interrompida com a adição de 125 µL de ácido tricloroacético a 10 % (m/v). Em seguida, 500 µL do reagente

colorimétrico contendo 10 % (v/v) de molibdato de amônio em 5 M ácido sulfúrico e 5 % (m/v) de sulfato ferroso foi adicionada à reação (TAUSSKY; SKORR 1953). O branco consistiu em uma mistura nas mesmas condições, realizando a parada da reação antes do início da incubação. A absorbância da solução foi medida a 700 nm e os valores comparados a uma curva-padrão de fosfato de sódio. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de fosfato inorgânico por minuto de reação.

2.9 – Determinação do efeito do pH e temperatura sobre a atividade enzimática

O efeito do pH sobre a atividade da fitase recombinante foi determinado como descrito acima (item 2.8), mas variando o pH da mistura da reação (substrato) usando os seguintes tampões: 200 mM glicina-HCl (pH 2,0-3,5), acetato de sódio (pH 4,0-6,0), Tris-HCl (pH 6,5 - 7,5). O efeito da temperatura sobre a atividade da enzima foi avaliado pela mensuração da atividade em diferentes temperaturas de incubação (20 a 65 °C), no pH de maior atividade determinado.

2.10 – Determinação estabilidade térmica e ao pH

A termoestabilidade da fitase foi determinada por meio da mensuração da atividade residual após incubação do extrato contendo a fitase em tampão acetado de sódio 100 mM a 70 e 80 °C por 1, 3 e 5 min. A estabilidade em meios com diferentes valores de pH foi avaliada na faixa de 2,0 a 7,5. Para isso, cada extrato enzimático foi diluído em tampão (conforme item anterior) na proporção de 1:1 para cada pH e essa mistura foi incubada por 1 h a 37 °C. A atividade de fitase residual foi determinada, conforme descrito no item 2.8, em tampão acetato de sódio pH 4,0.

2.11 – Testes de secagem

2.11.1 – Secagem do extrato por Spray Dryer

O extrato enzimático bruto foi submetido a secagem utilizando o equipamento Spray dryer de escala piloto modelo MSD 1.0 (Labmaq do Brasil, Brasil), que opera em

modo concorrente, com bico atomizador de duplo fluido com orifício de saída de 1,2 mm. A proporção de adjuvante utilizando, nesse caso, maltodextrina (5, 12 e 20 %), e a temperatura de saída do ar (100, 130 e 140 °C) foram avaliados de forma independente, tendo como variável resposta a atividade específica obtida após secagem. As demais condições de secagem foram: W_g (vazão do ar de secagem) 2,60 m³/min, P_{atm} (pressão de atomização) 6,5 kgf/cm², W_{atm} (vazão de atomização) 50 L/min. Cada tratamento foi realizado com repetição. A diferença entre as massas dos frascos utilizados para coletar o pó após e antes do processo foi utilizada para cálculo do rendimento do processo (Y) (Equação 1):

$$Y = 100 * (m_{após} - m_{antes}) / m_{total} \quad \text{(Equação 1)}$$

Em que $m_{após}$ é a massa do frasco após o processo (g); m_{antes} é a massa do frasco antes do processo (g); m_{total} é a quantidade de sólidos inicial de cada proporção extrato + adjuvante (g).

2.11.2 – Secagem do extrato por liofilização

Os testes de secagem por liofilização foram realizados na presença e ausência de adjuvante (5 % de maltodextrina). Para isso, os extratos adicionados ou não de adjuvante foram congelados a -20 °C por 24 h e a sublimação realizada em liofilizador CHRIST (Alpha 2-4 LDplus) durante 48 h. O efeito da secagem sobre a atividade enzimática foi então avaliado imediatamente após o processo e reidratação dos pós. Para isso, 0,1 g do material seco foi ressuspendido em 1 mL de água deionizada e a suspensão foi utilizada para análise da atividade residual.

2.12 – Estabilidade do extrato enzimático seco

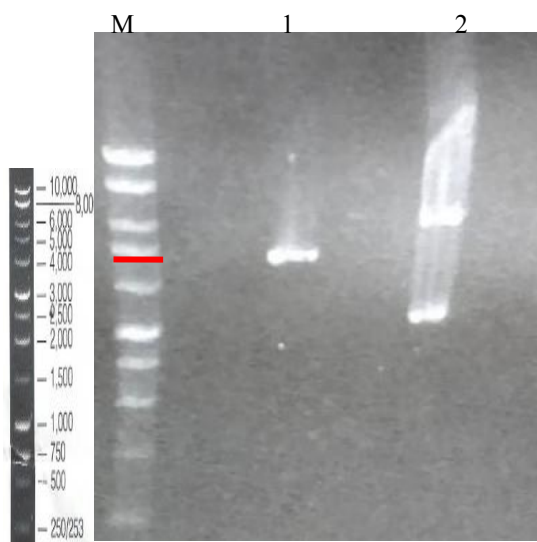
Os extratos enzimáticos secos obtidos por Spray Dryer foram acondicionados em tubos Falcon envoltos por papel alumínio e armazenados à temperatura ambiente (entre 10 e 25 °C). A cada 45 dias, durante 8 meses, foi testada a atividade residual para avaliação da estabilidade da fitase no extrato seco.

3 – RESULTADOS E DISCUSÃO

3.1 – Clonagem e produção da enzima em sistema heterólogo

Após transformação e multiplicação do plasmídeo nas células de *E. coli* DH5a, foi realizada a linearização do plasmídeo extraído (Figura 11), condição essencial para o processo de recombinação do DNA exógeno ao genoma do novo hospedeiro, nesse caso, *P. pastoris*. A presença do gene que codifica a fitase do fungo *D. frontalis* (gene rPhyXT52) nos transformantes selecionados foi então confirmada por meio da observação de bandas de DNA amplificado na PCR (Figura 12).

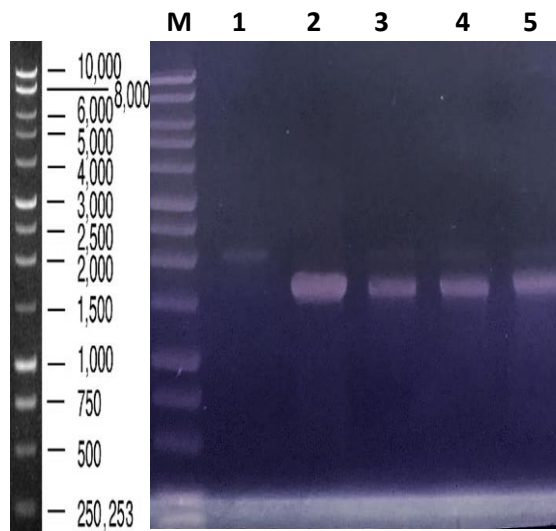
Figura 11: Confirmação da linearização do plasmídeo pPICZαB extraído. Linha 1 – marcador de peso molecular (Promega); O marcador em vermelho indica a altura esperada para DNAs lineares de 4,8 kb; Linha 1 – DNA do plasmídeo extraído e linearizado; Linha 2 – DNA do plasmídeo extraído e não linearizado (circular).



Fonte: Dados da pesquisa do Autor (2022)

Todos os transformantes selecionados na presença de zeocina continham a banda amplificada correspondente à presença do gene de interesse, indicando a recombinação (Figura 12). Três transformantes foram selecionados aleatoriamente e cultivados para avaliação da expressão do gene sob indução com metanol.

Figura 12: Confirmação da recombinação e inserção do gene em *Pichia pastoris*. O gene foi amplificado por PCR e visualizado em gel de agarose. Linha M – marcador de peso molecular (Ladder); Linha 1 – controle negativo (PCR de colônia não transformada); Linha 2 – controle positivo (PCR do DNA plasmidial); Linhas 3 a 5 a 5 – PCR de DNAs extraídos de transformantes.

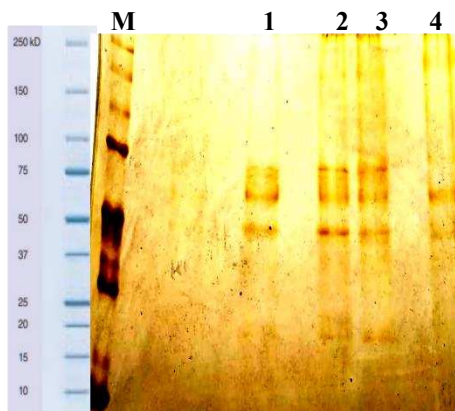


Fonte: Dados da pesquisa do Autor (2022)

O sobrenadante dos cultivos continha uma banda de proteína com peso molecular de cerca de 75 kDa, a qual estava ausente no controle (Figura 13), o que seria um indicativo da expressão da fitase por esses transformantes. Além dele, uma banda também na altura de 15-20 kDa também exclusiva para os transformantes 2 e 3 pôde ser observada. O tamanho predito para a fitase, de acordo com a sequência gênica sintetizada, é de 46,5 kDa. Tan *et al.* (2016), ao expressar o mesmo gene com cauda de histidina em sistema *E. coli*, obteve uma banda de altura de 52,5 kDa. A diferença observada, neste caso, pode decorrer de diferenças na confecção do próprio gel, já que proteínas migram de formas distintas e nem sempre a altura indicada pelo marcador é fidedigna à massa molar da proteína analisada. Uma segunda hipótese decorre da possibilidade da presença de glicosilações da enzima, a qual aumentaria a massa molar da molécula, justificando o resultado encontrado. Essa hipótese é reforçada pelo fato de o gene ser derivado de um fungo filamentoso, e de que a glicosilação não tenha sido

previamente observada devido a *E. coli* não possuir sistema de glicosilação, por ser um organismo procarioto (PAL ROY *et al.*, 2016).

Figura 13: Eletroforese em gel de poliacrilamida do sobrenadante dos cultivos dos transformantes, após processo de indução. M – Marcador de massa molar; Linha 1-3 – sobrenadantes dos cultivos dos transformantes; Linha 4 – *Pichia* GS115 (controle).

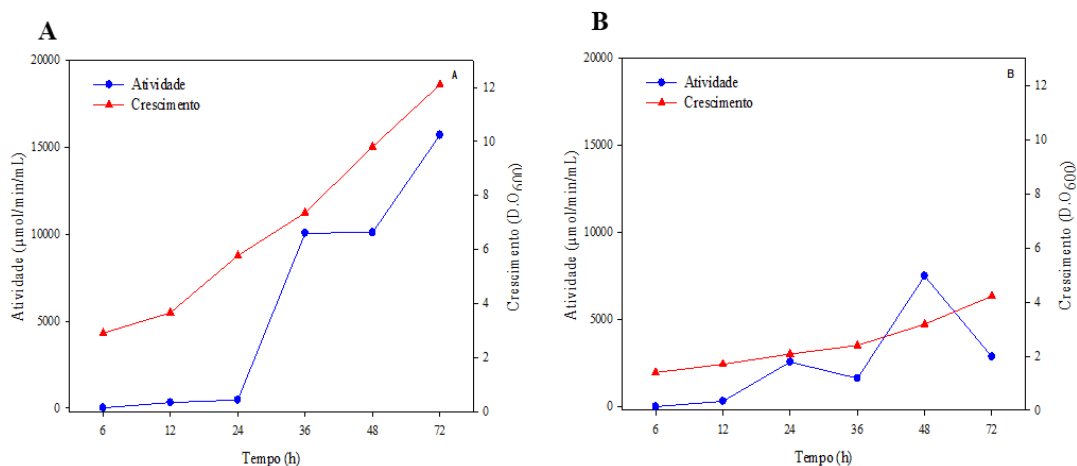


Fonte: Dados da pesquisa do Autor (2022)

3.2 – Expressão de fitases recombinante por *P. pastoris* em diferentes composições e condições de cultivo

A atividade de fitase obtida após expressão em meio minimamente tamponado (BMG/BMMH) foi significativamente baixa, então decidiu-se usar outros meios já padronizados. O meio complexo BMMY levou a um maior crescimento ($P < 0,05$) e densidade celular (DO_{600} de 12,1 a 13,8) dos transformantes, também refletido na maior atividade de fitase no sobrenadante (Figura 14). No meio mínimo tamponado BMMH, por outro lado, os transformantes apresentaram menor crescimento e menor produção de fitase (DO_{600} de 4,22 - 5,8).

Figura 14: Indução da expressão de fitase por *Pichia pastoris* em meio BMMY (A) e BMMH (B) durante 72 h. Alíquotas foram retiradas nos tempos de 6, 12, 24, 36, 48 e 72 h para controle de crescimento do meio e testes de atividade de fitases.



Fonte: Dados da pesquisa do Autor (2022)

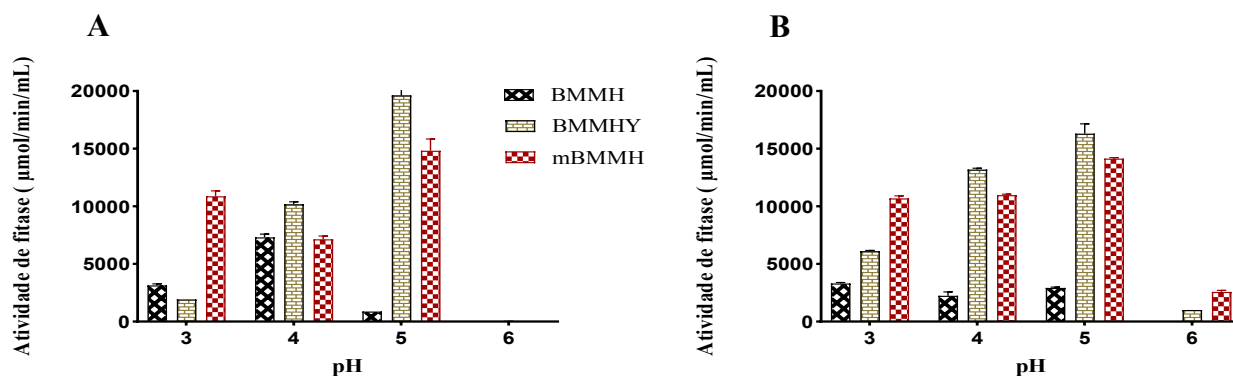
Os resultados indicam que a produção de fitase pelo gene KM873028, é maior quando extrato de levedura e peptona foi usado gerando um rendimento de até 3 vezes. As diferenças observadas nesta análise, podem estar relacionadas a composição distinta dos meios utilizados. O meio BMGH/BMMH é composto por meio mínimo suplementado com histidina. Já o BMGY/BMMY, contém extrato de levedura (YE) e peptona na sua composição. O YE é um meio rico em aminoácidos, vitaminas e outros micronutrientes essenciais ao crescimento de microrganismos. Por ser um composto rico e complexo, sua inclusão pode ter levado a uma taxa de crescimento mais alta e acúmulo de biomassa, considerando a dispensabilidade da ativação de rotas metabólicas secundárias para produção de micronutrientes, tornando o fluxo de carbono diretamente ligado ao crescimento celular e a produção da fitase. Além disso, a presença deste composto pode também estabilizar as proteínas secretadas, através da repressão da produção de proteases causada pela limitação de nitrogênio no meio de cultura (SHARMA; SINGH, 2016). Enquanto no meio BMMH, a falta destes nutrientes pode inicialmente levar a célula a condições elevadas de estresse metabólico e redução da produção da fitase.

Por outro lado, o rendimento da fitase é também aumentado significativamente (3,5 vezes) quando o meio mínimo foi suplementado com apenas 0,1% de peptona

(mBMMH) em um tempo de 48 h (Figura 15). Isso seria importante, para produção máxima e eficiente de fitases recombinante em grande volume, em biorreatores. Assim, com o mBMMH seria possível aumentar a viabilidade económica pela redução de custos e com rendimentos semelhantes ao BMMY que envolve maior concentração de YE e peptona.

Também foram testadas variações do pH no meio de indução, para avaliar a influência destes no nível de expressão da fitase (Figura 15). Tanto no meio BMMY quanto no mBMMH, foi observada produção e atividade de fitase em pH 3,0-5,0, mas esta aumentou significativamente ($P < 0,05$) em pH 5,0 nos tempos de 48 e 72 h. Em pH 6,0 a produção de fitase foi menor ($P < 0,01$) para todos os meios utilizados e apenas foi detectada no tempo de 72 h de indução.

Figura 15: Influência do pH na produção de fitase recombinante por *Pichia pastoris* por 48 (A) e 72 h (B) de indução em diferentes composições de meio.



Fonte: Dados da pesquisa do Autor (2022)

A eficiência de expressão e secreção destas proteínas por *P. pastoris* estão estritamente relacionadas ao pH do meio (CREGG *et al.*, 2000; JAHIC *et al.* 2003; CHAROENRAT *et al.*, 2013; TERRAZAS *et al.*, 2014). De acordo com vários trabalhos já relatados, o valor de pH que favoreceu o rendimento expressão de proteína em *P. pastoris* foi superior ao pH 5.0, (LI *et al.*, 2014; PAL ROY *et al.*, 2016; JOSEPH *et al.*, 2022), ao contrário do que foi observado durante a expressão da fitase no presente trabalho.

O valor de pH ideal para produção de proteína recombinante pode variar dependendo do tipo do microrganismo hospedeiro, modificação genética realizada e tipo de proteína recombinante em estudo (HOU *et al.*, 2012; JOSEPH *et al.*, 2022). Por exemplo, a fitase KM873028, é uma fitase ácida com ponto isoelétrico teórico de 7, 24. O que sugere que em condições de produção em que o pH do meio utilizado esteja próximo ao ponto isoelétrico dessas, o enovelamento da proteína poderia ser dificultado, levando a formação de agregados de proteína deixando a enzima sem atividade.

Já é bem relatado na literatura que um aumento da atividade de proteases é observado quando o pH do meio é aumentado. Sabe-se também que na expressão heteróloga em leveduras as proteínas secretadas precisam adentrar o retículo para repasse às vias de secreção, e que esse fluxo tende a gerar altos índices de estresse celular correlatos a expressão de diversas proteases com alta atividade em pH neutro, processo, que neste estudo pode ser relacionado à maior degradação da proteína estudada. Uma hipótese importante também poderia ser levantada pelo fato de que o gene da fitase em estudo possui 197 sítios de proteinase K segundo análise feita no software ExPASy Peptide Cutter tool, um serina protease muito presente em *Pichia*, com baixa atividade em pH ácido e diretamente ligada a vias de estresse, logo reduzindo o pH do meio entre 3-5 seria possível aumentar o nível de expressão e inibir a ação de algumas proteases.

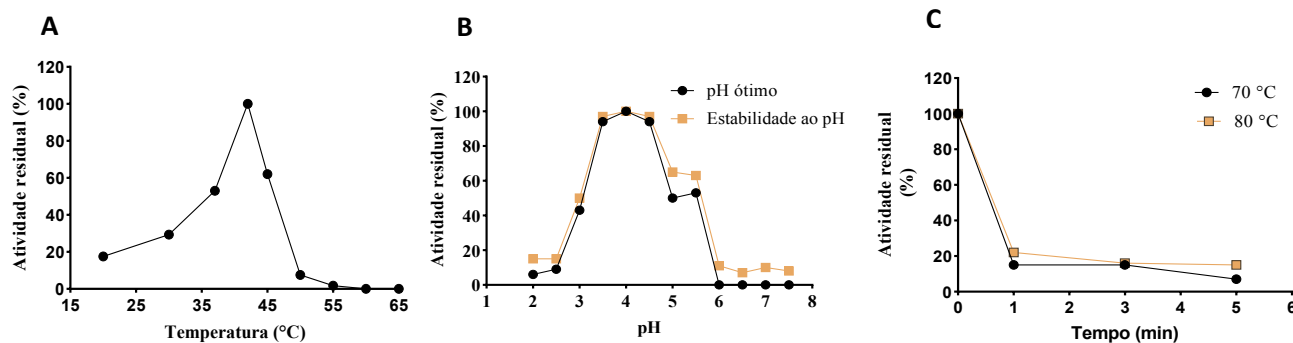
3.3 – Caracterização bioquímica da fitase

A fitase é uma enzima de grande relevância na indústria de alimentação animal, pois seus benefícios quando incorporada nos alimentos impactam o desempenho dos animais. No entanto, a eficiência da fitases é limitado devido a características especiais, cuja ação catalítica depende da natureza e processamento da ração, bem como da fisiologia do trato digestivo. Assim, características como temperatura, pH de melhor atuação, bem como a termoestabilidade são essenciais para que sejam empregadas na alimentação de monogástricos

A fitase expressa nesse trabalho, exibiu máxima atividade em meio com pH na faixa de 3,0 a 5,5, com a máxima atividade em pH 4,0, mantendo mais de 90 % de

atividade em pH 3,5 e 4,5. Em pH 3,0 e 5,5 ela foi capaz de reter 42 e 50 % da atividade máxima, respectivamente. Entretanto, em valores superiores a atividade foi completamente inibida (Figura 16). A atividade de fosfatases ácidas costuma ser favorecida em meios com pHs variando de 2,5 a 5,5 (FU *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2010; YAO *et al.*, 2013; AKBARZADEH *et al.*, 2015; TAN, *et al.*, 2016; PAL ROY *et al.*, 2016; DOKUZPARMAK *et al.*, 2017; SAXENA *et al.*, 2019). Considerando a ampla faixa de pH encontrada no trato digestivo de animais monogástrico (2,5 - 7,5), a maior abrangência de atividade de fitase é desejável, já que o sistema digestivo desses animais não se restringe apenas a um local de digestão.

Figura 16: Atividade da fitase KM873028 expressa em *P. pastoris*. A fitase foi expressa em meio BMMY e em pH 5,0 durante 72 h, com adição de metanol a cada 24 h. A: temperatura; B: pH e C: termostabilidade a 70 e 80 °C.



Fonte: Dados da pesquisa do Autor (2022).

Na temperatura de 42 °C a atividade da enzima foi máxima e estável por mais de 120 min, com 60 % de atividade residual a 37 °C. A temperatura fisiológica dos suínos é de 38 - 40 °C (RUCKEBUSCH; PHANEUF; DUNLOP 1991) e 42 °C para frangos de corte (NEZHAD *et al.*, 2020; ABBASI KHEIRABADI *et al.*, 2022), o que sugere uma atuação eficiente dessa enzima no sistema digestivo desses animais, em caso de ingestão. Fitases como a expressa por *Bacillus aryabhatai* RS1 (PAL ROY; DATTA; GHOSH, 2017) e aquela descrita por Gontia-Mishra *et al.*, (2013) não foram capazes de manter a atividade em temperaturas superiores a 40 °C.

Entretanto, temperaturas superiores a 45 °C reduziram drasticamente a atividade dessa enzima, mantendo uma atividade residual de apenas 22 % após apenas um minuto

de exposição a 70 e 80 °C (Figura 16). A fitase de *Dickeya paradisiaca* apresentou perda de atividade a 60 °C por 5 min. A estabilidade da fitase de *Citrobacter gillenii* expressa em *P. pastoris* não reteve de mais de 40 % de atividade a 70 °C e em pH 4.0, a atividade residual foi menor que 20 % na mesma temperatura (TKACHENKO *et al.*, 2021). Em um trabalho realizado por Casey e Walsh (2006), o valor da termoestabilidade encontrada foi similar com 22% de atividade a 80 °C após 3 minutos de exposição e apenas 18 % após 5 minutos.

O gene rPhyXT52, isolado do metagenoma de *D. frontalis* (TAN *et al.*, 2016), foi selecionado para estudos de caracterização devido à alta produtividade alcançada em sistema heterólogo e sua termorresistência (93 % a 100 °C por 15 min), conforme já mencionado. Embora a escolha do gene baseado em suas características seja importante para alcançar objetivos desejáveis para a indústria, esta não garante a eficiência na expressão e semelhanças nas características (pH e termoestabilidade), devido a fatores relacionados ao hospedeiro de seleção ou ainda nas suas propriedades estruturais complexas. Assim, diferenças significativas foram observadas nas características das enzimas codificadas pelo mesmo gene, mas expressas por sistemas heterólogos distintos. Sendo 22 % a 80 por 1 min quando expressa em *P. pastoris* e 93 % a 100 °C por 15 min quando expressa em *E. coli*.

Essas diferenças podem ser decorrentes de modificações pós-traducionais realizadas no sistema eucarioto, mas não no procarioto (PAL ROY *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2022). A glicosilação é uma dessas modificações, consideradas como uma das mais relevantes para a função e as propriedades das enzimas. Por exemplo, a termoestabilidade de uma fitase de *E. coli* expressa em *P. pastoris* aumentou em 40 % após a introdução de dois sítios de glicosilação (YAO *et al.* 2013). Da mesma forma, as diferenças nas propriedades das fitases de *Shigella sp.* CD2 expressas em *P. pastoris* e *E. coli* foram relacionadas à glicosilação (PAL ROY *et al.*, 2016). Naquele estudo, a fitase expressa em *Pichia* apresentou menor tolerância ao aquecimento, em relação à enzima expressa em *E. coli*. Além disso, a proteína expressa em *P. pastoris* apresentou massa molecular mais elevada, a qual foi semelhante à massa observada para a fitase expressa em *E. coli*, após a deglicosilação. Resultados semelhantes foram relatados por Tkachenko *et al.*, (2021).

Uma análise *in silico* realizada utilizando o servidor NetNGlyc 1.0 evidenciou a presença de três locais potenciais para N-glicosilação - N55, N123 e N278 - na sequência de aminoácidos da fitase KM873028, dos quais N123 é o mais propenso a ser glicosilado. Essa característica sugere uma possível modificação pós-traducional.

Outras diferenças existentes entre esses trabalhos, e que poderiam influenciar nas características observadas, incluem o fato de que, neste trabalho, foi utilizado todo o extrato enzimático para avaliação das condições de atividade, enquanto no estudo realizado por Tan e colaboradores (2016), a enzima foi previamente purificada. Entretanto, para efeitos de aplicação, o uso de enzima purificada na alimentação animal raramente seria viável, o que determinou a escolha do uso do extrato para os testes realizados. As análises devem ser realizadas da forma mais próxima a mimetizar as condições que serão utilizadas pela indústria e pelo produtor. Nesse caso, uma última diferença inclui, ainda, a presença de uma cauda de hexahistidina naquela fitase, que nesta foi excluída já a nível gênico.

3.4 – Testes de secagem e estabilização dos extratos de fitase

A aplicação comercial de enzimas requer para o efeito uma estabilização eficiente das mesmas durante o transporte e armazenamento a longo prazo. No entanto, enzimas são moléculas instáveis e facilmente desnaturadas em altas temperaturas, resultando em perda da sua função biológica. Por outro lado, as enzimas podem ser capazes de manter sua atividade quando protegidas contra esses fatores e sejam ajudadas a preservar a sua estrutura. Neste estudo, o extrato contendo a fitase foi submetido a dois métodos de secagem - liofilização e Spray dryer - e a estabilidade dos pós gerados a partir do Spray Dryer foi avaliada pelo prazo de 240 dias, em armazenamento à temperatura ambiente.

A secagem por liofilização levou à formação de pós com retenção de 62 % da atividade na presença de maltodextrina a 5 %, enquanto o extrato puro liofilizado manteve 41 % da atividade original. No processo de secagem da enzima α -amilase, a liofilização manteve maior atividade residual do que no processo de secagem por Spray dryer, com uma atividade residual de aproximadamente 95 % (PISANO *et al.*, 2013). No trabalho

realizado por Tang *et al.* (2017), apenas o método de liofilização foi capaz de preservar significativamente o alto nível de atividade da fitase. A liofilização é uma alternativa de secagem para enzimas termosensíveis, e a presença de um adjuvante pode prevenir a perda da atividade durante o congelamento do sistema, agindo como agente crioprotetor, como foi exposto por Santana *et al.* (2010), Isaev e Steinhoff (2021) Rockinger, Funk e Winter (2021).

Por outro lado, a secagem dos extratos utilizando o Spray Dryer afetou significativamente a atividade enzimática, de forma dependente principalmente da concentração da maltodextrina (Tabela 3). Maior eficiência na manutenção da atividade foi observada a 100 e 140 °C na presença de 5 % de maltodextrina. Concentrações de maltodextrina acima de 5 % nesta condição, reduziram significativamente a atividade de fitase ($p < 0,05$). No entanto, a temperatura de 130 °C levou a uma retenção média de atividade de 21 % independente da concentração de maltodextrina, sem diferença estatística ($p > 0,05$). Hamin-neto *et al.* (2014) afirmam que a maltodextrina, em baixas concentrações, não fornece proteção eficiente contra altas temperaturas. Depaz *et al.* (2002) explicam também que, a maltodextrina sozinha poderia afetar a estrutura secundária das proteínas devido ao impedimento estérico, o qual não permite a formação eficaz de ligação de hidrogênio a proteína. Por outro lado, altas concentrações deste polissacarídeo promovem a formação de ligações açúcar-açúcar, inibindo a atividade da enzima (TZANNIS *et al.*, 1999). Resultados diferentes foram encontrados por Nalmadi *et al.* (2006). Eles observaram alta capacidade de estabilização da enzima em todas as concentrações de maltodextrina utilizadas. No entanto, quando a temperatura foi aumentada em 120 °C levou a perda da atividade.

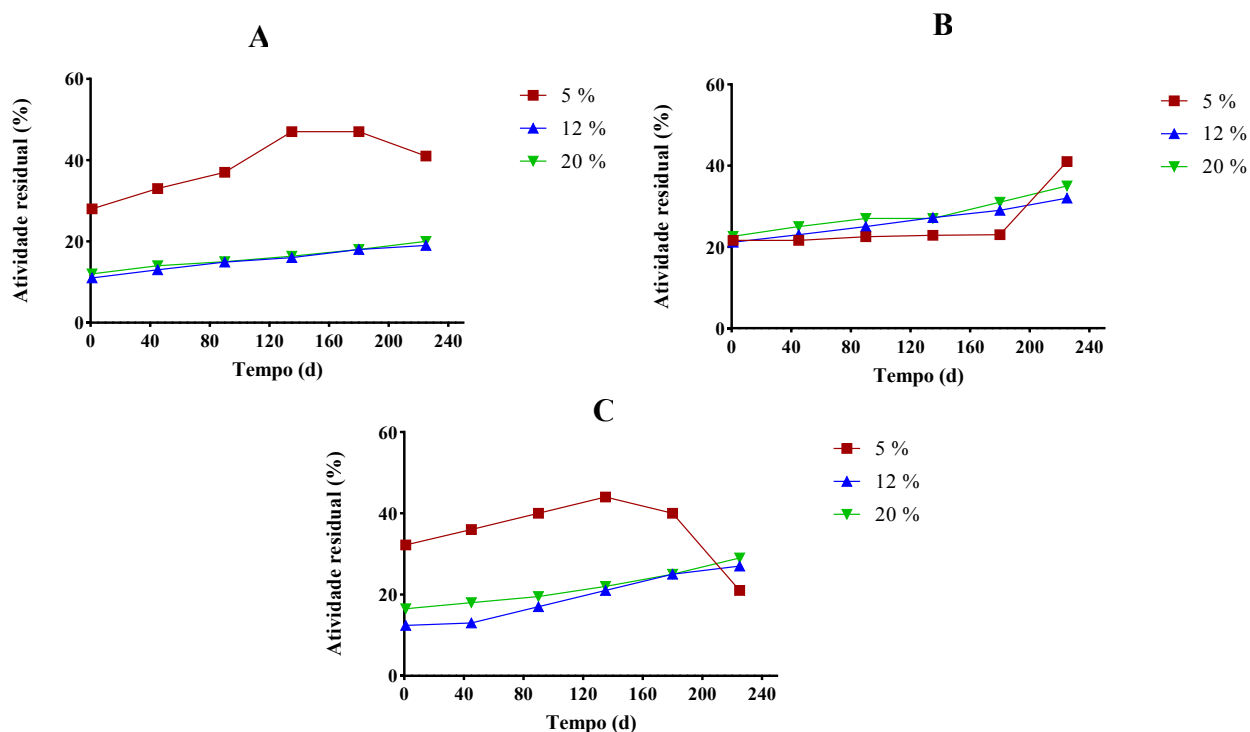
Tabela 3: Atividade residual dos extratos de fitases submetidos a secagem por Spray dryer.

	Concentração de Maltodextrina		
	5 %	12 %	20 %
Temp. (°C)	Atividade residual (%)		
100	32	11	12
130	21,6	21,2	22,6
140	32,2	10,14	16,6

Fonte: Dados da pesquisa do Autor (2022).

Apesar das significativas perdas de atividade apresentadas durante o processo de secagem por este método, a maltodextrina se mostrou eficiente na manutenção da atividade e estabilidade do extrato seco, pois a longo prazo, este foi capaz de manter a atividade por um período de pelo menos 240 dias, com um aumento da atividade residual inicial, mesmo quando o pó foi armazenado à temperatura ambiente. Resultados semelhantes foram observados por Hamin-Neto *et al.* (2017), neste estudo, as proteases secas apresentaram estabilidade durante 180 dias de armazenamento a 30 °C. Namaldi *et al.* (2006), observaram que a serina protease alcalina seca pelo mesmo método, na presença de maltodextrina manteve 80 % de sua atividade proteolítica após 180 dias a 4 °C. Comparada à liofilização, a técnica de Spray dryer é uma alternativa interessante por ser um processo mais simples, com maior taxa de processamento. Além disso, essa técnica oferece melhor custo benefício com maior tempo de prateleira dos produtos pela obtenção de partículas mais secas.

Figura 17: Estabilidade do extrato enzimático ao longo do armazenamento à temperatura ambiente. A: Extrato seco a 100 °C; B: Extrato seco a 130 °C; C: Extrato seco a 140 °C.



Fonte: Dados da pesquisa do Autor (2022).

4 – CONCLUSÃO

A ampliação de escala de um processo de produção de enzima para aplicação industrial é desafiadora, porque traz consigo alterações, que dependem das condições de processamento da ração a qual está destinada a enzima e da estabilidade da própria enzima. Seu sucesso depende ou requer de um adequado planejamento, estudo e controle das variáveis operacionais fundamentais que determinam as condições do processo em todas as etapas de produção.

Neste estudo, o gene da fitase foi sintetizada e expressa com sucesso em *P. pastoris* e mostrou alto rendimento quando utilizado o meio mBMMH, resultado promissor servindo ao propósito de redução de custos para aplicação industrial. A fitase expressa mostrou pouca resistência ao calor, mas na presença de um coadjuvante foi capaz de manter até 40 % de atividade.

Os dois métodos de secagem se mostraram adequadas para a secagem da fitase e o processo de liofilização resultou em uma técnica eficiente com melhor preservação atividade enzimática. Porém, uma das desvantagens deste processo para aplicação em larga escala é o espaço e tempo de secagem o que poderia ser economicamente inviável. Apesar do rendimento menor observado pela secagem por Spray Dryer seu uso pode ser uma opção viável para secagem de enzimas, pois sua atividade inicial foi preservada e foram estáveis durante o armazenamento a longo prazo, que podem ser características promissoras para aplicações industriais desta enzima. Sugere-se testes com outros tipos de adjuvantes para avaliar a eficiência destes na preservação da atividade, além de outras variáveis operacionais importantes deste método para a otimização do processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASI KHEIRABADI, M.; SAFFAR, B.; HEMMATI, R.; MORTAZAVI, M. Thermally stable and acidic pH tolerant mutant phytases with high catalytic efficiency from *Yersinia intermedia* for potential application in feed industries. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 22, p. 33713-33724, 2022. DOI: [10.1007/s11356-022-18578-4](https://doi.org/10.1007/s11356-022-18578-4).
- AKBARZADEH, A.; DEHNAVI, E.; AGHAEPOOR, M.; AMANI, J. Optimization of recombinant expression of synthetic bacterial phytase in *Pichia pastoris* using response surface methodology. **Jundishapur journal of microbiology**, v. 8, n. 12, 2015. DOI: [10.5812/jjm.27553](https://doi.org/10.5812/jjm.27553).
- CAUBLE, R. N.; GREENE, E. S.; ORLOWSKI, S.; WALK, C.; BEDFORD, M.; APPLE, J.; DRIDI, S. Research Note: Dietary phytase reduces broiler woody breast severity via potential modulation of breast muscle fatty acid profiles. **Poultry Science**, v. 99, n. 8, p. 4009-4015, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.05.005>.
- CHAROENRAT, T.; KHUMRUAENGSR, N.; PROMDONKOY, P.; RATTANAPHAN, N.; EURWILAICHITR, L.; TANAPONGPIPAT, S.; ROONGSAWANG, N. Improvement of recombinant endoglucanase produced in *Pichia pastoris* KM71 through the use of synthetic medium for inoculum and pH control of proteolysis. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, n. 2, p. 193-198, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.02.020>.
- CREGG, J. M.; CEREGHINO, J. L.; SHI, J.; HIGGINS, D. R. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **Molecular Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 23-52, 2000. DOI: [10.1385/MB:16:1:23](https://doi.org/10.1385/MB:16:1:23).
- DARVISHI, F.; DESTAIN, J.; NAHVI, I.; THONART, P.; ZARKESH-ESFAHANI, H. Effect of additives on freeze-drying and storage of *Yarrowia lipolytica* lipase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, n. 5, p. 1101-1107, 2012. DOI: [10.1007/s12010-012-9844-z](https://doi.org/10.1007/s12010-012-9844-z).
- DEPAZ, R. A.; DALE, D. A.; BARNETT, C. C.; CARPENTER, J. F.; GAERTNER, A. L.; RANDOLPH, T. W. Effects of drying methods and additives on the structure, function, and storage stability of subtilisin: Role of protein conformation and molecular mobility. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 6, p. 765-774, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00173-4](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00173-4).
- DERSJANT-LI, Y.; HRUBY, M.; EVANS, C.; GREINER, R. Critical review of methods used to determine phosphorus and digestible amino acid matrices when using phytase in poultry and pig diets. **Journal of Applied Animal Nutrition**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1017/JAN.2019.1>.
- DOKUZPARMAK, E.; SIRIN, Y.; CAKMAK, U.; SAGLAM ERTUNGA, N. Purification and characterization of a novel thermostable phytase from the *thermophilic Geobacillus* sp.

TF16. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 5, p. 1104-1116, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1203930>.

EMMENES, L.; PIETERSE, E.; HOFFMAN, L. C. Performance, water intake, carcass characteristics and intestinal histomorphology of broilers supplemented with phytase. **South African Journal of Animal Science**, v. 48, n. 4, p. 734-742, 2018. DOI: [10.4314/sajas.v48i4.15](https://doi.org/10.4314/sajas.v48i4.15).

FU, D.; HUANG, H.; LUO, H.; WANG, Y.; YANG, P.; MENG, K.; YAO, B. A highly pH-stable phytase from *Yersinia kristeensenii*: cloning, expression, and characterization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, n. 6, p. 499-505, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.01.014>.

HAMIN NETO, Y. A. A.; COITINHO, L. B.; DE FREITAS, L. A. P.; CABRAL, H. Box-Behnken analysis and storage of spray-dried collagenolytic proteases from *Myceliophthora thermophila* submerged bioprocess. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, n. 5, p. 473-480, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/10826068.2017.1292289>.

HAMIN NETO, Y.; DE OLIVEIRA, L. C. G.; DE OLIVEIRA, A. H. C.; ROSA, J. C.; JULIANO, A. M.; JULIANO, L.; CABRAL, H. Determination of specificity and biochemical characteristics of neutral protease isolated from *Myceliophthora thermophila*. **Protein and peptide letters**, v. 22, n.11, p. 972-982, 2015. DOI: [10.2174/0929866522666150817093719](https://doi.org/10.2174/0929866522666150817093719).

HAMIN-NETO, Y. A. A.; DE FREITAS, L. A. P.; CABRAL, H. Multivariate analysis of the stability of spray-dried *Eupenicillium javanicum* peptidases. **Drying Technology**, v. 32, n. 5, p. 614-621, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1080/07373937.2013.853079>.

ISAEV, N.; STEINHOFF, H. J. Protein and solutes freeze-concentration in water/glycerol mixtures revealed by pulse EPR. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 169, p. 44-51, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.08.017>.

JAHIC, M.; WALLBERG, F.; BOLLOK, M.; GARCIA, P.; ENFORS, S. O. Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in *Pichia pastoris* bioreactor cultures. **Microbial Cell Factories**, v. 2, n. 1, p. 1-11, 2003. DOI: [10.1186/1475-2859-2-6](https://doi.org/10.1186/1475-2859-2-6).

JOSEPH, J. A.; AKKERMANS, S.; VAN IMPE, J. F. M. Effects of Temperature and pH on Recombinant Thaumatin II Production by *Pichia pastoris*. **Foods**, v. 11, n. 10, p. 1438, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods11101438>.

KUTTAPPAN, V. A.; SHIVAPRASAD, H. L.; SHAW, D. P.; VALENTINE, B. A.; HARGIS, B. M.; CLARK, F. D.; OWENS, C. M. Pathological changes associated with white striping in broiler breast muscles. **Poultry Science**, v. 92, n. 2, p. 331-338, 2013. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02646>.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970. DOI: [10.1038/227680a0](https://doi.org/10.1038/227680a0).

LI, C.; LIN, Y.; HUANG, Y.; LIU, X.; LIANG, S. *Citrobacter amalonaticus* phytase on the cell surface of *Pichia pastoris* exhibits high pH stability as a promising potential feed supplement. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e114728, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114728>.

LI, X. J.; ZHENG, R. C.; WU, Z. M.; DING, X.; ZHENG, Y. G. Thermophilic esterase from *Thermomyces lanuginosus*: molecular cloning, functional expression and biochemical characterization. **Protein expression and purification**, v. 101, p. 1-7, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2014.05.006>.

LI, Z.; ZHAO, A.; WANG, X.; JIN, X.; LI, J.; YU, M. Cloning, overexpression, and functional characterization of a phytase from the genus *Bacillus*. **Microbial Physiology**, v. 23, n. 3, p. 193-202, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1159/000347027>.

MALLER, A.; DE QUADROS, T. C. O.; JUNQUEIRA, O. M.; GRAÑA, A. L.; DE LIMA MONTALDI, A. P.; ALARCON, R. F.; DE LOURDES TM POLIZELI, M. Biochemical effect of a histidine phosphatase acid (phytase) of *Aspergillus japonicus* var. Saito on performance and bony characteristics of broiler. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1418, p. 1-12, 2016. DOI: [10.1186/s40064-016-3082-8](https://doi.org/10.1186/s40064-016-3082-8).

NAMALDI, A.C.; ALIK, P.; ULUDAG, Y. Effects of spray drying temperature and additives on the stability of serine alkaline peptidase powders. **Drying Technology**, v. 24, p. 1495-1500, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1080/07373930600961108>.

NEZHAD, N. G.; RAJA ABD RAHMAN, R. N. Z.; NORMI, Y. M.; OSLAN, S. N.; SHARIFF, F. M.; LEOW, T. C. Integrative structural and computational biology of phytases for the animal feed industry. **Catalysts**, v. 10, n. 8, p. 844, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/catal10080844>.

PAL ROY, M.; MAZUMDAR, D.; DUTTA, S.; SAHA, S. P.; GHOSH, S. Cloning and expression of phytase appA gene from *Shigella sp.* CD2 in *Pichia pastoris* and comparison of properties with recombinant enzyme expressed in *E. coli*. **PLoS one**, v. 11, n. 1, p. e0145745, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145745>.

PAL ROY, M.; DATTA, S.; GHOSH, S. A novel extracellular low-temperature active phytase from *Bacillus aryabhatai* RS1 with potential application in plant growth. **Biotechnology Progress**, v. 33, n. 3, p. 633-641, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/btpr.2452>.

PISANO, R.; RASETTO, V.; BARRESI, A. A.; KUNTZ, F.; AOUDE-WERNER, D.; REY, L. Freeze-drying of enzymes in case of water-binding and non-water-binding substrates. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 85, n. 3, p. 974-983, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.02.008>.

REBELLO, S.; JOSE, L.; SINDHU, R.; ANEESH, E. M. Molecular advancements in the development of thermostable phytases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 7, p. 2677-2689, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8195-7>.

ROCKINGER, U.; FUNK, M.; WINTER, G. Current approaches of preservation of cells during (freeze-) drying. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 110, n. 8, p. 2873-2893, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.04.018>.

RUCKEBUSCH, Y.; PHANEUF, L.; DUNLOP, R. **Physiology of small and large animals**. 1991.

SAXENA, A.; VERMA, M.; SINGH, B.; SANGWAN, P.; YADAV, A. N.; DHALIWAL, H. S.; KUMAR, V. Characteristics of an acidic phytase from *Aspergillus aculeatus* APF1 for dephytinization of biofortified wheat genotypes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 191, n. 2, p. 679-694, 2020. DOI: [10.1007/s12010-019-03205-9](https://doi.org/10.1007/s12010-019-03205-9).

SHARMA, A. K.; SINGH, S. P. Effect of amino acids on the repression of alkaline protease synthesis in haloalkaliphilic *Nocardioopsis dassonvillei*. **Biotechnology Reports**, v. 12, p. 40-51, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.10.004>.

SULEIMANOVA, A. D.; BEINHAEUER, A.; VALEEVA, L. R.; CHASTUKHINA, I. B.; BALABAN, N. P.; SHAKIROV, E. V.; SHARIPOVA, M. R. Novel glucose-1-phosphatase with high phytase activity and unusual metal ion activation from soil bacterium *Pantoea* sp. strain 3.5. 1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 19, p. 6790-6799, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.01384-15>.

TAN, H.; WU, X.; XIE, L.; HUANG, Z.; PENG, W.; GAN, B. Identification and characterization of a mesophilic phytase highly resilient to high-temperatures from a fungus-garden associated metagenome. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 5, p. 2225-2241, 2016. DOI: [10.1007/s00253-015-7097-9](https://doi.org/10.1007/s00253-015-7097-9).

TANG, X. C.; PIKAL, M.; J. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. **Pharmaceutical research**, v. 21, n. 2, p. 191-200, 2004. DOI: [10.1023/b:pham.0000016234.73023.75](https://doi.org/10.1023/b:pham.0000016234.73023.75).

TERRAZAS, W. D. M.; AIZEMBERG, R.; GATTÁS, E. A. L. Using *Pichia pastoris* to produce recombinant glycerol kinase. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 2, 2014.

TKACHENKO, A. A.; KALININA, A. N.; BORSHCHEVSKAYA, L. N.; SINEOKY, S. P.; GORDEEVA, T. L. A novel phytase from *Citrobacter gilleni*: characterization and expression in *Pichia pastoris* (*Komagataella pastoris*). **FEMS Microbiology Letters**, v. 368, n. 2, p. fnaa217, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa217>.

TZANNIS, S. T.; PRESTRESLKY, S. J. Moisture effects on protein excipient interactions in spray-dried powders: Nature of destabilizing effects of sucrose. **Journal of**

Pharmaceutical Sciences, v. 88, n. 3, p. 360-370, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1021/js9800127>.

WANG, Q.; LIU, X.; TIAN, J.; WANG, Y.; ZHANG, H.; WANG, Y.; TU, T. Enhancing the Thermostability of Phytase to Boiling Point by Evolution-Guided Design. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 88, n. 11, p. e00506-22, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.00506-22>.

YAO, M. Z.; WANG, X.; WANG, W.; FU, Y. J.; LIANG, A. H. Improving the thermostability of *Escherichia coli* phytase, appA, by enhancement of glycosylation. **Biotechnology letters**, v. 35, n. 10, p. 1669-1676, 2013. DOI: [10.1007/s10529-013-1255-x](https://doi.org/10.1007/s10529-013-1255-x).

ZHAO, W.; XIONG, A.; FU, X.; GAO, F.; TIAN, Y.; PENG, R. High level expression of an acid-stable phytase from *Citrobacter freundii* in *Pichia pastoris*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 162, n. 8, p. 2157-2165, 2010. DOI: [10.1007/s12010-010-8990-4](https://doi.org/10.1007/s12010-010-8990-4).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O fitato é uma molécula que tende a formar complexos com vários cátions. Sua capacidade quelante tem efeitos negativos na utilização de nutrientes pelo animal. Aumentar a biodisponibilidade de micronutrientes por meio de adição de fitases é um método eficiente como já foi comprovado por vários estudos e além disso, sustentável. A habilidade da fitase em hidrolisar de forma eficiente o fitato é definido por sua propriedade bioquímica, especialmente eficiência catalítica, estabilidade em temperaturas de peletização e ao pH do trato digestivo. Várias pesquisas são relatadas para desenvolver fitases com características necessárias a este propósito.

O presente trabalho fornece uma análise sobre como o número e tipo de interações estruturais afetam a função das fitases, sejam elas relativas à resistência térmica ou estabilidade ao pH. Em termos comparativos, as análises em escala genômica das fitases estudadas e suas propriedades bioquímicas não mostraram correlação entre si, e sugeriram que o número de interações de hidrogênio, Van der Waals, iônica e dissulfeto não foram determinantes para as características apresentadas por essas enzimas, especialmente para termoestabilidade.

A fitase selecionada foi expressa eficientemente em *P. pastoris*, ainda que suas características diferiram daquelas originalmente apresentadas pelo mesmo gene expresso em *E. coli*. Essa diferença pode estar relacionada as condições e métodos experimentais variados para a indução da expressão dessas enzimas, ou ainda as características específicas de cada sistema utilizado. Este resultado ressalta a importância do sistema de expressão na produção e atividade biológica das enzimas.

Uma compreensão aprofundada das propriedades estruturais das fitases, bem como o estudo de suas interações sobre as características bioquímicas, é essencial para se projetar uma fitase com características ideais requeridas para aplicação destas na indústria de alimentação animal, uma vez que a atividade da fitase difere quando expressa em sistemas procarióticos ou eucarióticos. Em estudos futuros, os resultados aqui encontrados poderão contribuir para melhor compreensão dos fatores determinantes da atividade da fitase e assim alcançar maior eficiência na produção e aplicação da fitase.