

PAULO SÉRGIO MONTEIRO

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE FITASES DE *Rhizopus stolonifer* E *Aspergillus niger* UFV-1 E SUAS APLICAÇÕES EM RAÇÃO ANIMAL

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

PAULO SÉRGIO MONTEIRO

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE FITASES DE *Rhizopus stolonifer* E *Aspergillus niger* UFV-1 E SUAS APLICAÇÕES EM RAÇÃO ANIMAL

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

APROVADA: 29 de setembro de 2011.

Prof^a Valéria Monteze Guimarães
(Co-orientadora)

Prof. Eduardo Arruda Teixeira Lanna

Prof. Eduardo Basílio de Oliveira

Prof^a Elita Scio Fontes

Prof. Sebastião Tavares de Rezende
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Sr. João e Dona Adelina, exemplos de simplicidade e honestidade, pelo incondicional apoio em todas as batalhas.

Aos meus irmãos Valério e Fátima, pela amizade, confiança e disponibilidade em ajudar.

A Jildete pelo amor e carinho, incentivo, apoio incondicional e por ser realmente uma parceira, principalmente nos momentos mais difíceis.

Ao Luís Vítor, pelo carinho, pelos ensinamentos e por ser minha fonte de inspiração.

Ao professor Sebastião Tavares de Rezende, pelo exemplo de profissional, pela confiança, pela amizade e pela compreensão.

A professora Valéria Monteze Guimarães, pela amizade, pela disponibilidade e pelo otimismo, mesmo nos momentos mais difíceis.

Ao professor Olinto Liparini Pereira, pela amizade e pelas contribuições para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela valiosa oportunidade concedida.

À Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudo.

Às amigas Danielle e Patrícia pela amizade, pela convivência e pelo incentivo nos momentos de maior desgaste.

Ao Daniel e a Maíra, pela amizade e pela disponibilidade em ajudar.

Aos amigos do Laboratório de Tecnologia Bioquímica e do Laboratório de Análises Bioquímicas: Naldo, Sandra, Ricardo, Murillo, Solange, Gabriela, Larissa, Eleonice, Camila, Rafaela e Samara; pelo carinho, pelo apoio e pela convivência.

Ao primo e secretário da pós-graduação do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Eduardo Monteiro, pela dedicação, pela ajuda e pela paciência na resolução de nossos problemas.

Aos meus amigos: Arlindo Brás, Pelé, Marco Aurélio, Cássio, Alessandro, Alex, Nandão, Adhemar e Geléia, pela amizade duradoura, pelo apoio e pelos momentos de descontração.

Especialmente, ao meu grande amigo Erli, um parceiro de todas as horas, que repentinamente partiu e nos deixou a eterna lembrança.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução desse trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

ÍNDICE

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1. Introdução e Justificativa.....	1
2. Objetivos.....	3
2.1. Objetivos Gerais.....	3
2.2. Objetivos Específicos.....	3
3. Revisão bibliográfica.....	4
3.1. Ácido fítico.....	4
3.2. Fitases.....	10
3.3. Referências Bibliográficas.....	16
4. Artigo I – Produção e caracterização de uma fitase de <i>Rhizopus stolonifer</i> e sua avaliação na hidrólise de fitato em ração animal.....	25
4.1. Resumo.....	25
4.2. Abstract.....	25
4.3. Introdução.....	26
4.4. Materiais e Métodos.....	27
4.4.1. Isolamento de fungos e condição inicial de cultivo.....	27
4.4.2. Determinação da atividade enzimática.....	28
4.4.3. Identificação dos fatores importantes para a produção de fitases.....	28
4.4.4. Otimização das condições de cultivo para aumento da atividade de fitases.....	29
4.4.5. Efeito da temperatura e pH na atividade enzimática.....	30
4.4.6. Avaliação da estabilidade térmica do extrato enzimático.....	30
4.4.7. Determinação dos parâmetros cinéticos.....	31
4.4.8. Avaliação da hidrólise de fitato em ração animal.....	31
4.5. Resultados.....	31
4.5.1. Isolamento de fungos.....	31
4.5.2. Otimização das condições de cultivo para obtenção da atividade ótima de fitases.....	33
4.5.3. Efeito da temperatura e pH na atividade enzimática e avaliação da termoestabilidade.....	40
4.5.4. Determinação dos parâmetros cinéticos.....	43
4.5.5. Avaliação da hidrólise de fitato em ração animal.....	44
4.6. Conclusão.....	45
4.7. Referências Bibliográficas.....	45
5. Artigo 2 – Purification and characterization of a novel phytase from <i>Aspergillus niger</i> UFV-1 with strong proteolysis resistance and its application in livestock feed.....	48
5.1. Abstract.....	48

5.2. Introduction.....	48
5.3. Material and Methods.....	49
5.3.1. Strain isolation, culture conditions and enzyme production.....	49
5.3.2. Phytase assay.....	50
5.3.3. Enzyme purification.....	50
5.3.4. Electrophoretic analysis and molecular mass determination.....	51
5.3.5. Effect of temperature and pH on enzyme activity.....	52
5.3.6. Enzyme thermal stability and proteolysis resistance.....	52
5.3.7. Effect of potential effectors.....	52
5.3.8. Determination of substrate specificity and kinetic parameters.....	53
5.3.9. Evaluation of phytate hydrolysis in livestock feed.....	53
5.4. Results and discussion.....	54
5.4.1. Enzyme purification.....	54
5.4.2. Determination of molecular mass.....	56
5.4.3. Effect of temperature and pH on enzyme activity.....	57
5.4.4. Enzyme thermal stability and proteolysis resistance.....	57
5.4.5. Effect of potential effectors.....	60
5.4.6. Determination of substrate specificity and kinetic parameters.....	63
5.4.7. Evaluation of phytate hydrolysis in livestock feed.....	64
5.5. Conclusion.....	65
5.6. References.....	66
6. Conclusões gerais.....	69

RESUMO

MONTEIRO, Paulo Sérgio, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2011. **Produção e caracterização bioquímica de fitases de *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus niger* UFV-1 e suas aplicações em ração animal.** Orientador: Sebastião Tavares de Rezende. Co-orientadores: Valéria Monteze Guimarães e Luciano Gomes Fietto.

Neste trabalho, duas cepas fúngicas isoladas da castanha macadâmia e de bagaço de cana-de-açúcar foram avaliadas quanto ao potencial para produção de fitases, visando aplicação em processos biotecnológicos, principalmente em rações animais. O fungo *Rhizopus stolonifer*, isolado a partir da macadâmia, foi cultivado em meio líquido contendo infusão de batata, sacarose, peptona, Tween-20, e CaCl_2 , utilizando a metodologia de superfície de resposta (MSR) para otimizar a produção de fitases. O uso da MSR resultou em uma atividade enzimática de 0,65 U/mL, valor nove vezes maior em relação à atividade inicial de fitases. A enzima apresentou pH e temperatura ótimas na faixa de 5,0-5,5 e 65 °C, respectivamente, com $t_{1/2}$ de 50 minutos a 50 °C. Os valores de K_M $_{app}$ e V_{max} $_{app}$ foram 0,692 mM e 0,780 $\mu\text{mol}/\text{min}$, respectivamente. A enzima mostrou-se eficiente na hidrólise de fitato em ração animal, liberando 5,14 $\mu\text{mol PO}_4^{3-}/\text{mL}$ após 5 horas de tratamento. Esse valor é equivalente à concentração inicial de fósforo. O fungo *Aspergillus niger* UFV-1, isolado de bagaço de cana-de-açúcar, também foi cultivada em meio líquido contendo infusão de batata, sacarose, peptona, Tween-20 e CaCl_2 . Após oito dias de incubação, o extrato enzimático produzido foi coletado e analisado para a atividade enzimática de fitases. A enzima foi purificada por ultrafiltração, precipitação ácida e cromatografias de troca iônica e gel filtração. A fitase apresentou massa molecular de 161 kDa, determinada por gel filtração e 81 kDa, determinada por eletroforese SDS-PAGE, sugerindo que a enzima é formada por duas subunidades. Os valores de pH e temperatura ótimos foram de 2,0 e 60 °C, respectivamente. Os parâmetros cinéticos, K_M e V_{max} , determinados pela equação de *Lineweaver-Burk*, foram 30,9 mM e 7,48 $\mu\text{mol}/\text{min}$, respectivamente. A k_{cat} estimada foi de $1,46 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ e k_{cat}/K_M foi igual a $4724919 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$. A fitase mostrou elevada termoestabilidade, com $t_{1/2}$ de

6,2 horas a 80 °C e foi resistente a pepsina e tripsina. Além disso, foi eficiente na liberação de fósforo, quando avaliada em ração animal comercial, liberando 15,3 $\mu\text{mol PO}_4^{3-}/\text{mL}$, valor equivalente a quatro vezes a concentração inicial de fósforo. Os resultados obtidos sugerem que as duas cepas fúngicas avaliadas têm grande potencial como produtoras de fitases para aplicação industrial, principalmente a cepa de *Aspergillus niger* UFV-1, cuja fitase apresentou pH ótimo ácido e elevada resistência a proteases.

ABSTRACT

MONTEIRO, Paulo Sérgio, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2011. **Production and biochemical characterization of phytases from *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* UFV-1 and its applications in animal feed.** Adviser: Sebastião Tavares de Rezende. Co-advisers: Valéria Monteze Guimarães and Luciano Gomes Fietto.

In this work, two fungi strains isolated from macadamia nut and sugar cane bagasse were evaluated for potential productions of phytases, focusing on biotechnological applications, mainly in animal feed. The fungi *Rhizopus stolonifer* isolated from macadamia nut was cultivated in submerged fermentation containing potato infusion, sucrose, peptone, Tween-20 and CaCl₂, using response surface methodology (RSM) to optimize the phytase production. The use of MSR resulted in an enzyme activity of 0.65 U/mL, a value 9-times the initial phytase activity. The enzyme showed optimum pH and temperature in the range of 5.0-5.5 and of 65 °C, respectively, with t_{1/2} of 50 minutes at 50 °C. The K_{M app} and V_{max app} value were 0.692 mM and 0.780 μmol/min, respectively. The enzyme was efficient in phytate hydrolysis in animal feed, releasing 5.14 μmol PO₄³⁻/mL after 5 h of treatment. This value is equivalent to the initial phosphorus concentration. The fungi *Aspergillus niger* UFV-1 isolated from sugar cane bagasse was also cultivated in liquid medium containing potato infusion, sucrose, peptone, Tween-20 and CaCl₂. After eight days of fermentation, the crude extract produced was collected and analyzed for enzymatic activity of phytases. The enzyme was purified by ultrafiltration, acid precipitation, and ion exchange and gel filtration chromatography. The phytase showed a molecular mass of 161 kDa determined by gel filtration and 81 kDa by SDS-PAGE electrophoresis, suggesting that the enzyme is composed of two subunits. The optimal values of pH and temperature were 2.0 and 60 °C, respectively. The kinetic parameters, K_M and V_{max}, determined by the Lineweaver-Burk plot, were 30.9 mM and 7.48 μmol/min, respectively. The k_{cat} estimated was 1.46 x 10⁵ s⁻¹ and k_{cat}/K_M was 4724919 s⁻¹.M⁻¹. The phytase showed high thermostability with t_{1/2} of 6.2 h at 80 °C and was resistant to pepsin and trypsin. Additionally, it efficiently in release of phosphorus, when evaluated

in commercial animal feed, releasing 15.3 $\mu\text{mol PO}_4^{3-}/\text{mL}$, equivalent to 4-times the initial phosphorus concentration. The obtained results suggest that the two fungi strains evaluated have great potential as phytase producers for industrial application, mainly the strain *Aspergillus niger* UFV-1 that showed acidic optimum pH and high protease resistance.

1. Introdução e Justificativa

O ácido fítico é uma molécula bastante difundida na natureza, sendo encontrado em plantas, animais e solos. Nos cereais e leguminosas, é considerado como a principal fonte de fósforo a ser metabolizado durante a germinação das sementes. Devido ao seu elevado teor de fósforo e a sua capacidade complexante, o ácido fítico apresenta grande importância do ponto de vista da nutrição de plantas e animais, incluindo o homem, bem como do ponto de vista ambiental.

Nas últimas décadas o aumento da criação de animais, principalmente por meio da adoção de técnicas de confinamento, tem causado graves problemas ambientais, principalmente, nas áreas de pecuária intensiva. O fósforo presente no ácido fítico não é absorvido por animais monogástricos, uma vez que estes não apresentam em quantidades suficientes, as enzimas que catalisam a hidrólise do ácido fítico. A molécula não hidrolisada é excretada nos resíduos animais, podendo atingir os mananciais, resultando na proliferação de bactérias, morte de organismos aquáticos e produção de neurotoxinas prejudiciais ao homem. Na China e nos Estados Unidos, dois dos maiores produtores mundiais de suínos, o rápido crescimento desta atividade tem causado problemas ambientais, como a eutrofização das águas. Também no Brasil, as atividades agropecuárias, incluindo a suinocultura, vêm se intensificando a cada ano, causando a poluição das águas nas regiões de pecuária intensiva.

Em mamíferos, o ácido fítico está relacionado com vários processos fisiológicos, tais como a inibição da digestibilidade do amido, a redução do teor de glicose sanguínea e na redução da ocorrência das calcificações distróficas de órgãos e tecidos. No entanto, o ácido fítico é um fator antinutricional para animais monogástricos. A sua capacidade de complexar minerais e de interagir com proteínas, diminui a biodisponibilidade desses nutrientes para o organismo, uma vez que os monogástricos apresentam limitada capacidade de catalisar a hidrólise do ácido fítico das dietas.

Além da sua relevância em relação à nutrição animal e suas implicações ambientais, o ácido fítico também está relacionado à nutrição humana, exercendo ação antinutricional, principalmente em locais onde as dietas se baseiam principalmente em leguminosas e cereais.

No sentido de aumentar a biodisponibilidade de fósforo e outros minerais, a enzima fitase, que catalisa a hidrólise do ácido fítico, apresenta grande potencial de utilização em dietas para animais monogástricos. A inclusão de fitases em reações reduz a necessidade da suplementação das dietas com fósforo inorgânico. Como consequência, reduz-se significativamente o custo das rações e a concentração de fósforo nos resíduos animais, que por sua vez, está diretamente relacionada à diminuição da poluição das águas, principalmente em áreas de pecuária intensiva.

Fitases estão amplamente difundidas na natureza, sendo os microrganismos os principais produtores. Dentre estes, os fungos se destacam por produzirem fitases com maior estabilidade térmica e maior estabilidade em meios ácidos, características importantes para a utilização industrial das enzimas.

Com base na grande influência do ácido fítico na nutrição animal e humana, bem como na poluição ambiental, o uso biotecnológico de fitases tem se tornado uma tendência mundial. Nesse contexto, objetivou-se nesse trabalho, o isolamento e identificação de fungos produtores de fitases, bem como, a purificação e caracterização da enzima de maior potencial, além da avaliação *in vitro* da sua atividade hidrolítica de ácido fítico em ração animal comercial.

2. Objetivos

2.1. Objetivos Gerais

O objetivo desse trabalho foi isolar e avaliar o potencial de fungos produtores de fitases, visando à aplicação industrial das enzimas.

2.2. Objetivos Específicos

- Isolar e identificar fungos produtores de fitases, a partir de grãos e sementes.
- Aplicar a metodologia de superfície de resposta para otimizar os níveis dos fatores que afetam a produção da enzima.
- Caracterizar as fitases produzidas pelos isolados quanto à temperatura e pH ótimos e termoestabilidade.
- Purificar a fitase que apresentar melhor termoestabilidade.
- Caracterizar a fitase purificada quanto a temperatura e pH ótimos; termoestabilidade; resistência a proteases; massa molecular; efeito de potenciais efetores; especificidade; K_M , V_{max} , k_{cat} e k_{cat}/K_M .
- Testar o potencial das fitases em experimentos de hidrólise de fitato em ração animal comercial.

3. Revisão bibliográfica

3.1. Ácido fítico

A descoberta do ácido fítico (Figura 1) foi possibilitada graças aos trabalhos de Hartig, que, em 1855, isolou de várias sementes de plantas, pequenas partículas não amiláceas, as quais considerou como sendo uma fonte essencial de reserva de nutrientes para a germinação das sementes e o crescimento das plantas (Oatway *et al.*, 2001).

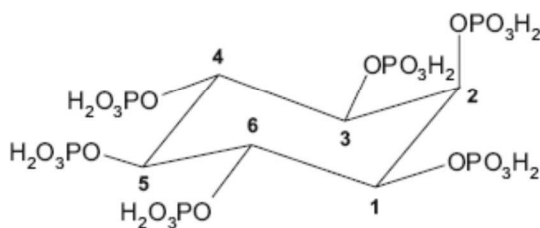


Figura 1 – Fórmula estrutural do ácido fítico (Haefner *et al.*, 2005).

Posteriormente, Pfeffer (1872) caracterizou as partículas isoladas anteriormente por Hartig, classificando-as em três grupos: cristais de oxalato de cálcio, uma substância proteica e um composto que não reagia quando testado para proteína, gordura ou sais inorgânicos. Esse composto do terceiro grupo possuía formas esféricas, continha cálcio, magnésio e fósforo, além de matéria orgânica e não continha nitrogênio. Pfeffer denominou esse grupo de grãos de globoides e foi sugerido que o composto era uma combinação de fosfatos com um carboidrato.

Segundo Sathe & Reddy (2002), a presença e a composição química desses globoides em mostarda indiana (*Sinapis niger*) foi confirmada por Schulze & Winterstein (1896), que sugeriram o nome ácido inositol-fosfórico como a denominação mais adequada para identificar os *globóides*, devido à sua hidrólise liberar inositol e ácido fosfórico.

Na literatura são adotadas nomenclaturas distintas para o ácido fítico, que pode ser denominado de *mio*-inositol 1,2,3,4,5,6-hexaquis (dihidrogênio) fosfato, *mio*-inositol hexaquisfosfato, Ins (1,2,3,4,5,6)P₆, InsP₆ ou IP₆, sendo seus sais geralmente denominados de fitatos (Figura 2) (Sathe & Reddy, 2002; Vats *et al.*, 2005; Crea, 2008).

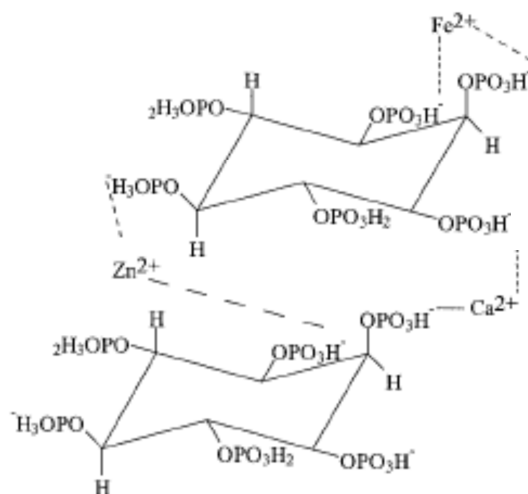


Figura 2 – Estrutura do fitato, formado pela complexação dos íons Fe^{2+} , Ca^{2+} e Zn^{2+} com os grupos fosfato do ácido fítico (adaptado de Lei & Porres, 2003).

Os fitatos são resultantes da interação do ácido fítico com íons, tais como cálcio, magnésio e potássio (Maga, 1982), sendo amplamente encontrados em grãos e sementes das plantas (Harland & Oberleas, 1987), em raízes e tubérculos (Ravindran *et al.*, 1994), em frutas, vegetais e nozes (Harland & Oberleas, 1987; Wolters *et al.*, 1993), no pólen de várias espécies de plantas (Baldi *et al.*, 1987) e em solos orgânicos (Caldwell & Black, 1958). Em animais também já foram identificados inositol fosfato, no entanto foi verificado que essas estruturas são formadas por menos de seis grupos fosfato, tal como o *mio*-inositol 1,3,4,5,6-pentaquisfosfato, encontrado nos eritrócitos de pássaros, tartarugas e peixes (Rapaport, 1940; Rapaport & Guest, 1941; Isaacks *et al.*, 1977).

Devido ao ácido fítico e o fitato ocorrerem simultaneamente em várias sementes, geralmente não é feita nenhuma distinção em relação à nomenclatura a ser adotada para essas duas formas (Sathe & Reddy, 2002).

As vias biossintéticas do ácido fítico já foram parcialmente elucidadas, a exemplo da via de síntese que ocorre em eucariotos (Figura 3). As vias iniciam-se com a síntese de inositol, que pode ser diretamente fosforilado passo a passo até a formação de ácido fítico ou então pode ser convertido em intermediários fosfatidilinositol fosfato (PtdIns P), que na sequência de reações é convertido em ácido fítico (Raboy *et al.*, 2002).

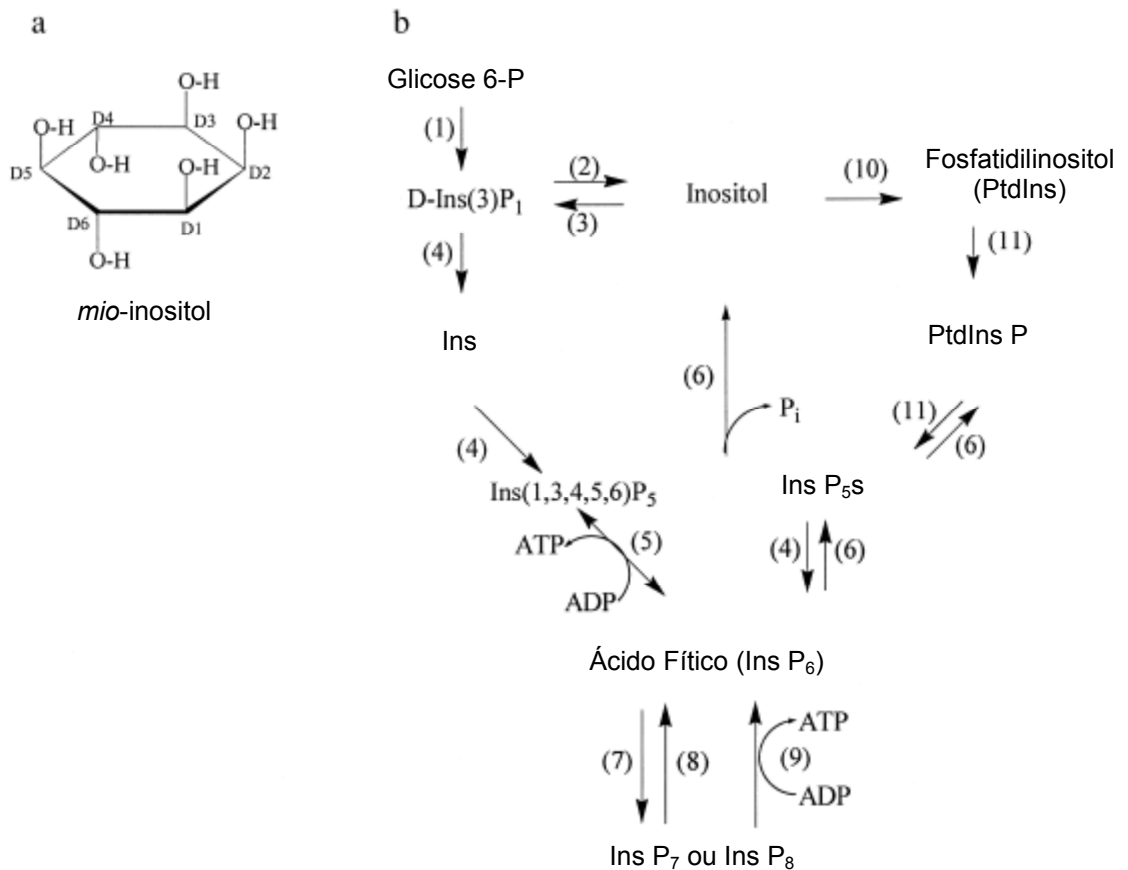


Figura 3 – Resumo das vias bioquímicas envolvidas na biossíntese de ácido fítico em células eucarióticas. (a) Estrutura do *mio*-inositol. (b) Vias bioquímicas. Os números entre parênteses indicam os nomes das enzimas envolvidas em cada reação: (1) *D-mio*-inositol 3-P₁ sintase (MIPS); (2) *D*-Ins 3-P₁ fosfatase ou Ins monofosfatase; (3) *D*-Ins 3-quinase ou Ins quinase; (4) Ins P ou poliP quinases; (5) Ins 1,3,4,5,6 P₅ 2-quinase ou ácido fítico-ADP fosfotransferase; (6) fitases e fosfatases; (7) Ins P₆ ou quinases formadoras de pirofosfato; (8) fosfatases pirofosfato específicas; (9) Ins PoliP-ADP fosfotransferases que contém pirofosfato; (10) fosfatidilinositol (PtdIns) sintase; (11) PtdIns e PtdIns P quinases, seguida pela PtdIns fosfolipase C P-específica (adaptado de Raboy *et al.*, 2002).

O ácido fítico é considerado uma molécula muito importante do ponto de vista da nutrição de plantas, da saúde e nutrição humana e de animais, bem como do ponto de vista ambiental e biotecnológico. Sendo assim, esta substância tem sido, no último século, objeto de pesquisas nessas diferentes áreas.

Dentre suas várias implicações, o ácido fítico é considerado o principal composto de estocagem de fosfato e inositol nos grãos e sementes das plantas

(Loewus, 2002; Poulsen *et al.*, 2010). Nas plantas, sua biossíntese inicia-se logo após o florescimento e o composto se acumula durante a maturação das sementes (Bohn *et al.*, 2008). Durante essa etapa, os cereais e as leguminosas acumulam em suas sementes uma quantidade considerável de ácido fítico (Honke *et al.*, 1998), representando entre 60 a 90 % do conteúdo total de fósforo nessas plantas (Vats *et al.*, 2005). A grande parte do ácido fítico presente nas sementes se encontra na forma de fitatos (Cheryan, 1980), que atuam como fonte de reserva de fósforo e de cátions, que podem ser metabolizados por várias enzimas durante a germinação (Vats *et al.*, 2005).

Nos eucariotos em geral, o ácido fítico demonstra possuir também ação antioxidante, devido à sua capacidade de se ligar e inativar íons ferro em solução, evitando a formação de radicais hidroxil (OH^\cdot), resultantes da oxidação do Fe^{2+} por H_2O_2 ou outros peróxidos. Esses radicais são espécies químicas altamente reativas que reagem com proteínas, lipídeos e/ou DNA, causando injúria ou a morte celular (Benzie, 2003). No entanto, as conclusões sobre sua ação antioxidante é controversa. Enquanto alguns estudos indicam que o ácido fítico fornece proteção antioxidante (Kamp *et al.*, 1998), outros indicam que tal efeito não ocorre (Rimbach & Pallauf, 1998). Além disso, Rimbach & Pallauf (1999) concluíram em seus estudos que o fitato estimulou o processo oxidativo em células do fígado de camundongos.

Em mamíferos, o ácido fítico também está correlacionado com vários outros processos fisiológicos. A utilização de ácido fítico em dietas reduziu a digestibilidade do amido *in vitro* por inibição da atividade enzimática da amilase e reduziu a concentração de glicose sanguínea em humanos (Thompson *et al.*, 1987), bem como em camundongos (Lee *et al.*, 2006). Além disso, tem sido sugerido que o ácido fítico está envolvido na redução do colesterol e de triglicerídeos do sangue (Onomi *et al.*, 2004).

A calcificação distrófica é uma desordem comum associada a órgãos, como os rins, e tecidos, como ósseo e cardiovascular (Virmani *et al.*, 2002). É normalmente causada pelo acúmulo de sais de fosfato de cálcio e oxalato de cálcio. O ácido fítico tem se mostrado um potente inibidor da cristalização desses sais na urina de camundongos e assim, atuando na prevenção dessas calcificações patológicas (Grases *et al.*, 2004).

O ácido fítico tem se mostrado eficiente também na prevenção e na terapia do câncer. A sua utilização nas dietas favorece o aumento da atividade

das células *Natural Killer*, envolvidas na supressão dos tumores. No entanto, as conclusões sobre seus efeitos anticarcinogênicos são controversas. Dentre os diversos trabalhos realizados com camundongos, alguns estudos indicam que o ácido fítico possui efeito anticarcinogênico (Vucenik & Shamsuddin, 2006), enquanto outros indicam que ocorre o estímulo da carcinogênese (Takaba *et al.*, 1994).

Entre as aplicações biotecnológicas, o ácido fítico pode ser utilizado no tratamento, *in situ*, de solos contaminados por vários metais, incluindo metais pesados e radionucleotídeos, devido às suas propriedades complexantes (Seaman *et al.*, 2003).

A despeito dos efeitos positivos, acima discutidos, o ácido fítico atua como um fator antinutricional em animais monogástricos, incluindo o homem. A sua capacidade de complexar minerais, tais como cálcio, magnésio, ferro, zinco, cobre, manganês, potássio, níquel e cobalto (Bohn *et al.*, 2007) e de interagir com proteínas, diminui a biodisponibilidade de minerais e de proteínas nutricionalmente importantes (Nagashima *et al.*, 1999). Segundo Ravindran *et al.* (1999), proteínas da soja, milho, trigo, farelo de girassol e farelo de arroz, formam complexos com o ácido fítico, diminuindo a sua digestibilidade intestinal. Além disso, ácido fítico inibe a atividade de enzimas digestivas como pepsina e tripsina (Ravindran *et al.*, 1995).

Soma-se ao seu caráter antinutricional, o fato de que o fósforo presente no ácido fítico não é absorvido por animais monogástricos, tais como aves, suínos e peixes, bem como por humanos, uma vez que estes não apresentam, ou apresentam em quantidades insuficientes, as enzimas que degradam o ácido fítico (Vats *et al.*, 2005). Assim, fósforo inorgânico, um mineral não renovável e de alto custo, é geralmente, suplementado nas dietas de animais monogástricos, visando a atender às suas necessidades de fósforo (Cheryan, 1980).

Além de ser suplementado nas dietas, desde o início do século XX, o fósforo tem sido utilizado na agricultura como fertilizante, em proporções cada vez maiores. Sendo assim, o fósforo utilizado, que é obtido através da mineração poderá tornar-se escasso em curto tempo. Muitos cientistas acreditam que as reservas atuais sejam esgotadas antes da metade do século XXII (Günther, 1997; Steen, 1998).

Nos dois últimos séculos, as atividades humanas têm alterado significativamente o ciclo do fósforo e, como consequência, atualmente o acúmulo de fósforo nos ecossistemas é três vezes maior quando comparado aos períodos pré-industriais (Hassan *et al.*, 2005). Parte desse fósforo presente nos solos é transferida para as águas através da erosão e lixiviação, gerando problemas ambientais como a eutrofização; resultando na proliferação de cianobactérias, hipoxia e a morte de organismos aquáticos (Vats *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2008).

Aliado à suplementação da nutrição de plantas e animais com fósforo inorgânico, o fitato não digerido e excretado pelos animais monogástricos contribui na geração da poluição ambiental, principalmente, em áreas de pecuária intensiva (Cheryan, 1980). Em dietas para suínos, à base de milho e soja, aproximadamente 70 % do fósforo é indisponível para esses animais (NRC, 1998).

Nas últimas décadas, a criação de animais, especialmente suínos, gados e aves, sofreu uma mudança importante sob o ponto de vista industrial (Thu & Durrenberger, 1998). A intensificação da produção animal pela adoção de técnicas de confinamento tem gerado um acúmulo de fósforo nos resíduos animais, em concentrações que, normalmente, excedem à capacidade de assimilação do ambiente local (Mallin & Cahoon, 2003).

Na China, o maior produtor mundial de suínos, nas áreas de pecuária intensiva, o volume de fezes animais têm sido maior que a capacidade de utilização das mesmas como fertilizantes, causando graves impactos ambientais (Chen *et al.*, 2008).

O Estado da Carolina do Norte, nos Estados Unidos, um dos maiores produtores mundiais de suínos, também é um exemplo dos efeitos causados pela rápida expansão industrial relacionada à criação de animais, principalmente de suínos. Em análises de solos realizadas no ano de 2003, constatou-se que o teor de fósforo dos solos da maioria dos municípios do Estado, excedia a concentração necessária para a agricultura (Johnson *et al.*, 2005). O agravante desse rápido crescimento, é que os sistemas de tratamento de resíduos adotado pelas unidades produtoras nas fases iniciais foram elaborados com previsões inadequadas para as consequências ambientais, em função das poucas regulamentações existentes na época. A partir de 1993, objetivando diminuir os problemas ambientais no país, passou-se a exigir

legalmente o cumprimento de novas regulamentações ambientais e planos de gerenciamento de resíduos (Burkholder *et al.*, 1997).

No Brasil vem ocorrendo também aumento da produção animal em escala, acarretando, em muitos casos, em graves impactos ambientais (Krapac *et al.*, 2002, Kunz *et al.*, 2009). O país possui atualmente o quarto maior rebanho mundial de suínos, superado somente pela China, Comunidade Europeia e Estados Unidos (USDA, 2011).

Além dos aspectos relevantes à nutrição animal e suas implicações ambientais, atenção também tem sido direcionada ao ácido fítico como um fator antinutricional em dietas de humanos. A indisponibilidade dos minerais ligados ao ácido fítico pode levar a deficiências nutricionais em populações onde trigo, milho e arroz são as principais, ou somente as únicas, fontes de nutrição (Bohn *et al.*, 2008). Em países em desenvolvimento, o ácido fítico é parcialmente correlacionado às deficiências nutricionais de cálcio, ferro e zinco (Manary *et al.*, 2002).

Necessidade de mudanças neste cenário tem estimulado a busca por alternativas para melhoria da biodisponibilidade de fósforo e outros minerais, redução da necessidade de suplementação de dietas com fósforo e, conseqüentemente, redução da poluição ambiental. Dentre as alternativas, revisadas por Maguire *et al.* (2005), destaca-se o uso potencial das enzimas fitases, capazes de catalisar a hidrólise o ácido fítico.

3.2. Fitases

As fitases (*mio*-inositol (1,2,3,4,5,6) hexaquisfosfato fosfohidrolase) são definidas como fosfatases com a capacidade de, *in vitro*, de liberar pelo menos um grupo fosfato através da hidrólise do fitato, diminuindo a concentração de inositol fosfato e potenciais minerais quelados (Bohn *et al.*, 2008).

As fitases estão amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas em animais, plantas e microrganismos. Sua atividade foi inicialmente observada em farelo de arroz (Suzuki *et al.*, 1907) e no sangue de bezerros (McCollum & Hart, 1908). Estudos posteriores revelaram a presença de fitases em pássaros, répteis e peixes (Rapaport *et al.*, 1941), trigo (Nagai & Funahashi, 1962), soja (Hamada, 1996), além de bactérias, leveduras, fungos e protozoários (Howson & Davis, 1983; Segueilha *et al.*, 1992; Freund *et al.*, 1992; Greiner *et al.*, 1993).

Fitases têm sido isoladas e caracterizadas a partir de plantas e microrganismos e, de acordo com o pH ótimo de atividade enzimática, podem ser classificadas em fitases ácidas ou alcalinas. Em função da elevada acidez do trato digestivo de animais monogástricos há um grande interesse em fitases com a capacidade de catalisar a hidrólise de fitato em pH ácido. As fitases ácidas são formadas por três grupos estruturalmente distintos, representado pelas fosfatases de histidina ácida, fitases β -propeller e fosfatases ácidas púrpuras (Mullaney & Ullah, 2003; Lei *et al.*, 2007).

Algumas fosfatases de histidina ácida apresentam ampla faixa de especificidade por substratos, porém reduzida especificidade para o ácido fítico. Entretanto, outras fosfatases deste grupo apresentam reduzida faixa de especificidade por substratos e elevada especificidade pelo ácido fítico. As enzimas desse grupo compartilham no sítio ativo os motivos RHGXRXP e HD, sendo a hidrólise das ligações fosfomonoéster do substrato realizada em duas etapas. Inicialmente ocorre a formação de uma fosfohistidina intermediária por meio de um ataque nucleofílico à ligação fosfomonoéster. Na sequência, ocorre a hidrólise do intermediário e liberação da histidina para a subsequente reação enzimática (Xiang *et al.*, 2004; Konietzny & Greiner, 2002).

Xiang *et al.* (2004) determinou, por cristalografia, a estrutura da fitase de *Aspergillus fumigatus*. A enzima apresenta em sua estrutura um pequeno domínio α e um grande domínio α/β . O pequeno domínio α -hélice consiste de uma estrutura α -hélice central rodeada por sete α -hélices. No grande domínio α/β , um filamento β -sanduíche forma a estrutura do núcleo, com duas longas α -hélices de um lado e várias pequenas α -hélices do lado oposto. Os resíduos conservados, o motivo catalítico 58RHGARXP64 e o motivo de ligação de substrato 338HD339, estão localizados na interface do grande domínio α/β e do pequeno domínio α .

Outro grupo de fitases ácidas é formado pelas enzimas que apresentam a conformação denominada de β -propeller, as quais são dependentes de Ca^{2+} para a atividade catalítica, a exemplo das fitases de *Bacillus subtilis* e *Bacillus amyloliquefaciens*. Estas enzimas apresentam dois sítios de ligação para substratos, sendo a hidrólise realizada no sítio catalítico. Em uma posição adjacente, situa-se outro sítio de ligação para um segundo grupo fosfato. Esse sítio não é catalítico, porém a sua ligação com o fosfato promove uma

alteração na conformação da enzima, aumentando a afinidade da ligação da enzima com o substrato. (Oh *et al.*, 2001, Shin *et al.*, 2001).

As fosfatases ácidas púrpuras são metaloenzimas que contêm ferro ou zinco no sítio catalítico. Fitases desse grupo isoladas de soja (*Glycine max* L. Merr.) e de *Aspergillus niger* NRRL 3135, apresentaram baixa atividade enzimática em relação a fitase de histidina ácida isolada do mesmo microrganismo. A baixa atividade da fitase de soja pode ser necessária devido ao processo de germinação das sementes necessitar da hidrólise mais lenta do fitato por um período mais prolongado (Gibson *et al.*, 1988; Klabunde *et al.*, 1996; Ullah *et al.*, 1998).

Com relação à sua estereoespecificidade, a IUPAC-IUBMB (União Internacional de Química Pura e Aplicada e União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular) reconhece, atualmente, três classes de fitases: 3-fitases (EC 3.1.3.8), 5-fitases (EC 3.1.3.72) e 4/6-fitases (EC 3.1.3.26). Essa classificação baseia-se na posição do anel inositol na qual a enzima inicia a desfosforilação do ácido fítico, produzindo diferentes isômeros inositol fosfato (Lei & Porres, 2003).

Em função das diferentes nomenclaturas adotadas para uma mesma enzima e seus produtos (grupos inositol fosfato), a IUPAC-IUB recomenda que os átomos de carbono do anel *mio*-inositol sejam sempre numerados de acordo com a configuração D. No entanto, existe um problema com relação ao grupo das 4/6 fitases, as quais iniciam a desfosforilação do ácido fítico no carbono 4 (configuração D) ou no carbono 6 (configuração L) do anel inositol. A nomenclatura oficial a ser adotada deve ser 4-fitases, mas, tradicionalmente, são identificadas como sendo 6-fitases, como ocorre no caso das fitases das plantas (Bohn *et al.*, 2008).

O maior grupo de fitases pertence às 3-fitases, que em geral são encontradas em fungos e bactérias. Uma fitase bem estudada dessa classe foi isolada da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A enzima é extracelular e sua expressão pode ser induzida quando a levedura é cultivada em meio contendo somente InsP₆ como única fonte de fósforo. Na Figura 4 é mostrada a desfosforilação sequencial do ácido fítico pela fitase de *S. cerevisiae*. Entretanto, nem todos os produtos da hidrólise enzimática tenham sido confirmados (Andlid *et al.*, 2004).

A classe das 5-fitases é representada por uma única fitase alcalina encontrada em pólen de lírio, que inicia a desfosforilação do ácido fítico no carbono 5 do anel inositol e produz $\text{Ins}(1,2,3)\text{P}_3$ como produto final (Barrientos *et al.*, 1994).

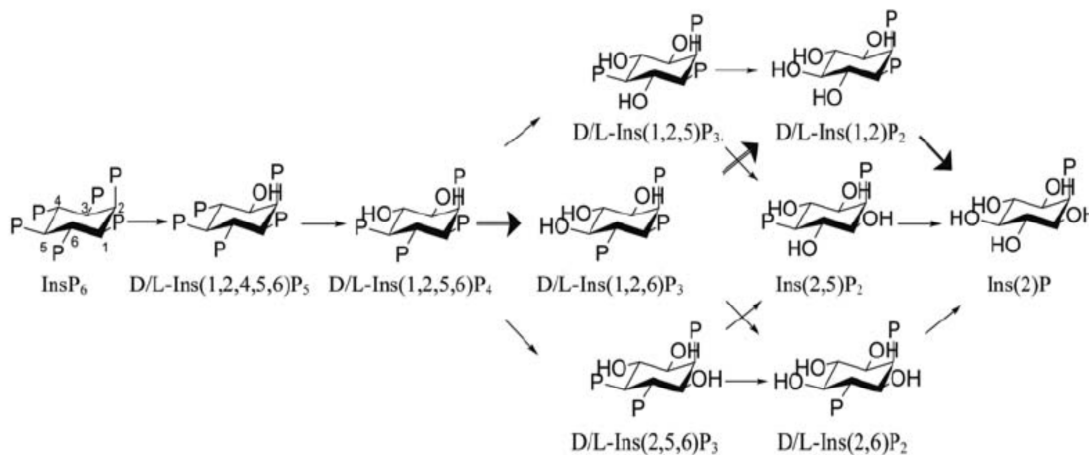


Figura 4 – Desfosforilação do ácido fítico pela 3-fitase de *Saccharomyces cerevisiae*. As setas maiores indicam a via principal de desfosforilação e as setas menores indicam outras possíveis vias. P representa o fosfato inorgânico, sendo que o restante das moléculas foi omitido para melhor visualização (adaptado de Bohn *et al.*, 2008).

Entre os principais obstáculos para a utilização de fitases para fins biotecnológicos destacam-se a dificuldade de obtenção de enzimas com elevada estabilidade térmica e estabilidade em meio ácido, além dos custos efetivos de produção e purificação (Lei & Porres, 2003; Bohn *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010). Essas características são importantes devido às altas temperaturas utilizadas durante os processos industriais, como na peletização das rações, e à elevada acidez do estômago dos animais monogástricos.

As fitases podem ser produzidas industrialmente por processos biotecnológicos a partir de fontes de origem animal e vegetal. No entanto, a fitase produzida por microrganismos é a forma mais promissora de produção da enzima. Apesar da capacidade de produção de bactérias e leveduras, os fungos são mais utilizados devido às suas fitases apresentarem maior estabilidade térmica e maior estabilidade em faixas mais amplas de pH, quando comparadas com as fitases de plantas (Bohn *et al.*, 2008). Têm-se pesquisado intensivamente a produção de fitases por diferentes microrganismos; contudo,

em termos de utilização industrial, os fungos do gênero *Aspergillus* apresentam-se como os mais promissores (Pandey *et al.*, 2001).

Vários experimentos, laboratoriais e de campo, têm mostrado que 500-1000 unidades de fitase podem substituir a suplementação de aproximadamente 1 g de fósforo inorgânico e reduzir a excreção de fósforo em torno de 30-50 % (Keme *et al.*, 1997). Na suplementação de rações com fitases, estima-se que haja um aumento da utilização de fósforo fítico entre 20 e 45 % (Ravindran *et al.*, 1995). A suplementação com fitase microbiana aumentou a biodisponibilidade de fósforo em 38 %, 12 % e 15 % em rações para suínos contendo milho, trigo e *triticale*, respectivamente (Dungelhoeft *et al.*, 1994) e possibilitou a redução da adição de zinco em, aproximadamente, 30 % na suplementação das dietas à base de milho e soja (Revy *et al.*, 2006). Em frangos, a suplementação das rações com fitase, reduziu significativamente a excreção de aminoácidos endógenos e de minerais como cálcio, sódio, fósforo fítico e ácido siálico (Cowieson *et al.*, 2004). O uso de fitase no pré-tratamento de dietas à base de soja correlacionou-se com aumento do teor corporal de fósforo em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Liebert & Portz, 2005). A adição de fitase no pré-tratamento de dietas para carpa comum (*Cyprinus carpio L.*) à base de glúten de milho, isolado proteico de soja, trigo e milho resultou em um considerável aumento na absorção de minerais pelos peixes, resultantes da hidrólise do fitato presente nas fontes vegetais utilizadas nas dietas (Nwanna *et al.*, 2008).

O aumento do conhecimento sobre os potenciais benefícios proporcionados pelos alimentos ricos em fibras tem aumentado também o interesse pela utilização de leguminosas e cereais na nutrição humana (Snider & Liebman, 1992). A utilização de fitase fúngica na fabricação de pão integral resultou em um aumento da biodisponibilidade de minerais no produto (Haros *et al.*, 2001). Em cereais infantis comercializados na Espanha, constatou-se aumento significativo da biodisponibilidade de ferro e zinco (Frontela *et al.*, 2008).

Assim, o benefício da fitase é, no mínimo, triplo: aumenta a biodisponibilidade de fósforo e minerais das dietas; preserva as fontes não renováveis de fósforo inorgânico, pela redução da necessidade da suplementação de dietas com fósforo; reduz a poluição do meio ambiente, pelo aumento da biodisponibilidade de fósforo e minerais, e conseqüentemente,

pela redução da excreção destes nutrientes. Sendo assim, vários pesquisadores têm direcionado seus esforços no isolamento e expressão heteróloga dos genes microbianos que codificam fitases.

Os genes que codificam fitases já foram clonados e caracterizados de bactérias (Shao *et al.*, 2008), fungos filamentosos (Mitchell *et al.*, 1997), fungos basidiomicetos (Lassen *et al.*, 2001) e leveduras (Li *et al.*, 2009).

Entretanto, a clonagem e expressão de genes que codificam fitases em fungos é, frequentemente, reportada em isolados do gênero *Aspergillus*, como de *A. niger* (Zao *et al.*, 2007), *A. terreus* (Mitchell *et al.*, 1997), *A. fumigatus* (Wang *et al.*, 2007), *A. oryzae* (Ushida *et al.*, 2006) e, recentemente de *A. japonicus* (Promdonkoy *et al.*, 2009).

A expressão heteróloga desses genes tem sido relatada em leveduras, como *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha* e *Saccharomyces cerevisiae* (Han *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2006; Promdonkoy *et al.*, 2009), plantas (Gao *et al.*, 2007) e até mesmo em animais (Golovan *et al.*, 2001). Visando a melhora da biodisponibilidade de fósforo e ferro para humanos, Lucca e colaboradores (2002) desenvolveram plantas de arroz transgênicas que superexpressaram fitase de *Aspergillus fumigatus* e ferritina de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). George e colaboradores (2005) geraram plantas transgênicas de *Nicotiana tabacum* que, expressando a fitase de *Aspergillus niger*, acumularam 52 % mais fósforo que as plantas controle. Plantas de feijão transgênicas, expressando fitase microbiana, também foram geradas (Gao *et al.*, 2007) e sementes de soja e milho transgênicas, expressando genes bacterianos que codificam fitases foram recentemente desenvolvidas (Bilyeu *et al.*, 2008).

As propriedades das fitases fúngicas variam, de modo que ainda não há uma enzima perfeita ou ideal para aplicações biotecnológicas. Teoricamente, uma fitase ideal deveria possuir alta eficiência catalítica, resistência à proteólise e apresentar elevada termoestabilidade. Entretanto, únicas ou múltiplas características das fitases têm sido, com sucesso, melhoradas por manipulação genética. Mutagênese sítio-direcionada melhorou propriedades funcionais de fitases de *Aspergillus fumigatus* (Tomschy *et al.*, 2002), de *Escherichia coli* (Rodrigues *et al.*, 2000) e de *Aspergillus niger* (Mullaney *et al.*, 2002). Maior termoestabilidade, atividade específica e redução do pH de máxima atividade têm sido obtidas por *design* de genes quiméricos (Jermutus *et al.*, 2001) ou mudança nos sítios ativos (Lehmann *et al.*, 2000). Xiong e colaboradores

(2005) usaram PCR para deletar sequências dos íntrons, otimizar o uso de códons preferenciais e substituir a sequência de peptídeo sinal de uma sequência codificante de 1347 pb de *Aspergillus niger*. Os genes sintéticos foram expressos em *Pichia pastoris* e duas fitases recombinantes apresentaram pH de máxima atividade de 2,5 e 5,5, temperatura ótima de 60 °C e um aumento de 14,5 vezes em relação à atividade enzimática da fitase produzida por *P. pastoris* expressando o gene selvagem.

Diante do exposto, fica claro que a suplementação de dietas com fitases aumenta a utilização de fósforo fítico e contribui para a redução da poluição ambiental, principalmente em áreas de pecuária intensiva. Nesse contexto, a biotecnologia tem sido, e continuará sendo, uma ferramenta efetiva para aumentar a produção, melhorar a estabilidade térmica e as variações de pH, além de otimizar sua aplicabilidade tecnológica.

3.3. Referências Bibliográficas

- Andlid, T. A., Veide, J., Sandberg, A. S. Metabolism of extracellular inositol hexaphosphate (phytate) by *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 97(2),157-169, 2004.
- Baldi, B. G., Franceschi, V. R., Loewus, F. A. Localization of phosphorus and cation reserves in *Lilium longiflorum* pollen. *Plant Physiology*, 83,1018-1021, 1987.
- Barrientos, L., Scott, J. J., Murthy, P. P. N. Specificity of hydrolysis of phytic acid by alkaline phytase from lily pollen. *Plant Physiology*,106(4),1489-1495, 1994.
- Benzie, I. F. Evolution of dietary antioxidants. *Comparative Biochemistry Physiology – Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 136(1), 113-126, 2003.
- Bilyeu, K., Zeng, P., Coello, P. Zhang, Z., Krishnan, H., Beuselinck, P. Quantitative conversion of seed phytate utilizable phosphorus in soybean seeds expressing a bacterial phytase. *Plant Physiology*, 146, 468-477, 2008.
- Bohn, L., Josefsen, L., Meyer, A. S., Rasmussen, S. K. Quantitative analysis of phytate globoids isolated from wheat bran and characterization of their sequential dephosphorylation by wheat phytase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(18), 7547-7552, 2007.
- Bohn, L., Meyer, A. S., Rasmussen, S. K. Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *Journal of Zhejiang University Science B*, 9(3),165-191, 2008.

- Burkholder, J. M., Malin, M. A., Glasgow, H. B., Larsen Jr., L. M., McIver, M. R., Shank, G. C., Deamer-Melia, N., Briley, D. S., Springer, J., Touchette, B. W., Hannon, E. K. Impacts to a coastal river and estuary from rupture of a swine waste holding lagoon. *Journal of Environmental Quality*, 26(6), 1451-1466, 1997.
- Caldwell, A. G., Black, C. A. Inositol hexaphosphate. III. Content in soils. *Proceedings - Soil Science Society of America*, 22, 290-293, 1958.
- Chen, M., Chen, J., Sun, F. Agricultural phosphorus flow and its environmental impacts in China. *Science of the Total Environment*, 405, 140-152, 2008.
- Cheryan, M. Phytic acid interactions in food systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 13, 297-336, 1980.
- Cowieson, A. J., Acamovic, T. Bedford, M. R. The effects of phytate and phytic acid on the loss of endogenous amino acids and minerals from broiler chickens. *British Poultry Science*, 45(1), 101-108, 2004.
- Crea, F., Stefano, C., Milea, D., Sammartano, S. Formation and stability of phytate complexes in solution. *Coordination Chemistry Reviews*, 252, 1108-1120, 2008.
- Dungelhoef, M., Rodehutsord, 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*, 49(1-2), 1-10, 1994.
- Freund, W. D., Mayr, G. W., Tietz, C., Schultz, J. E. Metabolism of inositol phosphates in the protozoan Paramecium. Characterization of a novel inositol-hexakisphosphate-dephosphorylating enzyme. *European Journal of Biochemistry*, 207(1), 359-367, 1992.
- Frontela, C., Haro, J. F., Ros, G., Martínez, C. Effect of dephytinization and Follow-on Formula Addition on vitro iron, calcium, and zinc availability from infant cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3805-3811, 2008.
- Gao, X. R., Wang, G. K., Su, Q., Wang, Y., An, L. J. Phytase expression in transgenic soybeans: stable transformation with a vector-less construct. *Biotechnology Letters*, 29, 1781-1787, 2007.
- George, T. S., Simpson, R. J., Hadobas, P. A., Richardson, A. E. Expression of a fungal phytase gene in *Nicotiana tabacum* improves phosphorus nutrition of plants grown in amended soils. *Plant Biotechnology Journal*, 3, 129-140, 2005.
- Gibson, D. M., Ullah, A. H. J. Purification and characterization of phytase from cotyledons of germination soybean seeds. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 260, 503-513, 1988.

- Golovan, S. P., Hayes, M. A., Phillips, J. P., Forsberg, C. W. Transgenic mice expression bacterial phytase as a model for phosphorus pollution control. *Nature*, 19, 429-433, 2001.
- Grases, F., Perello, J., Prieto, R. M., Simonet, B. M. Torres, J. J. Dietary myo-inositol hexaphosphate prevents dystrophic calcifications in soft tissues: A pilot study in Wistar rats. *Life Sciences*, 75(1), 11-19, 2004.
- Greiner, R., Konietzny, U., Jany, K. D. Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303, 107-113, 1993.
- Günther, F. Hampered effluent accumulation process: phosphorus management and societal structure. *Ecological Economics*, 21(2), 159-174, 1997.
- Haefner, S., Knietzsch, A., Scholten, E., Braun, J., Lohscheidt, M., Zelder, O. Biotechnological production and applications of phytases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(5), 588-597, 2005.
- Hamada, J. S. Isolation and identification of multiple forms of soybean phytases. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(9), 1143-1151, 1996.
- Han, Y., Wilson, D. B., Lei, X. G. Expression of an *Aspergillus niger* phytase gene (phyA) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(5), 1915-1918, 1999.
- Harland, B. F., Oberleas, D. Phytate in foods. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 52, 235-259, 1987.
- Haros, M., Rosell, C. M., Benedito, C. Use of fungal phytase to improve breadmaking performance of whole wheat bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5450-5454, 2001.
- Hassan, R., Scholes, R., Ash, N. Ecosystems and human well-being: current state and trends. *The millennium ecosystem assessment series*, vol. 1. Washington, Island Press, 2005.
- Honke, J., Kozłowska, H., Vidal-Valverde, C., Frias, J., Górecki, R. Changes in quantities of inositol phosphates during maturation and germination of legume seeds. *Z Lebensm Unters Forsch A*, 206, 279-283, 1998.
- Howson, S. J., Davis, R. P. Production of phytate-hydrolysing enzyme by some fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 5(5), 377-382, 1983.
- Huang, H. Q., Luo, H. Y., Bai, Y. G., Wang, Y. R., Yao, B., Meng, K., Yuan, T. Z., Yang, P.L. Overexpression of *Citrobacter braakii* phytase with high specific activity in *Pichia pastoris*. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 46(6), 945-950, 2006.

- Isaacks, R. E., Kim, H. D., Bartlett, G. R., Harkness, D. R. Inositol pentaphosphate in erythrocytes of a freshwater fish, peracarua (*Arapaima gigas*). *Life Sciences*, 20, 987-990, 1977.
- Jermutus, L., Tessier, M., Pasamontes, L., van Loon, A. P. G. M. Structure-based chimeric enzymes as an alternative to directed enzyme evolution: phytase as a test case. *Journal of Biotechnology*, 85, 15-24, 2001.
- Johnson, A. M., Osmond, D. L., Hodges, S. C. Predict impact and evaluation of North Carolina's phosphorus indexing tool. *Journal of Environmental Quality*, 34, 1801-1810, 2005.
- Kamp, D. W., Greenberger, M. J., Sbalchierro, J. S., Preusen, S. E., Weitzman, S. A. Cigarette smoke augments asbestos-induced alveolar epithelial cell injury: role of free radicals. *Free Radical Biology & Medicine*, 25, 728-739, 1998.
- Keme, P. A., Jongbloed, A. W., Mroz, Z., Beynem, A. C. The efficacy of *Aspergillus niger* phytase in rendering phytate phosphorus available for absorption in pigs is influenced by pig physiological status. *Journal of Animal Science*, 75, 2128-2138, 1997.
- Klabunde, T., Sträter, N., Fröhlich, R., Witzel, H., Krebs, B. Mechanism of Fe(III)-Zn(II) purple acid phosphatase based on crystal structures. *Journal of Molecular Biology*, 259, 737-748, 1996.
- Konietzny, U., Greiner, R. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 791-812, 2002.
- Krapac, I. G., Dey, W. S., Roy, W. R., Smyth, C. A., Stormont, E., Sargent, S. L., Steele, J. D. Impacts of swine manure pits on groundwater quality. *Environmental Pollution*, 120(2), 475-492, 2002.
- Kunz, A., Miele, M., Steinmetz, R. L. R. Advanced swine manure treatment and utilization in Brazil. *Bioresource Technology*, 100, 5485-5489, 2009.
- Lassen, S. F., Breinholt, J., Østergaard, P. R., Brugger, R., Bischoff, A., Wyss, M., Fuglsang, C. C. Expression, Gene Cloning and Characterization of Five Novel Phytases from Four Basidiomycete Fungi: *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, a *Ceriporia* sp., and *Trametes pubescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10), 4701-4707, 2001.
- Lee, S. H., Park, H. J., Chun, H. K., Cho, S. Y., Cho, S. M., Lillehoj, H. S. Dietary phytic acid lowers the blood glucose level in diabetic KK mice. *Nutrition Research*, 26(9), 474-479, 2006.
- Lehmann, M., Lopez-Ulibarri, R., Loch, C., Viarouge, C., Wyss, M., van Loon, A. P. Exchanging the active site between phytases for altering the functional properties of the enzyme. *Protein Science*, 9(10), 1866-1872, 2000.

- Lei, X. G., Porres, J. M. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. *Biotechnology Letters*, 25, 1787-1794, 2003.
- Lei, X. G., Porres, J. M., Mullaney, E. J., Brinch-Pedersen, H. Phytate: Source, Structure and Application. In: *Industrial Enzymes - Structure, Function and Applications*. Polaina, J., MacCabe, A. P. (Eds). Ed. Springer, Netherlands, 2007, 641 pp.
- Li, X., Liu, Z., Chi, Z., Li, J., Wang, X. Molecular cloning, characterization, and expression of the phytase gene from marine yeast *Kodamaea ohmeri* BG3. *Mycological Research*, 113, 24-32, 2009.
- Liebert, F., Portz, L. Nutrient utilization on Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* fed plant based low phosphorus diets supplemented with graded levels of different sources of microbial phytase. *Aquaculture*, 248, 111-119, 2005.
- Loewus, F. A. Biosynthesis of phytate in food grains and seeds. In: *Food Phytates*. Sathe, S. K., Reddy, N. R. (Eds). Boca Raton, Londres, 2002, 280 pp.
- Lucca, P., Hurrell, R., Potrykus, I. Fighting iron deficiency anemia with iron-rich rice. *Journal of the American College of Nutrition*, 21(3), 184S-190S, 2002.
- Maga, J. A. Phytate: Its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance, and methods of analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30, 1-9, 1982.
- Maguire, R. O., Dou, Z., Sims, J. T., Brake, J., Joern, C. Dietary Strategies for Reduced Phosphorus Excretion and Improved Water Quality. *Journal of Environmental Quality*, 34, 2093-2103, 2005.
- Mallin, M. A., Cahoon, L. B. Industrialized Animal Production - A Major Source of Nutrient and Microbial Pollution to Aquatic Ecosystems. *Population and Environment*, 24(5), 369-385, 2003.
- Manary, M. J., Krebs, N. F., Gibson, R. S., Broadhead, R. L., Hambridge, K. M. Community-based dietary phytate reduction and its effect on iron status in Malawian children. *Annals of Tropical Paediatrics*, 22, 133-136, 2002.
- McCollum, E. V., Hart, E. B. On the occurrence of a phytin-splitting enzyme in animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 4, 497-500, 1908.
- Mitchell, D. B., Vogel, K., Weimann, B. J., Pasamontes, L., van Loon, A. P. G. M. The phytases subfamily of histidine acid phosphatases: isolation of gene for two novel phytases from the fungi *Aspergillus terreus* and *Myceliophthora thermophila*. *Microbiology*, 143, 245-252, 1997.
- Mullaney, E. J., Daly, C. B., Kim, T., Porres, J. M., Lei, X. G., Sethumadhavan, K., Ullah, A. H. J. Site-directed mutagenesis of *Aspergillus niger* NRRL 3135 phytase at residue 300 to enhance catalysis at pH 4.0. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 297, 1016-1020, 2002.

- Mullaney, E. J., Ullah, A. H. J. The term phytase comprises several different classes of enzymes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 312, 179-184, 2003.
- Nagai, Y., Funahashi, S. Phytase (myo-inositol-hexaphosphate phosphohydrolase) from wheat bran. Part I. Purification and substrate specification. *Agricultural and Biological Chemistry*, 26(12), 794-803, 1962.
- Nagashima, T., Tange, T., Anazawa, H. Dephosphorylation of phytate by using the *Aspergillus niger* phytase with a high affinity for phytate. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4682-4684, 1999.
- NRC. *Nutrient requirements of swine*. 10th ed. National Academy Press, Washington, DC, 1998.
- Nwanna, L. C., Kolahsa, M., Eisenreich, R., Schwarz, F. J. Pre-treatment of dietary plant feedstuffs with phytase and its effect on growth and mineral concentration in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 92, 677-682, 2008.
- Oatway, L., Vasanthan, T., Helm, J. H. Phytic acid. *Food Reviews International*, 17(4), 419-431, 2001.
- Oh, B. C., Chang, B. S., Park, K. H., Ha, N. C., Kim, H. K. Oh, B. H., Oh, T. K. Calcium-dependent catalytic activity of a novel phytase from *Bacillus amyloliquefaciens* DS11. *Biochemistry*, 40, 9669-9676, 2001.
- Onomi, S., Okazaki, Y., Katyama, T. Effect of dietary level of phytic acid on hepatic and serum lipid status in rats fed a high-sucrose diet. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 68(6), 1379-1381, 2004.
- Pandey, A., Szakacs, G., Soccol, C. R., Rodriguez-Leon, J. A., Soccol, V. T. Production Purification and properties of microbial phytases. *Bioresource Technology*, 77, 203-214, 2001.
- Pfeffer, M. Comprehensive study of aleurone grains, identification of globoid and approximation of its chemical nature. *Johrb Wiss Bot* 8, 429-574, 1872.
- Poulsen, H. D., Blaabjerg, K., Strathe, A., Ader, P., Feuerstein, D. Evaluation of different microbial phytases on phosphorus digestibility in pigs fed a wheat and barley based diet. *Livestock Science*, 134, 97-99, 2010.
- Promdonkoy, P., Tang, K., Sornlake, W., Harnpicharnchai, P., Kobayashi, R. S., Ruanglek, V., Upathanpreecha, T., Vesaratchavest, M., Eurwilaichitr, L., Tanapongpipat, S. Expression and Characterization of *Aspergillus* thermostable phytases in *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Letters*, 290(1), 18-24, 2009.
- Raboy, V., Young, K. A., Larson, S. R., Cook, A. Genetics of Phytic Acid Synthesis and Accumulation. In: Reddy, N. R., Sathe, S. K. (Eds) *Food Phytates*. CRC Press LLC, New York, 2002, 280 pp.

- Rapaport, S. Phytic acid in avian erythrocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 135, 403-406, 1940.
- Rapaport, S., Guest, G. M. Distribution of acid-soluble phosphorus in the blood cells of various vertebrates. *The Journal of Biological Chemistry*, 138, 269-275, 1941.
- Rapaport, S., Leva, E., Guest, G. M. Phytase in plasma and erythrocytes of various species of vertebrates. *The Journal of Biological Chemistry*, 139, 621-632, 1941.
- Ravindran, V., Bryden, W. L., Kornegay, E. T. Phytates: Occurrence, Bioavailability and Implications in Poultry Nutrition. *Poultry and Avian Biology Reviews*, 6(2), 125-143, 1995.
- Ravindran, V., Cabahug, S., Ravindran, G., Bryden, L. Influence of microbial phytase on apparent ileal amino acid digestibility of feedstuffs for broiler. *Poultry Science*, 78, 699-706, 1999.
- Ravindran, V., Ravindran, G., Sivalogan, S. Total and phytate phosphorus contents of various foods and feedstuffs of plant origin. *Food Chemistry*, 50, 133-136, 1994.
- Revy, 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*, 90(1-2), 50-59, 2006.
- Rimbach, G., Pallauf, J. Effect of dietary phytate on magnesium bioavailability and liver oxidation status in growing rats. *Food and Chemical Toxicology*, 37, 37-45, 1999.
- Rimbach, G., Pallauf, J. Phytic acid inhibits free radical formation *in vitro* but does not affect liver oxidant or antioxidants status in growing rats. *The Journal of Nutrition*, 128, 1950-1955, 1998.
- Rodrigues, E., Mullaney, E. J., Lei, X. G., Expression of the *Aspergillus fumigatus* Phytase Gene in *Pichia pastoris* and Characterization of the Recombinant Enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 268, 373-378, 2000.
- Sathe, S. K., Reddy, N. R. Introduction. In *Food Phytates*; Sathe, S. K., Reddy, N. R. (Eds), Boca Raton, Londres, 2002; pp 1-280.
- Schulze, E., Winterstein, E. *Physiol. Chem.*, 40, 120, 1896.
- Seaman, J. C., Hutchison, J. M., Jackson, B. P. Vulava, V. M. In situ treatment of metals in contaminated soils with phytate. *Journal of Environmental Quality*, 32, 153-161, 2003.
- Segueilha, L., Lambrechts, C., Boze, H., Moulin, G., Galzy, P. Purification and properties of the phytases from *Schwanniomyces castellii*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 74(1), 7-11, 1992.

- Shao, N., Huang, H., Meng, K., Luo, H. Wang, Y., Yang, P., Yao, B. Cloning, Expression, and Characterization of a new Phytase form the Phytopathogenic Bacterium *Pectobacterium wasabiae* DSMZ 18074. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(7), 1221-1226, 2008.
- Shin, S., Ha, N., Oh, B., Oh, T., Oh B. Enzyme mechanism and catalytic property of β propeller phytase. *Structure*, 9, 851-858, 2001.
- Snider, M., Liebman, M. Calcium additives and sprouted wheat effects on phytate hydrolysis in whole wheat bread. *Journal of Food Science*, 51(1), 118-120, 1992.
- Steen, I. *Phosphorus availability in the 21st century: Management of a non-renewable resource*, Phosphorus & Potassium. British Sulphur Publishing, 217, 25-31, 1998.
- Suzuki, U., Yoshimura, K., Takaishi, M. *About the enzyme "phytase", which splits "anhydro-oxy-methylene diphosphoric acid"*. Bulletin of the College of Agriculture, Tokyo Imperial University, 7, 503-512, 1907.
- Takaba, K., Hirose, M., Ogawa, K., Hakoi, K., Fukushima, S. Modification of N-butyl-N-(4-hydroxy-butyl) nitrosamine-initiated urinary bladder carcinogenesis in rats by phytic acid and its salts. *Food and Chemical Toxicology*, 32, 499-503, 1994.
- Thompson, L. U., Button, C. L., Jenkins, D. J. A. Phytic acid and calcium affect the in vitro rate of navy bean starch digestion and blood glucose response in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 46, 467-473, 1987.
- Thu, K. M., Durrenberger, E. P. *Pigs, profits and rural communities*. Albany, State University of New York press, 1998.
- Tomschy, A., Brugger, R., Lehmann, M., Svendsen, A., Vogel, K., Kostrewa, P., Lassen, S. F., Burger, D., Kronenberger, A., van Loon, A. P. G. M., Pasamontes, L., Wyss, M. Engineering of phytase for improved activity at low pH. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1907-1913, 2002.
- Ullah, A. H. J., Cummins, B. J. *Aspergillus ficuum* extracellular pH 6.0 optimum acid phosphatase: purification, N-terminal amino acid sequence and biochemical characterization. *Preparative Biochemistry*, 18, 37-65, 1988.
- USDA. United States Department of Agriculture. <http://www.fas.usda.gov>, acesso em 20/10/2011.
- Ushida, H., Arakida, S., Sakamoto, T., Kawasaki, H. Expression of *Aspergillus oryzae* Phytase Gene in *Aspergillus oryzae* RIB40 niaB⁻. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102(6), 564-567, 2006.
- Vats, P., Bhattacharyya, M. S., Banerjee, U. C. Use of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolase) for combating phosphorus pollution: A biological approach. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 35(5), 469-486, 2005.

- Virmani, R., Burke, A. P., Farb, A., Kolodgie, F. D. Pathology of the unstable plaque. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 44, 349-356, 2002.
- Vucenik, I., Shamsuddin, A. M. Protection against cancer by dietary IP6 and inositol. *Nutrition and Cancer*, 55(2), 109-125, 2006.
- Wang, Y., Gao, X., Su, Q., Wu, W., An, L. Cloning, Expression, and Enzyme Characterization of an Acid Heat-Stable Phytase from *Aspergillus fumigatus* WY-2. *Current Microbiology*, 55, 65-70, 2007.
- Wolters, M. G. E., Diepenmaat, H. B., Hermus, R. J. J., Voragen, A. G. J. Relation between *in vitro* availability of minerals and food composition: A mathematical model. *Journal of Food Science*, 58, 1349-1355, 1993.
- Xiang, T., Liu, Q., Deacon, A. M., Koshy, M., Kriksunov, I. A., Lei, X. G., Hao, Q., Thiel, D. J. Crystal structure of a heat-resilient phytase from *Aspergillus fumigatus*, carrying a phosphorylated histidine. *Journal of Molecular Biology*, 339, 437-445, 2004.
- Xiong, A. S., Yao, Q.Ch., Peng, R. H., Han, P. L., Cheng, Z. M., Li, Y. High level expression of a recombinant phytase gene in *Pichia pastoris*. *Journal of Applied Microbiology*, 98(2), 418-428, 2005.
- Zao, D. M., Wang, M., Mu, X. J., Sun, M. L., Wang, Z. Y. Screening, cloning and over expression of *Aspergillus niger* Phytase (phy-A) in *Pichia pastoris* with favourable characteristics. *Letters in Applied Microbiology*, 45, 522-528, 2007.
- Zhang, G. Q., Dong, X. F., Wang, Z. H., Zhang, Q., Wang, H. X., Tong, J. M. Purification, characterization, and cloning of a novel phytase with low pH optimum and strong proteolysis resistance from *Aspergillus ficuum* NTG-23. *Bioresource Technology*, 101, 4125-4131, 2010.

4. Artigo I – Produção e caracterização de uma fitase de *Rhizopus stolonifer* e sua avaliação na hidrólise de fitato em ração animal.

4.1. RESUMO

A aplicação de fitases em rações animais contendo fitato aumenta a disponibilidade de fósforo e outros minerais, devido à redução da necessidade de suplementação das dietas com fósforo inorgânico e reduz a excreção de fósforo para o meio ambiente. Neste trabalho, foi obtido um isolado de *Rhizopus stolonifer*, que foi inoculado em meio contendo agente indutor para a produção de fitases. Foi usada metodologia de superfície de resposta (RSM), que resultou no aumento de nove vezes o valor inicial da atividade enzimática de fitases. A enzima mostrou pH ótimo na faixa de 5,0-5,5, temperatura ótima de 65 °C e $t_{1/2}$ de 50 min. A enzima seguiu a cinética de *Michaelis-Menten*, resultando em K_M app e V_{max} app de 0,692 mM e 0,780 $\mu\text{mol}/\text{min}$, respectivamente. A enzima foi eficiente na hidrólise de fitato em ração animal, liberando 5,14 μmol de $\text{PO}_4^{3-}/\text{mL}$ após 5 h de tratamento, valor correspondente à concentração inicial de fósforo.

4.2. ABSTRACT

The application of phytases in plant feedstuffs containing phytate increases the availability of phosphorus and other minerals due to reduction in the need for supplementation of diets with inorganic phosphorus and reduce phosphorus excretion to the environment. In this study, an isolate of *Rhizopus stolonifer* was obtained, which was inoculated in a medium containing inducer agent for phytases production. Response surface methodology (RSM) was utilized, which resulted in increase of 9-times the initial value of enzymatic activity of phytases. The enzyme presented an optimum pH ranging from 5.0-5.5, optimum temperature of 65 °C and $t_{1/2}$ of 50 min. The enzyme followed Michaelis-Menten kinetics, resulting in K_M app and V_{max} app of 0.692 mM and 0.780 $\mu\text{mol}/\text{min}$, respectively. The enzyme was efficient for phytate hydrolysis in animal feed, liberating 5.14 μmol $\text{PO}_4^{3-}/\text{mL}$ after 5 h of treatment, corresponding to initial phosphorus concentration.

4.3. Introdução

O ácido fítico representa entre 60 e 90 % do conteúdo total de fósforo nas plantas (Vats *et al.*, 2009). A maior parte do ácido fítico presente nas sementes se encontra na forma de fitatos (Cheryan, 1980), que atuam como fonte de reserva de fósforo (Loewus, 2002).

No entanto, o ácido fítico atua como um fator antinutricional em animais, incluindo o homem, devido a sua capacidade de complexar minerais, tais como cálcio, magnésio, ferro, zinco, cobre, manganês, potássio, níquel e cobalto (Bohn *et al.*, 2007) e de interagir com proteínas, diminuindo a biodisponibilidade de minerais e de proteínas nutricionalmente importantes (Nagashima *et al.*, 1999).

Soma-se ao seu caráter antinutricional, o fato de que o fósforo fítico não é absorvido por animais monogástricos, tais como aves, suínos e peixes, uma vez que estes não apresentam, ou apresentam em quantidades insuficientes, as enzimas que catalisam a hidrólise do ácido fítico (Vats *et al.*, 2009). Assim, fósforo inorgânico, um mineral não renovável e de alto custo, é geralmente, suplementado nas dietas de animais monogástricos, visando a atender às suas necessidades de fósforo. Dessa forma, o fitato não hidrolisado e excretado pelos animais, contribui para a poluição ambiental, principalmente em áreas de intensiva criação de animais (Cheryan, 1980, Wang *et al.*, 2007).

As fitases ou *mio*-inositol hexaquisfosfato fosfohidrolases (EC 3.1.3.8, 3.1.3.26 e 3.1.3.72) são fosfatases que catalisam a hidrólise de fitato, resultando na formação de isômeros *mio*-inositol pentakis-, tetrakis-, tris-, bis- e monofosfato, bem como na liberação de fósforo e possíveis minerais quelados (Bohn *et al.*, 2008; Azeke *et al.*, 2011).

As fitases podem ser produzidas industrialmente por processos biotecnológicos a partir de fontes de origem animal e vegetal. No entanto, a biossíntese microbiana é a forma mais promissora de produção da enzima. Apesar da capacidade de produção dessas enzimas por bactérias e leveduras, os fungos são mais utilizados devido às suas fitases apresentarem maior estabilidade térmica e maior estabilidade em uma maior faixa de pH, quando comparadas com as fitases de origem vegetal (Bohn *et al.*, 2008).

Esse trabalho descreve a obtenção de um isolado de *Rhizopus stolonifer*, a otimização da produção da enzima pelo fungo, a caracterização da fitase e a sua avaliação na hidrólise de fitato em ração animal comercial.

4.4. Materiais e Métodos

4.4.1. Isolamento de fungos e condição inicial de cultivo

Para a obtenção dos isolados de fungos a partir de milho (*Zea mays* L.), arroz (*Oriza sativa* L.), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), amendoim (*Arachis hypogea* L.) e noz macadâmia (*Macadamia integrifolia*) foi utilizado o método do papel de filtro (*Blotter-test*), conforme descrito pela *International Seed Testing Association* (ISTA, 1976). Foram utilizadas caixas plásticas do tipo *gerbox*, de tamanho de 11 x 11 x 3,5 cm, previamente higienizadas com solução de álcool 70 %. No fundo das caixas, foram colocadas duas folhas de papel de filtro esterilizadas e umedecidas com água destilada estéril. Posteriormente, foram introduzidas as sementes e grãos sobre as folhas de papel, sendo as caixas incubadas em estufa tipo BOD a 28 °C durante 5 dias. Após o período de incubação, para a obtenção de culturas puras, as colônias desenvolvidas foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura ágar batata dextrose (BDA), previamente esterilizado a 121 °C/20 minutos. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 28 °C durante 7 dias. Os fungos obtidos foram identificados por Olinto Liparini Pereira do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa

Para indução da produção de fitases foi utilizado meio de cultura líquido, de acordo com Gunashree & Venkateswaran (2008), com modificações. Para obtenção do extrato enzimático, cada isolado foi repicado em meio BDA e incubado a 28 °C durante 7 dias. Em seguida, a superfície das placas foi lavada com água deionizada estéril, contendo 0,25 % (v/v) de Tween-20. A suspensão de esporos obtida foi filtrada em filtro com gaze estéril e uma alíquota da suspensão foi diluída 10^1 , 10^2 e 10^3 vezes para contagem dos esporos em câmara de *Neubauer*. Em seguida, um volume pré-determinado da suspensão de esporos foi transferido para frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de meio líquido estéril ((infusão de batata (200 g/L); sacarose (10 g/L); peptona (5 g/L); Tween-20 (2,5 mL/L) e CaCl_2 (0,10 g/L), sendo o pH ajustado para 5,5). Os frascos foram incubados em shaker, a 28 °C sob agitação de 180 rpm. Em intervalos pré-determinados, alíquotas do meio foram coletadas, centrifugadas (10,000 x g, 5 min., a 4 °C) e o sobrenadante foi usado para o ensaio de atividade enzimática.

4.4.2. Determinação da atividade enzimática

A atividade de fitase foi determinada medindo o fosfato inorgânico liberado (Tausky & Shorr, 1953) a partir do substrato fitato de sódio (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO). Para o ensaio foram utilizados 600 μL do substrato fitato de sódio 1,5 mM, em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0) e 150 μL de extrato enzimático. A reação foi conduzida em banho-maria à 50 °C durante 30 minutos. A reação foi paralisada pela adição de 250 μL da solução de ácido tricloroacético 10 % (v/v). Na sequência foram adicionados aos tubos de ensaio, 1000 μL de reativo colorimétrico (Tausky & Shorr, 1953), preparado a partir de solução de molibdato de amônio 10 % (m/v), em solução de ácido sulfúrico 5M. O reativo foi preparado no momento do uso, misturando-se 10 % (v/v) da solução formada por ácido sulfúrico e molibdato de amônio, 5 % (m/v) de sulfato ferroso e água deionizada. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 700 nm e os valores de absorvância obtidos foram correlacionados com uma curva padrão feita com KH_2PO_4 . Todas as análises de atividade enzimática foram realizadas em triplicata. Uma unidade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para a liberação de 1 μmol de fosfato inorgânico por minuto, sob as condições de ensaio.

4.4.3. Identificação dos fatores importantes para a produção de fitases

A produção de fitases é influenciada pelos componentes do meio de cultivo, tais como, fonte de carbono, nitrogênio, íons metálicos, surfactantes, além de variáveis físicas como pH, temperatura, concentração de inóculo e tempo de incubação (Gunashree *et al.*, 2008, Bhavsar *et al.*, 2011). A escolha dos fatores utilizados nesse trabalho foi baseada em estudos envolvendo produção de fitases em meio submerso (Gunashree *et al.*, 2008).

A avaliação das condições de cultivo visou verificar simultaneamente, o efeito de cada fator na produção de fitases, e posteriormente estabelecer uma condição ótima de cultivo. Na primeira etapa, foi realizado um experimento fatorial completo 2^5 , com cinco fatores (sacarose (A), peptona (B), Tween-20 (C), pH inicial (D) e tempo de cultivo (E)) em dois níveis (mínimo e máximo), codificados como “-1” e “+1”, respectivamente, e três repetições no ponto central, o qual foi codificado como “0” (Tabela 1). Em todos os ensaios foram mantidos constantes a infusão de batata (200 g batata/L) e a concentração de

CaCl₂ (0,10 g/L). Todos os ensaios foram realizados a 28 °C sob agitação de 180 rpm, sendo o delineamento e a superfície de resposta realizados por meio do programa MINITAB 14.

Tabela 1 – Fatores e níveis utilizados no experimento fatorial 2⁵ para otimização das condições de cultivo para produção de fitases.

	Min	PC	Max
Fator	-1	0	+1
Sacarose (g/L)	5	12,5	20
Peptona (g/L)	2	6	10
Tween 20 (mL/L)	1	3	5
pH	4	5	6
Tempo (h)	24	48	72

Min: valor mínimo, PC: ponto central, Max: valor máximo.

4.4.4. Otimização das condições de cultivo para aumento da atividade de fitases

Com base na análise dos resultados do experimento fatorial completo, quatro fatores (A, B, C e E) foram utilizados na segunda parte experimental, a qual consistiu de um delineamento composto central (DCC), onde cada fator foi avaliado em quatro níveis, codificados como “-α”, “-1”, “+1” e “+α”, além de cinco repetições no ponto central, codificado como “0” (Tabela 2).

Em todos os ensaios foram mantidos constantes a infusão de batata (200 g batata/L) e a concentração de CaCl₂ (0,10 g/L). Todos os ensaios foram realizados a 28 °C sob agitação de 180 rpm, sendo o delineamento e a superfície de resposta dos dados realizados por meio do programa MINITAB 14.

Tabela 2 – Faixa de valores utilizados para a metodologia de superfície de resposta.

Fator	Níveis				
	- α	-1	0	+1	+ α
Sacarose (g/L)	0,0	2,5	5,0	7,5	10,0
Peptona (g/L)	0,0	1,0	2,0	3,0	4,0
Tween-20 (mL/L)	2,5	3,75	5,0	6,25	7,5
Tempo (h)	10,0	17,5	25,0	32,5	40,0

4.4.5. Efeito da temperatura e pH na atividade enzimática

O efeito da temperatura na atividade enzimática foi determinado na faixa de temperatura de 20 a 80 °C. A atividade enzimática foi avaliada conforme ensaio padrão de atividade enzimática.

O efeito do pH foi determinado segundo a mesma metodologia, utilizando as seguintes soluções tampão: glicina-HCl 0,2 M (pH 2,0-3,5), acetato de sódio 0,2 M (pH 4,0-5,5), Ácido 2-morfolinoetanosulfônico (MES) 0,2 M (pH 6,0-6,5) e Tris-HCl 0,2 M (pH 7,0-8,0). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.4.6. Avaliação da estabilidade térmica do extrato enzimático

O extrato enzimático bruto foi pré-incubado a 40 e 50 °C durante 6 e 3,3 horas, respectivamente. Em intervalos pré-determinados, alíquotas dos extratos foram coletadas e resfriadas a 4 °C. Na sequência foi determinada a atividade enzimática relativa de cada alíquota, por meio da correlação com a atividade enzimática da enzima não submetida aos tratamentos. Os valores de $t_{1/2}$ da enzima para cada temperatura foram calculados pelas curvas de velocidade em função do tempo de incubação, utilizando o programa Curve Expert 1.3. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.4.7. Determinação dos parâmetros cinéticos

Para obtenção dos parâmetros cinéticos, K_M aparente ($K_{M,app}$) e V_{max} aparente ($V_{max,app}$), os ensaios de atividade enzimática foram realizados conforme ensaio padrão, utilizando-se concentrações crescentes (0,1 a 2,0 mM) do substrato fitato de sódio. O gráfico de *Lineweaver-Burk* foi construído utilizando o programa Curve Expert 1.3.

4.4.8. Avaliação da hidrólise de fitato em ração animal

Para avaliar o efeito da fitase na hidrólise do ácido fítico, foi utilizada uma ração comercial para suínos composta por calcário calcítico, cloreto de sódio, farelo de glúten de milho 21, farelo de soja, farelo de trigo, farinha de carne e ossos de bovino, fosfato bicálcico, milho integral moído, premix mineral e premix vitamínico. Amostras de 1 g de ração foram autoclavadas (121 °C/20 min) e suspensas em 5 mL de tampão acetato de sódio (0,2 M, pH 5,0) em frascos do tipo Falcon com capacidade de 50 mL. As suspensões foram adicionadas de um volume pré-determinado de extrato enzimático bruto para se obter 4 U/mL de atividade enzimática no meio. Como controle foi utilizado a mesma suspensão da ração animal, contendo o extrato enzimático fervido a 100 °C por 15 minutos.

Os frascos foram incubados a 40 °C e 200 rpm em um agitador rotatório do tipo shaker, sendo as amostras de teste e controle coletadas em intervalos pré-determinados em um tempo total de 6 horas. As amostras foram imediatamente resfriadas a 4 °C, centrifugadas (10000 x g, 10 min, a 4 °C) e sobrenadante foi utilizado para a quantificação de fósforo liberado, de acordo com o ensaio padrão de atividade enzimática. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.5. Resultados

4.5.1. Isolamento de fungos

Foram obtidos oito isolados de fungos a partir dos grãos e sementes avaliados, sendo seis isolados de *Rhizopus stolonifer*, obtidos a partir das amostras de amendoim; um isolado de *Aspergillus niger*, obtido a partir de grãos de feijão e um isolado de *Rhizopus stolonifer*, obtido a partir da macadâmia. Nas demais amostras de arroz, milho e feijão não foi observado o

crescimento de fungos, sugerindo que as amostras possam ter sido tratadas com algum antifúngico. O isolado de *Rizopus stolonifer* obtido da macadâmia apresentou maior atividade de fitase (0,07 U/mL) em apenas 36 horas de cultivo (Tabela 3) e assim foi selecionado para a etapa de otimização da atividade de fitases. Além disso, entre os isolados obtidos, esse foi o que produziu a fitase com maior termoestabilidade (dados não mostrados). A termoestabilidade é um dos principais fatores a serem considerados para o uso industrial de fitases (Pandey *et al.*, 2001, Lei *et al.*, 2007).

Tabela 3 – Atividade de fitase dos diferentes isolados fúngicos.

Microrganismo	Fonte	Atividade enzimática (U/mL)
<i>Rhizopus stolonifer</i> ^{1**}	amendoim	0,07 ^{2 dias*}
<i>Rhizopus stolonifer</i> ^{2**}	amendoim	0,07 ^{2,5 dias*}
<i>Rhizopus stolonifer</i> ^{3**}	amendoim	0,07 ^{2 dias*}
<i>Rhizopus stolonifer</i> ^{4**}	amendoim	0,03 ^{1,5 dias*}
<i>Rhizopus stolonifer</i> ^{5**}	amendoim	0,03 ^{1,5 dias*}
<i>Rhizopus stolonifer</i> ^{6**}	amendoim	0,03 ^{1,5 dias*}
<i>Aspergillus niger</i>	feijão	0,08 ^{8 dias*}
<i>Rhizopus stolonifer</i> ^{7**}	macadâmia	0,07 ^{1,5 dias*}
-	Arroz	-
-	Milho	-
-	Feijão	-

* Os números sobrescritos nos valores de atividade enzimática indicam o tempo de maior atividade durante a incubação.

** Os números sobrescritos indicam isolados de *Rhizopus stolonifer* obtidos de diferentes amostras.

4.5.2. Otimização das condições de cultivo para obtenção da atividade ótima de fitases

A Tabela 4 apresenta a matriz do experimento fatorial completo com os valores reais, os valores codificados e as respostas para a atividade da enzima fitase. De acordo com os resultados, a atividade de fitase variou de 0,005 a 0,140 U/mL, sendo a maior atividade enzimática obtida nas condições do ensaio número cinco (batata, 200 g/L; sacarose, 5,0 g/L; peptona, 2,0 g/L; CaCl₂, 0,10 g/L; e Tween-20, 5,0 mL/L), com pH inicial do meio igual a 4,0 e o tempo de cultivo de 24 horas. De acordo com a análise de regressão, a atividade de fitases foi influenciada significativamente pelos fatores sacarose, peptona, Tween-20 e tempo de cultivo, enquanto o pH não foi significativo, em nível de 5 % de significância (Tabela 5). A significância de cada fator bem como de suas interações na atividade de fitases pode ser verificada no diagrama de Pareto (Figura 1).

De acordo com os resultados, a atividade enzimática foi influenciada positivamente, em função do aumento da concentração de Tween-20, do aumento simultâneo das concentrações de sacarose e peptona e com a redução do tempo de cultivo. No entanto, a atividade enzimática também foi influenciada, positivamente, pelas menores concentrações individuais de sacarose e peptona. De acordo com os resultados obtidos por Singh & Satyanarayana (2008b) na otimização da atividade de fitases por *Sporotrichum thermophile* em meio líquido, o aumento da atividade também foi observado somente em função das baixas concentrações de peptona no meio.

O uso de sacarose como fonte de carbono em meios de cultivo tem se mostrado um bom indutor para a produção de fitases fúngicas, enquanto monossacarídeos como glicose e frutose têm exercido ação repressora na síntese da enzima (Bogar *et al.*, 2003; Gunashree & Venkateswaran, 2008). Vats & Banerjee (2002) avaliaram o efeito de diferentes fontes de carbono na produção de fitases de *Aspergillus niger* van Teighem e concluíram que sacarose foi a fonte que mais influenciou no aumento da produção da enzima.

Tabela 4 - Matriz do experimento fatorial completo para atividade de fitase.

Ensaio	Sacarose (g/L)	Peptona (g/L)	Tween-20 (mL/L)	pH	Tempo de cultivo (h)	Atividade enzimática (U/mL)
1	5,0 (- 1)	2,0 (- 1)	1,0 (- 1)	4,0 (- 1)	24 (-1)	0,105
2	20,0 (1)	2,0 (- 1)	1,0 (- 1)	4,0 (- 1)	24 (-1)	0,005
3	5,0 (- 1)	10,0 (1)	1,0 (- 1)	4,0 (- 1)	24 (-1)	0,057
4	20,0 (1)	10,0 (1)	1,0 (- 1)	4,0 (- 1)	24 (-1)	0,005
5	5,0 (- 1)	2,0 (- 1)	5,0 (1)	4,0 (- 1)	24 (-1)	0,140
6	20,0 (1)	2,0 (- 1)	5,0 (1)	4,0 (- 1)	24 (-1)	0,018
7	5,0 (- 1)	10,0 (1)	5,0 (1)	4,0 (- 1)	24 (-1)	0,031
8	20,0 (1)	10,0 (1)	5,0 (1)	4,0 (- 1)	24 (-1)	0,027
9	5,0 (- 1)	2,0 (- 1)	1,0 (- 1)	6,0 (1)	24 (-1)	0,066
10	20,0 (1)	2,0 (- 1)	1,0 (- 1)	6,0 (1)	24 (-1)	0,013
11	5,0 (- 1)	10,0 (1)	1,0 (- 1)	6,0 (1)	24 (-1)	0,012
12	20,0 (1)	10,0 (1)	1,0 (- 1)	6,0 (1)	24 (-1)	0,015
13	5,0 (- 1)	2,0 (- 1)	5,0 (1)	6,0 (1)	24 (-1)	0,120
14	20,0 (1)	2,0 (- 1)	5,0 (1)	6,0 (1)	24 (-1)	0,091
15	5,0 (- 1)	10,0 (1)	5,0 (1)	6,0 (1)	24 (-1)	0,034
16	20,0 (1)	10,0 (1)	5,0 (1)	6,0 (1)	24 (-1)	0,042
17	5,0 (- 1)	2,0 (- 1)	1,0 (- 1)	4,0 (- 1)	72 (1)	0,005
18	20,0 (1)	2,0 (- 1)	1,0 (- 1)	4,0 (- 1)	72 (1)	0,005
19	5,0 (- 1)	10,0 (1)	1,0 (- 1)	4,0 (- 1)	72 (1)	0,005
20	20,0 (1)	10,0 (1)	1,0 (- 1)	4,0 (- 1)	72 (1)	0,005
21	5,0 (- 1)	2,0 (- 1)	5,0 (1)	4,0 (- 1)	72 (1)	0,088
22	20,0 (1)	2,0 (- 1)	5,0 (1)	4,0 (- 1)	72 (1)	0,023
23	5,0 (- 1)	10,0 (1)	5,0 (1)	4,0 (- 1)	72 (1)	0,022
24	20,0 (1)	10,0 (1)	5,0 (1)	4,0 (- 1)	72 (1)	0,061
25	5,0 (- 1)	2,0 (- 1)	1,0 (- 1)	6,0 (1)	72 (1)	0,005
26	20,0 (1)	2,0 (- 1)	1,0 (- 1)	6,0 (1)	72 (1)	0,005
27	5,0 (- 1)	10,0 (1)	1,0 (- 1)	6,0 (1)	72 (1)	0,005
28	20,0 (1)	10,0 (1)	1,0 (- 1)	6,0 (1)	72 (1)	0,005
29	5,0 (- 1)	2,0 (- 1)	5,0 (1)	6,0 (1)	72 (1)	0,005
30	20,0 (1)	2,0 (- 1)	5,0 (1)	6,0 (1)	72 (1)	0,005
31	5,0 (- 1)	10,0 (1)	5,0 (1)	6,0 (1)	72 (1)	0,005
32	20,0 (1)	10,0 (1)	5,0 (1)	6,0 (1)	72 (1)	0,005
33 (C)	12,5 (0)	6,0 (0)	3,0 (0)	5,0 (0)	48 (0)	0,085
34 (C)	12,5 (0)	6,0 (0)	3,0 (0)	5,0 (0)	48 (0)	0,075
35 (C)	12,5 (0)	6,0 (0)	3,0 (0)	5,0 (0)	48 (0)	0,074

Tabela 5 – Coeficientes de regressão para resposta de fitase.

Termos	Efeito	Coeficiente de regressão	p-valor
Constante		34,26	0,000
A	-24,03	-12,01	0,027*
B	-22,64	-11,32	0,036*
C	26,89	13,44	0,015*
D	-11,34	-5,67	0,273
E	-36,07	-18,04	0,002*
A*B	22,79	11,39	0,035*
A*C	2,51	1,26	0,805
A*D	15,04	7,52	0,151
A*E	20,78	10,39	0,053
B*C	-10,15	-5,08	0,325
B*D	-0,65	-0,33	0,949
B*E	19,14	9,57	0,072
C*D	-4,28	-2,14	0,675
C*E	-2,64	-1,32	0,796
D*E	-12,91	-6,46	0,214

*Fatores e interações significativas em nível de 5 % de significância. A = sacarose, B = peptona, C = Tween-20, D = pH e E = tempo. $R^2 = 0,73$

Vários autores têm mostrado que a adição de agentes surfactantes aos meios de cultivo líquido, tem resultado em aumento na atividade de fitases, provavelmente em função da formação de *pellets* menores durante o desenvolvimento dos microrganismos, além da possível alteração da permeabilidade celular, o que facilitaria a liberação da enzima pelas células (Al-asheh & Duvnjak, 1994; Nampoothiri *et al.*, 2004). Gunashree & Venkateswaran (2008) demonstraram que o uso de Tween-20 no meio de cultivo líquido influenciou na formação de *pellets* menores durante o desenvolvimento de *Aspergillus niger* CFR 335, além de aumentar a produção de fitases em relação ao meio controle, no qual não foi adicionado surfactante.

Singh & Satyanarayana (2008a), também obtiveram aumento significativo na atividade de fitases por *Sporotrichum termophile* ao utilizarem Tween-80 e Tween-20 no meio de cultivo líquido.

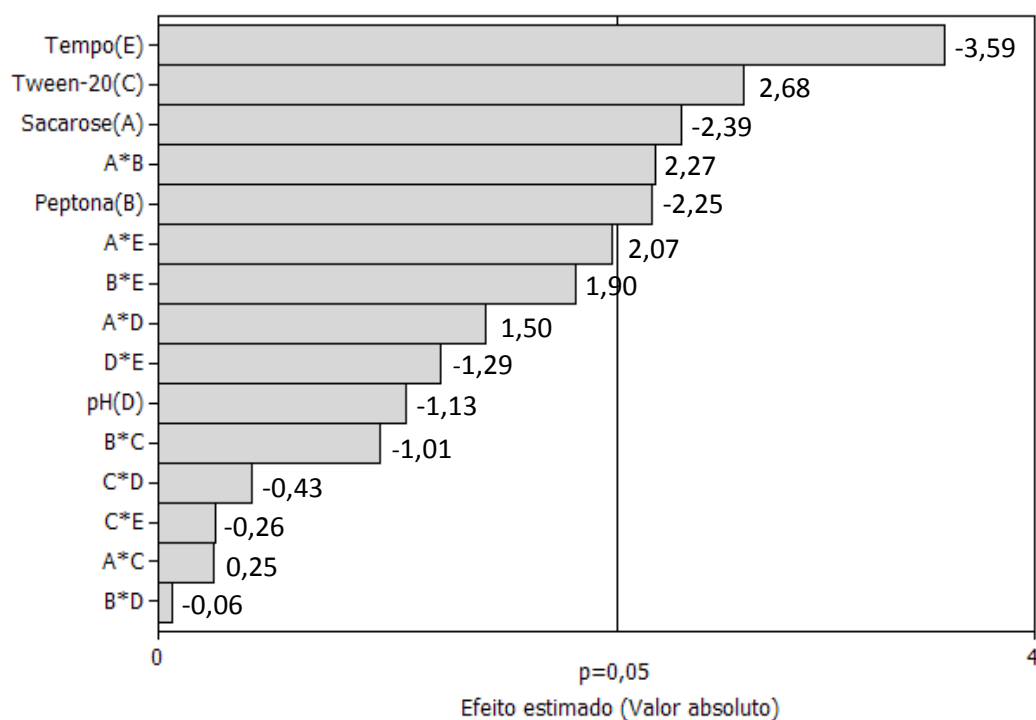


Fig. 1. Diagrama de Pareto para atividade de fitase no experimento fatorial 2^5 .

De acordo com as respostas para a atividade enzimática obtidas no DCC (Tabela 6), a maior atividade enzimática foi de 0,650 U/mL, obtida nas condições do ensaio número treze (batata, 200 g/L; sacarose 2,5 g/L; peptona, 1,0 g/L; CaCl_2 , 0,10 g/L; Tween-20, 6,25 mL/L), em pH 4,0 e tempo de cultivo de 32,5 horas.

De acordo com a análise de regressão, a produção de fitases foi influenciada, significativamente, pelos fatores sacarose, tempo de cultivo e pelas interações entre sacarose e peptona e entre sacarose e tempo de cultivo, ao nível de 5 % de significância (Tabela 7).

Tabela 6 - Matriz do DCC para atividade de fitase.

Ensaio	Sacarose (g/L)	Peptona (g/L)	Tween-20 (mL/L)	Tempo de cultivo (horas)	Atividade enzimática (U/mL)
1	2,5 (-1)	1,0 (-1)	3,75 (-1)	17,5 (-1)	0,093
2	7,5 (+1)	1,0 (-1)	3,75 (-1)	17,5 (-1)	0,026
3	2,5 (-1)	3,0 (+1)	3,75 (-1)	17,5 (-1)	0,120
4	7,5 (+1)	3,0 (+1)	3,75 (-1)	17,5 (-1)	0,037
5	2,5 (-1)	1,0 (-1)	6,25 (+1)	17,5 (-1)	0,094
6	7,5 (+1)	1,0 (-1)	6,25 (+1)	17,5 (-1)	0,020
7	2,5 (-1)	3,0 (+1)	6,25 (+1)	17,5 (-1)	0,089
8	7,5 (+1)	3,0 (+1)	6,25 (+1)	17,5 (-1)	0,019
9	2,5 (-1)	1,0 (-1)	3,75 (-1)	32,5 (+1)	0,530
10	7,5 (+1)	1,0 (-1)	3,75 (-1)	32,5 (+1)	0,140
11	2,5 (-1)	3,0 (+1)	3,75 (-1)	32,5 (+1)	0,260
12	7,5 (+1)	3,0 (+1)	3,75 (-1)	32,5 (+1)	0,140
13	2,5 (-1)	1,0 (-1)	6,25 (+1)	32,5 (+1)	0,650
14	7,5 (+1)	1,0 (-1)	6,25 (+1)	32,5 (+1)	0,070
15	2,5 (-1)	3,0 (+1)	6,25 (+1)	32,5 (+1)	0,330
16	7,5 (0,5)	3,0 (+1)	6,25 (+1)	32,5 (+1)	0,290
17	0,0 (- α)	2,0 (0)	5,00 (0)	25,0 (0)	0,220
18	10,0 (+ α)	2,0 (0)	5,00 (0)	25,0 (0)	0,130
19	5,0 (0)	0,0 (- α)	5,00 (0)	25,0 (0)	0,100
20	5,0 (0)	4,0 (+ α)	5,00 (0)	25,0 (0)	0,260
21	5,0 (0)	2,0 (0)	2,50 (- α)	25,0 (0)	0,100
22	5,0 (0)	2,0 (0)	7,50 (+ α)	25,0 (0)	0,098
23	5,0 (0)	2,0 (0)	5,00 (0)	10,0 (- α)	0,065
24	5,0 (0)	2,0 (0)	5,00 (0)	40,0 (+ α)	0,460
25 (C)	5,0 (0)	2,0 (0)	5,00 (0)	25,0 (0)	0,140
26 (C)	5,0 (0)	2,0 (0)	5,00 (0)	25,0 (0)	0,140
27 (C)	5,0 (0)	2,0 (0)	5,00 (0)	25,0 (0)	0,130
28 (C)	5,0 (0)	2,0 (0)	5,00 (0)	25,0 (0)	0,130
29 (C)	5,0 (0)	2,0 (0)	5,00 (0)	25,0 (0)	0,130

O aumento da atividade enzimática obtido foi de 9,3 vezes a atividade de 0,07 U/mL obtida nas condições iniciais de cultivo. Bhavsar *et al.* (2011), após otimização da produção de fitases por *Aspergillus niger* NCIM 563 em meio sólido contendo resíduos de torta de algodão e de amendoim, obtiveram aumento de, aproximadamente, 4 vezes em relação à produção inicial da enzima. Bogar *et al.* (2003), avaliando o efeito de diferentes fontes de carbono (farelo de canola, milho moído, farelo de trigo e farelo de soja) na produção de fitases de *Aspergillus ficcum* NRRL 3135, obtiveram aumento de, aproximadamente, 1,6 vezes após otimização da atividade enzimática. Singh & Satyanarayana (2008b) realizaram a otimização da atividade de fitases por *Sporotrichum thermophile* em meio líquido e obtiveram aumento de 3,7 vezes em relação à atividade inicial.

Tabela 7 – Coeficientes de regressão para resposta da enzima fitase.

Termos	Coeficiente de regressão	p-valor
Constante	0,134000	0,003
A	-0,066833	0,002*
B	-0,000750	0,966
C	0,008833	0,620
E	0,112583	0,000*
A*A	0,010687	0,534
B*B	0,011937	0,488
C*C	-0,008312	0,628
E*E	0,032562	0,073
A*B	0,049875	0,035*
A *C	-0,006500	0,765
A*E	-0,052250	0,028*
B *C	0,007875	0,718
B* E	-0,025125	0,259
C *E	0,020250	0,359

*Fatores e interações significativas em nível de 5 % de significância. A = sacarose, B = peptona, C = Tween-20 e E = tempo. $R^2 = 0,844$

Pela aplicação da análise de regressão múltipla nos dados experimentais, o seguinte modelo foi encontrado para explicar a produção de fitases:

$$Y = 0,134 - 0,0668333*A + 0,112583*E + 0,049875*AB - 0,052250*AE \quad (5.5.1)$$

Onde:

Y é a resposta prevista para atividade enzimática (U/mL) e A, B e E são as variáveis sacarose, peptona e tempo, respectivamente.

A Equação (5.5.1) mostra que a atividade enzimática foi influenciada positivamente pelo tempo de cultivo e pela interação entre sacarose e peptona (Figura 2) e negativamente pela sacarose e pela interação entre sacarose e tempo de cultivo (Figura 3). Com base nesses resultados, pode ser sugerido que a sacarose produziu um efeito negativo na produção da enzima muito mais significativo que o efeito positivo proporcionado pelo tempo de cultivo, fazendo com que a interação entre ambos resultasse em um efeito negativo, de acordo com o coeficiente de regressão (Tabela 7).

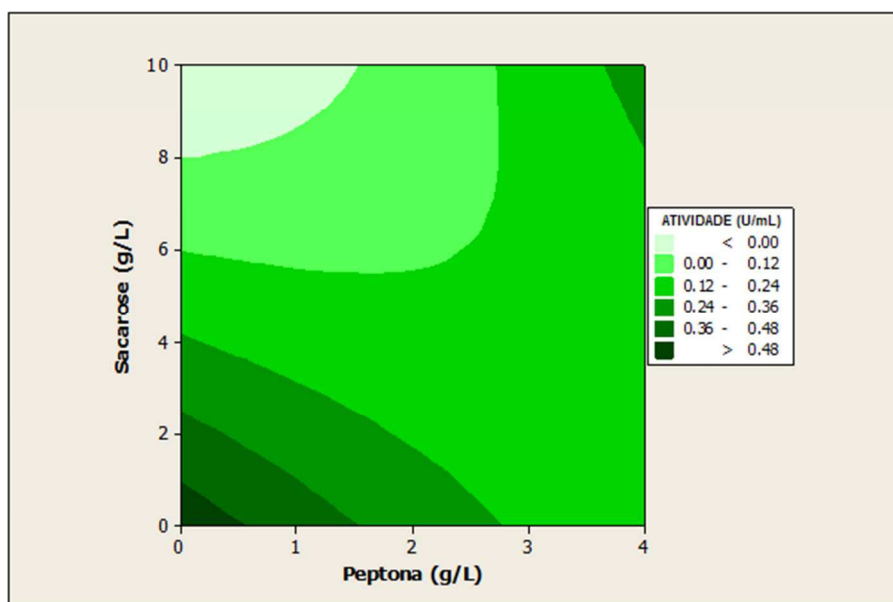


Fig. 2. Curva de contorno para atividade de fitase em função das concentrações de sacarose e peptona.

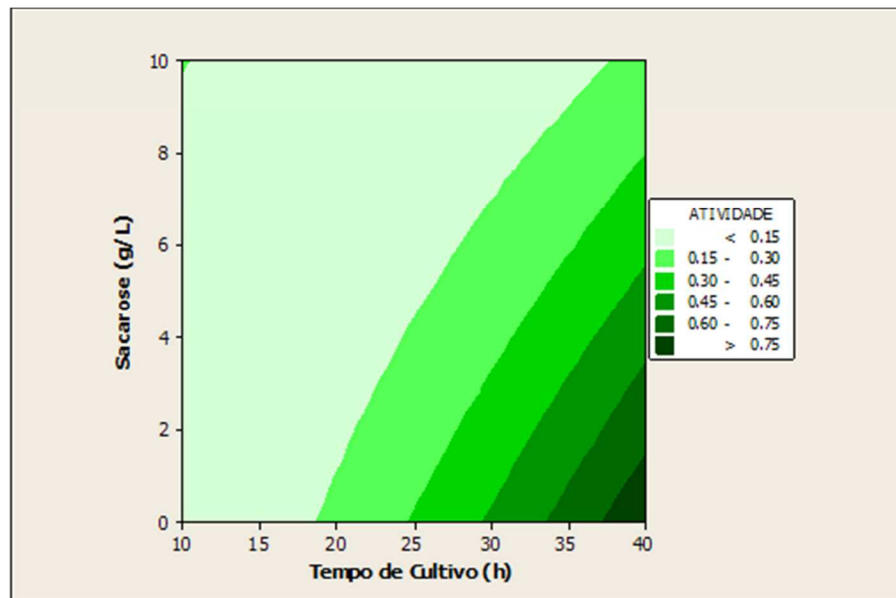


Fig. 3- Curva de contorno para atividade de fitase em função das concentrações de sacarose e tempo de cultivo.

4.5.3. Efeito da temperatura e pH na atividade enzimática e avaliação da termoestabilidade

A fitase de *Rhizopus stolonifer* apresentou temperatura ótima de 65 °C (Figura 4), resultado semelhante aos encontrados para outras fitases fúngicas (Casey & Waslsh, 2003; Wang *et al.*, 2007). O pH ótimo foi na faixa de 5,0 a 5,5 (Figura 5), com redução significativa da atividade enzimática em pH abaixo de 4,0 e acima de 7,0. Boyce & Walsh (2007) caracterizaram uma fitase de *Mucor hiemalis* Wehmer com pH ótimo na faixa de 5,0 a 5,5, a qual apresentou redução significativa da atividade enzimática a partir de pH 7,0. Resultado similar ao encontrado por Fugthong *et al.* (2010) na caracterização de uma fitase recombinante *Eupenicillium parvum* (BCC17694), a qual apresentou pH ótimo igual 5,5 e ausência de atividade em pH 7,0.

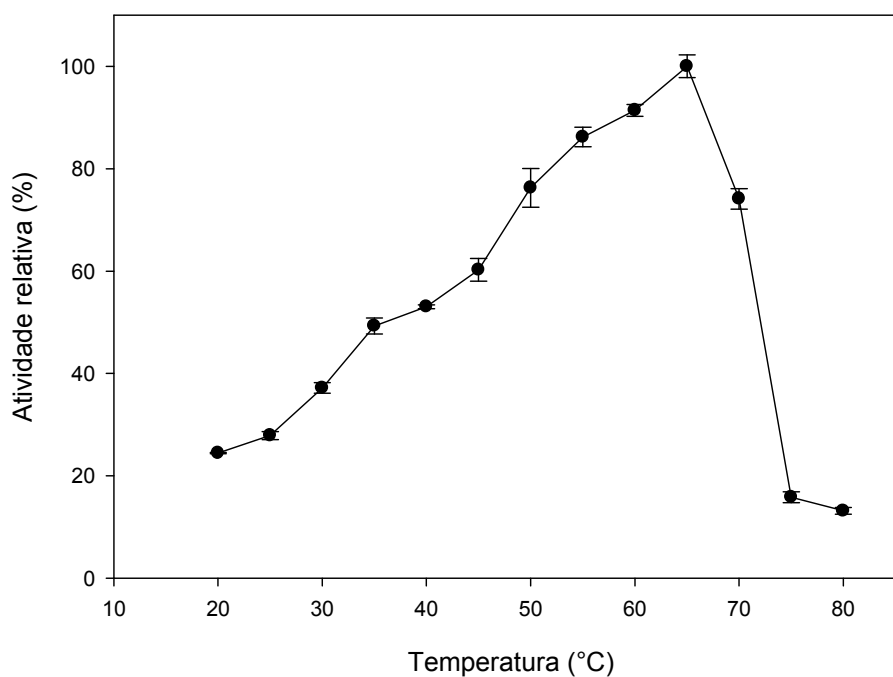


Fig. 4. Efeito da temperatura na atividade de fitase de *Rhizopus stolonifer*.

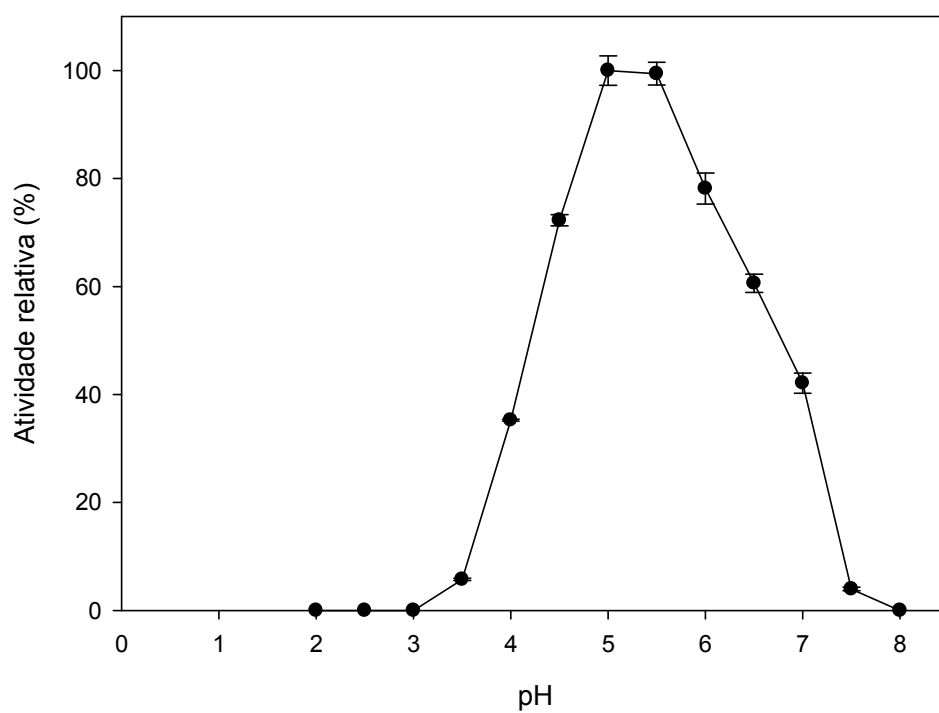


Fig. 5. Efeito do pH na atividade de fitase de *Rhizopus stolonifer*.

A fitase de *Rhizopus stolonifer* manteve mais de 60 % da atividade inicial após 2 horas a 40 °C, com $t_{1/2}$ de 2,8 horas. Na temperatura de 50 °C, a enzima manteve mais de 40 % da atividade inicial após 1 hora, com $t_{1/2}$ de 50 minutos (Figura 6).

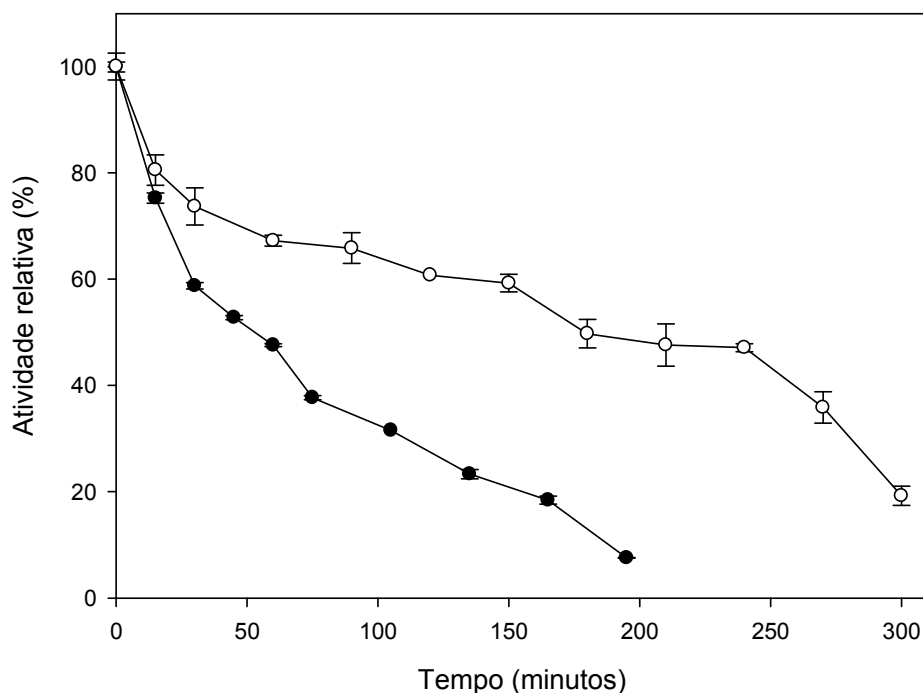


Fig. 6. Estabilidade térmica da fitase de *Rhizopus stolonifer* a 40 °C (○) e 50 °C (●)

A termoestabilidade e a resistência à proteólise estão entre as características mais importantes em relação ao uso industrial de fitases, em função das elevadas temperaturas adotadas nos processos industriais de fabricação de rações animais e da ação de enzimas digestivas no trato digestivo animal (Lei *et al.*, 2007). No entanto, as fitases podem ser incorporadas às dietas animais em uma etapa anterior ao processo de peletização ou extrusão das rações, evitando a perda da atividade enzimática. (Cain & Garling, 1995; Cao *et al.*, 2007). Nwanna *et al.* (2008) obtiveram significativa redução da concentração de fitato em dietas para peixes adicionadas de fitase comercial, sendo que as mesmas foram previamente umedecidas e incubadas a 40 °C, juntamente com a enzima comercial, antes de serem submetidas à secagem. Vats *et al.* (2009) avaliaram o efeito do pré-tratamento de dietas animais com fitase de *Aspergillus niger* van Teighem,

obtendo significativo aumento da liberação de fósforo no meio. Trabalho semelhante foi desenvolvido por Hughes *et al.* (1998) onde dietas para peixes foram tratadas com solução comercial de fitase, no qual observou-se que 1000 e 2300 U de fitase/kg de ração foram suficientes para manter a concentração de fósforo vertebral semelhante à concentração encontrada nos peixes tratados com as dietas controle, as quais foram adicionadas de fósforo inorgânico.

4.5.4. Determinação dos parâmetros cinéticos

As reações de hidrólise do fitato pela fitase de *Rhizopus stolonifer* seguiram a cinética de *Michaelis-Menten*, resultando em valores de $K_{M,app}$ e $V_{max,app}$ de 0,692 mM e 0,780 $\mu\text{mol}/\text{min}$, respectivamente, calculados por meio do gráfico de *Lineweaver-Burk* (Figura 7). Estes valores encontram-se dentro da faixa descrita para diversas outras fitases fúngicas (Boyce & Walsh, 2007, Fugthong *et al.*, 2010, Zhang *et al.*, 2010).

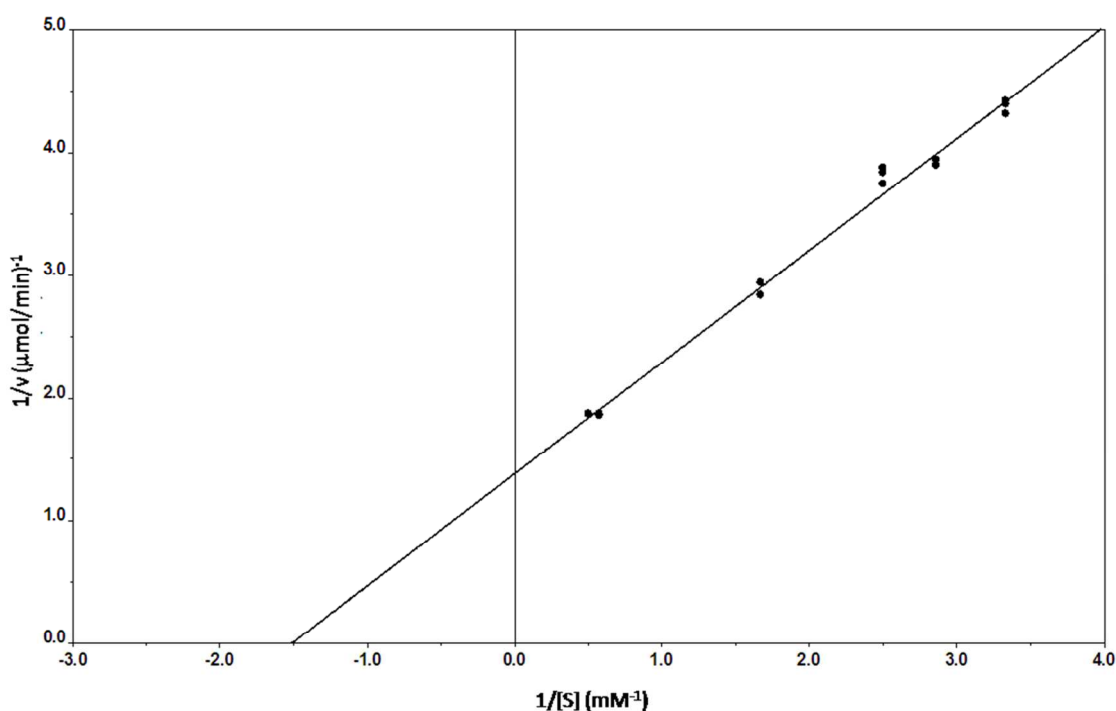


Fig. 7. Gráfico de *Lineweaver-Burk* utilizado para estimar as constantes cinéticas da fitase.

4.5.5. Avaliação da hidrólise de fitato em ração animal

A fitase foi efetiva na hidrólise do conteúdo de fitato e outros compostos fosfatados presentes nas amostras de ração animal utilizadas no ensaio. Após 5 horas de tratamento das amostras com fitase, foram liberados 5,14 $\mu\text{mol PO}_4^{3-}/\text{mL}$, valor que corresponde, aproximadamente, à concentração inicial de fósforo, em comparação com as amostras não tratadas enzimaticamente. Nessas condições, a liberação de fosfato foi estabilizada, possivelmente, devido à inibição da enzima pela elevada concentração de fósforo no meio (10,02 $\mu\text{mol PO}_4^{3-}/\text{mL}$) (Figura 8). Singh & Satyanarayana (2009) mostraram que a fitase de *Sporotrichum thermophile* foi parcialmente inibida na concentração de 5 mM de fosfato inorgânico no meio de reação. Vats *et al.* (2009) avaliaram o uso de fitase de *Aspergillus niger* van Teighem na desfosforilação do ácido fítico em ração animal, obtendo a liberação máxima de 48 nmol $\text{PO}_4^{3-}/\text{mL}$, após 48 horas à 55 °C. Os resultados obtidos indicam que a fitase de *Rhizopus stolonifer* apresenta potencial para ser utilizada em rações animais, possibilitando a liberação de fósforo e de possíveis minerais quelados.

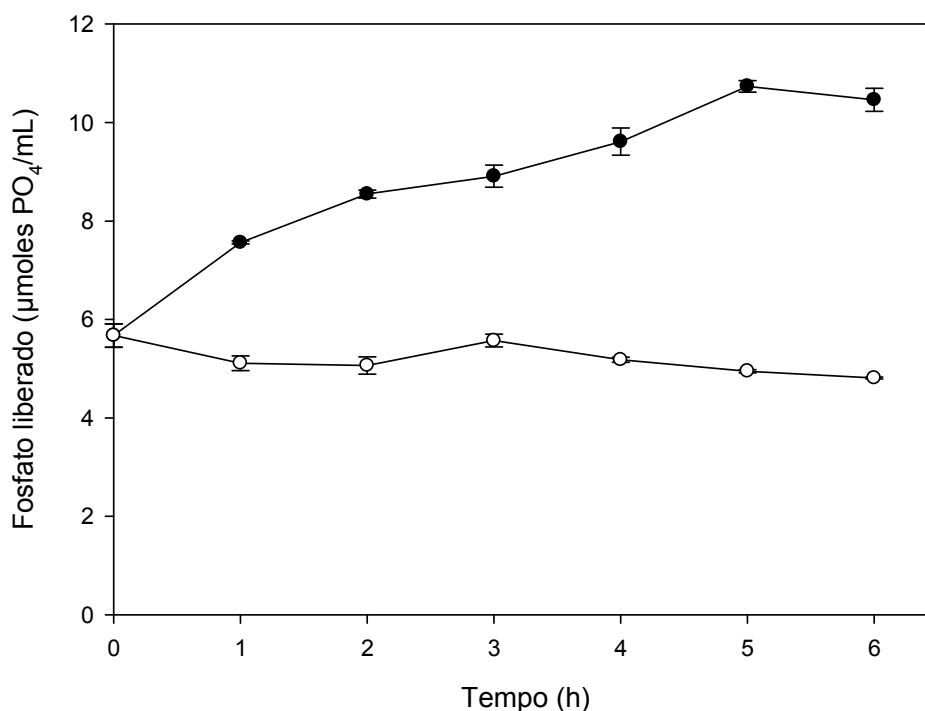


Fig. 8. Estudo da liberação de fosfato *in vitro* em ração animal, a 40 °C, controle (○), hidrólise enzimática (●).

4.6. Conclusão

O uso da metodologia estatística de superfície de resposta foi eficiente no aumento de nove vezes na atividade de fitases de *Rhizopus stolonifer* em meio líquido. A enzima apresentou propriedades bioquímicas e cinéticas semelhantes a outras fitases fúngicas, e foi efetiva na liberação de fósforo em ração animal, apresentando dessa forma elevado potencial para aplicação industrial.

4.7. Referências Bibliográficas

- Al-asheh, S., Duvnjak, Z. (1994). Effect of glucose concentration on the biomass and phytase production and reduction of phytic acid content in canola meal by *Aspergillus carbonarius* during solid-state fermentation process. *Biotechnology Progress*, 10, 353-359.
- Bhavsar, K., Kumar, V. R., Khire, J. M. (2011). High level phytase production by *Aspergillus niger* NCIM 563 in solid state culture: response surface optimization, up-scaling, and its partial characterization. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38, 1407-1417.
- Bogar, B., Szakes, G., Linden, J. C., Pandey, A. (2003). Optimization of phytase production by solid substrate fermentation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 30, 183-189.
- Bohn, L., Meyer, A., Rasmussen, S., 2008. Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *Journal of Zhejiang University-Science B*, 9, 165-191.
- Boyce, A., Walsh, G. (2007) Purification and characterization of an acid phosphatase with phytase activity from *Mucor hiemalis* Wehmer. *Journal of Biotechnology*, 132, 82-87.
- Cain, K. D., Garling, D. L. (1995). Pretreatment of soybean meal with phytase for salmonid diets to reduce phosphorus concentrations in hatchery effluents. *Progressive Fish-Culturist*, 57, 114-119.
- Cao, L., Wang, W., Yang, C., Yang, Y., Diana, J., Yakupitiyage, A., Luo, Z., Li, D. (2007). Application of microbial phytase in fish feed. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 497-507.
- Casey, A., Walsh, G., (2003). Purification and characterization of extracellular phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142. *Bioresource Technology*, 86, 183-188.
- Cheryan, M. (1980). Phytic acid interactions in food systems. *Critical Reviews in Food Science*, 13, 297-336.

- Fugthong, A., Boonyapakron, K., Sornlek, W., Tanapongpipat, S., Eurwilaichitr, L., Pootanakit, K. (2010). Biochemical characterization and in vitro digestibility assay of *Eupenicillium parvum* (BCC17694) phytase expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 70, 60-67.
- Gunashree, B., Venkateswaran, G. (2008). Effect of different cultural conditions for phytase production by *Aspergillus niger* CFR 335 in submerged and solid-state fermentations. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 35, 1587-1596.
- Hughes, K. P., Soares Jr., J. H. (1998). Efficacy of phytase on phosphorus utilization in practical diets fed to striped bass *Morone saxatilis*. *Aquaculture Nutrition*, 4, 133-140.
- International Seed Testing Association (1976). Seed health testing. *Seed Science and Technology*, 4, 3-49.
- Lei, X. G., Porres, J. M., Mullaney, E. J., Brinch-Pedersen, H. (2007). Phytase: Source, Structure and Application. In *Industrial Enzyme - Structure, Function and Applications*. Poalaina, J., MacCabe, A. P. (Eds).
- Loewus, F. A. (2002). Biosynthesis of phytate in food grains and seeds. In: *Food Phytates*. Sathe, S. K., Reddy, N. R. (Eds). Boca Raton, London, 280 pp.
- Nagashima, T., Tange, T., Anazawa, H. (1999). Dephosphorylation of phytase by using the *Aspergillus niger* phytase with a high affinity for phytate. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4682-4684.
- Nampoothiri, K. M., Tomes, G. J., Roopesh, K., Szakacs, G., Nagy, V., Soccol C. R., Pandey A. (2004). Thermostable phytase production by *Thermoascus aurantiacus* in submerged fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 118, 205-214.
- Nwanna, L. C., Kolahsa, M., Eisenreich, R., Schwarz, F. J. (2008). Pre-treatment of dietary plant feedstuffs with phytase and its effect on growth and mineral concentration in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 92, 677-682.
- Pandey, A., Szakacs, G., Soccol, C. R., Rodriguez-Leon, J. A., Soccol, V. T. (2001). Production Purification and properties of microbial phytases. *Bioresource Technology*, 77, 203-214.
- Singh, B., Satyanarayana, T. (2008a). Phytase production by *Sporotrichum thermophile* in a cost-effective cane molasses medium in submerged fermentation and its application in bread. *Journal of Applied Microbiology*, 1858-1865.
- Singh, B., Satyanarayana, T. (2008b). Improved phytase production by a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* in submerged fermentation due to statistical optimization. *Bioresource Technology* 99, 824-830.

- Singh, B., Satyanarayana, T. (2009). Characterization of a HAP-phytase from a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile*. *Bioresource Technology*, 100, 2046-2051.
- Tausky, H.H., Shorr, E. (1953). A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *The Journal of Biological Chemistry*, 202, 675- 685.
- Vats, P., Banerjee, U. C. (2002). Studies on the production of phytase by a newly isolated strain of *Aspergillus niger* var teigham obtained from rotten wood-logs. *Process Biochemistry*, 38, 211-217.
- Vats, P., Bhushan, B., Banerjee, U.C. (2009). Studies on the dephosphorylation of phytic acid in livestock feed using phytase from *Aspergillus niger* van Teighem. *Bioresource Technology*, 100, 287-291.
- 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, 65-70.
- Zhang, G.Q., Dong, X.F., Wang, Z.H., Zhang, Q., Wang, H.X., Tong, J.M. (2010). Purification, characterization, and cloning of a novel phytase with low pH optimum and strong proteolysis resistance from *Aspergillus ficuum* NTG-23. *Bioresource Technology*, 101, 4125-4131.

5. Artigo 2 – Purification and characterization of a novel phytase from *Aspergillus niger* UFV-1 with strong proteolysis resistance and its application in livestock feed.

5.1. ABSTRACT

A novel phytase was purified from *Aspergillus niger* UFV-1 using ultra filtration followed acid precipitation, ion exchange and gel filtration chromatography. The protein exhibited a molecular mass of 161 kDa in gel filtration and 81 kDa in SDS-PAGE, indicating that there may be a dimer. It showed an optimum temperature of 60 °C and optimum pH of 2.0. The K_M was 30.9 mM and V_{max} was 7.48 $\mu\text{mol}/\text{min}$; while k_{cat} and k_{cat}/K_M were $1.46 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ and $4724919 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$, respectively. Substrate specificity indicated that this enzyme may hydrolyze a broad range of substrates, including phytate. Enzymatic activity was slightly inhibited by Mg^{2+} , Cd^{2+} , K^+ and Ca^{2+} and drastically inhibited by F^- . The enzyme displayed a high thermostability at 80 °C, with $t_{1/2} = 6.2 \text{ h}$ and strong resistance at pepsin and trypsin. In addition, the enzyme revealed to efficiently hydrolysis phytate in livestock feed.

5.2. Introduction

Phytic acid (*myo*-inositol hexakisphosphate) is the major form of phosphorus, inositol and divalent cation storage in plants, constituting 3-5 % of the dry weight of seeds in cereal grains and legumes, that can be metabolized by several enzymes during germination (Reddy *et al.*, 1982; Vats *et al.*, 2009). Phytic acid acts as an antinutritional factor for animals due its ability to complex with ions such as calcium, magnesium, iron and zinc as well as proteins, decreasing their bioavailability (Bohn *et al.*, 2008; Fugthong *et al.*, 2010). Additionally, phytic phosphorus cannot be absorbed by monogastric animals, including humans, due to the lack of or insufficient amount of phytate degrading enzymes. Inorganic phosphorus, a non-renewable and expensive mineral, is generally supplemented in diets of monogastric animals. Thus, non-degraded phytate is excreted and this excess inorganic phosphorus used in agriculture, becoming an environmental pollutant in areas of intensive livestock units (Cheryan, 1980; Lei & Porres, 2003). One of the alternatives for solving this

problem may be supplementation of animal feeds with phytase (Maguire *et al.*, 2005).

Phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases (EC 3.1.3.8, 3.1.3.26 and 3.1.3.72)) are phosphatases that catalyze the phosphate monoester hydrolysis of phytate, resulting in the stepwise formation of *myo*-inositol pentakis-, tetrakis-, tris-, bis- and monophosphate isomers, as well as the liberation of inorganic phosphate and potentially chelated minerals (Bohn *et al.*, 2008; Azeke *et al.*, 2011). Therefore, the benefits of phytase are at least threefold: increase the bioavailability of phosphorus and others minerals in livestock feed, help preserve the non-renewable sources of phosphorus by reducing the need for supplementing diets with phosphorus and reduce environmental pollution.

The properties of phytases vary, but for biotechnological applications an ideal phytase must present high thermostability, resistance to proteolysis and high catalytic efficiency.

This paper describes the purification and characterization of a phytase produced from *Aspergillus niger* UFV-1 isolate and its application in a commercial livestock feed.

5.3. Material and Methods

5.3.1. Strain isolation, culture conditions and enzyme production

The fungus *Aspergillus niger* UFV-1 was isolated from samples of sugarcane bagasse, collected near the city of Urucânia, Minas Gerais, Brazil. Samples were subjected to serial dilutions and then inoculated in Petri dishes containing PDA medium (Potato Dextrose Agar), which were incubated at 28 °C for 7 days and then stored at 4 °C. Subsequently, the fungus was identified by Olinto Liparini Pereira at the Phytopathology Department of the Federal University of Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

Induction of phytase was achieved in liquid medium accordance to Gunashree & Venkateswaran (2008), with modifications. Its content per liter was: potato broth 1,000 mL, sucrose 10 g, peptone 5 g, Tween-20 2.5 mL and CaCl₂ 0.10 g. Potato broth was obtained by boiling 200 g of fresh potato in 1,000 mL distilled water. The final pH of the medium was adjusted to 5.5 by the addition of 0.1 M HCl. Aliquots of 50 mL of the medium were dispensed in 250

mL Erlenmeyer flasks and autoclaved at 121 °C for 20 min. The spores from 7 day-old solid PDA media were harvested by washing the plate surface with a distilled water solution containing 0.2 % (v/v) Tween-20. After cooling, the medium was inoculated with a determined spore suspension volume to achieve a final concentration of 10^6 spores/mL. The flasks were incubated for 8 days at 28 °C on an orbital shaker at 180 rpm. Then, extracellular crude phytase was harvested and submitted to initial filtration through a nylon filter and centrifugation (10,000 x *g*, 10 min at 4 °C) of the filtrate. The supernatant was stored at 4 °C until purification.

5.3.2. Phytase assay

Phytase activity was determined by measuring the released inorganic phosphate (Taussky & Shorr, 1953) from sodium phytate (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). For analysis 600 µL of 1.5 mM sodium phytate in 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 and 150 µL of enzymatic extract were used. The reaction was conducted in a water bath at 50 °C for 30 minutes. The reaction was stopped by adding 250 µL of 10 % (v/v) trichloroacetic acid solution. Following, were added to test tubes, 1000 µL of reagent colorimetric (Taussky & Shorr, 1953) prepared from 10 % (w/v) ammonium molybdate solution in 5M sulfuric acid solution. The reagent was prepared at moment of use by mixing 10 % (v/v) solution composed of sulfuric acid and ammonium molybdate, 5 % (w/v) ferrous sulfate and deionized water. Readings were taken in a spectrophotometer at a wavelength of 700 nm and the absorbance values obtained were correlated with a standard curve made with KH_2PO_4 . All analysis of enzyme activity were performed in triplicate. One unit of phytase activity was defined as the amount of enzyme that releases 1 µmol phosphate per minute under the assay conditions.

5.3.3. Enzyme purification

Crude extracellular phytase was concentrated using an Amicon ultrafiltration cell model 8400 (Bedford, MA) with a 30 kDa molecular cutoff PM 30 Amicon membrane, at 4 °C. The resulting retentate was acidified with 0.1 M HCl until reaching pH 2.0, maintained under slow agitation for 30 minutes at 4 °C and then centrifuged (10,000 x *g*, 10 min at 4 °C). A 10 mL aliquot of the enzyme was loaded onto a 20 mL DEAE-Sepharose CL 6B column pre-

equilibrated with sodium acetate buffer (50 mM, pH 5.0) containing 0.5 % (w/v) sucrose. Unbound protein was removed by washing with four bed volumes of equilibration buffer. Bound protein was then eluted using a linear salt gradient (0-0.5 M NaCl in 50 mM sodium acetate buffer pH 5.0 containing 0.5 % (w/v) sucrose) at 1 mL/min, where 4 mL fractions were collected. Pooled activity (3 mL) was loaded onto a Sephacryl S-300 HR (Amersham Biosciences) column (2.6 x 60 cm) pre-equilibrated with sodium acetate buffer (25 mM, pH 5.0) containing 0.5 % (w/v) sucrose at 0.8 mL/min, using a AKTA Purifier fast protein liquid chromatography device (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), from which 2.5 mL fractions were collected. Ion exchange chromatography was performed at 4 °C and gel filtration at room temperature.

Protein concentration was determined by the method of Bradford (1976) using bovine serum albumin as the standard at concentrations of 0 – 20 µg/mL.

5.3.4. Electrophoretic analysis and molecular mass determination

One dimensional SDS gel electrophoresis was performed using a 12.5 % gel using a vertical electrophoresis system (Laemmli, 1970). The proteins bands were visualized by silver staining and standard molecular weight markers were obtained from Fermentas.

For the zymogram analysis, one dimensional SDS gel electrophoresis was conducted using a 12.5 % gel, where SDS and 2-mercaptoethanol were omitted from the gel and buffer, respectively, and the sample was not heated prior to analysis. After electrophoresis, the gel was equilibrated with 0.2 M sodium acetate buffer, pH 2.5 for 30 min and then incubated in the same buffer containing 0.04 % (w/v) p-nitrophenyl phosphate (pNPP) at 50 °C for 30 min. After incubation, the gel was rinsed with distilled water and then a 0.5 M Na₂CO₃ solution was added for visualization of yellow zones, indicating substrate hydrolysis.

Native enzyme molecular mass was determined by gel filtration chromatography, using a 120 mL Sephacryl S-200 (Amersham Biosciences) column (100 x 2.5 cm) and sodium acetate buffer (25 mM, pH 5.0) containing 0.5 % (w/v) sucrose as a running buffer. Void volume was determined using blue dextran (2 mg/mL) and the following protein standards obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) used were: albumin (Bovine serum, MW 66,000), alcohol dehydrogenase (yeast, MW 150,000), β-amylase (Sweet

potato, MW 200,000), carbonic anhydrase (bovine erythrocytes, MW 29,000) and cytochrome C (Horse heart, MW 12,400).

5.3.5. Effect of temperature and pH on enzyme activity

The temperature profile of the purified enzyme was determined within the temperature range of 20 to 80 °C using the standard phytase assay. The pH profile was determined by measuring phytase activity using the following buffers: 0.2 M glycine-HCl (pH 1.0-3.5), 0.2 M sodium acetate (pH 4.0-5.5), 0.2 M MES (pH 6.0-6.5) and 0.2 M Tris-HCl (pH 7.0-8.0).

5.3.6. Enzyme thermal stability and proteolysis resistance

Purified phytase was incubated at 60, 70 and 80 °C for periods of up to 144, 120 and 12 hours respectively, cooled to 4 °C and assayed in accordance with the phytase assay previously described.

Phytase resistance to pepsin and trypsin was assayed in accordance with Zhang *et al.* (2010), with modifications. The purified enzyme (0.2 µg/mL) was incubated in 0.1 M glycine-HCl buffer (pH 2.5) containing pepsin purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) (0.2 µg/mL, the pepsin/enzyme ratio was 1:1 (v/v)) or 0.1M Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing trypsin also from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) (0.2 µg/mL, the trypsin/enzyme ratio was 1:1 (v/v)) for 10, 20, 40 and 60 min at 37 °C, respectively. As a control, the purified enzyme was incubated at the same conditions but without the addition of pepsin or trypsin. Residual phytase activity was assayed in according the phytase assay previously described.

5.3.7. Effect of potential effectors

The effect of ions (Mg^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Hg^{2+} and Na^+ and F^-) at concentrations of 5, 10 and 20 mM; EDTA, β-mercaptoethanol and dithiothreitol (DTT), at concentrations of 1 and 5 mM; detergents (Sodium dodecyl sulfate (SDS), at concentrations of 0.1 and 0.5 % (v/v)) and chaotropic agents (urea and guanidine chloride, at concentrations of 0.5, 1.0 and 2.0 M) on enzyme activity was investigated by incorporating these compounds into the reaction mixtures. The residual activity phytase was then obtained in accordance with the phytase assay previously described.

5.3.8. Determination of substrate specificity and kinetic parameters

Substrate specificity of the purified phytase was evaluated by replacing phytic acid in the reaction mixture with others phosphate compounds. The substrates used were sodium phytate, calcium phytate, pNPP, adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), adenosine monophosphate (AMP), glucose-6-phosphate, glucose-1-phosphate, 1-naphtyl phosphate, 2-naphtyl phosphate, phenyl phosphate and glycerol 2-phosphate, at final concentrations of 1.2 mM. Phytase activity was evaluated by applying the phytase assay previously described, except for pNPP in which the reaction mixture was composed of 400 μ L of 3.0 mM pNPP in 0.2 M glycine-HCl (pH 2.5), 400 μ L distilled water and 150 μ L of purified phytase, which was incubated at 50 °C for 15 min. The reaction was stopped with addition of 1 mL of 0.5 mM Na_2CO_3 and the p-nitrophenyl (pNP) concentration was determined at 410 nm.

Kinetic parameters were investigated using pNPP and sodium phytate substrates at concentrations of 0-95 mM and 0-8 mM, respectively. Phytase activity was obtained accordance of the phytase assay described above except for pNPP, where pNP concentration was determined at 410 nm. The kinetics of the enzyme was modeled according to the Michaelis-Menten model.

5.3.9. Evaluation of phytate hydrolysis in livestock feed

In order to evaluate the effect of phytase on hydrolysis of phytic acid, a commercial livestock feed for pigs was used. It is composed by corn grain, corn gluten meal, soybean meal, wheat bran, bovine meat and bone meal, dicalcium phosphate, calcium carbonate, sodium chloride, mineral premix and vitamin premix. The autoclaved (121 °C/20 min) feed samples (1 g) were suspended in 5 mL 0.2 M glycine-HCl buffer (pH 2.5) in a 50 mL conical flask and supplemented with crude phytase (4 U/mL). As a control, the autoclaved feed suspension was used to which no crude phytase was added. The flasks were then incubated at 50 °C and 200 rpm in a rotary shaker. Samples were withdrawn at intervals up to 8 h (test and control flasks) and immediately cooled to 4 °C, centrifuged (10000 x g, 10 min, at 4 °C) and the supernatant was used for quantification of the colorimetrically released phosphate at 700 nm in accordance with the phytase assay previously described.

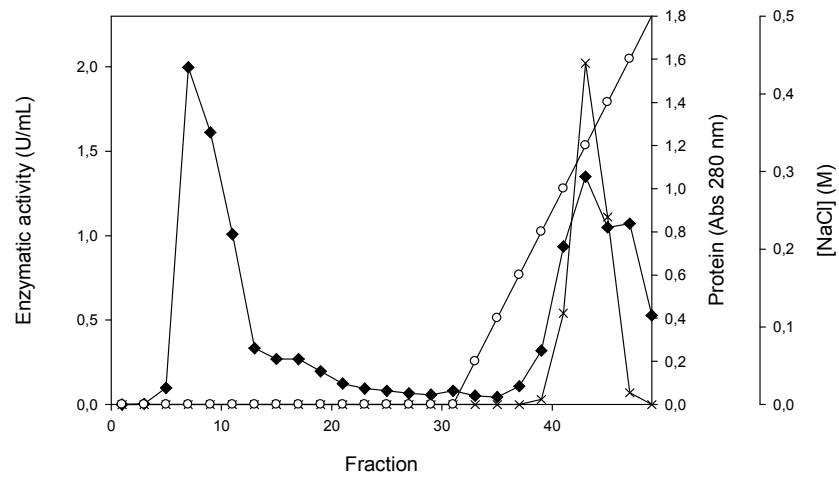
5.4. Results and discussion

5.4.1. Enzyme purification

Enzyme purification was performed by a combination of concentration by ultrafiltration, followed by acid precipitation, and ion exchange and gel filtration chromatography. After the ultrafiltration and precipitation steps, the fractions adsorbed on DEAE-Sepharose showed phytase activity (Fig. 1-A). Subsequently, only one peak with phytase activity was achieved when this fraction was submitted to gel filtration chromatography (Fig. 1-B). A purification factor of 64.1 was recorded with yield of 11.1 % (Table 1). Purification to homogeneity was confirmed by SDS PAGE analysis and a single band was observed on the non-denaturing electrophoresis gels (Fig. 2-A). Identification of this band as phytase on the non-denaturing gels was confirmed by the zymogram analysis, where the band stained for protein and activity displays identical retention factor (R_f) values (Fig. 2-B).

Previous studies on the purification of fungal phytases present similar purification factors and yields. Greiner *et al.* (2009) purified a phytase of *Aspergillus niger* 11T53A9 to a purification factor of 51 times and with 20.3 % yield. Singh & Satyanarayana (2009) reported a phytase from *Aspergillus ficcum* NTG-23 with a purification factor of 13.72-fold and a 4.31 % yield. Gulati *et al.* (2007) when purifying a phytase of *Thermomyces lanuginosus* TL-7 obtained a purification factor of 40.75-fold and a 3.44 % yield.

(A)



(B)

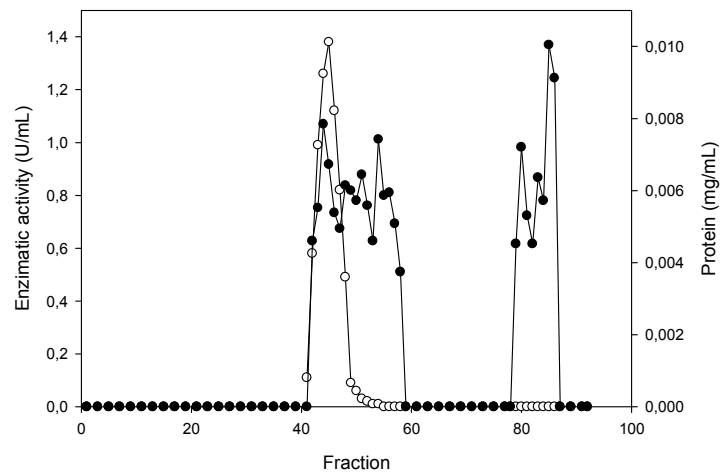


Fig.1. Elution profiles of phytase from *Aspergillus niger* UFV-1. (A) Ion exchange chromatography of fractions adsorbed on DEAE-Sepharose. The column was initially eluted with sodium acetate buffer (50 mM, pH 5.0) containing 0.5 % (w/v) sucrose and subsequently with a linear gradient of 0-0.5 M NaCl in the same buffer. The flow rate was 1.0 mL/min. (B) Gel filtration of fractions displayed phytase activity from DEAE-Sepharose on a Sephacryl S-300 HR column (2.6 x 60 cm), which was eluted with sodium acetate buffer (25 mM, pH 5.0) containing 0.5 % (w/v) sucrose. The flow rate was 0.8 mL/min.

Table 1

Summary of the steps for phytase purification from *Aspergillus niger* UFV-1.

Purification step	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification fold	Yield (%)
Crude Extract	47.70	138.6	2.91	1	100
Ultra-Filtration	41.30	129.6	3.14	1.08	93.5
Precipitation	15.36	103.7	6.75	2.31	74.8
Ion exchange	0.988	24.50	24.80	8.52	17.7
Gel filtration	0.082	15.30	186.6	64.1	11.1

5.4.2. Determination of molecular mass

The molecular mass of native phytase was determined to be 161 kDa by gel filtration, while the SDS-PAGE analysis exhibits a molecular mass of 81 kDa (Fig. 2-A). This suggests that the enzyme could be a dimer and the molecular mass is in the same range as observed in previous studies on fungal phytase. In addition, the single band observed on the non-denaturing electrophoretic gels (Fig. 2-B) also suggests that phytase could be a dimer.

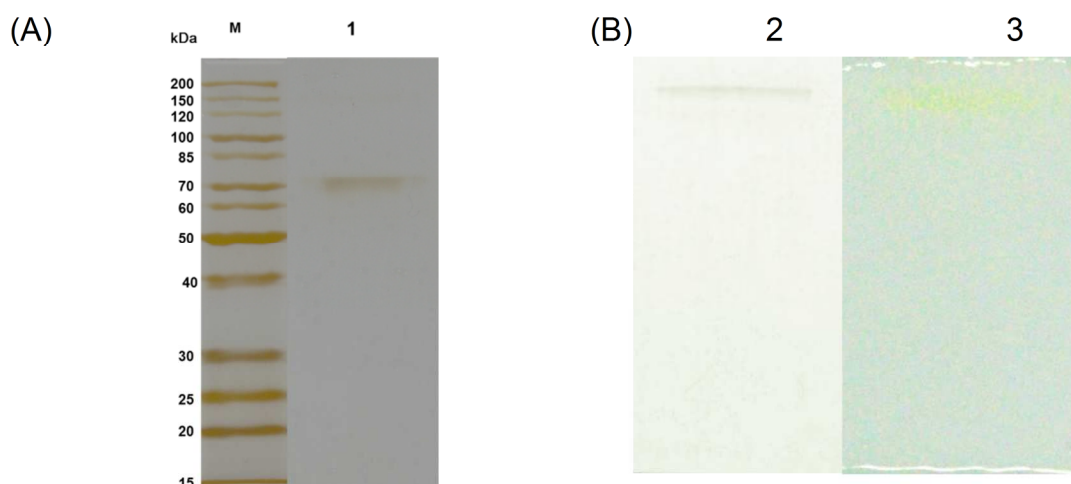


Fig. 2. SDS-PAGE (A) and zymogram (B) analysis of *Aspergillus niger* UFV-1 phytase. Lane M: molecular mass marker; Lane 1: purified phytase; Lane 2: Non-denaturing gel electrophoresis; Lane 3: Phytase activity on the non-denaturing gel.

Ullah & Cummins (1987) determined the molecular mass of an *Aspergillus ficcum* phytase by gel filtration analysis, obtaining a molecular mass of 130 kDa, while the SDS-PAGE technique resulted in approximately 68 kDa. The molecular mass of phytase of *Aspergillus niger* van Teghem was a pentamer of 353 kDa with monomer of 66 kDa (Vats & Banerjee, 2005).

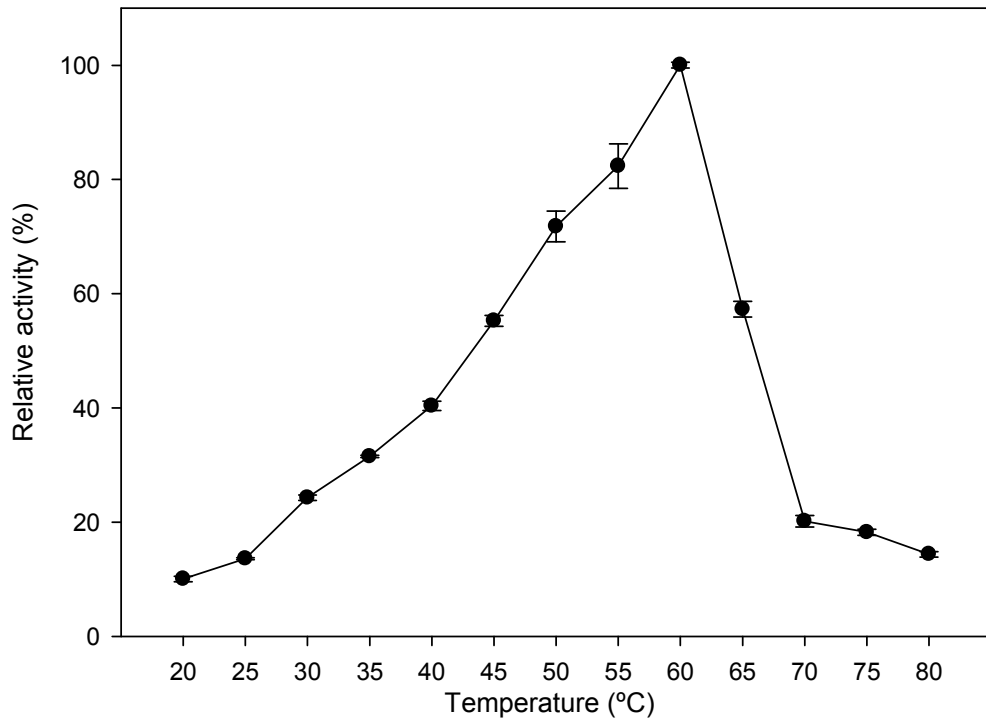
5.4.3. Effect of temperature and pH on enzyme activity

Purified phytase from *Aspergillus niger* UFV-1 displayed optimum activity at 60 °C (Fig. 3-A) as reported for most of fungal phytases (Lassen *et al.*, 2001; Fugthong *et al.*, 2010). The optimum pH was 2.0 (Fig. 3-B) with a decrease in enzyme activity as the pH approached the neutral range, similar to the work of Zhang *et al.* (2010), who determined the optimum pH of phytase of *Aspergillus ficuum* NTG-23 as 1.3. Nagashima *et al.* (1999) also determined the optimum pH of phytase from *Aspergillus niger*, showing a peak activity at pH 2.5, which was 60 % less than the optimum pH of 5.5. Phytases with acidic optimum pH and resistance to proteolysis in the animal digestive tract may be effective in the catalytic action of phosphate substrates in the stomach.

5.4.4. Enzyme thermal stability and proteolysis resistance

Purified phytase of *Aspergillus niger* UFV-1 retained more than 90 % activity at 60 °C during 120 h. At 70 °C more than 80 % activity was retained after 72 h with a $t_{1/2}$ = 94.5 h and at 80 °C more than 70 % activity after 4 h with $t_{1/2}$ = 6.2 h (Fig. 4). Several studies have investigated phytase production by different microorganisms. Thermostability and resistance to proteolysis in the animal digestive tracts are considered important and useful criterion for industrial application of phytase (Pandey *et al.*, 2001; Lei *et al.*, 2007). Zhang *et al.* (2010) purified a phytase from *Aspergillus ficcum* NTG-23 that showed total activity loss when maintained at 80 °C for 10 min. The purified phytase of *Aspergillus niger* ATCC 9142 maintained 22 % residual activity after it was maintained for 3 minutes at 80 °C (Casey & Walsh, 2003).

(A)



(B)

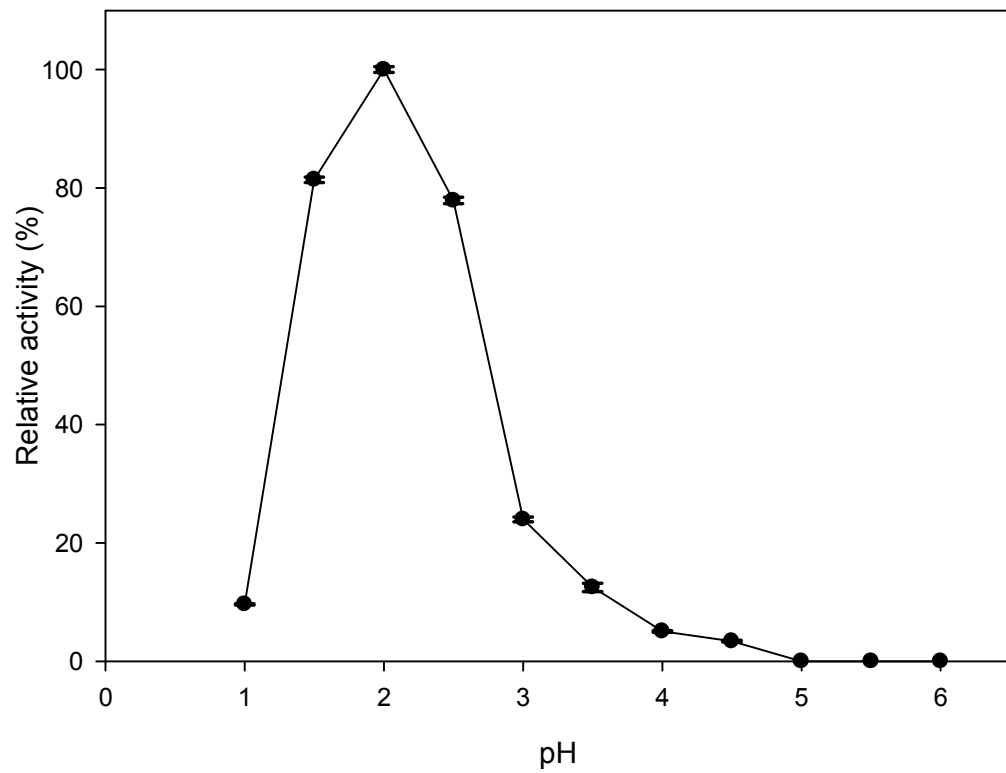


Fig. 3. Effects of pH (A) and temperature (B) on the phytase activity of *Aspergillus niger* UFV-1.

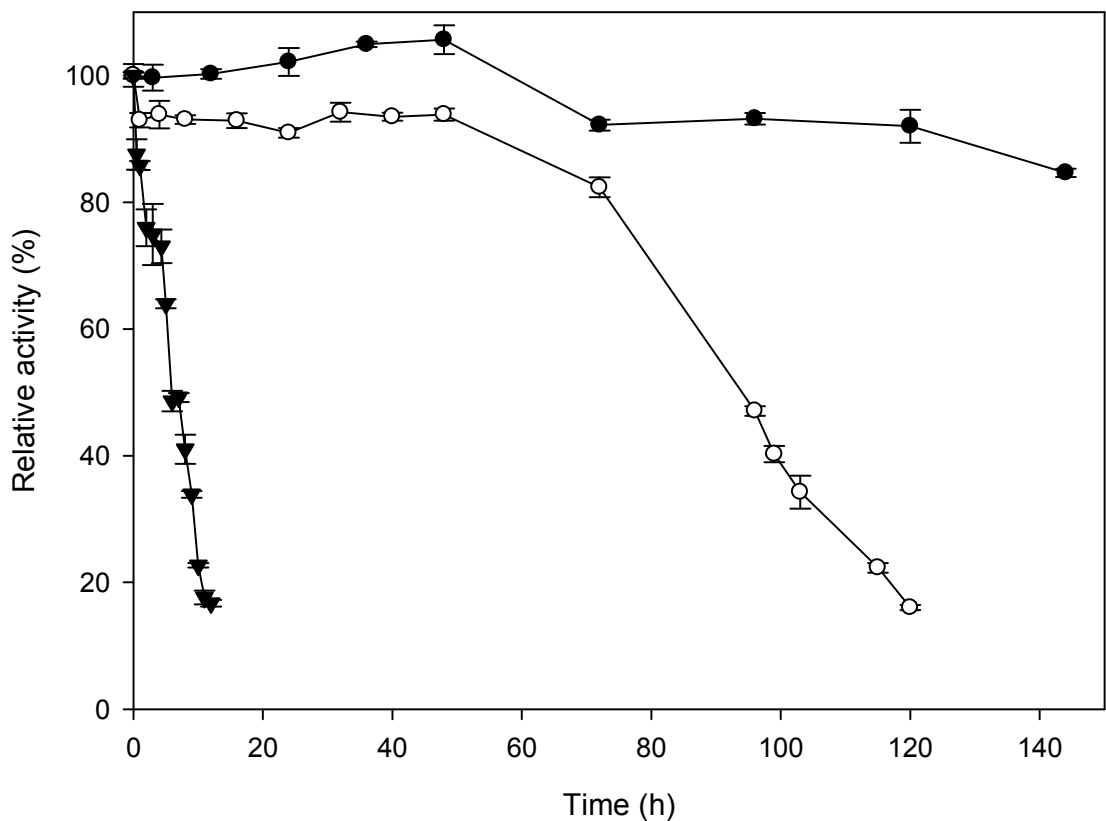


Fig. 4. Thermal stability of the purified *Aspergillus niger* UFV-1 phytase at 60 °C (●), 70 °C (○) and 80 °C (▼).

Purified phytase of *Aspergillus niger* UFV-1 showed high stability toward proteolytic enzymes at the ratio of 1:1 (pepsin or trypsin/phytase, w/w), retaining more than 90 % residual activity for both proteolytic enzymes (Fig. 5) which is similar to results reported by Zhang *et al.* (2010). Moreover, the results presented herein are more effective than the results reported by Fugthong *et al.* (2010), where a recombinant phytase purified of *Eupenicillium parvum* BCC 17694 expressed in *Pichia pastoris* showed low resistance to trypsin for different protease/phytase ratios (1/500, 1/200, 1/100 and 1/50 (w/w)). Wang *et al.* (2007) also evaluated the resistance to proteolysis of a recombinant phytase from *Aspergillus fumigatus* WY-2, which was very sensitive to trypsin and maintained about 30 % of its initial activity at the ratio (trypsin/phytase) of 0.005 (w/w) after 2 h of trypsin digestion. These results combined with its high thermostability suggest that the *Aspergillus niger* UFV-1 phytase has great potential for use in animal feeds.

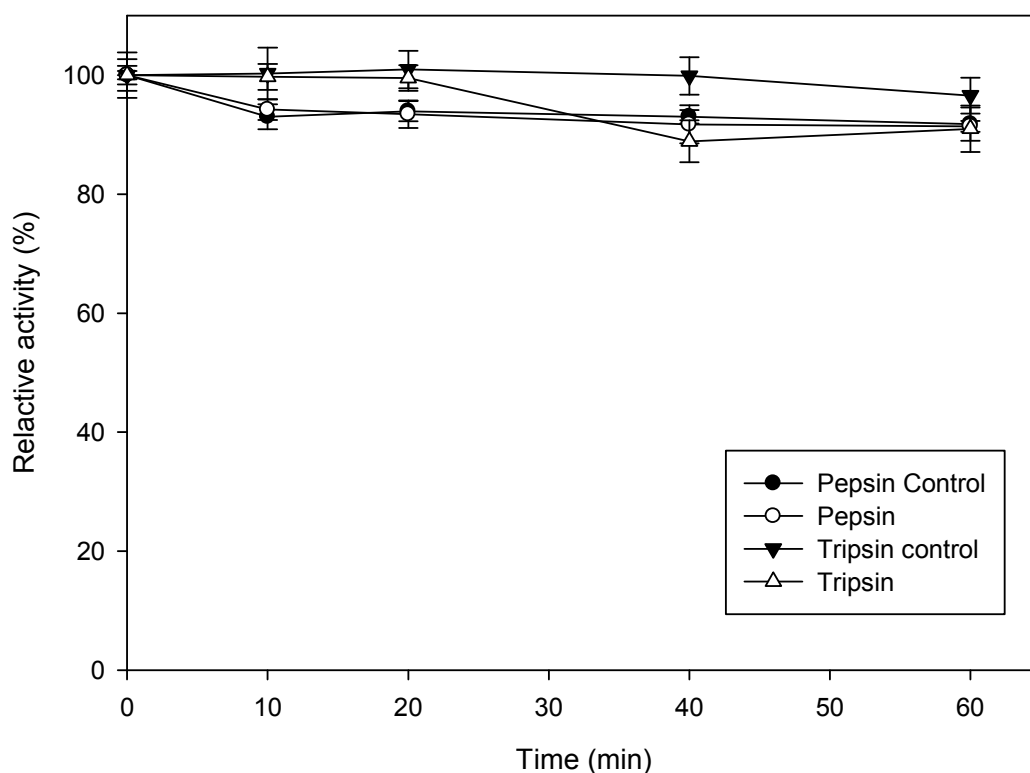


Fig. 5. Proteolysis resistance of the purified *Aspergillus niger* UFV-1 phytase at 37 °C.

5.4.5. Effect of potential effectors

At a concentration of 5 mM, Mg^{2+} , Cd^{2+} and Ca^{2+} ions slightly inhibited the enzymatic activity of phytase while Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} and Na^+ had a moderate inhibitory effect. However, the F^- ion highly inhibited enzyme activity (Table 2). Fluoride is a well-known strong competitive inhibitor of several acid bacterial, fungal and plant phytases (Konietzny & Greiner, 2002). Other than the F^- ion, the other ions evaluated showed to have inhibition effects on enzyme activity at ion concentrations of 10 mM and 20 mM. Metal ions have been shown to modulate phytase activity, but it is difficult to determine whether the inhibitory effect of various metal ions is the result of binding with the enzyme or the formation of little soluble metal ion-phytate complexes. Nevertheless, it is known that most phytases characterized to date are greatly inhibited by Cu^{2+} and Zn^{2+} (Konietzny & Greiner, 2002). Singh & Satyanarayana (2009) reported that the *Sporotrichum thermophile* phytase shows inhibition of 30.0, 12.4, 16.6, 58.2 and 10.5 % when tested in presence of 5 mM of Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}

and Na⁺ ions, respectively. According to Quan *et al.* (2004) a phytase of *Cladosporium* sp. FP-1 was inhibited by 46.0, 45.0, 44.0, 54.0, 39.0 and 34.0 % in presence of 1 mM of Zn²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, K⁺ and Na⁺ ions, respectively.

The enzyme was moderately inhibited by 5 mM of the reducing agents β-mercaptoethanol (35.7 % decrease) and DTT (18.1 % decrease) which is differed from other phytases that were not inhibited by these agents (Quan *et al.*, 2004; Singh & Satyanarayana, 2009). However, Fugthong *et al.* (2010) reported that a phytase of *Eupenicillium parvum* (BCC17694) has a similar inhibitory effect when evaluated in presence of β-mercaptoethanol and DTT at concentrations of 5 mM. This suggested that the sulfhydryl group is involved in the catalytic activity of the enzyme. Most phytases even have a number of cysteine residues, which may be implicated in disulphide bridges as shown in *Aspergillus ficuum* (Kostrewa *et al.*, 1997) and *Escherichia coli* (Lim *et al.*, 2000).

The chelating agent EDTA did not inhibit enzyme activity, suggesting that this enzyme does not require metal ions for its activity. This behavior is similar to that of most phytases except, for example, alkaline phytases of *Bacillus* spp., which are calcium dependent (Oh *et al.*, 2004). EDTA enhanced phytase activity at the concentration of 1-20 mM by about 130 %. Zhang *et al.* (2010) showed that enzyme activity of phytase from *Aspergillus ficcum* NTG-23 was stimulated by EDTA concentrations of 1.25-10 mM, increasing enzyme activity by about 10 %. A similar result was obtained by Vats & Banerjee (2005) who presented that a phytase of *Aspergillus niger* van Teighem was enhanced by EDTA by about 50 % with 0.1-2.0 mM. However, this result differs from others studies where the presence of EDTA at concentrations of 1-5 mM inhibited phytase enzyme activity (Quan *et al.*, 2004; Gulati *et al.*, 2007; Fugthong *et al.*, 2010). Chaotropic agents such as urea and guanidinium hydrochloride inhibited phytase activity (Table 2), particularly guanidinium at 1-2 M concentration. It is suggested that non-covalent forces, such as H-bonds and van der Waals interactions, play a role in maintaining the active conformation of the enzyme (Vats and Banerjee, 2005; Gulati *et al.*, 2007). The anionic detergent SDS, even at low concentrations (Table 2) fully inhibited enzymatic activity. Vats & Banerjee (2005) also reported that *Aspergillus niger* van Teighem phytase was inhibited by SDS at concentration of 0.1 % (v/v), resulting in 92 % loss in enzymatic activity. Anionic detergents can bind to protein and induce structural

changes that appear to inhibit enzymatic activity (Singh & Satyanarayana, 2009).

Table 2
Effect of potential effectors on phytase activity.

Effectors	Relative enzyme activity (%)		
Control	100		
Concentration	5 mM	10 mM	20 mM
MgSO ₄	95.3 ± 1.2	58.1 ± 0.9	28.9 ± 1.0
(CH ₃ COO) ₂ Mg	100.0 ± 0.6	26.6 ± 0.3	24.2 ± 1.5
C ₄ H ₆ CdO ₄	95.5 ± 0.9	59.6 ± 2.5	27.3 ± 0.7
MnSO ₄	74.9 ± 1.5	38.3 ± 1.6	21.4 ± 1.5
CuSO ₄	81.2 ± 0.2	52.8 ± 1.8	18.9 ± 0.5
ZnSO ₄	87.7 ± 2.7	52.2 ± 0.4	30.0 ± 1.1
ZnCl ₂	81.0 ± 2.6	60.9 ± 1.1	38.0 ± 1.1
CaCl ₂	96.3 ± 2.5	85.7 ± 0.5	64.6 ± 2.7
HgCl ₂	75.6 ± 2.4	59.3 ± 1.7	49.8 ± 2.6
NaCl	76.1 ± 1.1	68.0 ± 1.8	51.4 ± 1.1
KCl	101.8 ± 1.4	98.0 ± 1.3	87.5 ± 1.5
Na ₂ SO ₄	76.8 ± 1.2	63.2 ± 0.9	38.4 ± 1.6
NaF	0	0	0
Concentration	1 mM	5 mM	20 mM
EDTA	218.7 ± 0.7	227.2 ± 2.1	234.4 ± 2.5
β-mercaptoethanol	94.9 ± 1.8	64.3 ± 1.6	
DTT	97.5 ± 1.8	81.9 ± 2.0	
Concentration	0,5 M	1 M	2 M
Urea	100.3 ± 2.7	75.8 ± 1.6	63.2 ± 1.8
Guanidine-HCl	42.0 ± 1.8	0	0
Concentration	0.1 % (v/v)	0.5 % (v/v)	
SDS	0	0	

5.4.6. Determination of substrate specificity and kinetic parameters

The purified phytase exhibited broad substrate specificity on a range of phosphorylated compounds (Fig. 6), presenting activity on pNPP, 2-naphthyl phosphate, 1-naphthyl phosphate, and ATP of more than 3-fold greater than enzymatic activity on sodium phytate. *In vitro* experiments with livestock feed suggest that phytate degrading enzymes with broad substrate specificity are better suited for animal nutrition purposes than phytate-degrading enzymes with narrow substrate specificity (Wyss *et al.*, 1999). Several researchers have presented fungal phytases with different substrate specificity. Phytase of *Aspergillus ficum* NTG-23 displayed a broad substrate specificity, with enzyme activity on ATP, fructose-6-phosphate, and pNPP more than 2-fold higher than on sodium phytate (Zhang *et al.*, 2010). Wyss *et al.* (1999) studied the catalytic properties of fungal phytase and showed that *Aspergillus niger* acid phosphatase and *Aspergillus fumigatus* phytase displayed rather broad substrate specificity, while phytases from *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* CBS, *Aspergillus terreus* 9A1 and *Escherichia coli* were more phytic acid specific. Phytase of *Rhizopus oligosporus* showed to have a rather broad substrate specific behavior but were more specific to pNPP phosphate than sodium phytate (Azeke *et al.*, 2011). Similar results were encountered by Casey & Walsh (2004) who showed that *Rhizopus oligosporus* ATCC 22959 phytase displayed rather broad substrate specificity, however it was more specific to phytate than others phosphate compounds.

Upon incubation of the purified phytase with various pNPP concentrations (up to 95.0 mM), the kinetics properties were determined from the Lineweaver-Burk Plot (data not shown). The values of K_M and V_{max} were 30.9 mM and 7.48 $\mu\text{mol}/\text{min}$, respectively. The estimated k_{cat} of the enzyme was $1.46 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ and catalytic efficiency (k_{cat}/K_M) was $4724919 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$. The enzymatic hydrolysis presented classical Michaelis-Menten kinetics, whereas relatively low K_M values have been reported for phytate-degrading enzymes from *Aspergillus niger* (10-40 μM), *Aspergillus terreus* (11-23 μM), *Aspergillus fumigatus* (<10 μM), *Schwanniomyces castelli* (38 μM), *Klebsiella aerogenes* (62 μM), cattail pollen (17 μM), maize root (24-43 μM), tomato root (38 μM), oat (30 μM), wheat bran (PHY1: 48 μM , PHY2: 77 μM), barley (P1: 72 μM), soybean (48-61 μM), and lupine (L11: 80 μM) (Konietzny & Greiner, 2002; Bohn *et al.*, 2008).

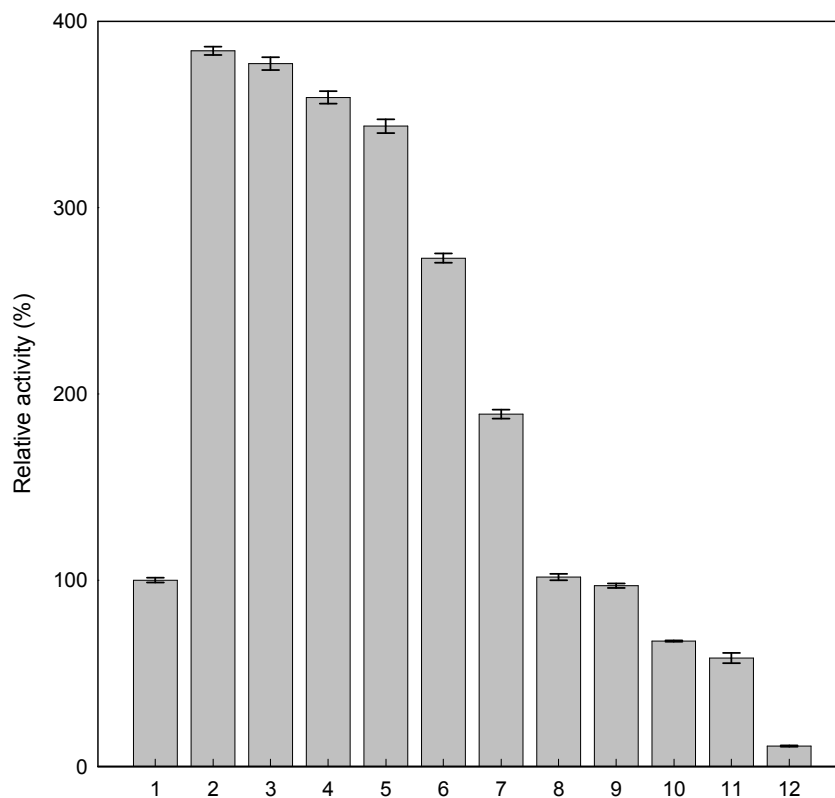


Fig. 6. Substrate specificity of *Aspergillus niger* UFV-1 phytase. 1, sodium phytate; 2, p-nitrophenyl phosphate (pNPP); 3, 2-naphthyl phosphate; 4, 1-naphthyl phosphate; 5, adenosine triphosphate (ATP); 6, Phenyl phosphate; 7, Glucose 6-phosphate; 8, adenosine diphosphate (ADP); 9, Calcium phytate; 10, Glycerol 2-phosphate; 11, Glucose 1-phosphate; 12, adenosine monophosphate (AMP).

5.4.7. Evaluation of phytate hydrolysis in livestock feed

The crude phytase extract was able to effectively hydrolyze phytate and others phosphate compounds in the animal feed tested. After 2 ½ h, 15.3 µmol phosphate/mL had already been liberated and this approximate rate was maintained until 8 h (Fig. 7). Concerning the amount of phosphorus released in a short time, this result is very significant. Vats *et al.* (2009) studied the dephosphorylation of phytic acid in livestock feed using phytase from *Aspergillus niger* van Teighem and obtained a maximum liberation of 48 nmol phosphate/mL at 55 °C after 48 h.

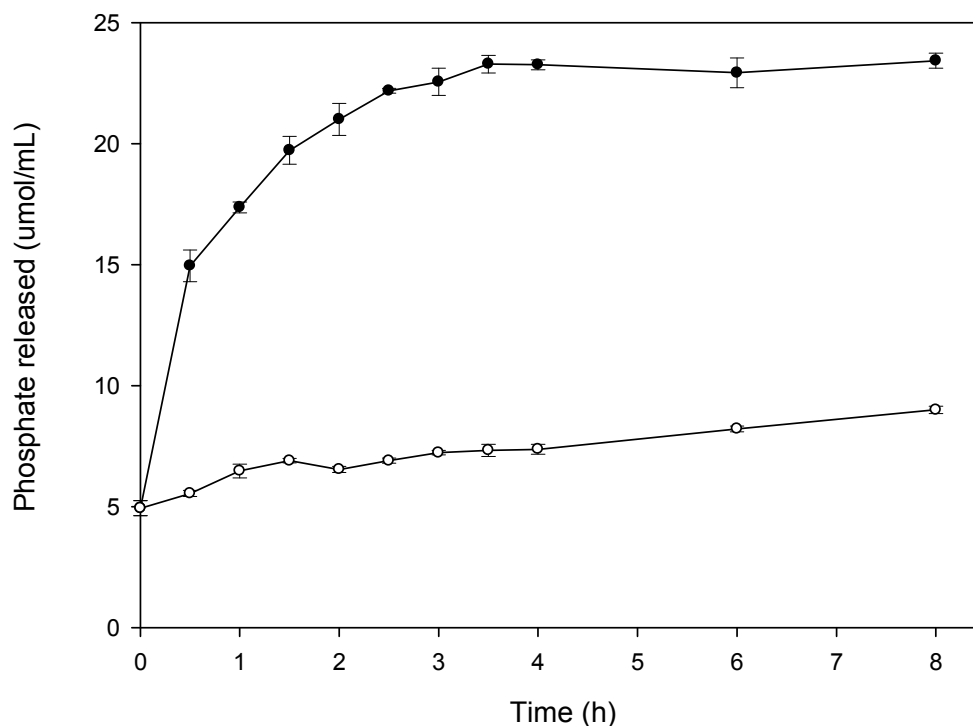


Fig. 7 Phosphate released from commercial livestock feed at 50 °C with phytase (●) and control (o).

5.5. Conclusion

Phytase of *Aspergillus niger* UFV-1 is a thermostable and acid stable phosphatase. The enzyme showed low optimal pH of 2.0, a broad substrate specificity, and strong pepsin and trypsin resistance. Acid phosphatase has been shown to be of fundamental importance in feed phytate dephosphorylation. The *Aspergillus niger* UFV-1 phytase was able to effectively hydrolyze phytate and others phosphate compounds in animal feed. Its high ability to hydrolyze phytate in acidic conditions, as well as its high resistance to proteolytic enzymes, suggests that it is effective in the release of phytic phosphorus in the animal digestive tract. Additionally, its high thermostability suggests that the enzyme is suitable for industrial use since high temperatures are usually encountered in the animal feed industrial process. Due to the features displayed, this phytase is a promising enzyme for use in animal feed.

5.6. References

- Azeke, M. A., Greiner, R., Jany, K.-D., 2011. Purification and characterization of two intracellular phytases from the tempeh fungus *Rhizopus oligosporus*. *J. Food Biochem.*, 35, 213-227.
- Bohn, L., Meyer, A., Rasmussen, S., 2008. Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *J. Zhejiang Univ.-Sc. B*, 9, 165-191.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- Casey, A., Walsh, G., 2003. Purification and characterization of extracellular phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142. *Bioresour. Technol.*, 86, 183-188.
- Casey, A., Walsh, G., 2004. Identification and characterization of a phytase of potential commercial interest. *J. Biotechnol.*, 110, 313-322.
- Cheryan, M., 1980. Phytic acid interactions in food systems. *Crit. Rev. Food Sci.*, 13, 297-336.
- Fugthong, A., Boonyapakron, K., Sornlek, W., Tanapongpipat, S., Eurwilaichitr, L., Pootanakit, K., 2010. Biochemical characterization and in vitro digestibility assay of *Eupenicillium parvum* (BCC17694) phytase expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Express. Purif.*, 70, 60-67.
- Greiner, R., Silva, L., G., Couri, S., 2009. Purification and characterization of an extracellular phytase from *Aspergillus niger* 11T53A9. *Braz. J. Microbiol.*, 40, 795-807.
- Gulati, H. K., Chadha, B. S., Saini, H. S., 2007. Production, purification and characterization of thermostable phytase from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* TL-7. *Acta Microbiol. Imm. H.*, 54(2), 121-138.
- Gunashree, B., Venkateswaran, G., 2008. Effect of different cultural conditions for phytase production by *Aspergillus niger* CFR 335 in submerged and solid-state fermentations. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 35, 1587-1596.
- Konietzny, U., Greiner, R., 2002. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). *Int. J. Food Sci Tech.*, 37, 791-812.
- Kostrewa, D., Gruninger-Leitch, F., D'Arcy, A., Broger, C., Mitchell, D. B., van Loon, A. P. G. M., 1997. Crystal structure of phytase from *Aspergillus ficuum* at 2.5 Å resolution. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 4(3), 185-190.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

- 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: *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, a *Ceriporia* sp., and *Trametes pubescens*. *Appl. Environ. Microb.*, 67(10), 4701-4707.
- Lei, X. G., Porres, J. M., Mullaney, E. J., Brinch-Pedersen, H., 2007. Phytase: Source, Structure and Application, in: Polaina, J., MacCabe, A. P. (Eds.), *Industrial enzyme - Structure, Function and applications*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 505-530.
- Lei, X.G., Porres, J.M., 2003. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. *Biotechnol. Lett.*, 25, 1787-1794.
- Lim, D., Golovan, S., Fosberg, C. W., Jia, Z., 2000. Crystal structures of *Escherichia coli* phytase and its complex with phytate. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 7(2), 108-113.
- Nagashima, T., Tange, T., Anazawa, H., 1999. Dephosphorylation of phytase by using the *Aspergillus niger* phytase with a high affinity for phytate. *Appl. Environ. Microb.*, 65, 4682-4684.
- Oh, B., Choi, W., Park, S., Kim, Y., Oh, T., 2004. Biochemical properties and structure specificities of alkaline and histidine aci phytases. *Appl. Microbiol. Biot.* 63, 362-372.
- Quan, C., Tian, W., Fan, S., Kikuchi, J., 2004. Purification and properties of a low-molecular-weight phytase from *Cladosporium* sp. FP-1. *J. Biosci. Bioeng.*, 97(4), 260-266.
- Reddy, N.R., Sathe, S.K., Salunkhe, D.K., 1982. Phytases in legumes and cereals. *Adv. Food Res.*, 28, 1-92.
- Singh, B., Satyanarayana, T., 2009. Characterization of a HAP-phytase from a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile*. *Bioresource Technol.*, 100, 6, 2046-2051.
- Taussky, H.H., Shorr, E., 1953. A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 202, 675- 685.
- Ullah, A. H., Cummins, B. J., 1987. Purification, N-terminal amino acid sequence and characterization of pH 2.5 optimum acid phosphatase (E.C. 3.1.3.2) from *Aspergillus ficuum*. *Prep. Biochem.*, 17(2), 397-422.
- Vats, P., Banerjee, U.C., 2005. Biochemical characterization of extracellular phytase (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase) from hyper-producing strain of *Aspergillus niger* van Teighem. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 32(4), 141-147.
- Vats, P., Bhushan, B., Banerjee, U.C., 2009. Studies on the dephosphorylation of phytic acid in livestock feed using phytase from *Aspergillus niger* van Teighem. *Bioresource Technol.*, 100, 287-291.

- 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. *Curr. Microbiol.*, 55, 65-70.
- Wyss, M., Brugger, R., Kronenberger, A., Rémy, R., Fimbel, R., Oesterhelt, G., Lehmann, M., van Loon, A. P. G. M., 1999. Biochemical Characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): Catalytic properties. *Appl. Environ. Microb.*, 367-373.
- 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 Technol.* 101, 4125-4131.

6. Conclusões Gerais

Neste trabalho foi proposto o isolamento de fungos produtores de fitases, a caracterização bioquímica e cinética das enzimas, bem como a avaliação da hidrólise enzimática de fitato em ração animal.

O fungo *Rhizopus stolonifer* obtido a partir da macadâmia foi inoculado em meio líquido para a produção de fitases. O uso da metodologia de superfície de resposta (MSR) resultou em aumento de nove vezes a atividade enzimática inicial.

A fitase de *Rhizopus stolonifer* apresentou pH e temperatura ótimas na faixa de 5,0-5,5 e 65 °C, respectivamente, com $t_{1/2}$ de 50 minutos a 50 °C. Na hidrólise de fitato em ração animal, a enzima foi eficiente, liberando 5,14 $\mu\text{mol PO}_4^{3-}/\text{mL}$ após 5 horas de tratamento.

O fungo *Aspergillus niger* UFV-1, isolado de bagaço de cana-de-açúcar, também foi cultivado em meio líquido. A enzima purificada apresentou pH ótimo igual a 2,0 e elevada termoestabilidade, com $t_{1/2}$ de 6,2 horas a 80 °C. Além disso, a fitase foi resistente a pepsina e tripsina e foi eficiente na hidrólise de fitato em ração animal, liberando 10,5 $\mu\text{mol de PO}_4^{3-}/\text{mL}$ após 2 horas de tratamento.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que as fitases de *Rhizopus stolonifer* e de *Aspergillus niger* UFV-1 apresentam elevado potencial para aplicação em rações animais.