UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

GISLENE FERREIRA

Clonagem, expressão e caracterização de fitase do fungo termofílico
Myceliophthora thermophila

LORENA
2019

GISLENE FERREIRA

Clonagem, expressão e caracterização de fitase do fungo termofílico
Myceliophthora thermophila

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de concentração de Microbiologia Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Fernando Segato

Versão Corrigida

Lorena

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ferreira, Gislene

Clonagem, expressão e caracterização de fitase do
fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* /
Gislene Ferreira; orientador Fernando Segato -
Versão Corrigida. - Lorena, 2019.
128 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de
Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo. 2019

1. Fitases. 2. Fungos termofílicos. 3.
Myceliophthora thermophila. 4. Expressão heteróloga.
I. Título. II. Segato, Fernando , orient.

Dedico essa tese a mulher da minha vida,
minha inspiração e base de tudo, minha mãe
e ao meu pai, que mesmo partindo tão cedo,
sempre foi meu maior incentivo.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo e todos, agradeço a Deus, por ter me direcionado pra esse caminho, pelo propósito que somente Ele irá apontar;

Ao meu orientador, prof. Dr. Fernando Segato, por toda paciência, sabedoria e alegria compartilhados durante esses quatro anos e principalmente, por sempre manter o lado humano acima de qualquer interesse;

A toda minha família, em especial, à minha mãe, por sempre acreditar em mim, mesmo quando eu já não acreditava, aos meus sobrinhos, irmãos e cunhados, por todo apoio e alegria nos raros momentos em que nos encontrávamos;

Aos meus companheiros e amigos de laboratório, Aline, Bruno, Awana, Bianca, Josman e meninos da iniciação científica e agregados, por toda ajuda oferecida, conhecimentos compartilhados, gargalhadas nos momentos mais difíceis e principalmente, por me aceitarem como mais uma no time, dentro e fora do laboratório, independente das diferenças;

Aos grandes e verdadeiros amigos conquistados durante essa jornada, em especial, Evandro Mulinari, por todo ensinamento e ajuda, pela companhia nos filmes de terror, risadas e confidências compartilhadas e Marcelo Holanda, por sempre estar presente nos momentos em que mais precisei, sempre me ajudando com muita paciência, mesmo diante de minha frequente chatice;

Às minhas pequenas, Nega e Nina, por serem as companheiras mais fieis e amorosas durante todo esse tempo, aguentando meus momentos de impaciência e desespero, mas nem por isso, deixando de me amar;

Ao meu namorado Nelson, que não acompanhou o desespero das piores fases do início, mas aguentou com muito carinho e paciência essa etapa afinal;

À Maura, que me acompanha há muito tempo, participando dos altos e baixos e tomando conta das meninas na hora que apertava por aqui;

Ao técnico de laboratório Zé “Cobrinha”, por estar sempre de bom humor e transmitir essa alegria ao chegar no laboratório, fornecendo apelidos a todos sem perdão e principalmente, pela doação da ração;

À Universidade de São Paulo e ao Departamento de Biotecnologia, pela oportunidade de desenvolver esse trabalho;

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESP, pelo incentivo financeiro;

Enfim, agradeço a todos, amigos, colegas, famílias, professores, funcionários, que de alguma forma contribuíram para eu chegar até essa etapa. Muito obrigada!

RESUMO

FERREIRA, G. **Clonagem, expressão e caracterização de fitase do fungo termofílico *Myceliophthora thermophila***. 2019. 128p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

Fitases são enzimas que hidrolisam o ácido fítico, substâncias orgânicas complexas amplamente encontradas na natureza, principalmente em cereais e leguminosas. Nesses alimentos vegetais, o fitato é a principal fonte de fósforo, correspondendo entre cinquenta a oitenta por cento do conteúdo de fósforo orgânico. Entretanto, o fósforo do fitato é muito pouco utilizado por humanos e outros animais monogástricos, como suínos e aves, devido à ausência ou insuficiência das enzimas que o degradam. Assim, rações contêm o fósforo orgânico do fitato e fósforo inorgânico adicionado, que é um mineral caro e não renovável. Em áreas de criação intensiva o excesso de fósforo é excretado no ambiente, causando problemas, tais como a eutrofização. Devido aos problemas ambientais e ao alto custo do fósforo inorgânico, a suplementação de enzimas, principalmente fitases, tem ganhado destaque, entre elas, as enzimas fúngicas, devido a sua estabilidade a diferentes temperaturas e pH. Além disso, técnicas de engenharia genética permitem a transferência de genes entre espécies, resultando em muitos benefícios, principalmente em relação ao aumento e melhoramento na produção de enzimas industriais. O objetivo deste trabalho foi realizar a clonagem, expressão heteróloga, purificação e caracterização bioquímica da enzima fitase (*MtPhy*) obtida a partir do fungo termofílico *M. thermophila*. O gene que codifica a enzima foi clonado no vetor pEXPYR e heterologamente expresso em *A. nidulans*. A proteína recombinante foi purificada e teve sua identidade confirmada por espectrometria de massas. Nas análises bioquímicas, apresentou pH ótimo de 5,0 e temperatura ótima de 60°C e manteve praticamente 100% de sua atividade a 50°C por 2 horas e pela análise de dicroísmo circular e ThermoFluor, apresentou desenovelamento de sua estrutura nas temperaturas de 63 e 67°C, respectivamente. Demonstrou atividade aumentada na presença de CaCl₂ e MgCl₂ e foi fortemente inibida por FeCl₃, CuSO₃ e SDS. Sua atividade específica (954,8 U/mg) utilizando fitato de sódio foi bastante superior a de outras fitases descritas na literatura. Demonstrou-se efetiva na liberação do fósforo em rações e extremamente resistente às proteases, tripsina e pepsina, presentes no trato digestório de animais monogástricos, demonstrando dessa forma, seu elevado potencial para aplicação industrial.

Palavras-chave: Fitases. Fungos termofílicos. *Myceliophthora thermophila*. Expressão heteróloga.

ABSTRACT

FERREIRA, G. **Cloning, expression and characterization of phytase produced by thermophilic fungus *Myceliophthora thermophyla***. 2019. 128p. Thesis (Doctoral of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

Phytases are enzymes that hydrolyse phytic acid, which are complex organic substances, found widely in nature mainly in cereals and legumes. In plants, the phytate are the main source of phosphorus. It accounts for fifty to eighty percent of the total organic phosphorus. However, the phytate phosphorus is very poorly used by humans and other animals, such as swines and poultry due to the absence or insufficiency of enzymes that degrade phytate. Thus, animal feed contains phytate organic phosphorus and inorganic phosphorus added, which is an expensive and not renewable mineral and in areas of intensive breeding, the excess phosphorus is excreted in the environment, causing problems, such as, eutrophication. Due to environmental problems and the high price of inorganic phosphorus, the enzyme supplementation, mainly phytases, has been growing, among them, fungal enzymes, because of their stability at different temperatures and pH. In addition, genetic engineering techniques allow the transfer of genes between species, resulting in many benefits, mainly in relation to the increase and improvement in the production of industrial enzymes. The aim of this work was to perform the cloning, heterologous expression, purification and biochemical characterization of the phytase enzyme (*MtPhy*) obtained from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila*. The gene encoding this enzyme was cloned and heterologously expressed in *A. nidulans* A773, the *MtPhy* was purified and had its identity confirmed by mass spectrometry. In the biochemical analysis the *MtPhy* showed an optimum pH of 5.0 and optimum temperature of 60°, maintaining practically 100% of its activity at 50°C for 2 hours. The circular dichroism and ThermoFluor analysis showed a denaturation of its structure at temperatures of 63 and 67°C, respectively. The activity of *MtPhy* was increased in the presence of CaCl₂ and MgCl₂ and was highly affected by FeCl₃, CuSO₃ and SDS. The specific activity (954,8 U/mg) in sodium phytate was far superior to other phytases described in literature. It was effective in release of phosphorus in animal feed and extremely resistant to proteases, trypsin and pepsin, present in the digestive tract of monogastric animals, thus proving high potential for industrial application.

Keywords: Phytases. Thermophilic fungal. *Myceliophthora thermophila*. Heterologous expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do ácido fítico.....	21
Figura 2 - Principais ligantes do ácido fítico formando o fitato.....	24
Figura 3 - Ação da fitase sobre o ácido fítico.....	28
Figura 4 – Hidrólise do fitato pela fitase, em inositol e fosfato, liberando micronutrientes, proteínas e amido.....	29
Figura 5 - Vetor <i>pEXPYR</i> para clonagem e expressão de proteínas em <i>A. nidulans</i>	50
Figura 6 – Análise da sequência de aminoácidos da fitase de <i>M. thermophila</i> pelo servidor SignalP 4.1.....	67
Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando o produto de PCR após amplificação do gene de interesse.....	69
Figura 8 - Etapas de amplificação e clonagem envolvendo a metodologia de <i>Gibson Assembly</i>	70
Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose 1%, mostrando amplificação do gene da fitase de <i>M. thermophila</i> , após PCR de colônia.....	71
Figura 10 – Eletroforese em SDS-PAGE 15% mostrando o perfil protéico dos extratos obtidos após cultivo por 48 h de 8 colônias transformantes de <i>A. nidulans</i> A773, contendo o gene <i>MtPhy</i>	73
Figura 11 - Análise por LC-MS/MS realizada com peptídeos gerados após digestão com tripsina da <i>MtPhy</i>	74
Figura 12 – SDS-PAGE 15% das frações obtidas na cromatografia de troca iônica.....	75
Figura 13 – Gel SDS-PAGE 15% das frações que apresentaram pico na cromatografia de exclusão por tamanho.....	76
Figura 14 – Gráfico obtido pela análise de <i>ThermoFluor</i> , com as Tm da <i>MtPhy</i> de acordo com diferentes condições tamponantes.....	78
Figura 15 – Espectros de dicroísmo circular, determinando a fração desenhovelada da <i>MtPhy</i> e sua Tm em três diferentes tampões, no comprimento de onda 222 nm.....	81
Figura 16 – Espectro de dicroísmo circular da enzima <i>MtPhy</i> no intervalo de comprimento de onda de 195 a 270 nm, com tampão acetato de sódio (50 mM).....	82
Figura 17 – Espectro de dicroísmo circular da enzima <i>MtPhy</i> no intervalo de comprimento de onda de 195 a 270 nm, com tampão fosfato de potássio (50mM).....	83
Figura 18 – Espectro de dicroísmo circular da enzima <i>MtPhy</i> no intervalo de comprimento de onda de 195 a 270 nm, com tampão fosfato de potássio (50mM), acrescido de 300 mM de NaCl.....	83
Figura 19 – Modelo de estrutura tridimensional da <i>MtPhy</i> , obtido pela ferramenta I-TASSER.....	84
Figura 20 - Geis de SDS-PAGE das diferentes condições de cultivo para secreção de <i>MtPhy</i> , em diferentes tempos, com e sem agitação.....	85
Figura 21 – Nova purificação da <i>MtPhy</i> após cultivo de 72 horas.....	86
Figura 22 – Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática da <i>MtPhy</i>	88
Figura 23 – Trato digestório de um suíno e seus diferentes valores de pH.....	90

Figura 24 – Estabilidade térmica da <i>MtPhy</i> em diferentes temperaturas e tempo.	91
Figura 25 – Íons ativadores da atividade da fitase em duas diferentes concentrações	94
Figura 26 – Especificidade da <i>MtPhy</i> em diferentes substratos	100
Figura 27 – Curva de liberação do produto da reação	101
Figura 28 – Velocidade da reação enzimática de <i>MtPhy</i> em relação à concentração do substrato (Michaelis-Menten)	102
Figura 29 – Ensaio <i>in vitro</i> de ação da <i>MtPhy</i> em ração a base de milho	104
Figura 30 – Ensaio <i>in vitro</i> de ação da <i>MtPhy</i> em ração comercial	105
Figura 31 – Resistência da <i>MtPhy</i> à proteólise pelas enzimas pepsina e tripsina em 37°C	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Conteúdo de ácido fítico, fósforo total, e fósforo ligado ao inositol em alguns cereais, leguminosas, oleaginosas e castanhas.....	23
Tabela 2 - Algumas fitases microbianas comercialmente disponíveis no mercado.	30
Tabela 3 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação do gene da fitase de <i>M. thermophila</i> (<i>MtPhy</i>)	48
Tabela 4 - Condições utilizadas nos ciclos e reações de PCR.	49
Tabela 5 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação do vetor <i>pEXPYR</i>	50
Tabela 6 – Condições utilizadas nos ciclos e reações de PCR de colônia	52
Tabela 7 – Tampões utilizados para avaliar <i>MtPhy</i> pela técnica de <i>ThermoFluor</i>	59
Tabela 8 - Massa molar, ponto isoelétrico, coeficiente de extinção molar e número de aminoácidos estimado para a fitase de <i>M. thermophila</i> (<i>MtPhy</i>).....	68
Tabela 9 – Diferentes tampões, em diferentes pHs, com ou sem adição de NaCl e temperatura de <i>Melting</i> apresentada pela enzima <i>MtPhy</i> em cada condição	79
Tabela 10 – Efeito de vários compostos iônicos na atividade enzimática da <i>MtPhy</i>	93
Tabela 11 – Efeito de outros aditivos na atividade da fitase	96
Tabela 12 – Parâmetros cinéticos determinados para a enzima <i>MtPhy</i>	102

LISTA DE ABREVIATURAS

ε	Coeficiente de extinção molar
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CD	Dicroísmo Circular
dNTP	Deoxi ribonucleotídeo trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAg	DNA genômico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSPS	<i>Double Strength Protoplasting Solution</i>
DTT	Ditiotreitol
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
5-FOA	5-Fluoroorotic acid
GA	<i>Gibson Assembly</i>
GE	<i>General Electric</i>
HCl	Ácido clorídrico
HAP	Fosfatase histidina ácida
JGI	<i>Joint Genome Institute</i>
Kcat	<i>Turn over number</i>
kDa	Kilo Dalton
Km	Constante de Michaelis-Menten
LB	Luria-Bertani (meio de cultura)
LC MS/MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
L	Litro
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MM	Meio mínimo (meio de cultura)
MW	Massa molar
m/v	Massa/volume
MPa	Mega Pascal
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
<i>MtPhy</i>	Enzima fitase de <i>Myceliophthora thermophila</i>
<i>Mtphy</i>	Gene codificante da enzima <i>MtPhy</i> do fungo <i>M. thermophila</i>
<i>MtPhy + Xyl</i>	Enzima fitase de <i>M. thermophila</i> + xilanase
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NaCl	Cloreto de sódio
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEG	Polietilenoglicol
pl	Ponto isoelétrico
<i>pyrG</i>	gene que codifica a orotidina-5'-monofosfato descarboxilase de <i>A. niger</i>
<i>pEXPYR</i>	Vetor utilizado para clonagem e expressão de proteínas em <i>A. nidulans</i>

PMSF	Fluoreto de fenilmetilsufonil
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel</i>
<i>Electrophoresis</i>	
SOC	<i>Super Optimal Broth</i>
STC	<i>Sorbitol Tris Calcium Solution</i>
TAE	Tris, Ácido acético, EDTA
TCA	Ácido tricloacético
Tm	Temperatura de <i>Melting</i>
T5	Enzima 5'-T5-exonuclease
U/kg	Unidades da enzima/quilo de ração
U	Atividade enzimática
v/v	Volume/volume
µg	Micrograma
µL	Microlitro
TRIS	Tris (<i>hydroxymethyl</i>)aminomethane

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Fósforo	19
2.2 Ácido fítico	20
2.2.1 Nomenclatura do ácido fítico	21
2.2.2 Fontes de fitato	21
2.2.3 Efeitos prejudiciais do fitato	23
2.2.4 Efeitos benéficos do fitato	25
2.2.5 Problemas ambientais	27
2.3 Fitases	28
2.3.1 Histórico das fitases	29
2.3.2 Classificação das fitases	30
2.3.3 Aplicações das fitases	33
2.3.4 Fontes de fitases	35
2.3.5 Fatores que influenciam a atividade das fitases	38
2.4 Fungos termofílicos	42
2.5 Clonagem e expressão heteróloga	43
3 OBJETIVOS	46
3.1 Objetivo geral	46
3.2 Objetivos específicos	46
4 MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 Linhagens	47
4.2 Seleção das sequências gênicas da fitase de <i>M. thermophila</i>	47
4.3 Construção dos oligonucleotídeos (<i>primers</i>) de interesse	47
4.4 Extração de DNA genômico (DNAg) de <i>M. thermophila</i>	48
4.5 Amplificação do gene que codifica a <i>MtPhy</i> e do vetor <i>pEXPYR</i>	49
4.6 Inserção do gene de Interesse no vetor	50
4.7 Transformação de <i>E. coli</i> quimiocompetentes	51
4.8 PCR de colônia	52
4.9 Purificação do DNA plasmidial	53
4.10 Transformação em <i>A. nidulans</i> A773	53
4.10.1 Obtenção de protoplastos	53
4.10.2 Transformação dos protoplastos mediada por PEG	54

4.10.3 <i>Screening</i> e seleção dos transformantes	55
4.11 Análise por espectrometria de massas	55
4.12 Produção e purificação da enzima	56
4.12.1 Cromatografia de troca iônica e de exclusão por tamanho	57
4.13 Determinação da concentração da fitase e atividade enzimática.....	57
4.14 Estabilidade térmica da <i>MtPhy</i> por <i>ThermoFluor</i>	58
4.15 Espectroscopia de Dicroísmo circular.....	60
4.16 Determinação da melhor condição de expressão.....	61
4.17 Caracterização bioquímica da fitase	62
4.17.1 Determinação de temperatura e pH ótimos	62
4.17.2 Estabilidade térmica.....	63
4.17.3 Efeitos de compostos iônicos e outros aditivos sobre a atividade da fitase	63
4.17.4 Determinação da especificidade ao substrato	64
4.17.5 Determinação dos parâmetros cinéticos.....	64
4.18 Hidrólise <i>in vitro</i> em ração comercial para aves.....	65
4.19 Resistência à proteólise.....	66
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1 Seleção da sequência proteica.....	67
5.2 Construção dos <i>primers</i> e clonagem dos genes	68
5.3 Transformação bacteriana e PCR de colônia.....	69
5.4 Transformação em <i>A. nidulans</i> A773 e <i>screening</i> dos transformantes...	71
5.5 Espectrometria de massas	73
5.6 Purificação de fitase de <i>A. nidulans</i> recombinante	74
5.7 <i>ThermoFluor</i>	77
5.8 Dicroísmo circular (CD).....	80
5.10 Determinação de temperatura e pH ótimos.....	87
5.11 Efeitos de compostos iônicos e outros aditivos sobre a atividade da fitase	92
5.13 Determinação da especificidade ao substrato.....	99
5.14 Parâmetros cinéticos da <i>MtPhy</i>	101
5.15 Hidrólise <i>in vitro</i> em rações para aves	103
5.16 Resistência à proteólise.....	105
6 CONCLUSÕES	108
REFERÊNCIAS	109

1 INTRODUÇÃO

O fósforo é um dos mais importantes macronutrientes das células vivas, envolvido em numerosos processos celulares, sendo considerado essencial para o crescimento, desenvolvimento e metabolismo de todos os organismos vivos (SULEIMANOVA *et al.*, 2015; EMMENES *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2018; VILLAMIZAR, *et al.*, 2019a; VERARDI *et al.*, 2019).

No entanto, sua disponibilidade na natureza é limitada, uma vez que grande parte deste mineral se encontra ligada ao ácido fítico, que dificulta sua utilização (AGUILAR, ZEA, VILCHEZ, 2018; CHHABRA, 2019) e de vários outros minerais, para os animais monogástricos que não possuem ou apresentam baixa quantidade de enzimas que o hidrolisam, afetando assim, a qualidade nutricional dos alimentos. Por esse motivo, o ácido fítico é conhecido como um importante “fator antinutricional” (SINGH, JOSHI, GUPTA, 2013; SAVITA *et al.*, 2017; VASUDEVAN *et al.*, 2019).

O ácido fítico, um grupo complexo de componentes naturais, encontrado em plantas e no solo (ROSTAMI; GIRI, 2013; MITTAL *et al.*, 2013), é considerado a maior forma de armazenamento do fósforo nos alimentos vegetais (cerca de 50 a 80%), especialmente os cereais e leguminosas (FARHADI *et al.*, 2019; SHARIDEH *et al.*, 2019; VASUDEVAN *et al.*, 2019), principais ingredientes das rações para aves e suínos (WANG *et al.*, 2018; VASUDEVAN *et al.*, 2019).

Dessa forma, alimentos e rações a base de grãos e cereais contêm uma parte do fósforo presente em sua composição orgânica ligado ao ácido fítico, sendo este excretado no ambiente (VIER *et al.*, 2018a), resultando na necessidade de suplementar suas dietas com fósforo inorgânico, a fim de alcançar as recomendações dietéticas deste nutriente (ARREDONDO *et al.*, 2019). Como consequência ao alto nível de fósforo excretado no solo e mananciais, ocorre um aumento no índice de poluição ambiental em áreas de criação intensiva de aves e suínos, resultando na morte de muitas espécies aquáticas (VILLAMIZAR *et al.*, 2019b; VIDYASAGAR *et al.*, 2019).

Assim, problemas ambientais, aliadas a aspectos econômicos, vêm impulsionando a investigação de estratégias para reduzir a suplementação de minerais inorgânicos em rações animais, bem como a excreção do fósforo não absorvido na natureza (VIDYASAGAR *et al.*, 2019). Dentre as principais

estratégias, destaca-se a utilização de enzimas exógenas, como as fitases, para melhorar a digestão do ácido fítico e, consequentemente, a liberação e absorção do fósforo, (ABBASI *et al.*, 2019). As fitases são enzimas que hidrolisam o ácido fítico, liberando o fósforo e minerais associados, permitindo sua absorção em animais monogástricos (AJITH *et al.*, 2018; ABBASI *et al.*, 2019).

Apesar destas enzimas serem amplamente produzidas na natureza e encontradas em plantas, animais e microrganismos (SINGH, JOSHI, GUPTA, 2013; AJITH *et al.*, 2019), análises de fitases de diferentes origens mostraram eficiência superior das enzimas microbianas em relação às demais fontes (SATO, 2015). Fitases produzidas por fungos filamentosos têm recebido atenção especial, por serem de natureza extracelular, ao contrário das fitases bacterianas e de leveduras, que são intracelulares (SINGH, SATYANARAYANA, 2011).

Fungos termofílicos são microrganismos que crescem em altas temperaturas, cujas enzimas extracelulares podem ser ativas e estáveis sob condições de temperaturas superiores às enzimas produzidas por fungos mesofílicos, mostrando estabilidade em temperaturas próximas de 70 a 80°C, fornecendo dessa forma, vantagens econômicas na aplicação industrial (SINGH, 2016; WANG *et al.*, 2015).

Dessa forma, considerando o aumento na produção de ração animal nas últimas décadas e a baixa disponibilidade do fósforo nos cereais e leguminosas, presentes nas rações, levando à necessidade de adição de fósforo inorgânico, que pode aumentar os custos de produção, além de contribuir para a contaminação ambiental, faz-se necessário estudar alternativas para o aproveitamento do fósforo naturalmente disponível nestes alimentos, através da produção e extração de enzimas fitases por fungos termofílicos, cuja estabilidade em altas temperaturas, pode possibilitar um maior tempo de armazenamento e reação, resultando em menores custos no produto final.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fósforo

O fósforo encontra-se entre os elementos químicos mais abundantes da natureza e um importante macroelemento das células vivas. É um componente essencial de moléculas importantes como, a adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP), glicose-6-fosfato, entre outras, que participam de reações específicas nos sistemas biológicos, estando envolvidas no crescimento, divisão e metabolismo das células (ARIF *et al.*, 2018; DIPTA *et al.*, 2019, FERNÁNDEZ; CHÁRRAGA; ÁVILA-GONZALEZ, 2019), bem como na síntese de ácidos nucleicos e fosfolipídios (SATO; JORGE; GUIMARÃES, 2016, BARREIRO; MARTÍNEZ-CASTRO, 2019).

No reino vegetal sua atuação não é diferente, sendo extremamente importante para o crescimento das plantas (CHHABRA, 2019). Um suprimento adequado de fósforo estimula a formação inicial de raízes, iniciação de flores, desenvolvimento de sementes e maturação da planta, além de resistência às pragas, por fornecer compostos de alta energia que controlam os processos de fotossíntese, respiração, síntese de proteínas e ácidos nucleicos, transporte de nutrientes através da parede celular, entre outros (DIPTA *et al.*, 2019).

Dessa forma, sob o ponto de vista biológico, o fósforo é um dos mais importantes macronutrientes para os organismos vivos, uma vez que é essencial para a grande maioria das biomoléculas (BARREIRO; MARTÍNEZ-CASTRO, 2019) e por estar envolvido em numerosos processos celulares vitais. Sua reserva mundial é de extrema importância para atender a demanda global crescente de alimentos, devido ao intenso crescimento da população (VILLAMIZAR *et al.*, 2019b).

Atualmente, o fósforo é o terceiro ingrediente mais caro de rações para aves e suínos (ABBASI *et al.*, 2019), e cada vez mais, maiores quantidades desse mineral têm sido exigidas para satisfazer as crescentes necessidades agroalimentares do mundo. O fósforo é um recurso mineral limitado, baseado em sua disponibilidade no ambiente e na forma como está disponível para as plantas (CHHABRA, 2019), encarecendo ainda mais sua suplementação na ração animal e fertilizantes de plantas nas últimas décadas (VILLAMIZAR *et al.*, 2019b).

No solo, esse mineral pode ser encontrado sob duas formas: fósforo orgânico e inorgânico (VIEIRA *et al.*, 2019; DIPTA *et al.*, 2019). O inorgânico representa entre 35 a 70% do fósforo total dos solos e é encontrado principalmente em complexos minerais insolúveis (DIPTA *et al.*, 2019), sendo o fosfato bicálcico a forma mais utilizada como suplemento na nutrição de animais, com disponibilidade equivalente a 100% desse mineral (RIBEIRO, 2019). No entanto, as fontes inorgânicas são limitadas e não renováveis, além de ser uma das mais onerosas entre os elementos minerais (RIBEIRO, 2019; VIEIRA *et al.*, 2019; PUPPALA *et al.*, 2019). Apesar disso, continuam amplamente utilizadas na produção animal e vegetal, com reservas economicamente exploradas projetadas para se esgotarem entre os anos de 2060 e 2130 (VIEIRA *et al.*, 2019).

Por outro lado, o fósforo orgânico, representando em torno de 20 a 80% do total do solo, é encontrado na forma de fitinas, fosfatos de inositol ou ácido fítico, fosfolipídios, polifosfatos, entre outros, cuja disponibilidade geralmente é baixa, dependendo de vários fatores, como tipo de solo, microrganismos presentes no ambiente, etc. (DIPTA *et al.*, 2019).

Nos alimentos, as maiores fontes desse mineral são os vegetais e a água que contêm fósforo (BUJNA, 2014). Nos vegetais, o ácido fítico (mio-inositol 1,2,3,4,5,6-hexaquisfosfato) é a principal forma de estoque de fósforo, encontrado principalmente em sementes, raízes e tubérculos, onde é utilizado como fonte de energia para germinação e crescimento (ROSTAMI; GIRI, 2013; DAHIYA, 2016).

2.2 Ácido fítico

Os fosfatos de inositol consistem de um anel de inositol, onde um ou mais grupo hidroxila é substituído por pelo menos um grupo fosfato, sendo a forma mais comum o mio-inositol 1,2,3,4,5,6-hexaquisfosfato, onde seis grupos fosfatos se ligam ao anel de inositol, como mostrado na Figura 1 (ROSTAMI; GIRI, 2013, DUONG, LAPSLEY, PEGG, 2018).

Figura 1 - Estrutura do ácido fítico.

Fonte: (PuBChem, 2019)

2.2.1 Nomenclatura do ácido fítico

Na literatura podem ser encontradas diversas nomenclaturas aceitas para o ácido fítico, podendo ser denominado de mio-inositol 1,2,3,4,5,6-hexaquisfosfato, mio-inositol1,2,3,4,5,6 ácido hexafosfórico, mio-inositol hexaquisfosfato, Ins (1,2,3,4,5,6)P6, InsP6 ou IP6 (BERWAL; GOYAL; CHUGH, 2018; CHEN *et al.*, 2018; DUONG; LAPSLEY; PEGG, 2018; ZHU; HONG; WAKISAKA, 2019).

Os fitatos são sais de ácido fítico, resultantes de sua interação com íons: fitato de cálcio, zinco, magnésio, potássio ou sódio (DUONG, LAPSLEY, PEGG, 2018; DAHDOUH *et al.*, 2019). Por ocorrerem simultaneamente em diversos alimentos, geralmente não se faz nenhuma distinção de nomenclatura para essas duas formas (MONTEIRO, 2011).

O prefixo “hexaquis” é usado no lugar de “hexa”, indicando que os grupos fosfatos não são ligados internamente o que torna esse composto um ligante em potencial, com mais de um sítio de ligação para átomos de metal (ROSTAMI; GIRI, 2013).

2.2.2 Fontes de fitato

O fitato é a forma de armazenamento de fósforo nas plantas, encontrado em altas concentrações em sementes, cereais e leguminosas (SINGH, JOSHI, GUPTA, 2013; HUSSAIN *et al.*, 2017; BENINCASA *et al.*, 2019, BABATUNDE *et*

al., 2019; DAHDOUH *et al.*, 2019), provavelmente servindo como estoque para garantir a efetiva germinação das sementes e crescimento das plantas, utilizando seus próprios nutrientes, incluindo o fósforo armazenado (LEI *et al.*, 2013; DAHDOUH *et al.*, 2019).

De maneira geral, o estoque de ácido fítico ocorre na forma de uma mistura de sais, os fitatos, que se encontram quelados a diferentes minerais carregados positivamente. Durante o processo de germinação, a enzima fitase endógena que degrada o fitato, é ativada, liberando o fósforo estocado, mioinositol e minerais para serem utilizados pela planta (BERWAL; GOYAL; CHUGH, 2018). Conforme a quantidade de fitato diminui, a biodisponibilidade de fósforo e outros minerais aumenta. O conteúdo dos principais macronutrientes no milho, como sódio, potássio, magnésio, cálcio e fósforo, tende a aumentar após alguns dias do período de germinação, assim como alguns microminerais (BENINCASA *et al.*, 2019).

Dessa forma, a maioria dos alimentos vegetais, principalmente os cereais, leguminosas, castanhas e oleaginosas, possui entre 50 a 80% de seu conteúdo total de fósforo na forma de fitato, demonstrando que esta substância funciona como um verdadeiro estoque de fósforo e outros nutrientes para as plantas (SINGH, JOSHI, GUPTA, 2013; HUSSAIN *et al.*, 2017; GOURLEY *et al.*, 2018). No entanto, o conteúdo de fósforo ligado ao inositol nos vegetais varia amplamente, sendo descrito um teor de 30 a 95% para os cereais e leguminosas e uma faixa menor para as oleaginosas e castanhas entre 25 a 75%, mostrando que os cereais e leguminosas são as principais fontes de ácido fítico (DUONG; LAPSLEY; PEGG, 2018; ABBASI *et al.*, 2019).

Nas plantas, o ácido fítico geralmente se encontra em maior quantidade nas substâncias ou órgãos de reserva, como no caso dos grãos de cereais, castanhas e nozes, cuja maior concentração é observada na camada aleurona da semente e nas leguminosas, onde é encontrado no cotilédone dos grãos (DUONG; LAPSLEY; PEGG, 2018; ABBASI *et al.*, 2019; LAMID *et al.*, 2019; VASUDEVAN *et al.*, 2019).

A Tabela 1 descreve o conteúdo de ácido fítico em 100 g de peso seco de alguns alimentos (cereais, leguminosas, oleaginosas e castanhas), assim como, o percentual de fósforo total e ligado ao ácido fítico (P-inositol).

Tabela 1 - Conteúdo de ácido fítico, fósforo total, e fósforo ligado ao inositol em alguns cereais, leguminosas, oleaginosas e castanhas

Alimento	Ácido fítico (g/100g) (em peso seco)	Total fósforo (%)	Total de P-inositol (%)
<u>Cereais</u>			
Germe de milho	6,39	0,33	0,21
Farelo de trigo	2,10 – 7,30	1,09	0,83
Germe de trigo	1,14 – 3,91	0,30	0,21
Farelo de arroz	2,56 – 8,7	1,78	1,41
Cevada	0,38 – 1,16	0,32	0,19
Aveia	0,42 – 1,16	0,37	0,25
Centeio	0,54 – 1,46	0,36	0,24
<u>Leguminosas</u>			
Feijão	0,61 – 2,38	0,29	0,08
Ervilha	0,22 – 1,22	0,41	0,24
Grão de bico	0,28 – 1,60	ND	ND
Lentilhas	0,27 – 1,51	ND	ND
<u>Oleaginosas</u>			
Soja	1,00 – 2,22	0,73	0,33
Linhaça	2,15 – 3,69	ND	ND
Semente de gergelim	1,44 – 5,36	ND	ND
Farinha de girassol	3,90 – 4,30	ND	ND
<u>Castanhas</u>			
Amendoim	0,17 – 4,47	ND	ND
Amêndoas	0,35 – 9,42	ND	ND
Nozes	0,20 - 6,69	ND	ND
Castanha de caju	0,19 – 4,98	ND	ND

Fonte: Adaptado de (KUMAR; SINHA; KAJBAF, 2019) e (ABBASI *et al.*, 2019)

Nota: ND: Conteúdo não determinado

2.2.3 Efeitos prejudiciais do fitato

Embora a presença do fitato seja desejada para a maioria dos alimentos vegetais, por ser uma importante fonte de fósforo e outros nutrientes necessários para seu crescimento e desenvolvimento (BENINCASA *et al.*, 2019; DAHDOUH *et al.*, 2019), o fitato é considerado a principal causa de redução e deficiência de minerais em alimentos e rações derivadas de vegetais, atuando como um fator antinutricional, por se quelar fortemente com íons metais, como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{2+} (SINGH; JOSHI; GUPTA, 2013; PRIYODIP; PRAKASH; BALAJI, 2017; MAURYA; PARASHAR; SATYANARAYANA, 2017; VASUDEVAN *et al.*, 2019; BENINCASA *et al.*, 2019), além de manganês (BERWAL; GOYAL; CHUGH, 2018; BENINCASA *et al.*, 2019), cobre (SREEDEVI; REDDY, 2012; COBAN; DEMIRCI, 2014), e molibdênio (SREEDEVI; REDDY, 2012), formando complexos minerais-fitato, e assim afetando a absorção de nutrientes para o homem e outros animais

monogástricos (SINGH; SATYANARAYANA, 2010; MITTAL *et al.*, 2013; BERWAL; GOYAL; CHUGH, 2018).

A alta carga negativa conferida pela presença dos seis grupos fosfato em sua molécula, mesmo em diferentes faixas de pH, fornece uma forte afinidade por nutrientes carregados positivamente, favorecendo assim, a formação de complexos com íons cátions (DUONG; LAPSLEY; PEGG, 2018; BERWAL; GOYAL; CHUGH, 2018; BENINCASA *et al.*, 2019), em sua grande maioria insolúveis e resistentes à ação do trato intestinal em animais e humanos, reduzindo assim, a disponibilidade desses nutrientes (KALSI *et al.*, 2016; NIU *et al.*, 2017).

Além disso, a carga negativa do fitato em diferentes valores de pH, também confere grande potencial para interagir com proteínas, carboidratos e lipídios, carregados positivamente, reduzindo a solubilidade, funcionalidade, digestibilidade e biodisponibilidade destes nutrientes nos alimentos (HUSSAIN *et al.*, 2017; DUONG; LAPSLEY; PEGG, 2018; KUMAR, SINHA, KAJBAF, 2019; VASUDEVAN *et al.*, 2019) (Figura 2). No caso das proteínas, essas interações podem afetar sua estrutura, reduzindo ou inibindo sua atividade (SATO; JORGE; GUIMARÃES, 2016; MAURYA; PARASHAR; SATYANARAYANA, 2017) e consequentemente, levando à inibição de várias enzimas digestivas, como tripsina, amilase, pepsina, pancreatina, lipases, entre outras (SINGH; SATYANARAYANA, 2010; DUONG; LAPSLEY; PEGG, 2018).

Figura 2 - Principais ligantes do ácido fítico formando o fitato

Fonte: (adaptado de FREIRE *et al.*, 2008)

Dessa forma, a presença do fitato nos alimentos e rações, pode alterar a secreção de compostos endógenos, como enzimas digestivas, ácido clorídrico (HCl do estômago), mucina, etc., além de formar quelatos com nutrientes essenciais à saúde, levando à redução na sua disponibilidade e consequente, valor nutritivo do alimento (VASUDEVAN *et al.*, 2019).

Por outro lado, pesquisas recentes têm demonstrado que o inositol-6P, bem como seus diferentes intermediários produzidos na hidrólise sequencial do fitato estão presentes em grandes proporções nas células eucarióticas e podem desenvolver importantes funções fisiológicas (DUONG; LAPSLEY; PEGG, 2018).

2.2.4 Efeitos benéficos do fitato

Embora o interesse inicial na ação do fitato tenha sido baseado no seu efeito adverso na absorção de minerais e outras substâncias, esta mesma habilidade em se ligar aos minerais, particularmente ao ferro, tem sido estudada com relação aos efeitos benéficos para o organismo humano, (MAYRINCK JUNIOR, 2014) como sua ação antioxidante e anticarcinogênica (MITTAL *et al.*, 2013; DAHIYA, 2016; DUONG; LAPSLEY; PEGG, 2018; KUMAR, SINHA, KAJBAF, 2019).

Por este ser um potente inibidor na formação de radicais livres, tornando-os cataliticamente inativos, ao se quelarem ao ferro, mantendo-o na sua forma férrica, o fitato oferece proteção contra danos oxidativos, já que o Fe^{3+} é a forma mais inerte deste metal, comparada ao Fe^{2+} , que produz oxiradicais e peroxidação de lipídios (MAYRINCK JUNIOR, 2014; DUONG; LAPSLEY; PEGG, 2018). Outros efeitos antioxidantes do fitato também já foram reconhecidos, como a inibição na proliferação de células cancerosas, angiogênese e inflamação (DUONG; LAPSLEY; PEGG, 2018).

O ácido fítico pode ser desfosforilado enzimaticamente, produzindo intermediários de menores tamanhos, como pentafofato (IP5), tetrafofato (IP4), trifosfato (IP3) e, provavelmente, o inositol difosfato (IP2), cujos graus de fosforilação determinam em qual proporção a absorção dos minerais pode ser inibida, aumentada, ou não afetada (RAGHAVENDRA; HALAMI, 2009). Os menores fosfatos de inositol (IP1 a IP4) e o próprio mio-inositol têm mostrado diferentes papéis biológicos benéficos (DUONG; LAPSLEY; PEGG, 2018); e o

efeito negativo na biodisponibilidade de minerais parece estar mais associado ao penta e hexafosfato de inositol (RAGHAVENDRA; HALAMI, 2009).

Várias ações benéficas à saúde e efeitos terapêuticos, como redução no risco de câncer de cólon e redução nos níveis sanguíneos de colesterol, triglicérides e glicose; adjuvante no tratamento das doenças de Parkinson, Alzheimer, esclerose múltipla, diabetes e litíase renal já foram estudados e atribuídos a esses compostos, (SINGH; SATYANARAYANA, 2010; BUJNA, 2014; BHAGYAWANT *et al.*, 2018; DUONG; LAPSLEY; PEGG, 2018; KUMAR; SINHA; KAJBAF, 2019).

Alguns desses efeitos possivelmente promovidos pelo fitato são frequentemente observados em populações de países em desenvolvimento, que têm como característica comum, uma alimentação baseada em vegetais com grandes quantidades de ácido fítico e que apresentam baixa prevalência nas patologias descritas; diferente do que ocorre em países desenvolvidos, onde essas doenças são comuns e as dietas são ricas em alimentos processados e industrializados, com baixo conteúdo de fitato (MITTAL *et al.*, 2013; DUONG; LAPSLEY; PEGG, 2018).

Dessa forma, uma nova perspectiva em relação ao ácido fítico e sua ação no organismo, tanto de humanos, quanto animais vêm sendo criada, incentivando o desenvolvimento de pesquisas que envolvam a prevenção de doenças crônico-degenerativas, relacionadas à ação do fitato por impedir a absorção de minerais e desta forma, inibir o acúmulo de substâncias indesejáveis no organismo, como a formação de cristais de hidroxiapatita e consequentemente, a formação de cálculos renais (KUMAR; SINHA; KAJBAF, 2019).

Além disso, deve-se considerar o papel do ácido fítico como a principal reserva de fósforo em sementes e grãos, responsável pelo armazenamento de até 90% desse mineral (SANNI; LAWALA; ENUJIUGHAB, 2019). Atualmente, os cereais e leguminosas são os principais ingredientes de rações animais, sendo o milho e a soja os maiores representantes desse grupo de alimento na maioria das formulações para suínos (VEUM; LIU, 2018) e frangos (ALAGAWANY; ELNESR; FARAG, 2018), tornando o ácido fítico a maior reserva de fósforo para esses animais (ARREDONDO; CASAS; STEIN *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2019).

No entanto, o fósforo ligado ao ácido fítico é muito pouco absorvido pelo trato digestório de animais monogástricos, como os humanos, cachorros, porcos,

frangos e peixes (ZHANG *et al.*, 2013; BERWAL; GOYAL; CHUGH, 2018), pois enquanto os ruminantes possuem bactérias específicas em seu intestino, que liberam enzimas para degradar o fitato de sua dieta (COBAN; DEMIRCI, 2014), os animais monogástricos não possuem ou produzem de forma deficiente tais enzimas, tornando o fósforo de sua dieta indisponível para absorção (SINGH; JOSHI; GUPTA, 2013; AARHUS UNIVERSITET 2017; BERWAL; GOYAL; CHUGH, 2018; VASUDEVAN, *et al.*, 2019).

2.2.5 Problemas ambientais

Para assegurar os requerimentos nutricionais diários de fósforo dos animais, principalmente em áreas de criação intensiva de suínos e frangos, as rações a base de soja e milho vêm sendo enriquecidas com fósforo inorgânico, um mineral não renovável e de alto custo (AARHUS UNIVERSITET 2017; VIEIRA *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2019). Consequentemente, o fósforo não absorvido ligado ao fitato, bem como o excesso de fósforo inorgânico adicionado às rações, são excretados nas fezes desses animais, causando sérios problemas (ZAREI, 2007; MAURYA; PARASHAR; SATYANARAYANA, 2017), uma vez que no solo encontram-se microrganismos que podem degradar o fitato e, desta maneira, aumentar a liberação de fósforo no ambiente (ZHAO *et al.*, 2007; DAHIYA, 2016). Este fósforo liberado pode ser transportado até mananciais e contribuir para a eutrofização de rios e lagos (GULATI; CHADNA; SAINI, 2007), os quais podem ser utilizados para irrigar áreas de agricultura intensiva (ZHANG *et al.*, 2010). A eutrofização resulta na depleção de oxigênio devido ao crescimento excessivo de microrganismos, em especial as algas que habitam a superfície aquática (DAHIYA, 2016), ocasionando a morte de peixes e outros animais, levando a uma alteração da fauna e da flora local (ROSTAMI; GIRI, 2013; COBAN; DEMIRCI, 2014).

Dessa forma, considerando o efeito adverso da propriedade antinutricional do fitato, a poluição ambiental crescente em áreas de criação intensiva de animais e o valor oneroso do fósforo inorgânico (VIDYASAGAR *et al.*, 2019; VASUDEVAN *et al.*, 2019; VIEIRA *et al.*, 2019; BRODACKI; BATKOWSKA; DRABIK, 2019), que eleva o custo da ração para cerca de 60 a 70% dos custos da produção pecuária (VASUDEVAN *et al.*, 2019), torna-se necessário encontrar

alternativas mais eficientes e econômicas para melhorar a utilização do fósforo presente no ácido fítico em dietas a base de cereais e leguminosas. Neste contexto, a adição de enzimas que hidrolisam o fitato, promovendo a liberação do fósforo na ração, tem se destacado (AFIFY *et al.*, 2011).

Dentro do mercado de enzimas para alimentação animal, as fitases são as mais comumente utilizadas em rações de aves e suínos, pois têm proporcionado melhor aproveitamento dos nutrientes, melhor digestibilidade das proteínas e consequentemente, redução na contaminação ambiental causada pelo fosfato (MANTRANA, 2015; DERSJANT-LI *et al.*, 2019).

2.3 Fitases

As enzimas fitases ou mio-inositol hexaquisfosfato fosfohidrolase (3-fitase [EC 3.1.3.8], 4- ou 6-fitase [EC 3.1.3.26] e 5-fitase [EC 3.1.3.72] são fosfatases que hidrolisam ligações fosfomonoéster do fitato, liberando de forma sequencial grupos fosfatos de diferentes tamanhos (mio-inositol, pentaquis- tetraquis-tris-bis- e mono-fosfatos, assim como o fosfato inorgânico e inositol) (Figura 3) (GOURLEY, 2017; GESSLER *et al.*, 2018; KUMAR; SINHA; KAJBAF, 2019; SHARIDEH *et al.*, 2019).

Figura 3 - Ação da fitase sobre o ácido fítico

Fonte: Adaptado de MITTAL *et al.* (2011).

Apesar da ação da fitase ocorrer diretamente nas ligações onde se encontram os grupos fosfato, ela possui efeito indireto na disponibilidade de outros nutrientes, como proteínas, minerais e carboidratos, por eliminar a propriedade anti-nutricional do fitato, ao hidrolisar o mioinositol hexaquisfosfato (IP6) até IP5 ou IP4 no início do trato digestório (ABBASI *et al.*, 2019; SHARIDEH *et al.*, 2019) (Figura 4).

Figura 4 – Hidrólise do fitato pela fitase, em inositol e fosfato, liberando micronutrientes, proteínas e amido

Fonte: Adaptado de REDDY *et al.* (2013).

2.3.1 Histórico das fitases

Estudos com fitase datam de mais de 100 anos, desde a sua descoberta em 1907 (ZHANG *et al.*, 2010; LI *et al.*, 2019), quando foi identificada em grãos de arroz e micélio do fungo *Aspergillus niger* (GESSLER *et al.*, 2018) quatro anos após a primeira citação científica sobre o ácido fítico, aparecer na literatura (LEI *et al.*, 2013).

No entanto, apenas em 1968 sua atividade na hidrólise do fitato foi descrita por Nelson e colaboradores (NELSON *et al.*, 1968; GESSLER *et al.*, 2018; ABBASI *et al.*, 2019), e mesmo após sua descoberta e descrição de sua atividade, por muito tempo, não se deu importância à enzima, devido ao seu alto custo de produção e uso, que competia com os fosfatos inorgânicos (BABATUNDE *et al.*, 2019).

Somente no final da década de 1980 a produção de fitase alcançou escala comercial, possibilitando redução no seu custo e viabilizando sua utilização nas dietas de animais monogástricos (SATO, 2015). Mesmo assim, apenas nos últimos 15 anos, com aumento da poluição ambiental e a alta no preço do fosfato inorgânico, as fitases tornaram-se um dos mais importantes suplementos alimentares para animais monogástricos, principalmente suínos e aves (GREINER, 2017; VIEIRA *et al.*, 2019).

Atualmente, cerca de 70% das dietas para aves e suínos contém fitase e seu mercado vem se tornando cada vez mais competitivo, com um crescente número de fitases comercializadas (GREINER, 2017).

A primeira fitase comercial produzida pela BASF, foi lançada no mercado em 1991 (MITTAL *et al.*, 2013), possibilitando a redução na excreção de fósforo pelos animais monogástricos (SINGH; JOSHI; GUPTA, 2013). Em 1993, uma fitase produzida por *Aspergillus ficuum* foi adicionada pela primeira vez na dieta de aves de corte (frangos), obtendo um aumento linear no ganho de peso dos animais e no conteúdo de cinzas dos ossos, concluindo que as aves conseguiram absorver de maneira eficiente, tanto o fósforo do fitato, quanto o fósforo inorgânico (NELSON, 1968; KUMAR; SINHA; KAJBAF, 2019).

Desde então, como mostrado na Tabela 2, vários outros produtos comerciais vêm sendo lançados no mercado (MITTAL *et al.*, 2013).

Tabela 2 - Algumas fitases microbianas comercialmente disponíveis no mercado.

Empresa	Nome Comercial	Origem da Enzima	Cepa Produtora	Tipo	Subtipo
BASF	Natuphos®	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i>	HAPhy	3
AB Enzymes	Finase® P/L	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	HAPhy	3
Novozymes	Bio-Feed® Phytase	<i>Peniophora lycii</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	HAPhy	6
Dupont Industrial Biosciences	Phyzyme®	<i>Escherichia coli</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	HAPhy	6

Fonte: Adaptado de LEI *et al.* (2013) e MANTRANA (2015).

2.3.2 Classificação das fitases

Vários critérios são utilizados para a classificação das fitases. Com base em suas diferenças estruturais e mecanismo de ação catalítica, as fitases podem ser classificadas em fosfatases ácido histidina (HAP, fitases ácidas), β -propeller fitases (BPP, fitases alcalinas), fosfatases ácido púrpuras (PAP, metaloenzimas) e proteínas fosfatase tirosina (PTP, fitases cisteínas) (BELGAROUÏ *et al.*, 2016).

As HAP são as fitases mais estudadas e utilizadas, sendo as únicas que possuem uma sequência conservada de heptapeptídeo (RHGARAP) e um dipeptídeo (HD) em seu sítio ativo (MAURYA; PARASHAR; SATYANARAYANA,

2017; NIU *et al.*, 2017) e hidrolisam fitatos livre de metal com pH ótimo na faixa de 3 a 5 (SULEIMANOVA *et al.*, 2015).

Existem dois tipos de fitases ácidas (HAP) encontradas principalmente em microrganismos, sendo uma com ampla variedade de substratos, mas com baixa atividade específica sobre o ácido fítico e outra, com baixa variedade de substratos, mas com alta atividade específica sobre o fitato (SATO, 2015). Essas diferenças podem ser atribuídas, em parte, pela composição variada de aminoácidos no centro de ligação ao substrato, já que o sítio catalítico dessas enzimas é bastante conservado; além de seu tamanho, que parece ser relativamente grande para acomodar vários substratos fosforilados, como AMP (adenosina monofosfato), ATP (trifosfato de adenosina), frutose-1,6-difosfato, glicose-6P, entre outros (SULEIMANOVA *et al.*, 2015).

Apesar das fitases ácidas serem a classe de enzimas mais amplamente utilizadas na indústria, algumas desvantagens de seu uso devem ser consideradas, tais como, sua incapacidade de hidrolisar fitato ligado a metais, sua ampla especificidade aos substratos e sua baixa termoestabilidade (CHEN; YU; YE, 2016). As fitases β -*propeller* (BPP) presentes no gênero *Bacillus*, possuem estrutura molecular de beta-folha e não apresentam nenhuma relação com as HAPs e outras fosfatases: elas requerem o íon Ca^{2+} tanto para sua atividade, como para termoestabilidade e possuem um pH ótimo na faixa de 7,0-8,0, sendo que não foi demonstrado até o momento fosfatases com esse tipo de estrutura (YAO *et al.*, 2011; SATO, 2015).

As fitases alcalinas pertencentes às espécies de *Bacillus* têm sido uma ótima alternativa na suplementação de rações, devido a sua alta termoestabilidade, habilidade em hidrolisar fitato ligado a metais e alta especificidade, no entanto, comparada às HAPs, apresentam desvantagem de ter atividade específica muito menor mesmo sob condições ótimas de reação (CHEN; YU; YE, 2016).

As fosfatases ácido púrpuras são metaloenzimas, que contém ferro ou zinco em seu sítio catalítico (MONTEIRO, 2011), foram isoladas principalmente de vegetais e possuem uma atividade hidrolítica específica relativamente baixa para o ácido fítico, quando comparadas às fitases ácidas (NAVES, 2009), no entanto, a função destas fosfatases nos vegetais é pouco conhecida (LI *et al.*, 2017). Provavelmente, essa baixa atividade em vegetais seja devido ao processo de

germinação das sementes necessitar de uma hidrólise mais lenta do ácido fítico por um período de tempo mais prolongado (DAHDOUH *et al.*, 2019).

As proteínas fosfatases tirosina (PTPs), são uma nova classe de fitases, recentemente isoladas de várias bactérias anaeróbias do rúmen de gado (NAKASHIMA *et al.*, 2007). As PTPs estão envolvidas na desfosforilação de uma variedade de substratos, com frequente implicação na sinalização celular de vírus (GRUNINGER *et al.*, 2014). Outra classificação bastante conhecida e descrita das fitases leva em consideração o local onde se inicia a desfosforilação do ácido fítico, nas diferentes posições do anel de inositol, podendo ser assim classificadas:

- 3-fitases (EC 3.1.3.8, mio-inositol hexaquisfosfato-3-fosfohidrolase): hidrolisa moléculas de ácido fítico na terceira posição de mio-inositol hexaquisfosfato, liberando mio-inositol-1,2,4,5,6-pentaquisfosfato e ortofosfato;
- 5-fitases (EC 3.1.3.72, mio-inositol hexaquisfosfato-5-fosfohidrolase): hidrolisa a ligação éster na quinta posição do mio-inositol hexaquisfosfato, liberando mio-inositol-1,2,3,4,6-pentaquisfosfato e ortofosfato;
- 6-fitases (EC 3.1.3.26, mio-inositol hexaquisfosfato-6-fosfohidrolase): quebra a ligação éster do mio-inositol hexaquisfosfato na sexta posição, liberando mio-inositol-1,2,3,4,5-pentafosfato e ortofosfato. (KUMAR, SINHA, KAJBAF, 2019).

O maior grupo das fitases, pertence às 3-fitases, isoladas de fungos e bactérias (MONTEIRO, 2011). De um modo geral, as 6-fitases são classificadas como enzimas vegetais e as 3-fitases, enzimas microbianas (SULEIMANOVA *et al.*, 2015). Entretanto, fitases de *Escherichia coli* e *Peniophora lycii* são exceções, pois constituem 6-fitases (NAVES, 2009). As 5-fitases foram isoladas de alfafa, feijão, ervilha e de bactérias presentes no rúmen, as *Selenomonas ruminantium* (YAO *et al.*, 2011).

Fitases também podem ser classificadas de acordo com seu pH ótimo de atividade, podendo ser agrupadas em fitases ácidas, que incluem as enzimas fosfatase ácida histidina (HAPs), fosfatases ácida púrpura (PAPs) e proteínas fosfatases tirosina (PTP). As enzimas de *Bacillus*, as β -propeller (BPPs) são as únicas classificadas como fitases alcalinas (YAO *et al.*, 2011).

2.3.3 Aplicações das fitases

Atualmente, a principal aplicação das enzimas fitases é, sem dúvida, na indústria de rações animais, devido a sua capacidade em degradar o ácido fítico, liberando fósforo. Cerca de 70% das enzimas comerciais usadas para nutrição animal são fitases, que acumulam uma receita anual em torno de US\$ 350 milhões (GREINER, 2017; MAURYA; PARASHAR; SATYANARAYANA, 2017). A ação da fitase permite a utilização do mineral fósforo, presente naturalmente nos cereais e leguminosas (base alimentar das rações), uma vez que este se encontra ligado ao fitato e, portanto, indisponível para absorção. Em animais monogástricos esta enzima está ausente ou em quantidade insuficiente, levando à excreção de todo o ácido fítico contido na ração no ambiente, bem como, o fósforo inorgânico adicionado em excesso como suplemento (BUJNA, 2014; TINH; DIEP; GIAN, 2014; CHEN; YU; YE, 2016).

A suplementação de rações animais com a fitase reduz os custos finais da dieta, por diminuir a necessidade de adição de fósforo inorgânico e aumentar a biodisponibilidade do fósforo naturalmente presente para digestão (OLSTORPE; SCHNÜ RER; PASSOTH, 2009; SREEDEVI; REDDY, 2012; CHAROENRAT *et al.*, 2016). Além da preocupação com os custos da ração animal, mais recentemente, a adição de fitase tem sido feita também com o objetivo de reduzir o nível de poluição ambiental acarretada pelo excesso de fósforo excretado em áreas de criação intensiva de animais, visto que a enzima favorece a utilização do fósforo fítico e conseqüentemente, reduz sua eliminação fecal em até 50% (HUSSIN *et al.*, 2007; YIN *et al.*, 2007; YAO *et al.*, 2011; SINGH; JOSHI; GUPTA, 2013; LEI *et al.*, 2013; DE OLIVEIRA *et al.*; 2014; NUGE *et al.*, 2014).

De acordo com Lei *et al.* (2013), a importância dessa redução, pode ser observada quando se considera, por exemplo, a produção anual em torno de 60 milhões de porcos nos Estados Unidos e a excreção média de 1,23 kg de fósforo no ambiente por cada animal, durante todo seu ciclo de vida. Essa importância é ainda mais elevada, quando se destaca que os benefícios descritos servem também para a criação de aves e peixes.

As fitases possuem grande potencial para aplicação em diferentes setores industriais, como na nutrição animal, alimentação humana, aquicultura e farmácia (SATO; JORGE; GUIMARÃES, 2016), pois além de melhorarem a

biodisponibilidade do fósforo, possibilitam um melhor aproveitamento de aminoácidos, proteínas e outros minerais que se ligam ao ácido fítico, além de potencializar o valor energético da dieta (MAZZOLA, 2017). A aplicação da fitase na alimentação de humanos está sendo considerada tão importante quanto a observada nas rações animais, considerando a grande capacidade quelante do ácido fítico, que pode gerar possíveis e graves deficiências de minerais essenciais à saúde humana, como ferro, zinco e cálcio, principalmente em populações onde a base da alimentação são os vegetais, como é o caso dos vegetarianos e veganos, ou mesmo populações de países em desenvolvimento, que consomem grande quantidade de vegetais (TROESCH *et al.*, 2011; LEI *et al.*, 2013; BUJNA, 2014). A fitase também pode ser usada em fórmulas infantis e alimentos processados a base de cereais (LEI *et al.*, 2013).

Estudos demonstraram que a adição de fitases em alimentos aumenta significativamente a digestibilidade de proteínas e melhora a utilização de fósforo, cálcio e ferro (MITTAL *et al.*, 2013). Recentemente, outros efeitos benéficos da fitase vêm sendo descritos, em função da liberação sequencial de mio-inositol fosfatos de diferentes tamanhos, durante a hidrólise do ácido fítico. Esses intermediários têm demonstrado diversos efeitos terapêuticos e farmacológicos à saúde humana (SREEDEVI; REDDY, 2012; BUJNA, 2014; NUGE *et al.*, 2014), tais como, prevenção de complicações do diabetes (SREEDEVI; REDDY, 2012), efeitos anti-inflamatórios, antiangiogênicos, antitumorais (SREEDEVI; REDDY, 2012; DUONG; LAPSLEY; PEGG, 2018) e efeitos antioxidantes (BHAGYAWANT *et al.*, 2018; DUONG; LAPSLEY; PEGG, 2018). Também foi relatado associação desses intermediários na redução do risco de câncer de cólon e nos níveis de colesterol e triglicérides sanguíneos em testes com animais (BUJNA, 2014).

O número e a posição dos resíduos de fosfato nos intermediários do ácido fítico, liberados durante a sua hidrólise, determinam o efeito de cada um dos isômeros de mio-inositol (KUMAR, SINHA, KAJBAF, 2019), mas é certo que, cada vez mais o uso da fitase vem demonstrando excelentes perspectivas de atuação na saúde humana e medicina (LEI *et al.*, 2013). Como exemplo, no estudo de Pagano *et al.* (2007) foi testada a suplementação de fitase na alimentação de porcos jovens, com o objetivo de verificar sua ação na formação da massa óssea em humanos, uma vez que os suínos são utilizados como modelos para pesquisa

de osteoporose e demonstraram que a enzima pode ser eficaz para tratar ou prevenir essa doença.

Maller *et al.* (2016), analisaram a suplementação de fitases de *Aspergillus japonicus* na mineralização e fortalecimento ósseo em frangos e demonstraram que a enzima favoreceu a formação da estrutura óssea e desempenho dos frangos, uma vez que os ossos fortalecidos resultaram em um aumento no desenvolvimento muscular, mostrando que a fitase foi eficaz em fornecer fosfato e outros minerais presentes na dieta. Koshy *et al.* (2012), analisaram em 77 pessoas o efeito da suplementação de zinco e fitase, no tempo de efeito da toxina botulínica no tratamento estético facial e observaram aumento na duração do tratamento de espasmos, hemifacial, blefarospasmo ou tratamentos cosméticos de rugas. Outras aplicações da fitase são na indústria de papel e polpa (SREEDEVI; REDDY, 2012), e de produção e processamento de biocombustíveis (LEI *et al.*, 2013).

Deste modo, é possível observar que a utilização de fitases oferece inúmeros benefícios, mas de uma forma geral, três deles são mais importantes: o aumento da biodisponibilidade de fósforo e minerais na dieta de animais, preservação de fósforo inorgânico de fontes não renováveis e de alto custo e a redução na poluição do ambiente, incentivando cada vez mais o desenvolvimento de pesquisas que busquem novas formas e fontes de obtenção da enzima (MONTEIRO *et al.*, 2015).

2.3.4 Fontes de fitases

Fitases são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em plantas, animais e microrganismos (HUSSIN *et al.*, 2007; RAGHAVENDRA; HALAMI, 2009; RANI; GHOSH, 2011; YAO *et al.*, 2011; SREEDEVI; REDDY, 2012; BUJNA, 2014; SULEIMANOVA *et al.*, 2015; NIU *et al.*, 2017).

O crescente mercado da fitase, gerado pelas suas inúmeras e importantes aplicações, tem impulsionado a busca por uma boa fonte da enzima, que possa atender aos diversos processos industriais (HUSSIN *et al.*, 2007) e para isso uma grande variedade de tecidos animais, vegetais e microrganismos vem sendo prospectados (QUAN, *et al.*, 2001; YAO *et al.*, 2011), objetivando isolar e caracterizar novas fitases de diferentes fontes (KALSI *et al.*, 2016).

Em vegetais superiores, as fitases são encontradas predominantemente nos grãos, sementes e pólen, onde possuem o papel de hidrolisar o fitato, liberando fósforo, mio-inositol e outros minerais necessários para o crescimento da planta (KUMAR *et al.*, 2013). Apesar de ter sua atividade descrita pela primeira vez, em 1907 em um vegetal (farelo de arroz), a atividade de fitases em plantas tem pouca importância comercial, pois é relativamente baixa, provavelmente para possibilitar a liberação lenta do fósforo em quantidades necessárias para a germinação das sementes. (NAVES, 2009).

Apesar de sua ampla distribuição, diversas pesquisas comprovaram que os microrganismos são as principais fontes de fitases para produção em nível industrial e aplicações biotecnológicas (HUSSIN *et al.*, 2007; RANI; GHOSH, 2011), por serem capazes de produzi-las com uma ampla faixa de características, como variadas faixas de temperatura e pH de atuação (GANGOLIYA; GUPTA; SINGH, 2015; MAZZOLA, 2017), serem de fácil cultivo e manipulação, exigindo pouco espaço e tempo de crescimento (KALSI *et al.*, 2016). Além disso, estudos demonstraram que as fitases microbianas são extremamente mais efetivas para degradar o ácido fítico que fitases obtidas de outras fontes (SATO; JORGE; GUIMARÃES, 2016).

Bactérias são boas fontes de fitases, pois são relativamente baratas e exigem menor tempo para sua produção (KALSI *et al.*, 2016), sendo produzidas principalmente em espécies do gênero *Lactobacillus* (HUSSIN *et al.*, 2007; COBAN; DEMIRCI, 2014; GIZAW *et al.*, 2017), *Escherichia* (HUSSIN *et al.*, 2007; COBAN; DEMIRCI, 2014, SREEDEVI; REDDY, 2012; SULEIMANOVA *et al.*, 2015; GIZAW *et al.*, 2017), *Pseudomonas*, *Klebsiella* spp (HUSSIN *et al.*, 2007; COBAN; DEMIRCI, 2014, SULEIMANOVA *et al.*, 2015, GIZAW *et al.*, 2017), *Bacillus* (HUSSIN *et al.*, 2007; SREEDEVI; REDDY, 2012; SULEIMANOVA *et al.*, 2015; GIZAW *et al.*, 2017), *Enterobacter* (HUSSIN *et al.*, SULEIMANOVA *et al.*, 2015; GIZAW *et al.*, 2017), *Citrobacter* (HUSSIN *et al.*, 2007), *Aerobacter* (SULEIMANOVA *et al.*, 2015), bactérias anaeróbicas do rumen (HUSSIN *et al.*, 2007), entre outras (GIZAW *et al.*, 2017).

Kalsi *et al.* (2016), estudando isolados de bactérias, observou que as fitases de *Serratia* sp. PSB-15 e *Enterobacter cloacae* PSB-45 apresentaram boas características de termoestabilidade, solubilidade e faixa de pH para aplicação em rações e alimentos. Entre as leveduras, poucas espécies foram descritas como

produtoras da enzima fitase, entre elas, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schwanniomyces castellii* (SREEDEVI; REDDY, 2012; COBAN; DEMIRCI, 2014; SAVITA *et al.*, 2017), *Schizophyllum* spp.(COBAN; DEMIRCI, 2014), *Schwanniomyces occidentalis* e *Pichia anomala* (SAVITA *et al.*, 2017).

Os fungos filamentosos, têm sido os principais microrganismos citados em trabalhos que descrevem a produção de fitases, sendo o gênero *Aspergillus*, a fonte mais ativa de fitase extracelular (HUSSIN *et al.*, 2007; TINH; DIEP; GIAN, 2014), com destaque para alguns: *A. fumigatus* (TINH; DIEP; GIAN, 2014); *A. niger* (TINH; DIEP; GIAN, 2014; SREEDEVI; REDDY, 2012; SATO; JORGE; GUIMARÃES, 2016; SAVITA *et al.*, 2017), *A. oryzae* (TINH; DIEP; GIAN, 2014; SREEDEVI; REDDY, 2012); *A. ficuum* (SREEDEVI; REDDY, 2012; COBAN; DEMIRCI, 2014; SAVITA *et al.*, 2017); *A. caerbonarius* (TINH; DIEP; GIAN, 2014), *A. flavus* e *A. caespitosus* (SATO; JORGE; GUIMARÃES, 2016).

Savita *et al.* (2017), relataram que os fungos *A. ficuum* e *A. niger* já são conhecidos como fungos empregados com propósitos industriais e Mazzola (2017), reforça que o fungo *A. niger* foi identificado como o produtor mais ativo de fitase fúngica usada em ensaios com peixes desde 1990. De fato, grande parte das fitases comerciais encontradas no mercado são obtidas de *A. ficuum* NRRL3135, como a Allzyme Phytase® (Alltech Inc.) e Phyzyme®XP (DuPont™Danisco®) (TINH; DIEP; GIAN, 2014) e *A. niger*, com a Natuphos®E (BASF) e Finase® (AB Enzymes), sendo essa última também produzida pelo fungo *A. awamori* (FUGTHONG, *et al.*, 2010).

Apesar da disponibilidade comercial destas enzimas, pesquisas vêm sendo realizadas, como por exemplo, a de Maller *et al.* (2016), que demonstraram que o fungo *A. japonicus* pode ser uma nova alternativa comercial para a suplementação de rações, uma vez que a fitase produzida por este organismo apresentou termoestabilidade, resistência a pH ácido e foi capaz de liberar fosfato inorgânico quando adicionada à ração de frangos, suprimindo a deficiência desse composto nas aves. Outros fungos produtores de fitases são *Rhizopus oligosporus* (TINH; DIEP; GIAN, 2014; SATO; JORGE; GUIMARÃES, 2016; SAVITA *et al.*, 2017), *Mucor piriformis* (TINH; DIEP; GIAN, 2014; SAVITA *et al.*, 2017), *Rhodotorula mucilaginosa*, *Paecilomyces variotii* (SATO; JORGE; GUIMARÃES, 2016), espécies de *Cladosporium* (TINH; DIEP; GIAN, 2014), de

Penicillium (SREEDEVI; REDDY, 2012), e *Myceliophthora thermophila* (SINGH; JOSHI; GUPTA, 2013; SINGH, 2016).

Fungos são importantes elementos microbianos do solo e dependendo das condições ambientais podem contribuir com mais biomassa no solo que as bactérias, além de apresentarem maior habilidade em solubilizar o fosfato insolúvel (GIZAW *et al.*, 2017). Têm se destacado como os mais importantes produtores de fitases de interesse biotecnológico, devido a estas apresentarem maior estabilidade térmica e atividades em ampla faixa de pH (MALLER *et al.*, 2016; SATO; JORGE; GUIMARÃES, 2016).

Além disso, do ponto de vista industrial, a produção de fitases por fungos pode ser mais econômica e vantajosa, uma vez que estes microrganismos são capazes de secretar enzimas diretamente no meio extracelular, não havendo necessidade de rompimento de células para obtenção de enzimas, como no caso de grande parte das bactérias (ALVES, 2014). Apesar de serem as principais fontes produtoras de fitases comerciais, a utilização dos fungos filamentosos ainda enfrenta alguns desafios para se garantir uma alta produção com menores custos, já que suas enzimas necessitam possuir uma alta estabilidade térmica em meio ácido, permitindo resistir a todas as etapas do processamento industrial e biotecnológico.

2.3.5 Fatores que influenciam a atividade das fitases

A atividade da fitase é medida na forma de unidades de fitase (U), sendo 1U definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μ mol de fósforo inorgânico do fitato por minuto em condições ótimas de pH e temperatura (ZELENKA *et al.*, 2017).

Embora a atividade da fitase tenha sido descrita em dietas para frangos há várias décadas, por muito tempo seu uso comercial não foi aplicado, já que até então sua produção era baixa, o era custo elevado e a atividade enzimática após o processo de peletização da ração se apresentava extremamente baixa. Necessidades de mudar esses parâmetros alavancaram pesquisas científicas no campo da biotecnologia (YAO *et al.*, 2011), cujo objetivo era produzir uma fitase para ração animal que fosse estável para manter sua atividade no trato digestório

do animal, resistir à inativação do processamento térmico da ração e da estocagem e ainda, ser economicamente viável (NUGE *et al.*, 2014).

Enzimas de interesse comercial, para que sejam consideradas de boa qualidade, precisam preencher uma série de critérios pré-definidos, elaborados de acordo com a sua aplicação (HUSSIN *et al.*, 2007). No caso da adição da fitase à ração animal esses critérios incluem: alta atividade específica, ampla especificidade ao substrato, ampla faixa de pH ótimo e ser estável durante o processo de peletização da ração, período de estocagem e na passagem pelo trato digestório (HUSSIN *et al.*, 2007; NAVES, 2009; MITTAL *et al.*, 2013, TINH; DIEP; GIANG, 2014; SATO; JORGE; GUIMARÃES, 2016). A termoestabilidade é um dos critérios mais importantes, já que a temperatura média do trato digestório de animais monogástricos, onde provavelmente a enzima irá atuar, é em torno de 37°C, mas a peletização ocorre em temperaturas entre 65 e 85°C (HUSSIN *et al.*, 2007; ZHAO *et al.*, 2007; GULATI; CHADHA; SAINI, 2007; ZUO *et al.*, 2010; SATO, 2015; MAURYA; PARASHAR; SATYANARAYANA, 2017).

A fitase comercial de *A. niger* é amplamente utilizada como aditivo em rações. No entanto, sua termoestabilidade é um dos maiores entraves na indústria, já que a maior parte da enzima adicionada é inativada pelas altas temperaturas do processamento industrial de peletização (MAURYA; PARASHAR; SATYANARAYANA, 2017). Esta etapa, melhora a digestibilidade das rações, ajudando a balancear a dieta dos animais, bem como aumentar o tempo de validade das mesmas, impedindo o crescimento de microrganismos patógenos. No entanto, esse processo expõe a enzima a temperaturas elevadas por intervalos de tempo entre 1 a 10 minutos (MALLER *et al.*, 2016), levando à necessidade de obtenção de uma fitase que mantenha sua atividade, mesmo após ser exposta a elevadas temperaturas por alguns minutos.

A termoestabilidade de uma enzima é definida por sua habilidade em resistir à desnaturação térmica ou retornar a sua conformação tridimensional original após o tratamento térmico (NAVES, 2009), sendo estas as características necessárias e desejadas para a utilização da fitase (MALLER *et al.*, 2016).

De acordo com Lei e Stahl, citados por Lei *et al.* (2013) para uma fitase ser considerada ideal, a enzima precisa possuir pelo menos 3 características, que são: manter a habilidade de hidrólise do ácido fítico no trato digestório superior dos animais, flexibilidade de se manter ativa em temperatura de peletização de

rações entre 65 a 85°C e possuir um custo de produção relativamente acessível, o qual pode ser obtido se a tolerância térmica da mesma for aumentada (MITTAL *et al.*, 2013).

Sabe-se que a estrutura primária da proteína determina sua estabilidade térmica, uma vez que aminoácidos em posições específicas podem contribuir de maneira favorável, e alguns resíduos específicos podem aumentar sua temperatura de desnaturação em até 15 ou 22°C (ZHAO *et al.*, 2007).

Yin *et al.* (2007), estudaram a termoestabilidade de 4 tipos de fitases: duas comerciais do fungo *A. niger*, uma nativa de *E. coli* e outras duas de *E. coli* expressas em *P. pastoris*. Eles encontraram temperaturas superiores nas fitases dos fungos, devido à glicosilação e à presença de 10 resíduos de cisteínas, que permitem a formação de pontes de dissulfeto, característica marcante nestes microrganismos. Também demonstraram que a atividade relativa de todas as fitases diminuiu em temperaturas acima de 60°C, com exceção de uma das enzimas comerciais, que manteve uma atividade residual superior em comparação as outras, quando exposta a temperaturas na faixa de 80°C.

Características e propriedades de cada enzima, tais como, mecanismos catalíticos, parâmetros ótimos e estabilidade, irão depender do tipo e da espécie do microrganismo de origem (BUJNA, 2014). Enzimas fúngicas têm várias vantagens na aplicação industrial, entre elas, estabilidade a diferentes temperaturas e pHs. A fitase de *A. japonicus* mostrou ser estável a 50°C, mantendo mais de 80% de sua atividade em temperaturas entre 41 – 42°C e pH ácido (MALLER *et al.*, 2016).

Segundo Tan *et al.* (2016), a fitase mais termoestável descrita até hoje é produzida pelo fungo *Sporotrichum* e, apresentou meia vida mais longa de 1,5 horas a 80°C. A fitase produzida pelo fungo termofílico *A. fumigatus* manteve até 90% de sua atividade a 100°C por 20 minutos, mostrando grande potencial para a aplicação industrial (TINH; DIEP; GIANG, 2014).

Por outro lado, Suleimanova *et al.* (2015) mostraram que a fitase da linhagem 3.5.1 de uma bactéria do gênero *Pantoea* sp., demonstrou uma temperatura ótima de 37°C, mas permaneceu estável por 1 hora em temperaturas variando entre 10 e 45°C, perdendo apenas 20% de sua atividade na temperatura de 45°C.

Outro critério de extrema importância para aplicação industrial da fitase é sua estabilidade e manutenção de atividade em diferentes faixas de pH (MITTAL *et al.*, 2013; MALLER *et al.*, 2016), já que os valores de pH variam no trato digestório dos animais monogástricos, sendo mais ácido no estômago (pH 2,0-4,0) e mais elevado no intestino (pH 4,0–7,0) (YIN; ZHENG; KANG, 2007; AJITH *et al.*, 2019), variando também entre os animais, como no caso do pH gástrico de suínos, que é em torno de 3,5 (QVIRIST *et al.*, 2015), comparado ao de frangos, próximo de 5,5 (LEI *et al.*, 2013).

Estudos demonstraram que o principal local de hidrólise do fitato em porcos quando alimentados com dietas a base de milho e soja foi no estômago (43%), comparado ao intestino delgado (6,8%), mostrando que fitases resistentes a pHs mais ácidos, podem ser mais efetivas no ponto de vista industrial (JONGBLOED; MROZ; KEMME, 1992; YIN; ZHENG; KANG, 2007).

Como a maioria das fitases microbianas pertence à família das histidinas ácidas (NIU *et al.*, 2017), cuja faixa de pH ótimo fica em torno de 4,0 - 5,5, (SULEIMANOVA *et al.*, 2015), espera-se que a maioria dos microrganismos produzam fitases estáveis em ambientes ácidos. As fitases bacterianas apresentam faixas de pH ótimo entre 4,5 - 6,0 para fitases intracelulares e 6,0 - 7,0 para extracelulares. Com exceção das espécies de *Bacillus*, que produzem fitases do tipo β -*propeller*, com pH na faixa de 7,0 - 8,0, nenhuma outra fitase bacteriana mostrou estabilidade em meio alcalino (MITTAL *et al.*, 2013).

A maior parte das fitases fúngicas apresenta pH ótimo na faixa entre 4,0 - 6,0 (SATO; JORGE; GUIMARÃES, 2016). Tinh; Diep e Giang (2014), caracterizaram fitases de *A. fumigatus* isolados do solo e encontraram um pH ótimo de atividade em torno de 4,0, mostrando valores menores de pH que os descritos para bactérias e fungos (pH 5,0-7,0). Embora as fitases microbianas, em especial a de fungos filamentosos, tenham demonstrado grande potencial na bioconversão do fitato, até o momento, nenhuma fitase foi capaz de alcançar todas as características desejadas para sua aplicação industrial (GULATI; CHADHA, SAINI, 2007; HUSSIN *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2010; SINGH; SATYANARAYANA, 2011; NUGE *et al.*, 2014), principalmente em relação às altas temperaturas aplicadas durante o processo de peletização das rações (MAURYA; PARASHAR; SATYANARAYANA, 2017).

Dessa forma, há interesse crescente na maioria das pesquisas em isolar e caracterizar novas fitases de ocorrência natural que possam contemplar as características desejadas para se obter um processo biotecnológico de alta produção e baixo custo (ZHANG *et al.*, 2010; SINGH; SATYANARAYANA, 2011; SREEDEVI; REDDY, 2012; NUGE *et al.*, 2014).

2.4 Fungos termofílicos

Conforme descrito anteriormente, o principal entrave na aplicação de fitases é a alta temperatura do processamento das rações, que chegam a valores próximos a 90°C (MAURYA; PARASHAR; SATYANARAYANA, 2017). Nessas temperaturas, por maior que seja a produção da enzima pelo microrganismo e mais alta sua atividade, a maioria das enzimas sofre desnaturação, perdendo sua atividade original. Uma estratégia para superar esse obstáculo seria isolar e obter enzimas termoestáveis, que pudessem suportar altas temperaturas, sem perda na sua atividade (ZHAO; GUO; TIAN, 2015; MAURYA; PARASHAR; SATYANARAYANA, 2017).

Algumas fitases têm sido isoladas de fungos termofílicos (LEI *et al.*, 2013), organismos amplamente distribuídos na natureza e frequentemente encontrados em matérias orgânicas em decomposição (BERKA *et al.*, 2011). Enzimas produzidas por estes microrganismos apresentam grande potencial de aplicação industrial (BERKA *et al.*, 2011; SINGH, 2014; SINGH, 2016), uma vez que podem ser estáveis em temperaturas entre 70 a 80°C (LI; LI; PAPAGEORGIOU; 2011; BERKA *et al.*, 2011; SINGH, 2014; SINGH, 2016).

Myceliophthora thermophila (sinônimo *Sporotrichum thermophile*) é um fungo termofílico, filamentoso que foi recentemente reposicionado no gênero *Thermothelomyces* (MARIN-FELIX *et al.*, 2015; NIKOLAIVITS *et al.*, 2019). É amplamente distribuído na natureza com grande habilidade para secretar enzimas extracelulares acima de 45°C, tais como celulases, lacases, xilanases, pectinases, lipases e fitases (SINGH, 2014).

Análises em seu genoma e dados experimentais têm sugerido que esse organismo é capaz de hidrolizar quase todos os polissacarídeos presentes na biomassa, com características diferenciadas, tais como estabilidade em temperaturas elevadas, tornando este fungo um excelente candidato a biorefinaria

de produtos químicos e biocombustíveis, a partir de fontes renováveis de carbono (BERKA *et al.*, 2011; SINGH, 2014; XU *et al.*, 2015; GU *et al.*, 2018; NIKOLAIVITS *et al.*, 2019)

Além de enzimas termoestáveis, *M. thermophila* também produz uma variedade de biomoléculas, incluindo: tiol, inibidores de proteases, xilooligosacarídeos antimicrobianos e frutooligosacarídeos (SING, 2014).

Singh e Satyanayrana (2010) testaram o potencial de aplicação biotecnológica de fitases de 138 isolados de fungos termofílicos e concluíram que a fitase produzida pelo fungo *M. thermophila*, por apresentar características desejáveis, como hidrolisar ampla faixa de fosfatos orgânicos, incluindo fitatos, termoestabilidade, pH ótimo ácido e insensibilidade a tripsina e pepsina, mostrou grande potencial para aplicação na indústria de rações.

No entanto, linhagens selvagens de microrganismos termofílicos produzem baixo nível de fitase (ZHAO *et al.*, 2007, SINGH, 2014; SREEDEVI; REDDY, 2012), sendo necessária a modificação genética de cepas por tecnologias de recombinação, visando aumentar o rendimento das enzimas (ZHAO *et al.*, 2007). Quando expressas heterologicamente em hospedeiros mesofílicos, as enzimas dos fungos termofílicos geralmente mantêm a característica termoestável (BERKA *et al.*, 2011).

Assim, a clonagem e expressão de genes termofílicos em hospedeiros mesofílicos com crescimento mais rápido e melhor secreção de enzimas, torna-se uma opção para obter uma enzima termoestável para fins comerciais (SINGH, 2014; VASUDEVAN *et al.*, 2019).

2.5 Clonagem e expressão heteróloga

Técnicas de engenharia genética permitem a transferência de genes entre espécies e ou a modificação de genes, resultando em melhoramentos, principalmente em relação ao aumento na produção de enzimas industriais, por meio da seleção de genes de interesse, uso de múltiplas cópias do gene por célula, de promotores ou peptídeos sinais mais eficientes (FALCH, 1991).

As formas mais conhecidas de manipulação do conteúdo genético das células, no que tange à expressão gênica, são a expressão homóloga e

heteróloga, diferenciadas entre si, pela procedência do material genético inserido na célula hospedeira (CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2010).

A engenharia genética possibilita a seleção de organismos hospedeiros. Muitas vezes, a enzima de interesse é encontrada em um organismo não caracterizado, ou associado a produção de toxinas, ou mesmo um patógeno. Essas incertezas podem ser evitadas escolhendo um hospedeiro seguro para a transferência do gene que codifica a enzima de interesse (FALCH, 1991). Atualmente, os organismos hospedeiros mais comumente utilizados para expressão heteróloga de enzimas são as bactérias, em especial, a *E. coli*, e as leveduras, principalmente *P. pastoris* e *S. cerevisiae* (CASTRO; PEREIRA JUNIOR, 2010; CHEN; YU; YE, 2016).

Embora a expressão em bactérias, mais precisamente em *E. coli*, seja universal, eficiente (altos níveis de expressão) e utilizada em larga escala, com inúmeras vantagens, como curto ciclo de cultura, manuseio simples, capacidade de alcançar alta densidade celular e alta produção da proteína de interesse (CHEN; YU; YE, 2016), observam-se inúmeros problemas na expressão de genes eucarióticos em *E.coli*, devido principalmente aos processamentos pós-transcricionais e traducionais, além da diferença entre os códons preferenciais, que necessitam ser otimizados no processo de síntese do gene. A existência de regiões de introns nos eucariotos, ausentes em procariotos exige que o gene seja clonado diretamente do RNA mensageiro maduro (SEGATO *et al.*, 2014). Além disso, a *E. coli* como hospedeiro de expressão torna-se parcialmente limitada por sua incapacidade de excretar eficientemente algumas proteínas exógenas (CHEN; YU; YE, 2016), tornando as etapas de extração e purificação das proteínas recombinantes em bactérias um processo desgastante (HANNIG; MAKRIDES, 1998). Outro grande entrave na utilização de *E. coli* está na formação de corpos de inclusão e seu potencial de patogenicidade, que não a classifica como escolha mais indicada para a produção em grande escala de proteínas utilizadas na indústria alimentícia (CHEN; YU; YE, 2016).

Leveduras, como a *P. pastoris* se apresentam como hospedeiros eficientes para a expressão heteróloga de proteínas, apresentando várias vantagens, como por exemplo, a capacidade de fermentação com alta densidade celular e habilidade de grande secreção de proteínas controladas por um forte promotor (AOX1). No entanto, também apresentam desvantagens, como ciclo de vida

longo, procedimentos operacionais mais complexos (CHEN; YU; YE, 2016) e principalmente a forte tendência a modificações extremamente relevantes nas etapas pós-traducionais, como as glicosilações, acetilações e fosforilações da proteína de interesse (HANNIG; MAKRIDES, 1998; CHEN; YU; YE, 2016).

Visando reduzir os efeitos pós-traducionais, a sequência do gene de interesse pode ser obtida de um fungo (organismo eucarioto), ser clonada em vetor específico e reinserida no mesmo ou em outro organismo eucarioto (HINNEN; HICKS; FINK, 1978). A maioria dos fungos filamentosos é transformada utilizando plasmídeos integrativos, sugerindo uma potencial estabilidade genética em longo prazo (SEGATO *et al.*, 2012).

Nesse sentido, os fungos filamentosos têm mostrado vantagens como plataformas de expressão de proteínas heterólogas, entre elas, a capacidade de crescer em meios de cultura simples e com fontes de carbono de baixo custo, secretar grandes quantidades de enzimas para o meio extracelular, evitar o acúmulo de substâncias tóxicas no interior da célula e a necessidade de lisar as células para extração das proteínas, num processo moroso e caro para purificação da proteína; bem como realizar modificações pós-traducionais corretamente, como glicosilação e adição de pontes dissulfeto (SEGATO *et al.*, 2014).

Atualmente, inúmeros vetores estão disponíveis para expressão em fungos filamentosos, construídos com promotores fortes, constitutivos ou induzíveis e com marcas de seleção, de forma a melhorarem a expressão de proteínas (MEYER *et al.*, 2011). Um exemplo de sistema de expressão heteróloga construído para produção de proteínas extracelulares em espécies de *Aspergillus*, é o vetor pEXPYR desenvolvido por Segato *et al.* (2012), o qual permite a expressão e secreção de grandes quantidades de proteínas, induzidas por maltose.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho foi realizar a clonagem, expressão heteróloga em *Aspergillus nidulans*, purificação e caracterização bioquímica da enzima fitase (*MtPhy*) obtida a partir do fungo termofílico *M. thermophila*.

3.2 Objetivos específicos

- Isolar o gene que codifica a enzima *Mtphy* no genoma de *M. thermophila*;
- Clonar o gene que codifica a enzima *MtPhy*;
- Transformar e expressar o gene mencionado anteriormente em *Aspergillus nidulans* linhagem A773;
- Purificar e caracterizar a enzima fitase obtida.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens

Foram utilizadas as linhagens de *M. thermophila* M77 e *A. nidulans* A773 (*pyrG89*; *wA3*; *pyroA4*), adquiridas no *Fungal Genetic Stock Center* (FGSC, St. Louis, MO, EUA). A linhagem de *A. nidulans* A773 foi utilizada como sistema de expressão heteróloga.

4.2 Seleção das sequências gênicas da fitase de *M. thermophila*

A seleção das sequências utilizadas na clonagem e expressão heteróloga da fitase, baseou-se em resultados anteriores encontrados por nosso grupo de pesquisa, que ao analisarem o secretoma do fungo termofílico *M. thermophila*, observaram a presença da enzima fitase, quando este organismo foi cultivado em bagaço de cana, como única fonte de carbono.

A partir de uma busca realizada no *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) foi selecionada uma sequência nucleotídica que codifica a enzima fitase do fungo *M. thermophila*. A sequência obtida foi analisada através do programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool* - www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), a fim de buscar similaridades com sequências depositadas no *GenBank* (ALTSCHUL *et al.*, 1990).

Para se obter maiores informações sobre as características da fitase selecionada, utilizou-se a ferramenta de bioinformática *ProtParam* do servidor Expasy (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) para determinação do ponto isoelétrico, massa e coeficiente de extinção molar teóricos, baseados na sequência de aminoácidos da proteína.

4.3 Construção dos oligonucleotídeos (*primers*) de interesse

Um par de *primers* para amplificar o gene que codifica a *MtPhy* de *M. thermophila* foi desenhado a partir da sequência completa de nucleotídeos do gene obtida nos bancos de dados, contendo a região codificadora para o peptídeo sinal, identificada pelo servidor Signal P 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (PETERSEN *et al.*, 2011). Para isso,

foram localizados os trinta nucleotídeos iniciais, localizados na região 5' – 3' do gene. Para a construção do *primer reverse*, a sequência da região 3' ao gene foi inserida no *software Reverse Complement*, da plataforma *Bioinformatics* (www.bioinformatics.org/sms/index.html). Em seguida, as sequências obtidas foram analisadas para ajustar a temperatura de *melting* (T_m), com a ferramenta *OligoAnalyser* 3.1 (<http://www.idtdna.com/calc/analyser>), tendo como parâmetros que o comprimento dos *primers* apresentasse um número de bases acima de 20 e a diferença de T_m dos *primers forward* e *reverse* não ultrapassasse 3°C. Por fim, foram adicionadas aos *primers* (*forward* e *reverse*) sequências específicas de nucleotídeos (em negrito na Tabela 3), denominadas caudas, que permitiram a subsequente inserção do gene amplificado ao vetor de expressão, por técnicas de recombinação homóloga *in vitro* (*Gibson Assembly*) (GIBSON, 2009).

Tabela 3 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação do gene da fitase de *M. thermophila* (*MtPhy*)

Primer	Sequência
<i>Mtphy forward</i>	5' cattacacctcagca ATG ACT GGG CTC GGA GTG ATG GTG 3'
<i>Mtphy reverse</i>	5' gtcccgtgccggtta TCA AGC AAA GCA GAG ATC CCA CTT GCC GTT 3'

Fonte: Arquivo próprio

Nota: As regiões utilizadas para a recombinação *in vitro* pelo método de *Gibson Assembly* estão destacadas em negrito.

4.4 Extração de DNA genômico (DNAg) de *M. thermophila*

Esporos do fungo *M. thermophila* foram inoculados em frasco Erlenmeyer de 1 L contendo 200 mL de meio de Mandels líquido (APÊNDICE A) e mantidos a 45°C, sob agitação a 180 rpm, durante 36 horas. O micélio foi separado por filtração em papel de filtro *Whatman* n°1, pesado e cerca de 50 mg do peso úmido foram macerados em almofariz com auxílio de pistilo, adicionando-se nitrogênio líquido. O macerado foi transferido para um microtubo de centrifuga de 1,5 mL para ser utilizado no processo de extração do DNAg, com o Kit de purificação de DNA genômico *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega®), seguindo as especificações do fabricante.

4.5 Amplificação do gene que codifica a *MtPhy* e do vetor *pEXPYR*

Tendo o DNAg do fungo *M. thermophila* extraído e os *primers* sintetizados, foi possível realizar a amplificação do gene que codifica para a enzima de interesse pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR – do inglês, *Polymerase Chain Reaction*), utilizando a enzima *Phusion*[®] DNA polimerase (*New England BioLabs*[®]).

As reações de PCR foram preparadas de acordo com o seguinte protocolo: 1 µL do DNAg de *M. thermophila* (500 ng/µL), 2µL de cada *primer* (*forward* e *reverse*) a uma concentração de 10 pmol/µL cada, 10 µL de tampão (5X) da enzima, 2 µL da mistura de nucleotídeos dNTPs (2,5 mM), 2 µL de DMSO, 0,5 µL de MgCl₂(50mM), 0,5 µL de *Phusion*[®] polimerase (2,5 UI) e 32 µL de água ultrapura para completar o volume final de reação de 50 µL. As condições das reações de PCR estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4 - Condições utilizadas nos ciclos e reações de PCR.

Etapas do PCR (Programação do termociclador)			
Etapas	Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
1	98°C	30 seg	1
2	98°C	10 seg	25
2	65°C	30 seg	
2	72°C	1 min	
3	72°C	5 min	1
4	16°C	∞	

Fonte: Arquivo próprio

A amplificação do gene foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando 5µL do produto final de PCR, misturados a 5µL de DNA *Loading Buffer* (APÊNDICE A), utilizando como padrão, o marcador de *Gene Ruler 1kb plus DNA Ladder* (*Thermo Fisher Scientific*). As reações que apresentaram bandas no tamanho esperado foram purificadas com o Kit *Wizard*[®] SV Gel and PCR *Clean-Up System* (Promega), segundo as especificações do fabricante.

O vetor *pEXPYR* foi utilizado para a expressão e secreção da proteína de interesse no fungo filamentoso *A. nidulans* A773 (Figura 5). O vetor apresenta marcas de seleção que conferem resistência à ampicilina (AMP) e zeocina (ZEO)

e um promotor da glucoamilase de *A. niger* (*glaAP*), para indução da expressão gênica induzida por maltose. Além disso, possui também uma marca de reversão de auxotrofia, composta pelo gene que codifica a enzima orotidina-5'-monofosfato descarboxilase (*pyrG*) de *A. niger*, que é uma enzima fundamental para a biossíntese de pirimidinas.

A presença da região *pyrG* no vetor é utilizada para reverter a auxotrofia em *A. nidulans* A773 (*pyrG*⁻), que não consegue sintetizar uracila e uridina, o que permite a seleção das colônias transformantes positivas deste fungo quando cultivadas em meio mínimo sem adição de uracila e uridina, já que a inserção do vetor torna o fungo prototrófico a estes compostos (SEGATO *et al.*, 2012).

Figura 5 - Vetor *pEXPYR* para clonagem e expressão de proteínas em *A. nidulans*.

Fonte: SEGATO *et al.* (2012)

4.6 Amplificação do vetor e inserção do gene de interesse

Para a inserção do gene de interesse no vetor, foram necessárias a linearização e amplificação do mesmo, por meio da técnica de PCR, utilizando *primers* específicos, também com adição de caudas (negrito), contendo sequências específicas de ligação ao gene de interesse (Tabela 5).

Tabela 5 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação do vetor *pEXPYR*.

Primer	Sequência
pEXPYR forward	5' ccg gca cgg gac TTC TAG TGA TTT AAT AGC TCC ATG TCA ACA 3'
pEXPYR reverse	5' ctctgcctaactttaca AAT TCG AGC TCT CCC CTG ACC TTC CGA 3'

Fonte: Arquivo pessoal
Nota: As regiões utilizadas para a recombinação *in vitro* pelo método de *Gibson Assembly* estão destacadas em negrito.

Em seguida, foi utilizada a metodologia de *Gibson Assembly* (GIBSON, 2011), cuja reação é composta de 4 µL do gene de interesse amplificado e purificado (50 ng/µL), 1 µL do vetor *pEXPYR* (50 ng/µL) e 5 µL de *master mix Gibson Assembly (GA)* (*New England BioLabs®*), incubados por uma hora a 50°C, em termociclador *MyCycler (Bio-Rad)*. O *master mix GA* é composto pelas enzimas 5'-T5-exonuclease, que remove as sequências da cadeia de DNA a partir da extremidade 5', gerando cadeias simples, permitindo que os fragmentos se unam; Phusion® DNA polimerase, que preenche os espaços deixados pela T5 e *Taq* DNA ligase, que une os nucleotídeos.

Após a incubação, todo o conteúdo do tubo foi utilizado para transformar células de *E. coli* quimio competentes.

4.7 Transformação de *E. coli* quimiocompetentes

A fim de multiplicar o plasmídeo contendo o gene de interesse, a construção foi inserida em uma célula bacteriana, cujo crescimento permitiu obter uma maior concentração de DNA plasmidial, necessária para a transformação do fungo *A. nidulans* A773.

Para a transformação bacteriana, foi utilizada a metodologia de *heat shock*, com células quimiocompetentes de *E. coli* Turbo, que apresentam crescimento acelerado e possuem a membrana celular carregada positivamente por tratamento químico com MgCl₂. Uma alíquota de 100 µL do estoque de *E. coli* Turbo competente contida em meio SOC (APÊNDICE A), foi descongelada em banho de gelo e homogeneizada. A essas células foi adicionado o produto da reação de *Gibson Assembly* (gene de interesse + vetor) e a mistura foi mantida em banho de gelo, por 30 minutos, período suficiente para o DNA plasmidial se aderir à membrana celular, por apresentar carga negativa.

Após os 30 minutos, a reação foi submetida ao choque térmico, em banho-maria a 42°C por 45 segundos, permitindo assim, a entrada do DNA no interior da célula bacteriana. A reação foi imediatamente transferida para o banho de gelo, onde foi incubada por 2 minutos. Após esse tempo, foi adicionado 1 mL de meio SOC à reação, sendo esta incubada a 37°C por cerca de 1 hora, sob agitação de 250 rpm, seguida de centrifugação a 13.000 rpm por 1 minuto e descarte do

excesso de sobrenadante. Alíquotas do volume restante da transformação (cerca de 100 µL) foram ressuspensas e inoculadas em placas de Petri, contendo meio ágar LB (APÊNDICE A), acrescido de 100 µg/mL de ampicilina. As placas foram incubadas por 18 horas a 37°C, e nessas condições, apenas as células contendo plasmídios conseguiram se desenvolver e formar colônias.

4.8 PCR de colônia

As colônias de *E. coli* resistentes à ampicilina (*amp*⁺), resultantes do processo de transformação foram submetidas a técnica de PCR de colônia, para confirmar a presença do vetor contendo o gene de interesse. Para isso, foram selecionadas e coletadas 10 colônias, que foram transferidas para microtubos contendo 10 µL de água destilada estéril. Em seguida, 1µL desta suspensão foi utilizado como *template* para reação de PCR de colônia realizada em termociclador *MyCycler* (Bio-Rad), cujos reagentes foram os mesmos empregados para a amplificação do gene da fitase, com a distinção de que o DNA molde (*template*) foi substituído pela suspensão de células de *E. coli* transformadas com a construção de interesse, nas condições descritas na Tabela 6.

Nos primeiros cinco minutos da reação de PCR, as células são totalmente lisadas pelo efeito da temperatura (98°C), liberando o conteúdo intracelular para dar continuidade à reação. A presença do gene de interesse no produto do PCR foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), utilizando o marcador *GeneRuler 1 Kb plus DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific). A eletroforese foi realizada a 60 V por 1 hora.

Tabela 6 – Condições utilizadas nos ciclos e reações de PCR de colônia

Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
98°C	5 min	1
98°C	10 seg	24
63°C	30 seg	
72°C	1 min	
72°C	5 min	
12°C	∞	1

Fonte: Arquivo próprio

4.9 Purificação do DNA plasmidial

Após confirmação da presença do gene clonado nas colônias bacterianas por meio do PCR de colônia, os 9 µL restantes da suspensão celular (usada como DNA molde) foram inoculados em 10 mL de meio LB líquido, acrescido de 100 µg/mL de ampicilina e incubados a 37°C por 16 horas a 200 rpm. Para extrair os plasmídeos das células bacterianas, os cultivos foram centrifugados a 13.000 rpm por 10 min e o *pellet* resultante foi submetido a etapa de extração e purificação utilizando o *kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System*(Promega), seguindo as especificações do fabricante.

4.10 Transformação em *A. nidulans* A773

4.10.1 Obtenção de protoplastos

Para obtenção dos protoplastos, esporos frescos do fungo *A. nidulans* A773 foram cultivados em Meio Mínimo Ágar, contendo piridoxina (1 mg/L), uracila e uridina (2,5 mg/L) em pH 6,5 (APÊNDICE A) a 37°C, por 2 dias. Após este período, preparou-se uma suspensão dos esporos obtidos (aproximadamente 10⁸ esporos/mL) e 20 µL foram inoculados em 250 mL de meio mínimo líquido, suplementado com uracila e uridina (2,5 mg/L cada) e piridoxina (1 mg/L) em pH 6,5. O cultivo foi mantido a 37°C, sob agitação (200 rpm) por 18 horas. O micélio resultante foi separado por filtração, utilizando-se papel de filtro *Whatman* n°1 estéril e lavado com solução de MgSO₄ 0,6 M e DSPS (*Double Strength Protoplasting Solution*: KCl 1,1M, ácido cítrico 0,1M, pH ajustado para 5,8 com KOH e esterilizado por filtração). O micélio foi então transferido para um tubo de centrifuga de 50 mL estéril, contendo 10 mL de DSPS, acrescido das seguintes enzimas: 500 mg de *Lysing enzymes from Trichoderma harzianum* (Sigma L1412) e 250 mg de *Lysozyme from Chicken Egg White* (Sigma L6876) para ser submetido à lise da parede celular. Esta mistura foi incubada a 32°C, sob agitação a 180 rpm, por aproximadamente 3 horas, até a completa liquefação.

Os protoplastos resultantes da digestão foram separados da solução por filtração em membrana *Miracloth* (Calbiochem), em funil de *Buchner* com sucção,

sendo o filtrado, contendo os protoplastos, coletado em tubo de centrifuga de 50 mL estéril. Os protoplastos obtidos foram ressuspensos e lavados por 3 vezes com 50 mL de STC50 (Sorbitol 1,2 M, CaCl_2 50 mM, Tris 50 mM, pH 7,5, autoclavado e mantido a 4°C) e centrifugados a 4000 rpm a 4°C por 10 min. Após esse tempo, descartou-se o sobrenadante e o *pellet* resultante foi ressuspensado em STC50 e avolumado até 45 mL para nova centrifugação. Esses passos foram repetidos 3 vezes consecutivas e ao final deste processo, o *pellet* foi ressuspensado no volume final necessário para o número desejado de transformações.

4.10.2 Transformação dos protoplastos mediada por PEG

A transformação do fungo *A. nidulans* A773 com o vetor contendo o gene que codifica a proteína *MtPhy* foi realizada pelo método de transformação mediado por Polietilenoglicol (PEG).

A um tubo estéril de 15 mL contendo 250 μL da solução de protoplastos, foram adicionados aproximadamente 5 μg do DNA plasmidial (*miniprep*) previamente obtido. A mistura foi homogeneizada cuidadosamente, para evitar a ruptura dos protoplastos e incubada em temperatura ambiente por 15 min, para permitir que os plasmídeos com carga negativa se concentrem ao redor dos protoplastos, carregados positivamente. Após, adicionou-se à mistura dos protoplastos 2 mL de uma solução de PEG 60% estéril (6 g de Polietilenoglicol 4000, dissolvido em 10 mL de STC50, em micro-ondas), que foi agitada cuidadosamente e extensivamente. Esta reação foi incubada à temperatura ambiente por 20 min, sendo adicionado após este período 10 mL de STC50, misturando-se bem. A solução final foi transferida em alíquotas de 2 mL para placas de Petri contendo meio de regeneração (meio mínimo adicionado de sorbitol 1,2 M e piridoxina 1 mg/L), onde os transformantes foram selecionados pela reversão da marca auxotrófica *pyrG* (sem adição de uracila, uridina ou 5-FOA). As placas foram incubadas a 37°C com as tampas voltadas para cima por 24 horas e então invertidas e incubadas por mais 48 horas, para o crescimento dos transformantes. Algumas colônias obtidas foram selecionadas para verificar a expressão da fitase recombinante.

4.10.3 *Screening* e seleção dos transformantes

Após a confirmação do evento de integração dos plasmídeos no genoma do fungo pela reversão auxotrófica evidenciada pelo crescimento de algumas colônias de *A. nidulans* A773 em ausência de uracila e uridina, faz-se necessária uma triagem (*screening*) dos transformantes, visando selecionar a melhor cepa com relação à eficiência de expressão e secreção da proteína de interesse.

Cada uma das colônias transformantes foi numerada e seus esporos foram coletados com palito estéril e inoculados em placas de Petri contendo meio mínimo líquido, acrescido de maltose 5% e piridoxina (1mg/L). As placas foram mantidas a 37°C por 48 horas em estado estacionário. Nessa etapa, foi utilizado como controle de expressão/secreção, uma cepa de *A. nidulans* A773 (*pyrG*⁺), contendo o vetor *pEXPYR* sem o gene de interesse (vetor vazio), inoculado nas mesmas condições. Os extratos enzimáticos resultantes foram filtrados em papel de filtro para separação do micélio e 2 mL do volume total obtido de cada extrato, foi concentrado 20 vezes em dispositivo de ultrafiltração Vivaspín (GE *Healthcare*) de 500µL, com membrana de corte de 10kDa, mediante centrifugação a 10.000 rpm, por 10 min.

Os extratos concentrados foram utilizados para analisar a expressão heteróloga da proteína de interesse em gel de poliacrilamida, sob condições desnaturantes, SDS-PAGE 15% (APÊNDICE A), utilizando marcador de baixo peso molecular (97, 66, 45, 30, 20.1 e 14.4 kDa). Alíquotas de 20 µL das amostras foram misturadas com 5 µL de tampão de carregamento de proteínas (*protein loading*), composto de 62,5 mM de Tris-HCl, 2% de SDS, 25% de glicerol, 0,01% de azul de Bromofenol (pH 6,8), adicionado de 5% de β-mercaptoetanol e aplicadas no gel, juntamente com o marcador e o controle. Após a corrida, o gel de poliacrilamida foi corado com azul brilhante de Coomassie.

4.11 Análise por espectrometria de massas

Para confirmar se as bandas observadas na análise por SDS-PAGE correspondiam à proteína fitase heteróloga, uma das bandas foi excisada do gel e submetida a uma etapa prévia de digestão com tripsina, conforme descrito por Schevchenko *et al.* (1996; 2006). Em seguida, uma alíquota dos peptídeos

obtidos foi analisada por LC-MS/MS, em cromatógrafo líquido *RP-nano UPLC* (*nanoAcquity, Waters*), acoplado a um espectômetro de massas Q-TOF *Ultimamass* (*Waters*), equipado com fonte de nano-eletropulverização (*nanoESI*). O perfil MS/MS foi comparado com a sequência de aminoácidos da proteína fitase de *M. thermophila*, através do software *Mascot* v.2.3 (*Matrix Science Ltd.*). As análises de espectrometria de massas foram realizadas pela equipe de proteômica do Laboratório Central de Tecnologia de Alto Desempenho (LaCTAD – UNICAMP).

4.12 Produção e purificação da enzima

Para uma adequada caracterização bioquímica, estrutural ou funcional de uma proteína, é necessário que a mesma seja purificada. Este processo só é possível pela combinação de vários passos, como isolamento, concentração e estabilização da proteína, seguida de remoção de possíveis impurezas presentes na amostra, tais como, outras proteínas e ácidos nucleicos (CORRÊA, 2004).

Para a produção da proteína em quantidade suficiente para as análises posteriores, foram necessários ajustes para seu escalonamento. Dessa forma, uma das colônias transformantes, identificada como positiva no teste de expressão e secreção da fitase (*MtPhy*) foi aleatoriamente selecionada e repicada para novas placas de Petri, contendo meio mínimo Ágar com piridoxina (1 mg/L) em pH 6,5.

As placas foram incubadas a 37°C, por 48h para a produção de esporos, os quais foram coletados após esse tempo e inoculados em 15 placas de Petri, contendo meio mínimo líquido, acrescido de 5% de maltose e piridoxina (1 mg/L) por 48 horas a 37°C.

Ao término da incubação, cerca de 300 mL do extrato obtido foi filtrado a vácuo em papel de filtro e o volume total do extrato foi concentrado no aparato de ultrafiltração com agitação *Amicon® Stirred Cell* (*Merck Millipore*), com membrana de corte de 10kDa, até um volume de 50 mL. O extrato bruto concentrado foi dialisado com tampão Tris-HCl 100 mM, pH 7,0, para que a enzima fosse carregada negativamente, levando-se em conta que o pI predito foi igual a 5,0, até atingir o volume de 100 mL, que em seguida, foi novamente concentrado até 30mL.

A amostra foi então submetida à purificação, constituída por 2 etapas: cromatografia de troca iônica, seguida por cromatografia de exclusão por tamanho ou gel filtração.

4.12.1 Cromatografia de troca iônica e de exclusão por tamanho

O extrato concentrado foi aplicado em coluna de cromatografia de bancada, com objetivo de separar as moléculas de acordo com sua carga, contendo 10 mL de resina DEAE-Sepharose[®]CL-6B (GE *Healthcare Life Science*) de troca iônica, previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,0,.

O eluato foi recuperado e a coluna foi submetida a uma etapa de lavagem com 10 mL do tampão anteriormente utilizado. A fração de lavagem foi coletada e a proteína de interesse foi submetida a eluição a partir de 10 mL do mesmo tampão adicionado de NaCl, em diferentes concentrações (50, 100, 200, 300, 400, 500 e 1000 mM).

As frações obtidas foram coletadas e analisadas em SDS-PAGE 15% (APÊNDICE A) e aquelas positivas para a enzima de interesse foram reunidas e concentradas em dispositivo de ultra-filtração *Vivaspin*[®] 6 (GE *Healthcare Life Science*), com corte de 5 kDa, até o volume de 5mL, para posterior aplicação em coluna de gel filtração Superdex[®] 200 10/300 GL acoplada ao sistema *ÄKTA*[™]*Pure* 25M (GE *Healthcare Life Science*), utilizando um fluxo de 0,5 mL/min, pressão máxima de 1,5 MPa, com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,0 e coletando frações com volume de 1,5 mL. As frações correspondentes ao pico de absorbância em 280 nm foram coletadas, analisadas por SDS-PAGE 15%, e aquelas contendo a proteína de interesse foram reunidas e utilizadas em análises posteriores.

4.13 Determinação da concentração da fitase e atividade enzimática

A enzima *PhyMt* obtida após o processo de purificação foi quantificada no equipamento NanoDrop One_C – *Thermo Fisher Scientific*, onde foi aplicado 1 µL da amostra e utilizado como branco, o mesmo tampão da proteína (Tris-HCl 50 mM pH7,0). A leitura foi feita após fornecimento dos valores de coeficiente de extinção molar (ϵ) em $M^{-1}cm^{-1}$ e massa molar (MW) da proteína em Da.

A atividade da fitase foi determinada medindo-se o fosfato inorgânico liberado a partir do substrato fitato de sódio (*Sigma-Aldrich®*). O ensaio foi conduzido utilizando a metodologia adaptada de Gulati; Chadha e Saini (2007), modificando o volume da reação para microensaio. Para o ensaio, foram utilizados 50 µL de amostra enzimática, na concentração de 0,01 mg/mL e 50 µL de solução de fitato de sódio 1% (m/v), dissolvido em tampão acetato de sódio 200mM, pH 5,5. A reação foi conduzida em termociclador a 50°C por 1 hora. Após esse tempo, a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) 15%. Em seguida, 40 µL dessa mistura foi transferida para um microtubo contendo 180 µL de reagente cromogênico, preparado no momento do uso, composto por ácido sulfúrico (0,76M), ácido ascórbico (10%) e molibdato de amônio (2,5%), na proporção de 3:1:0,5 (v/v/v). Os tubos foram incubados a 50°C por 20 min e após resfriamento, uma alíquota de 200µL foi transferida para microplaca de poliestireno transparente de fundo chato (*Greiner Bio-One*) para leitura de absorbância a 820 nm no equipamento *Infinite M200 (Tecan)*, utilizando uma amostra sem adição da enzima como branco. Os valores de absorbância obtidos foram correlacionados com uma curva padrão, construída com KH_2PO_4 (APÊNDICE B). Uma unidade (U) da enzima foi definida como a quantidade de *MtPhy* necessária para a liberação de um µmol de fosfato por minuto, nas condições estabelecidas. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.14 Estabilidade térmica da *MtPhy* por *ThermoFluor*

A técnica de escaneamento diferencial de fluorimetria, também conhecida como *ThermoFluor*, foi utilizada para avaliar a estabilidade térmica da proteína *MtPhy* em diferentes condições. Os ensaios de *ThermoFluor* foram executados de acordo com protocolos previamente descritos na literatura (ERICSSON *et al.*, 2006; PHILLIPS; DE LA PEÑA, 2011). As medidas foram realizadas no equipamento CFX96 *Real-Time System (BioRad)*, usando uma placa de PCR de parede fina com 96 poços e fita de vedação de qualidade óptica *MiniOpticon Real-Time PCR (BioRad)*. Em cada poço foram adicionados 30 µg da proteína *MtPhy*, diferentes soluções tamponantes com pH entre 1,2 a 10,0 na concentração final de 50 mM (Tabela 7) e 1:2000 da sonda fluorescente *SYPRO Orange*, diluída em tampão fosfato de sódio 50 mM (*Molecular Probes*).

O gradiente de temperatura aplicado na análise foi de 25 a 90°C, com aumento de 1°C, ao longo do experimento e incubação de 30 segundos em cada temperatura, até que a condição de equilíbrio fosse atingida. A variação da fluorescência da sonda *SYPRO Orange* foi medida utilizando excitação em 490 nm e emissão em 530 nm. A construção e análise das curvas, incluindo a determinação da temperatura de fusão ou *melting temperature* (T_m) de cada amostra, foram realizadas usando o *software GraphPad Prism5.0* (*GraphPad software*).

Todas as etapas deste experimento foram desenvolvidas junto ao grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas”, no Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (IFSC-USP).

Tabela 7 – Tampões utilizados para avaliar *MtPhy* pela técnica de *ThermoFluor*

Tampão (50mM)	pH	NaCl (mM)	Tampão (50mM)	pH	NaCl (mM)
Água	-	0	Fosfato de Sódio	7,5	0
HCl	1,2	0	Tris	7,5	0
HCl	2,0	0	Imidazol	8,0	0
Ácido Cítrico	3,0	0	Hepes	8,0	0
Citrato de Sódio	4,0	0	Tris	8,0	0
Acetato de Sódio	4,5	0	Bicina	8,0	0
Citrato de Sódio	4,7	0	Tris	8,5	0
Acetato de Sódio	5,0	0	Bicina	9,0	0
Fosfato de Potássio	5,0	0	Carbonato de Sódio	9,5	0
Citrato de Sódio	5,5	0	Carbonato de Sódio	10,0	0
Fosfato de Sódio	5,5	0	Ácido Cítrico	3,0	300
Mes	5,8	0	Acetato de Sódio	4,5	300
Fosfato de Potássio	6,0	0	Fosfato de Potássio	5,0	300
Bis-Tris	6,0	0	Bis-Tris	5,5	300
Mes	6,2	0	Citrato de Sódio	5,5	300
Fosfato de Sódio	6,5	0	Mês	5,8	300
Cacodilato de Sódio	6,5	0	Bis-Tris	6,0	300
Bis-Tris	6,5	0	Cacodilato de Sódio	6,5	300
Mes	6,5	0	Fosfato de Sódio	6,5	300
Bis-Tris	6,7	0	Bis-Tris	7,0	300
Fosfato de Potássio	7,0	0	Hepes	7,0	300

“Continua”

“Continuação”

Hepes	7,0	0	Acetato de Amônio	7,3	300
Bis-Tris	7,0	0	Tris	7,5	300
Acetato de Amônio	7,3	0	Hepes	8,0	300

Fonte: arquivo próprio

4.15 Espectroscopia de Dicroísmo circular

As moléculas biológicas, em sua maioria, são opticamente ativas e essa atividade óptica está relacionada com a sua conformação estrutural. Moléculas que possuem diversos centros quirais, como proteínas e peptídeos, podem interagir com a luz incidente, alterando sua polarização e exibindo sinais em regiões típicas, tornando possível o estudo de suas estruturas secundárias, como α -hélices e β -folhas, por meio de dados de dicroísmo circular (GREENFIELD; FASMAN, 1969; PROVENCHER; GLOECKNER, 1981).

Nesse contexto, a técnica de espectroscopia de dicroísmo circular (CD) tem sido adotada no estudo da estabilidade conformacional de proteínas, uma vez que é uma ferramenta sensível às variações de suas estruturas primárias e secundárias, ao longo do processo de desnaturação térmica (WALLACE, 2019).

Além disso, ao se monitorar a intensidade de CD em comprimento de onda específico, pode-se determinar o grau de desenovelamento da proteína, como uma função da temperatura (KELLY *et al.*, 2005), obtendo-se sua temperatura de fusão, ou *melting* (T_m), onde 50% da amostra da proteína analisada se encontra em seu estado desenovelado e a outra metade, na forma intacta, permitindo concluir que quanto maior for a T_m , maior sua estabilidade térmica.

As análises de CD da enzima *MtPhy* foram realizadas junto ao grupo de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas”, no Instituto de Física de São Carlos, USP. Esse experimento investigou o efeito do desenovelamento da *MtPhy* com o aumento da temperatura em 3 tampões: acetato de sódio 50 mM em pH 5,0; fosfato de potássio 50 mM em pH 5,0 e fosfato de potássio 50 mM com 300 mM de NaCl, também em pH 5,0, todos apontados pela análise prévia em *ThermoFluor*, como melhores tampões para garantir a estabilidade térmica da proteína. Os tampões também foram medidos e utilizados como referência no experimento.

Os espectros de CD da enzima foram obtidos utilizando-se um espectropolarímetro Jasco J-815, no intervalo de comprimento de onda de 195 a 270 nm, com cubetas de quartzo de 0,1 cm de caminho óptico. Os espectros por temperatura foram medidos com a proteína na concentração de 2 mg/mL em cada um dos 3 tampões anteriormente citados. A leitura foi feita variando-se a temperatura de 30 a 95°C a cada 5°C, com velocidade de 50 nm/min, obtendo-se um total de 6 espectros por temperatura para cada tampão, com resolução de 0,2 nm e tempo de resposta de 1 seg. Os espectros finais foram obtidos a partir da subtração dos tampões, utilizados como branco, da média dos seis espectros.

Para a curva de desenovelamento térmico e cálculo da T_m , foi monitorada a elipticidade a 222 nm, com tempo de resposta de 32 seg com intervalo de temperatura de 20 a 80 °C e leitura a cada 2°C. A proteína foi testada em uma concentração de 1,5 mg/mL em cada um dos três tampões. A curva de transição foi calculada através da fração desenovelada de *MtPhy*, que é o resultado da subtração da elipticidade de *MtPhy* nativa e da elipticidade em qualquer temperatura testada, dividido pela diferença entre a elipticidade de *MtPhy* nativa e desenovelada, conforme a equação a seguir:

$$f_D = \frac{(\Delta\theta_N - \Delta\theta_x)}{(\Delta\theta_N - \Delta\theta_D)} \quad (1)$$

Onde,

f_D = fração de proteína desenovelada

$\Delta\theta_N$ = elipticidade da proteína nativa

$\Delta\theta_D$ = elipticidade da proteína desenovelada

4.16 Determinação da melhor condição de expressão

A fim de se encontrar a melhor condição de expressão da enzima *MtPhy*, diferentes meios e condições de cultivo foram testados. Em um primeiro momento, foram analisados 3 meios: meio mínimo sem glicose, com 5% de maltose de alto grau de pureza (*Sigma-Aldrich*) ou 5% de *HIGH* maltose (WE Consultoria), utilizada na fabricação de cerveja, e meio mínimo com 5% de maltose (*Sigma-Aldrich*), acrescido de 1% de glicose, todos tamponados com tampão HEPES 100mM. Os meios de cultura foram acondicionados em um

volume de 50 mL em frascos Erlenmeyers de 125 mL e esterilizados em autoclave, em pressão de 1 atm, a 121°C por 15 minutos. Em seguida, cada meio de cultura foi inoculado com 500 µL de uma suspensão de 10⁸ esporos/mL de uma cepa transformante para *MtPhy* e incubados por 24, 48 e 72 horas, sem agitação e agitada (200 rpm), a 37°C. Ao final de cada período de incubação, foram coletadas alíquotas de 2 mL do volume total de cada extrato enzimático, que foram concentradas por cerca de 20 vezes e a presença da proteína foi verificada por gel SDS-PAGE 15%.

Após encontrar a melhor condição de secreção da fitase, analisando diferentes meios, formas e tempos de cultivos, buscou-se avaliar o método pelo qual o meio de cultivo é esterilizado, uma vez que a metodologia usual em nosso grupo de pesquisa, a esterilização por alta temperatura em autoclave (121°C, em pressão de 1 atm por 15 minutos), poderia estar interferindo no perfil final de carboidratos no meio, havendo a possibilidade de redução da maltose disponível no meio de cultura. Dessa forma, foi testado meio mínimo com 1% de glicose + 5% de maltose de alto grau de pureza, porém esterilizados por 2 métodos diferentes: meio esterilizado em autoclave, sob pressão de 1 atm e temperatura de 121°C por 15 minutos e meio esterilizado por filtração, utilizando frasco completo de filtração com membrana PES (poliestersulfona), 0,22 µm a vácuo, capacidade de 500 mL (*BioNaky® Molecular Biology Line*). Após a esterilização, 100 mL de cada meio foram acondicionados em frascos Erlenmeyers de 250 mL, previamente esterilizados, e inoculados com 500 µL de uma suspensão de 10⁸ esporos/mL da cepa transformante *MtPhy* e incubados por 72h a 37°C.

4.17 Caracterização bioquímica da fitase

4.17.1 Determinação de temperatura e pH ótimos

O ensaio de determinação da temperatura ótima de atividade para a *MtPhy* fitase foi realizado sob diferentes temperaturas no intervalo de 30 a 85°C, variando a cada 5°C. A atividade da enzima foi avaliada, conforme ensaio padrão de atividade enzimática, descrito no item 4.13.

Na determinação do pH ótimo foi seguida a mesma metodologia, substituindo apenas, a temperatura de reação, pela temperatura ótima obtida no

ensaio anterior. Para essa análise foi utilizada a solução tampão acetado de sódio 50 mM, dentro da faixa de pH de 3,5 a 7,0, variando a cada 0,5 unidade de pH (SATO, 2015).

Todos os ensaios foram feitos em triplicata e os valores obtidos foram reportados em termos de atividade relativa, onde o valor de 100% foi estabelecido como sendo a condição que apresentou maior absorbância.

4.17.2 Estabilidade térmica

O estudo da estabilidade térmica da *MtPhy* foi realizado, incubando-se a enzima em diferentes intervalos de tempo (15 a 120 min) e em diferentes temperaturas (40 a 60°C). Para a reação, 5 µL da enzima foram pré-incubados com 45 µL do tampão acetato de sódio 50 mM em pH 5, sob as temperaturas de 40, 50, e 60°C, cada uma no tempo de 15, 30, 60, e 120 min. Após cada período de incubação, a solução enzimática foi coletada e resfriada em banho de gelo, em seguida, foram adicionados 50 µL do substrato fitato de sódio 1% (m/v) (*Sigma-Aldrich*®) e a mistura foi incubada a 60°C por 5min para determinar a atividade enzimática relativa de cada condição reacional, os quais foram correlacionados com a atividade de *MtPhy* não submetida a pré-incubação, considerada como 100%. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

4.17.3 Efeitos de compostos iônicos e outros aditivos sobre a atividade da fitase

Buscando melhorar o desempenho catalítico da enzima e investigar possíveis efeitos inibitórios de íons, foi analisado o comportamento da *MtPhy* sob a adição de 10 diferentes compostos iônicos na mistura reacional. Os compostos analisados na reação catalítica a uma concentração de 5mM foram: CaCl₂, NaCl, ZnSO₄, KCl, MnCl₂, CoCl₂, Na₂SO₄, MgCl₂, FeCl₃, CuSO₃. O volume reacional final de 100µL foi composto de 5µL da enzima, 45µL do tampão acetato de sódio, 5µL da solução do respectivo composto iônico e 50µL do substrato. A atividade fitásica foi determinada conforme descrito anteriormente. Como controle, foi utilizada a mesma condição de reação, sem adição de íons. Os íons que tiveram melhor ação sobre a atividade da enzima foram testados posteriormente, com diferentes concentrações (2,5 a 20mM).

Além do efeito dos compostos iônicos na atividade da enzima, também foram analisados, nas concentrações de 1 e 5mM, os aditivos EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético), Molibdato de amônio, β -mercaptoetanol, PMSF (Fluoreto de fenilmetilsulfonil) e DTT (Ditiotreitol) e os surfactantes, Triton X-100, Tween 20, Tween 80 e SDS (Dodecil sulfato de sódio), nas concentrações de 0,1 e 0,5% (v/v). A atividade enzimática foi analisada, incorporando esses compostos com as concentrações específicas na mistura reacional. A atividade relativa de 100% foi estabelecida com a incubação da enzima, nas mesmas condições, sem a adição de compostos. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

4.17.4 Determinação da especificidade ao substrato

Com o propósito de conhecer a especificidade da atividade catalítica da enzima, o efeito de diferentes substratos na atividade da *MtPhy* purificada foi avaliado, utilizando-se vários compostos contendo fosfato, tais como, fitato de sódio, adenosina monofosfato (AMP), adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP), glicose-6-fosfato, frutose-6-fosfato, 4-nitrofenil-fosfato e fenil-fosfato de sódio, adquiridos de *Sigma Aldrich*. O volume final do meio reacional foi de 100 μ L, sendo 5 μ L da enzima, 50 μ L de cada solução contendo o composto avaliado a 1% (m/v), dissolvido em tampão acetato de sódio 0,2 M, pH 5,5 e 45 μ L do tampão da enzima. A hidrólise enzimática ocorreu sob pH e temperaturas ótimos e a atividade relativa de 100% foi estabelecida com a incubação da enzima nas mesmas condições, usando como substrato, o fitato de sódio (*Sigma-Aldrich*®). Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

4.17.5 Determinação dos parâmetros cinéticos

Para determinação dos parâmetros cinéticos, a enzima purificada foi incubada com concentrações crescentes (0,375 a 6 mM) do substrato fitato de sódio (*Sigma-Aldrich*®) em um volume final de reação de 100 μ L, sob pH e temperatura ótimos, em tampão acetato de sódio 50 mM, usando 5 μ L da enzima. O protocolo da reação enzimática foi o mesmo descrito anteriormente. Os valores de velocidade enzimática e concentração de substrato foram analisados *pelo software GraphPad Prism 7.03*, para cálculo das constantes cinéticas por regressão não-linear. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.18 Hidrólise *in vitro* em ração comercial para aves

Visando avaliar o efeito das propriedades catalíticas da *MtPhy* sobre o ácido fítico presente em rações para aves, a hidrólise *in vitro* desse substrato foi testada em uma ração comercial para aves e uma ração desenvolvida e gentilmente cedida pelo Prof. Dr. José Fernando Machado Menten, do Departamento de Zootecnia, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP).

A ração obtida junto à ESALQ/USP tinha como único componente vegetal, o milho, além do óleo de soja, sem nenhum outro componente ou enzima que pudesse afetar a atividade da *MtPhy* avaliada. A ração continha cerca de 58% de milho, sendo o restante composto por óleo de soja, mais fosfato bicálcico (aproximadamente 1,8%), calcário calcítico (aproximadamente 1,0%), cloreto de sódio (aproximadamente 0,5%), L-Lisina, HCl, DL-Metionina, L-Treonina, suplemento de microminerais (ferro, cobre, zinco, manganês, iodo e selênio) e suplemento de vitaminas.

A ração comercial para aves de corte em fase de crescimento tinha como composição básica: farelo de soja, milho integral moído, farelo de trigo, farinha de carne e ossos, farelo de milho, farelo de arroz, calcário calcítico, cloreto de sódio, sulfato de ferro, sulfato de cobre, monóxido de manganês, óxido de zinco, sulfato de cobalto, iodato de cálcio, selenito de sódio, vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, vitamina B1, vitamina B2, niacina, ácido pantotênico, vitamina B6, ácido fólico, biotina, vitamina B12, clorato de colina, metionina, aditivo enzimático, halquinol, salinomicina e ácido propiônico, apresentando, dentro desta composição, 5000 mg de fósforo/kg e 750 U de fitase/kg.

Para avaliar a hidrólise do fitato contido nas rações por meio da liberação do fósforo, seguiu-se a metodologia adaptada de Wiss *et al.*, (1999).

Amostras peneiradas de ração (milho) para homogeneizar o tamanho das partículas foram autoclavadas (20 min, 1 atm a 120°C), objetivando inativar qualquer resíduo de fitase que pudesse estar presente. Alíquotas (2,5 g) da ração foram ressuspensas em 80 mL de acetato de sódio 200mM (pH 5,0) e incubadas com 200U de *MtPhy*/kg de ração, a 50°C, sob agitação de 200 rpm, por até 8 horas. Alíquotas de 100 µL foram coletadas em diferentes tempos, resfriadas em banho de gelo e adicionadas de 100 µL de ácido tricloroacético

(TCA) 15% para parar a reação. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi coletado para quantificação do fósforo inorgânico a 820 nm, através da reação colorimétrica, de acordo com a metodologia de determinação, anteriormente descrita. O controle da reação foi a ração incubada nas mesmas condições, sem adição da enzima *MtPhy*.

Para avaliar a hidrólise do fitato na ração comercial, buscou-se adequar a concentração da *MtPhy* na amostra, na mesma proporção em que a fitase comercial é utilizada (750 U/Kg de ração).

Além disso, foi avaliada a ação sinérgica de uma xilanase na liberação do fósforo, a qual foi adicionada na mesma proporção da *MtPhy* à ração. Dessa forma, alíquotas de 2,5 g de ração comercial peneiradas e autoclavadas foram ressuspendidas em 80 mL de acetato de sódio 200mM (pH 5,0) e incubadas até 10 horas com 750 U de *MtPhy*/kg de ração, 750 U de *MtPhy*/kg + 750 U de xilanase/kg de ração e sem adição de enzima, a 50°C, sob agitação de 200 rpm, por até 8 horas. Em intervalos sucessivos, alíquotas da amostra foram coletadas para analisar a liberação de fósforo da ração. Todas as análises foram feitas em triplicata.

4.19 Resistência à proteólise

Para avaliar a resistência da *MtPhy* contra a ação das enzimas proteolíticas tripsina e pepsina, 5 µL da enzima purificada (0,1 mg/mL) foi incubada com 5 µL de pepsina (0,1 mg/mL) em tampão 100mM glicina-HCl (pH 2,5) e 5 µL de tripsina (0,1 mg/mL) em 100mM Tris-HCl (pH 8,0), por 10, 20, 40, 60 e 90 min, a 37°C. O volume final da reação foi de 50 µL (usando 40 µL de cada tampão).

Após os tempos de incubação determinados, 5 µL de cada mistura foram incubados com 50 µL de solução de fitato de sódio 1% (m/v) (*Sigma-Aldrich*®), dissolvido em tampão acetato de sódio 200mM, pH 5,5 e 45 µL de tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,0 para determinação da atividade enzimática, nas condições previamente descritas, no item 4.13. Como controle dessa reação, a *MtPhy* purificada foi incubada nas mesmas condições, usando como substrato, o fitato de sódio, sem adição das enzimas pepsina ou tripsina. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção da sequência proteica

A sequência utilizada na clonagem e expressão heteróloga foi obtida no banco de dados *GenBank* (número de acesso XP_003665867.1), sendo então submetida ao servidor *SignalP 4.1Server* (PETERSEN *et al.*, 2011) para verificação e identificação da região correspondente ao peptídeo sinal, que sinaliza que a proteína será secretada no meio extracelular. A posição de clivagem foi localizada entre os aminoácidos 21 e 22 (Figura 6).

Figura 6 – Análise da sequência de aminoácidos da fitase de *M. thermophila* pelo servidor SignalP 4.1.

Fonte: Arquivo próprio

Nota: O gráfico indica a região correspondente ao peptídeo sinal da proteína *MtPhy*.

A sequência de aminoácidos sem o peptídeo sinal, foi utilizada para calcular o ponto isoelétrico (pI), coeficiente de extinção molar (ϵ) e a massa molar (MW) da proteína nativa, através da plataforma *ExPasy*, utilizando o *software ProtParam* (Tabela 8). Os dados obtidos foram utilizados para a realização de

etapas necessárias em outros experimentos, assim como na interpretação de alguns resultados posteriores.

Tabela 8 - Massa molar, ponto isoelétrico, coeficiente de extinção molar e número de aminoácidos estimado para a fitase de *M. thermophila* (*MtPhy*)

Proteína	MW	pI Teórico	ϵ	Nº de aminoácidos
XP_003665867.1	51339	5,00	66405	474

Fonte: Arquivo próprio

Nota: MW: Massa molar em Daltons

pI: Ponto Isoelétrico

ϵ : Coeficiente de extinção molar em $M^{-1}cm^{-1}$

5.2 Construção dos *primers* e clonagem dos genes

Utilizando ferramentas de bioinformática, obteve-se as sequências do gene do fungo *M. thermophila* (XM_003665819.1) que codifica a proteína de interesse *MtPhy*, cujo tamanho molecular é de 1488 pares de base (pb). Para a construção dos *primers* utilizados para amplificar as sequências de nucleotídeos da *MtPhy*, o peptídeo sinal foi conservado e caudas contendo sequências específicas, complementares ao vetor de expressão foram adicionadas, possibilitando assim o *assembly* entre as partes, conforme descrito anteriormente.

O produto obtido das reações de PCR foi avaliado por eletroforese em gel de agarose 1%. De acordo com a Figura 7, foi possível observar que o fragmento de DNA do gene completo por PCR foi satisfatório, uma vez que essa é uma metodologia rápida e eficaz, por utilizar a enzima *Phusion*[®] DNA Polimerase, que é altamente eficiente, além do fato que os oligos iniciadores foram desenhados de forma específica para obter a amplificação da sequência desejada.

No entanto, apesar de ocorrer a amplificação, notou-se bandas em regiões ligeiramente superiores à esperada para o gene de interesse (1488pb), embora a banda resultante observada tenha sido bastante espessa (devido à grande quantidade de DNA). Mesmo assim, foi considerada a possível presença de regiões intrônicas comumente encontradas em genes de organismos eucariotos, que possuem em sua estrutura sequências não codificantes, denominadas íntrons, intercalada pelas regiões responsáveis pela codificação do produto gênico, os éxons (SOLHA, 2005).

Figura 7 – Eletroforese em gel de agarose 1% mostrando o produto de PCR após amplificação do gene de interesse.

Fonte: Arquivo próprio

Nota: M: Marcador de peso molecular (*GeneRuler 1 kb plus ladder*)

1: gene que codifica a proteína *MtPhy* com 1488 pb.

A partir desse resultado obtido, decidiu-se analisar a sequência do gene de *M. thermophila* no banco de dados do *JGI MycoCosm* (GRIGORIEV *et al.*, 2014), a fim de verificar a presença e o número de íntrons, encontrando uma região não codificante de 57 pb nesse gene, que resultou em um tamanho molecular final de 1545 pb, compatível com a posição da banda observada no gel.

5.3 Transformação bacteriana e PCR de colônia

Após confirmação da amplificação e purificação dos produtos de PCR obtidos para o gene *Mtphy*, o plasmídeo foi construído, através da inserção das cópias do gene amplificado no vetor *pEXPYR* pela metodologia de *Gibson Assembly* (Figura 8).

Para replicação eficiente do plasmídeo, a clonagem gênica e transformação em células de *E. coli* quimiocompetentes foi primeiramente realizada, visando utilizar a maquinaria celular bacteriana, até atingir uma quantidade de DNA suficiente para transformar o fungo *A. nidulans* A773, uma vez que as células procarióticas possuem um sistema de replicação mais ágil e condições mais simples de crescimento, comparados com os das células eucarióticas. (NEVALAINEN; TE'O; BERGQUIST, 2005).

Figura 8 - Etapas de amplificação e clonagem envolvendo a metodologia de *Gibson Assembly*.

Fonte: Segato (2015), dados não publicados

Notas: A: amplificação do vetor de clonagem *pEXPYR* a partir do *GAP* que será ocupado pelo gene de interesse;

B: foram inseridas caudas no vetor e no gene de interesse amplificados para que ocorra o *assembly* entre as partes;

C: vetor e gene de interesse são colocados com *mix* de enzimas (exonuclease, ligase e polimerase), que farão a ligação entre as partes, criando extremidades *overhanging* para o gene e para o vetor;

D: os *overhangings* serão complementares e assim ocorre a ligação biológica entre o vetor e o gene de interesse, originando o DNA final.

Desta forma, células de *E. coli* Turbo foram transformadas com o vetor *pEXPYR* contendo o gene exógeno *Mtphy*, pela técnica de choque térmico. Em seguida, estas células foram cultivadas em meio sólido contendo ampicilina, que possibilitou selecionar colônias resistentes que se desenvolveram no meio, através da marca de seleção de resistência à ampicilina do vetor, confirmando a presença do plasmídeo.

Algumas destas colônias foram selecionadas aleatoriamente e utilizadas em procedimento de PCR de colônia, cujo resultado é mostrado na Figura 9.

Figura 9 – Eletroforese em gel de agarose 1%, mostrando amplificação do gene da fitase de *M. thermophila*, após PCR de colônia.

Fonte: Arquivo próprio

Nota: M: marcador de tamanho em pares de base (1 kb);

1 a 10: cópias dos genes amplificados a partir de cada colônia.

De acordo com a Figura 9, das 10 colônias bacterianas selecionadas, oito se mostraram positivas para o gene de interesse, demonstrando 80% de transformação entre as colônias testadas, com grau de intensidade variável entre os clones, mas com o mesmo tamanho molecular, ligeiramente acima da região que corresponde ao esperado pelo gene *Mtphy* (1545 pb).

Para os próximos experimentos, selecionou-se aleatoriamente o clone 7, que foi cultivado para aumentar a quantidade de plasmídeos a serem utilizados na transformação do fungo *A. nidulans* A773

5.4 Transformação em *A. nidulans* A773 e screening dos transformantes

O vetor *pEXPYR* clonado com o gene de interesse foi extraído de uma das colônias bacterianas positivas e utilizado para transformação do fungo filamentoso *A. nidulans*, mediada por PEG, para a efetiva expressão heteróloga da proteína *MtPhy*. Quando o vetor é integrado ao genoma do hospedeiro, espera-se uma superexpressão induzida por maltose e, consequentemente, uma alta secreção e acúmulo da proteína de interesse no meio extracelular (SEGATO *et al.*, 2012).

Após o processo de transformação de *A. nidulans* A773 com o vetor contendo o gene *Mtphy*, os transformantes positivos foram selecionados por sua

habilidade em crescer em meio mínimo sem adição de uracila e uridina, uma vez que o vetor *pEXPYR* contém o gene *pyrG*, que corrige a via de síntese destes compostos em *A. nidulans* A773. Na ausência do vetor incorporado, a linhagem mutante é incapaz de crescer sem uracila e uridina. Dessa forma, foram selecionados aleatoriamente 8 transformantes de *A. nidulans*, crescidos em meio seletivo.

Cada um dos transformantes foi cultivado em placas de Petri, contendo meio de indução de proteínas, suplementado com 5% de maltose, a 37°C, por 48 horas. Como controle, utilizou-se a cepa selvagem de *A. nidulans* A773, transformada com o vetor *pEXPYR* vazio. Após o tempo de cultivo, o micélio foi removido por filtração e os extratos foram concentrados e avaliados quanto ao seu perfil proteico por SDS-PAGE, confirmando a expressão heteróloga e secreção da *MtPhy* em *A. nidulans* A773 em todos os 8 transformantes testados, que apresentaram bandas em regiões correspondentes ao peso molecular esperado para a *MtPhy* (51,3 kDa), embora em nível variado de secreção (Figura 10).

Apesar da expressão heteróloga de proteínas em organismos eucariotos apresentar diversas vantagens, variações em relação ao *locus* de integração do DNA exógeno no genoma, bem como diferenças no número de eventos integrativos são esperados (RUBINI, 2009). Por esse motivo, mesmo após a confirmação da ocorrência de integração no genoma do organismo hospedeiro, uma triagem dos clones para selecionar a linhagem com maior eficiência na expressão e secreção da proteína de interesse é necessária.

Figura 10 – Eletroforese em SDS-PAGE 15% mostrando o perfil protéico dos extratos obtidos após cultivo por 48 h de 8 colônias transformantes de *A. nidulans* A773, contendo o gene *Mtphy*.

Fonte: Arquivo Pessoal

Nota: M: marcador molecular;

C: controle: *A. nidulans* com o vetor vazio;

1-8: colônias testadas para expressão e secreção de *MtPhy*

5.5 Espectrometria de massas

Para confirmar se as bandas apresentadas na análise por SDS-PAGE após o *screening* dos transformantes correspondiam à proteína de interesse *MtPhy*, uma das bandas geradas foi escolhida aleatoriamente e excisada do gel para ser analisada pela técnica de Espectrometria de Massas acoplada a Cromatografia Líquida (*Liquid chromatography tandem-mass spectrometry*, em inglês LC-MS/MS). Esse método corresponde a uma digestão *in vitro* pela enzima tripsina da proteína a ser analisada, seguida de uma análise espectrométrica dos peptídeos gerados após a digestão, que são comparados contra um banco de dados teórico, possibilitando fazer a identificação da proteína em questão e confirmar sua expressão (BALDWIN, 2004).

Os resultados obtidos na análise (Figura 11) demonstraram que a proteína secretada pelo transformante *A. nidulans* A773 foi identificada como uma 3-fitase, com cobertura de 29% dos aminoácidos comparados e 12 peptídeos identificados e confirmados como pertencentes à proteína fitase.

Figura 11 - Análise por LC-MS/MS realizada com peptídeos gerados após digestão com tripsina da *MtPhy*

Fonte: Arquivo próprio

Nota: M: marcador molecular;

1: Transformante *A. nidulans* A773 com a enzima *MtPhy* excisado para análise

Em vermelho: Aminoácidos detectados nos peptídeos gerados após digestão da enzima

O limiar de confiabilidade deste método deve incluir pelo menos 3 peptídeos identificados, com cobertura acima de 25%, ou seja, quando os fragmentos peptídicos experimentalmente extraídos resultam em cobertura maior que 25% sobre a sequência de aminoácidos da fitase disponível no banco de dados do MASCOT, é possível concluir que a banda analisada está associada à proteína desejada. Desta forma, pode-se afirmar que o processo de transformação e produção heteróloga da *MtPhy* foi obtido com sucesso.

5.6 Purificação de fitase de *A. nidulans* recombinante

Cerca de 300 mL do extrato contendo a enzima de interesse foi produzido em meio mínimo líquido contendo 5% (m/v) de maltose, dispostos em 15 placas de Petri e submetido ao processo de purificação. O extrato inicial foi concentrado até cerca de 30 mL e dialisado com tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,0. Este extrato foi submetido à primeira etapa de purificação: a cromatografia de troca iônica, a qual tem por objetivo separar as moléculas de acordo com sua carga. O mesmo tampão, na concentração de 50 mM, foi utilizado para equilibrar a coluna e eluir a amostra.

A eluição da proteína ligada à resina foi realizada através de lavagem com o tampão de eluição adicionado de NaCl em concentrações variando entre 0.05 e 1M e as frações obtidas foram analisadas em SDS-PAGE (Figura 12).

Não foram observadas bandas na fração *flow-through* (eluato), indicando que a proteína de interesse se fixou bem à coluna, e eluiu em maior quantidade, nas frações com 300 e 400 mM de NaCl, conforme indicado pelas setas na figura.

Figura 12 – SDS-PAGE 15% das frações obtidas na cromatografia de troca iônica

Fonte: Arquivo próprio

Nota: M: Marcador de massa molecular

*MW da *MtPhy*

As frações proteicas obtidas nesta etapa foram reunidas, concentradas de 20 para 5mL e submetidas à última etapa de purificação, através da cromatografia por exclusão de tamanho, para uma melhor separação a partir de seu peso molecular.

A amostra concentrada foi injetada no sistema Äkta Pure M25, utilizando uma coluna Superdex 200 10/300 GL, obtendo-se 2 picos cromatográficos maiores (Figura 13), cujas frações correspondentes (frações 6, 7, 8, 9, 10 e 11) foram analisadas em gel SDS-PAGE 15% (Figura 14), a fim de verificar a presença da *MtPhy*.

Figura 13 – Cromatograma obtido pelo processo de gel filtração

Fonte: Arquivo próprio

Figura 13 – Gel SDS-PAGE 15% das frações que apresentaram pico na cromatografia de exclusão por tamanho

Fonte: Arquivo próprio

Nota: M: Marcador de peso molecular

6-11 frações correspondentes aos picos do cromatograma em que houve a eluição da enzima

Setas: bandas correspondentes à *MtPhy* purificada

*MW da *MtPhy*

Após a análise por SDS-PAGE, as frações foram unidas e a concentração da enzima foi quantificada em NanoDrop One_C – *Thermo Fisher Scientific*, a partir do fornecimento de seus valores de coeficiente de extinção molar (ϵ) e massa molar (MW), obtendo-se ao final do processo 0,115 mg/mL.

5.7 ThermoFluor

A técnica de *ThermoFluor* se baseia na exposição do núcleo hidrofóbico da proteína, quando esta é desnaturada termicamente e associada com uma molécula de prova hidrossolúvel (*SYPRO Orange Molecular Probes*), que se liga preferencialmente ao interior hidrofóbico da proteína. Com o aumento da temperatura e consequente desenovelamento da proteína, seu núcleo torna-se exposto, causando aumento da emissão da fluorescência da amostra, devido à exposição da molécula de prova. Assim, a fluorescência é detectada em função da temperatura. Sendo a temperatura de *Melting* (T_m) definida como o ponto médio da temperatura de transição entre o estado enovelado e desenovelado.

Alguns tampões e aditivos são soluções que podem proporcionar um ambiente local favorável à proteína, para que mantenha sua homogeneidade e estabilidade, reduzindo as chances de agregação e precipitação por redução da flexibilidade conformacional (ERICSSON *et al.*, 2006). Assim, tampões com maiores valores de T_m são desejados, por preservar a proteína em uma forma mais homogênea, por períodos prolongados.

Dessa forma, a enzima *MtPhy* foi submetida à técnica de *ThermoFluor*, a fim de conhecer seu comportamento frente a diferentes tampões e encontrar o mais adequado na manutenção de sua estabilidade, para uso nos próximos experimentos.

O gráfico representado na Figura 14 e os dados descritos na Tabela 9 demonstram a análise obtida pelo método *ThermoFluor*. No gráfico, as barras em verde indicam os tampões que aumentaram a temperatura, quando comparados com o valor obtido sem a adição de tampão (primeira barra, indicada como “água” no gráfico), demonstrando que esses tampões asseguraram maior estabilidade da proteína, quando seu desenovelamento é influenciado pelo aumento da temperatura.

Figura 14 – Gráfico obtido pela análise de *ThermoFluor*, com as Tm da *MtPhy* de acordo com diferentes condições tamponantes

Fonte: Arquivo próprio

Nota: a seta vermelha compreende os tampões com adição de 300 mM de NaCl

Ainda, de acordo com a Figura 14 (seta vermelha inferior direito), nota-se que o NaCl pode ter efeito sinérgico na estabilização da estrutura da fitase, em combinação com alguns tampões, fazendo com que a Tm aumente em até 5°C, como é o caso do tampão Bis-Tris. O mesmo efeito não foi observado para o tampão fosfato de potássio, que apresentou a mesma Tm com ou sem adição de NaCl.

Na Tabela 9, é possível visualizar com mais clareza as maiores temperaturas de *melting* (Tm) encontradas pela análise por *ThermoFluor*, indicadas em verde com tonalidade crescente, conforme cresce a temperatura.

Tabela 9 – Diferentes tampões, em diferentes pHs, com ou sem adição de NaCl e temperatura de *Melting* apresentada pela enzima *MtPhy* em cada condição

TAMPÃO	pH	NaCl (mM)	Temp. Melting	TAMPÃO	pH	NaCl (mM)	Temp. Melting
Água	-	0	55,00	Água	-	0	56,00
HCl	1,2	0	None	HCl	1,2	0	None
HCl	2,0	0	46,00	HCl	2,0	0	47,00
Ácido Cítrico	3,0	0	41,00	Ácido Cítrico	3,0	0	41,00
Citrato de Sódio	4,0	0	54,00	Citrato de Sódio	4,0	0	56,00
Acetato de Sódio	4,5	0	56,00	Acetato de Sódio	4,5	0	57,00
Citrato de Sódio	4,7	0	59,00	Citrato de Sódio	4,7	0	60,00
Acetato de Sódio	5,0	0	67,00	Acetato de Sódio	5,0	0	66,00
Fosfato de Potássio	5,0	0	64,00	Fosfato de Potássio	5,0	0	64,00
Citrato de Sódio	5,5	0	57,00	Citrato de Sódio	5,5	0	58,00
Fosfato de Sódio	5,5	0	63,00	Fosfato de Sódio	5,5	0	63,00
Mes	5,8	0	58,00	Mes	5,8	0	58,00
Fosfato de Potássio	6,0	0	61,00	Fosfato de Potássio	6,0	0	61,00
Bis-Tris	6,0	0	57,00	Bis-Tris	6,0	0	58,00
Mes	6,2	0	55,00	Mes	6,2	0	56,00
Fosfato de Sódio	6,5	0	58,00	Fosfato de Sódio	6,5	0	58,00
Cacodilato de Sódio	6,5	0	53,00	Cacodilato de Sódio	6,5	0	54,00
Bis-Tris	6,5	0	55,00	Bis-Tris	6,5	0	55,00
Mes	6,5	0	54,00	Mes	6,5	0	55,00
Bis-Tris	6,7	0	53,00	Bis-Tris	6,7	0	54,00
Fosfato de Potássio	7,0	0	56,00	Fosfato de Potássio	7,0	0	56,00
Cacodilato de Sódio	6,5	300	55,00	Ácido Cítrico	3,0	300	37,00
Fosfato de Sódio	6,5	300	57,00	Acetato de Sódio	4,5	300	54,00
Bis-Tris	7,0	300	52,00	Fosfato de Potássio	5,0	300	64,00
Hepes	7,0	300	54,00	Bis-Tris	5,5	300	62,00
Acetato de Amônio	7,3	300	54,00	Citrato de Sódio	5,5	300	59,00
Tris	7,5	300	52,00	Mes	5,8	300	57,00
Hepes	8,0	300	49,00	Bis-Tris	6,0	300	56,00

Fonte: Arquivo próprio

Além disso, observa-se que as menores T_m foram encontradas nos extremos de pH, ou seja, nas faixas de pH entre 1, 2 e 3 e entre 8 e 10, indicando a ionização dos resíduos de aminoácidos e consequentemente, desestabilização da estrutura da proteína e exposição do seu núcleo hidrofóbico. No entanto, esse comportamento não é tão evidente quando o tampão é adicionado de 300 mM de NaCl, indicando mais uma vez, o efeito sinérgico do sal na estabilidade da proteína, por aumento da força iônica do meio tamponante.

Dessa forma, os resultados encontrados demonstram que diferentes soluções tampões e valores de pH podem interferir e melhorar a estabilidade térmica da proteína analisada. De acordo com os dados obtidos, os melhores valores de temperatura de *melting* para a enzima *MtPhy* foram alcançados na presença de acetato de sódio, pH 5,0, quando a T_m atingiu 67°C e fosfato de

potássio, pH 5,0, com ou sem adição de 300 mM de NaCl, com T_m máxima de 64°C.

Considerando que o fosfato inviabiliza os testes com fitase, por ser o próprio produto da enzima, além de ter se mostrado como o segundo melhor tampão na manutenção da sua estabilidade, definiu-se o acetato de sódio, 50 mM, pH 5,0, como tampão para as próximas etapas de caracterização da enzima *MtPhy*. No entanto, para a realização das etapas posteriores, buscou-se comprovar a eficiência deste tampão pela técnica de dicroísmo circular.

5.8 Dicroísmo circular (CD)

A análise de dicroísmo circular (CD) foi realizada, visando confirmar os dados obtidos nos experimentos de *ThermoFluor*, em relação a estabilidade térmica da *MtPhy* em diferentes tampões, utilizando os 3 melhores tampões indicados pela técnica anterior: acetato de sódio (50mM) pH 5,0; fosfato de potássio (50 mM), pH 5,0 e o mesmo adicionado de 300 mM de NaCl.

A partir dos experimentos de desnaturação térmica, foi possível obter uma curva típica para a temperatura de desenovelamento da proteína. Dessa forma, os gráficos A, B e C da Figura 15 mostram os espectros de CD em função da temperatura nas 3 condições investigadas e a perda de estrutura secundária com o aumento da temperatura. Nos gráficos B e C é possível observar que as temperaturas de transição entre o estado enovelado e desenovelado (T_m) foram praticamente iguais no tampão fosfato com e sem NaCl (66,3 e 66,7°C, respectivamente), porém, superior à apresentada com o tampão acetato (63°C) no gráfico A (Figura 15). Tais dados, divergem dos resultados obtidos com a técnica de *ThermoFluor*, que indicou o acetato de sódio como o melhor tampão para a estabilidade da fitase, quando comparado com o fosfato de potássio, embora com pouca diferença entre eles.

Figura 15 – Espectros de dicroísmo circular, determinando a fração desenovelada da *MtPhy* e sua T_m em três diferentes tampões, no comprimento de onda 222 nm.

Fonte: Arquivo próprio

De qualquer forma, conforme mencionado anteriormente, a utilização do fosfato como tampão é inviável para os ensaios enzimáticos de fitases, o que torna o acetato de sódio, 50 mM, pH 5,0, o tampão de escolha, utilizado nas etapas de caracterização da *MtPhy*.

A T_m é considerada um dos melhores indicadores da termoestabilidade de uma proteína (MAURYA; PARASHAR; SATYANARAYANA, 2017) e ainda que se considere a menor temperatura de desnaturação encontrada com o tampão acetato (63°C), deve-se ponderar que 50% da população da proteína começa perder sua estrutura secundária, apenas nesta temperatura, o que pode caracterizar a *MtPhy* como uma enzima termoestável, principalmente, levando-se em conta que a mesma foi obtida de um fungo termofílico.

Medeiros (2008) estudou a desnaturação térmica da proteína cisteína fosfatase da soja utilizando a técnica de CD e encontrou que a enzima recombinante apresentou baixa estabilidade térmica (em torno de 34°C). Maurya; Parashar; Satyanarayana (2017) encontraram uma T_m de 73°C para a fitase do fungo termofílico *Sporotrichum thermophile*, observando a diminuição no conteúdo de α -hélice e aumento de regiões *random coil*, sugerindo perda da estrutura secundária e mostrando a função essencial das estruturas α -hélice na manutenção da conformação estrutural da fitase.

Sabe-se que a análise de espectroscopia de CD se apresenta como um excelente método para determinar a estrutura secundária de uma proteína

(GREENFIELD, 2006) e dessa forma, além de corroborar com os dados de estabilidade térmica de *MtPhy* obtidos anteriormente nos experimentos de *ThermoFluor*, o ensaio de CD foi conduzido para conhecer o enovelamento estrutural de predominância da enzima *MtPhy*.

As figuras 16, 17 e 18 mostram os espectros de CD da *MtPhy* obtidos nos 3 diferentes tampões, sendo possível notar a predominância de estrutura secundária referente à alfa-hélice, de acordo com os dois picos das bandas negativas observados próximos a 208 e 222 nm e uma pequena “banda” positiva entre 193 e 198 nm (GREENFIELD, 2006; MANZINI, 2011), apesar da diferença entre os espectros em cada um dos gráficos, devido à diferença entre os tampões utilizados.

Figura 16 – Espectro de dicroísmo circular da enzima *MtPhy* no intervalo de comprimento de onda de 195 a 270 nm, com tampão acetato de sódio (50 mM)

Fonte: Arquivo próprio

Figura 17 – Espectro de dicroísmo circular da enzima *MtPhy* no intervalo de comprimento de onda de 195 a 270 nm, com tampão fosfato de potássio (50mM)

Fonte: Arquivo próprio

Figura 18 – Espectro de dicroísmo circular da enzima *MtPhy* no intervalo de comprimento de onda de 195 a 270 nm, com tampão fosfato de potássio (50mM), acrescido de 300 mM de NaCl

Fonte: Arquivo próprio

A proteína tirosina fosfatase de soja estudada por Medeiros em 2008, com baixa estabilidade térmica, apresentou uma composição estrutural de 28% de α -hélice e 20% de folhas- β , bastante diferente da fitase estudada por Maurya; Parashar; Satyanarayana (2017), que apresentou uma estrutura secundária a 60°C composta de 26,65% de α -hélice, 5,26% de β -folha e 68,09% de regiões *random coils* em pH 5,0. Fonseca-Maldonado *et al.* (2014) avaliaram pela técnica de CD, a estabilidade térmica de uma fitase HAP clonada de *Aspergillus japonicus* CO3 e expressa em *P. pastoris* e observaram que a desnaturação da enzima iniciou quando a temperatura chegou a 50°C, encontrando uma T_m de 53°C. O espectro de CD observado por esses autores indicou que a enzima purificada

apresentava estrutura predominante de α -hélice, semelhante aos espectros observados para a enzima *MtPhy*. Os autores confirmaram a alto conteúdo de α -hélice pela estrutura tridimensional modelada da enzima.

Para confirmar a composição da estrutura secundária da *MtPhy*, foi realizada a predição de sua estrutura tridimensional, por meio de modelagem molecular. Para construção do modelo teórico, foi utilizada a sequência primária nativa da *MtPhy*, a fim de buscar similaridade com outras proteínas que já possuem sua estrutura tridimensional depositada em bancos de dados. Esta análise foi realizada utilizando a ferramenta *online* I-TASSER (Figura 19).

Figura 19 – Modelo de estrutura tridimensional da MtPhy, obtido pela ferramenta I-TASSER

Fonte: Arquivo próprio

De acordo com a figura 19, observa-se um modelo tridimensional da fitase com estrutura secundária quase que totalmente formado por α -hélices (em vermelho), com quantidade reduzida de estruturas em folha beta (em verde), comprovando o resultado obtido pela espectroscopia de CD.

5.9 Melhores condições de secreção da proteína *MtPhy*

A fim de buscar uma melhor expressão da *MtPhy*, diferentes meios e condições de cultivos foram avaliados:

- Meio mínimo (MM) sem glicose, com 5% de Maltose (*Sigma-Aldrich*);

- Meio mínimo (MM) sem glicose, com 5% de *HIGH* maltose (WE Consultoria);
- Meio mínimo (MM) com 1% de glicose e 5% de Maltose (*Sigma-Aldrich*);

Todos os meios foram testados para expressão da enzima *MtPhy*, cultivando o fungo transformante *A. nidulans* A773, por 24, 48 e 72h, a 37°C, sob agitação e de forma estacionária.

Ao final de cada período de incubação, foram coletadas alíquotas do extrato bruto para concentração e posterior aplicação em gel SDS-PAGE 15% para verificação da presença da proteína *MtPhy* (Figura 20).

Figura 20 - Geis de SDS-PAGE das diferentes condições de cultivo para secreção de *MtPhy*, em diferentes tempos, com e sem agitação

Fonte: Arquivo próprio

Nota: A: Meio mínimo + 5% de Maltose (*Sigma-Aldrich*)

B: Meio mínimo + 5% de *HIGH* Maltose

C: Meio mínimo + 1% de glicose + 5% de Maltose (*Sigma-Aldrich*)

As setas indicam as melhores bandas observadas em 72h, em A e C, sem agitação

**MW da *MtPhy*

Observou-se maior secreção de *MtPhy*, quando o fungo transformante *A. nidulans* A773, foi cultivado em meio mínimo contendo 1% de glicose e 5% de maltose (*Sigma-Aldrich*), por 72 horas, sem agitação (Figura 20C). Apesar de ter havido diferença na secreção da fitase com os diferentes meios de cultivo, mostrando que a maltose com alto grau de pureza foi a melhor indutora, pode-se observar que o tempo de cultivo de 72 h, sem agitação, foi o melhor em todas as situações, quase não havendo secreção da *MtPhy* nos meios com maltose *Sigma-Aldrich* e *HIGH* maltose, sem adição de glicose nos tempos de 24 e 48h, seja em cultivo agitado ou sem agitação (Figuras 20A e 20B).

No entanto, quando se utilizou a maltose com alto grau de pureza (*Sigma-Aldrich*) acrescida de 1% de glicose, observou-se secreção da *MtPhy* em praticamente todas as condições testadas, ou seja, em 24, 48 e 72h, com ou sem agitação do meio, embora com formação de banda mais expressiva para a forma estacionária (Figura 20C), mostrando a importância da presença de glicose no meio de cultivo suplementado com maltose. Contudo, não foi feito um teste para avaliar o efeito da *HIGH* maltose acrescida de 1% de glicose na secreção de *MtPhy*, não sendo possível, portanto, afirmar que a utilização da maltose de alto grau de pureza foi mais eficiente que a *HIGH* maltose para produção da *MtPhy*.

A partir da determinação da melhor condição de cultivo que possibilitou a secreção de maiores quantidades de *MtPhy*, todos os procedimentos em diante foram realizados através do cultivo do fungo *A. nidulans* em MM acrescido de 1% de glicose e 5% de maltose (*Sigma-Aldrich*) a 37°C, por 72 horas, sem agitação. A etapa de produção da *MtPhy* foi novamente realizada, sob estas condições e a enzima foi purificada, utilizando-se desta vez, o tampão acetato de sódio, 50 mM, pH 6,5, confirmando a maior secreção da enzima já na primeira etapa de concentração em aparato de ultra-filtração *Amicon-Millipore*, com corte de 10kDa, quando se verificou também uma pequena perda da enzima no eluato (*flow-through*) (Figura 21).

Figura 21 – Nova purificação da *MtPhy* após cultivo de 72 horas

Fonte: Arquivo próprio

Nota: M: Marcador de peso molecular

1: Extrato bruto concentrado 10x em membrana Amicon.

2: *Flow-through* (eluato) da ultra filtração por Amicon

*MW da *MtPhy*

Para verificar se a metodologia utilizada na esterilização do meio de cultivo do fungo transformante poderia influenciar na produção final da proteína, o meio foi esterilizado por autoclave (a 121°C, sob pressão de 1 atm, por 15 minutos) e por filtração, com frasco completo de filtração com membrana PES (poliestersulfona), 0,22 µm a vácuo (*BioNaky® Molecular Biology Line*) e incubado por 72h.

Após esse período e todas as etapas de purificação, as amostras coletadas na etapa de cromatografia por exclusão de tamanho, analisadas e confirmadas por SDS-PAGE, foram unidas e a concentração da enzima purificada foi quantificada em NanoDrop One_C – *Thermo Fisher Scientific*, obtendo-se ao final do processo, uma concentração de 0,116 mg/mL de *MtPhy* para as amostras obtidas com o fungo cultivado em meio esterilizado por autoclave e 0,3 mg/mL com o cultivo em meio esterilizado por filtração, comprovando que a esterilização do meio de cultura por filtração foi mais eficaz em manter os componentes do meio, portanto, melhorar a secreção da enzima.

5.10 Determinação de temperatura e pH ótimos

A atividade catalítica de uma enzima é influenciada pelas alterações dos valores de pH e temperatura do meio em que se encontram, uma vez que cada enzima apresenta faixa de pH e temperatura denominados de ótimos, onde sua atividade demonstra o máximo desempenho (FRANKBERGER; JOHANSON, 1982).

No caso das fitases, valores de pH e temperatura ótimos são características essenciais para que estas apresentem interesse comercial no uso em rações, uma vez que devem ser estáveis em temperaturas acima de pelo menos 70°C, considerando o tratamento térmico utilizado no processamento das rações e resistentes ao pH ácido do estômago de animais monogástricos (CASEY; WALSHY, 2003; KLOSOWSKI; MIKULSKI; JANKOWIAK, 2018; SANDHYA; SRIDEVI; SUARNALATHADEVI, 2019).

As reações para determinação do pH ótimo e da melhor temperatura de atividade fitásica foram realizadas com pH entre 3,5 e 7,0 e temperatura entre 30 e 85°C (Figura 22).

Em relação a influência do pH na atividade da enzima, a figura 22A mostra que a *MtPhy* apresentou atividade máxima em pH 5,0, mantendo cerca de 80% dessa atividade em uma faixa de pH, entre 4,5 e 5,5 confirmando os resultados apontados na análises do *ThermoFluor*, onde os tampões acetato de sódio e fosfato de potássio em pH 5,0 possibilitaram os maiores valores de Tm para a *MtPhy*, com temperaturas de 67 e 64°C, respectivamente.

Figura 22 – Efeito do pH e da temperatura na atividade enzimática da *MtPhy*

Fonte: Arquivo próprio

Resultados semelhantes foram observados em outros trabalhos. Klosowski; Mikulski; Jankowiak (2018) observaram uma faixa muito estreita de pH para a fitase isolada da levedura *S. cerevisiae*, obtendo a máxima atividade catalítica em pH 4,0, mas mantendo menos de 60% da atividade na faixa de pH 3,5 e 4,5; da mesma forma que Sandhya; Sridevi e Suvarnalathadevi (2019), cuja fitase produzida pelo fungo *Aspergillus niger* S2 apresentou um valor ótimo de pH igual a 5,0, mas com queda para menos de 70% na atividade em pH 4,5 e menor que 60% em pH 5,5.

Ainda em relação ao pH, pode-se observar na figura 22A que a partir do pH 6,0, praticamente não há mais atividade catalítica para a *MtPhy*, característica observada para a maioria das fitases microbianas (SAPNA, 2017; SANDHYA; SRIDEVI; SUARNALATHADEVI, 2019). Resultado similar foi encontrado por Fugthong *et al.* (2010), na caracterização de uma fitase recombinante do fungo *Eupenicillium parvum*, a qual apresentou pH ótimo igual a 5,5 e ausência de atividade em pH 7,0. Monteiro (2011), encontrou um pH ótimo entre 5,0 e 5,5 para a fitase do fungo *Rhizopus stolonifer*, a qual apresentou uma redução em sua

atividade enzimática para menos que 10% quando exposta a valores de pH abaixo de 4,0 e acima de 7,0. Fitase purificada do fungo *A. oryzae* exibiu atividade máxima em pH 5,0, mantendo mais de 60% de sua atividade em pH 6,0 e redução significativa (menos de 20% de sua atividade) em pH a partir de 7,0 (SAPNA, 2017).

Na literatura, poucos estudos descrevem a produção de fitases alcalinas, com atividade máxima em pH maior que 7 e não há estudos que relatem fitases produzidas por fungos com máxima atividade em pH alcalino (SATO, 2015; ARIF *et al.*, 2018).

Considerando o ambiente ácido do estômago (entre 2 e 4) dos animais monogástricos (YIN; ZHENG; KANG, 2007; QVIRIST *et al.*, 2015; AJITH *et al.*, 2019), dificilmente haverá uma fitase que demonstre eficiência desejada nos menores valores dessa faixa de pH, uma vez que as características das fitases relatadas até o momento concluem que a maioria dessas enzimas pertencem à família das fosfatases ácidas histidinas (HAP), cuja provável eficiência catalítica máxima seja em torno de 4,0 a 5,5 (YAO *et al.*, 2011; LEI *et al.*, 2013, TAN *et al.*, 2015). Além disso, é sabido que as fitases provenientes de fungos geralmente apresentam atividade catalítica máxima na faixa de pH entre 4,5 e 6,0 (SANDHYA; SRIDEVI; SUVARNALATHADEVI, 2019).

No entanto, o pH do trato digestório dos animais não se restringe ao pH extremamente ácido do estômago (YIN; ZHENG; KANG, 2007; MALLER *et al.*, 2016). A digestão pode se iniciar na boca, onde o pH da glândula salivar fica entre 5 e 6, continuar ou se iniciar no estômago, com pH entre 2 e 4, e finalmente, finalizar no intestino delgado, cuja faixa de pH fica entre 4 e 7 (Figura 23) (AJITH *et al.*, 2019).

Portanto, uma enzima com atividade catalítica máxima em pH muito ácido também não é desejada, uma vez que sua atuação ficaria restrita apenas a um local de digestão, o estômago.

Figura 23 – Trato digestório de um suíno e seus diferentes valores de pH

Fonte: (adaptado de Kringen-Scholtz, 2018)

Dessa forma, mesmo a enzima *MtPhy* demonstrando sua maior atividade em uma estreita faixa de pH, os valores observados nessa faixa corroboram com outros estudos encontrados na literatura e permitem considerar a possibilidade de hidrólise do fitato pelos animais monogástricos, com início na boca, finalizando no intestino delgado.

Em relação à temperatura, ao se analisar o comportamento da *MtPhy* em diferentes valores, encontrou-se uma atividade catalítica máxima em 60°C (Figura 22B), e a manutenção de mais de 80% dessa atividade em 50°C. Quando se aumentou a temperatura para 65°C, a eficiência catalítica da enzima foi reduzida para 60%. Tais resultados foram compatíveis com os obtidos nas análises por *ThermoFluor*, cujo valor máximo de Tm obtido em tampão acetato de sódio, pH 5, foi de 67°C e por CD no mesmo tampão, 63° C. Maurya; Parashar e Satyanarayana (2017), descreveram resultados muito semelhantes, ao observarem a máxima atividade para a fitase do fungo *Sporotrichum thermophile* na temperatura de 60°C e uma Tm aproximada de 73°C por análise de CD.

A medida que se aumenta a temperatura acima da faixa ótima de uma enzima, há perda de estrutura secundária, causando alterações no seu sítio ativo e, conseqüentemente, sua desnaturação (MAURYA; PARASHAR; SATYANARAYANA, 2017; SANDHYA; SRIDEVI; SUVARNALATHADEVI, 2019).

Apesar de demonstrar redução de 60% na sua atividade em temperatura de 65°C, a temperatura ótima de 60°C da *MtPhy* é superior a várias outras

descritas em trabalhos na literatura. Fitase obtida do fungo *A. niger* e expressa em *P. pastoris* mostrou atividade máxima aos 55°C (ZHAO *et al.*, 2007). Fitases de *A. flavus* e *A. niger* UFV-1, apresentaram temperaturas ótimas de 45 e 50°C, respectivamente (GAIND; SINGH, 2015; MONTEIRO *et al.*, 2015). Fitases de *Candida krusei* Wz-001, *R. microsporus* e *A. fumigatus* tiveram atividade máxima em 40 °C (QUAN *et al.*, 2002; SATO, 2015; SANNI; LAWAL; ENUJIUGHA, 2019) e uma fitase de *A. niger* CFR 335, apresentou 100% de atividade em temperatura de 30°C (GUNASHREE; VENKATESWARAN, 2015).

5.10 Estabilidade térmica

Apesar de conhecer a temperatura em que a fitase apresenta sua *performance* máxima para que a mesma tenha aplicação industrial, é preciso conhecer seu comportamento frente a diferentes temperaturas, por determinados períodos de tempo (HALLAJI *et al.*, 2019). Dessa forma, a termoestabilidade da *MtPhy* foi medida em três diferentes temperaturas (40, 50, e 60°C), por diferentes intervalos de tempo (Figura 24).

Figura 24 – Estabilidade térmica da *MtPhy* em diferentes temperaturas e tempo.

Fonte: Arquivo próprio

Embora tenha demonstrado uma atividade máxima na temperatura de 60°C, a *MtPhy* perdeu cerca de 80% de sua eficiência após ser incubada na mesma temperatura por 15 minutos.

Por outro lado, manteve praticamente 100% de sua atividade catalítica quando foi incubada por pelo menos 2 horas às temperaturas de 40 e 50°C, característica bastante desejada para a temperatura de 40°C, quando se considera que irá atuar no trato digestório de animais monogástricos, cuja temperatura é em torno de 37°C (HUSSIN *et al.*, 2007; ZHAO *et al.*, 2007).

Vários trabalhos descrevem perda relativa de atividade em temperaturas maiores que 40°C em fitases de diferentes origens. A fitase de *A. fumigatus* apresentou apenas 48% de sua atividade após 1h de incubação a 50°C e 27% em 60°C no mesmo tempo (SANNI *et al.*, 2019). A fitase de *P. pastoris* reteve somente 50% de sua atividade após 40 minutos em 50°C e 23% a 60°C, no mesmo período de tempo (FONSECA-MALDONADO *et al.*, 2014). A enzima de *S. cerevisiae* manteve 90% de sua atividade máxima a 40°C e 75% em 50°C, após 30 minutos de incubação (KLOSWSKI; MIKULSKI; JANKOWIAK, 2018) e os fungos *E. parvum* e *A. foetidus*, demonstraram estabilidade térmica ainda mais baixa, sendo que *E. parvum* perdeu 40% de sua atividade em 10 minutos quando incubado a 40°C e foi quase completamente inibido após 5 minutos de incubação a 50°C e *A. foetidus* manteve 87% de sua atividade após 30 min a 50°C (FUGTHONG *et al.*, 2010; AJITH *et al.*, 2019).

Dessa forma, pode-se afirmar que a *MtPhy*, apesar de ter sua atividade catalítica reduzida em 80% na temperatura de 60°C após 15 minutos, foi extremamente estável em 40 e 50°C, demonstrando assim uma característica desejada para uso em rações, considerando a temperatura próxima de 40°C do trato digestório dos animais monogástricos.

5.11 Efeitos de compostos iônicos e outros aditivos sobre a atividade da fitase

É extremamente importante conhecer a ação de íons e outros aditivos sobre a enzima, uma vez que alguns podem agir como cofatores, aumentando significativamente sua atividade, porém, outros podem inibi-la, por interagir quimicamente com a mesma, alterando sua estabilidade e solubilidade (ZHAO, 2005). Sendo assim, a análise da influência de compostos iônicos sobre a atividade da enzima *MtPhy*, na concentração de 5 mM é demonstrada na Tabela 10. Os íons Ca^{2+} e Mg^{2+} demonstraram uma melhora na atividade catalítica da

fitase de 15,3 e 18,3%, respectivamente, enquanto Fe^{+3} , Cu^{+2} , Co^{+2} e Zn^{+2} , inibiram a enzima, sendo o maior nível de inibição observado na presença de Fe^{+3} e Cu^{+2} , os quais causaram uma redução na atividade enzimática de 96,6 e 50,7%, respectivamente.

Tabela 10 – Efeito de vários compostos iônicos na atividade enzimática da *MtPhy*

Composto iônico (5mM)	Atividade relativa (%)
Controle	100
CaCl_2	$115,3 \pm 4,7v$
NaCl	$97,9 \pm 0,8$
ZnSO_4	$72,4 \pm 6,5$
KCl	$94,9 \pm 4,3$
MnCl_2	$101,3 \pm 1,9$
CoCl_2	$55,1 \pm 2,6$
Na_2SO_4	$95,1 \pm 5,1$
MgCl_2	$118,4 \pm 10,2$
FeCl_3	$3,4 \pm 0,3$
CuSO_3	$49,3 \pm 3,0$

Fonte: Arquivo próprio

Nota: A atividade enzimática sem adição de metal foi considerada como controle. Os valores das médias e desvio padrão são referentes às triplicas.

O efeito benéfico do cálcio na atividade da fitase é amplamente descrito na literatura, assim como o efeito do magnésio e manganês. A glicose-1-fosfatase, com atividade de fitase (AgpP) de *Pantoea agglomerans* apresentou aumento de até 200% em sua atividade, na presença dos íons Ca^{+2} , Mg^{+2} e Mn^{+2} (SULEIMANOVA *et al.*, 2015). O Ca^{+2} e o Mg^{+2} na concentração de 5 mM aumentaram em 122,7 e 112,8%, a atividade da fitase de *A. niger* CFR 335, respectivamente (GUNASHREE; VENKATESWARAN, 2015). Uma fitase recombinante demonstrou atividade aumentada na presença de Mn^{+2} , mas apenas 50% da atividade dessa enzima foi mantida na presença de Ca^{+2} (HALLAJI *et al.*, 2019). O Mg^{+2} e Mn^{+2} foram os responsáveis pelo maior aumento na atividade da fitase da levedura *S. cerevisiae* (mais de 20%) em concentrações de 5 mM, mas em maiores concentrações (10mM), esses mesmos íons provocaram inibição na atividade, o que não foi o caso do íon Ca^{+2} , que mesmo

em altas concentrações, manteve a atividade catalítica desta enzima em 112% (KLOSOWSKI; MIKULSKI; JANKOWIAK, 2018). Avaliando o efeito de diversas substâncias e íons sobre a atividade da fitase produzida em biofilmes de *R. microsporus var. microsporus*, Sato (2015) observou que o Ca^{+2} foi o íon que mais ativou a fitase (142,92%).

O efeito dos íons Ca^{+2} e Mg^{+2} sobre a atividade da *MtPhy* foi testado novamente, agora em diferentes concentrações (Figura 25), demonstrando que não houve grandes diferenças na atividade da fitase ao se aumentar a concentração do íon Ca^{+2} até 20 mM, cujos valores passaram de 115,5 para 121,8%.

Figura 25 – Íons ativadores da atividade da fitase em duas diferentes concentrações

Fonte: Arquivo próprio

Entretanto, quando se aumentou a concentração de Mg^{+2} , observou-se um aumento considerável na atividade da enzima, chegando a 35% de sua atividade na presença de 20 mM do íon.

A enzima fitase isolada de um metagenoma teve sua atividade ligeiramente elevada pelo Ca^{+2} em uma concentração de 20mM, mas foi inibida em maiores concentrações (50mM) e não sofreu influência significativa em baixas concentrações de Mg^{+2} , mas também foi inibida quando essa concentração aumentou para 20mM e 50mM (TAN *et al.*, 2016). Em comparação, outra fitase isolada de metogenoma, não demonstrou qualquer efeito inibitório na presença do Ca^{2+} em concentrações de até 50 mM (TAN *et al.*, 2015) e a fitase isolada de *A.*

fumigatus foi estimulada na presença de íon Ca^{+2} em todas as concentrações testadas (SANNY; LAWAL; ENUJIUGHA, 2019).

De maneira geral, pode-se observar que o cálcio parece ser benéfico para a atividade da maioria das fitases, apesar de algumas serem inibidas em sua presença, como a enzima fitase de *S. thermophile* que mostrou inibição de 30 e 12% na presença de 5mM de Ca^{+2} e Mn^{+2} , respectivamente (SINGH; SATYANARANA, 2009), da mesma forma que a fitase de *A. niger* UFV-1, cuja atividade foi ligeiramente inibida na presença de 5mM de Ca^{+2} e Mg^{+2} (MONTEIRO, 2011), efeito completamente contrário ao observado na atividade da *MtPhy*, que nas mesmas concentrações apresentou aumento de 14,3 e 11,4%, respectivamente.

É bastante conhecido o papel do cálcio em estimular e estabilizar as fitases microbianas em concentrações moderadas. No entanto, em excesso pode levar a inibição da enzima por competição, ao se ligar ao sítio ativo da fitase (PRIYODIP; PRAKASH; BALAJI, 2017). Porém, considerando que vários compostos são frequentemente adicionados às rações animais de maneira a melhorar sua nutrição mineral, a habilidade das fitases em manter sua atividade na presença destes elementos é muito importante (TAN *et al.*, 2016), permitindo sugerir que a *MtPhy* é adequada para aplicação em ração animal contendo suplementação de cálcio (TAN *et al.*, 2015).

Por outro lado, a atividade da *MtPhy* foi inibida na presença de alguns íons, principalmente Fe^{+3} , Cu^{+2} , Co^{+2} e Zn^{+2} , testados na concentração de 5mM. O íon Fe^{+3} foi o principal inibidor da enzima, reduzindo sua atividade para 3,4% e o Cu^{+2} , para cerca de 49%. Os íons Fe^{+3} e Cu^{+2} têm sido frequentemente descritos como fortes inibidores de várias fosfatases e fitases de diferentes organismos, tais como a fitase de *Mitsuokella jalaludinii* que demonstrou uma inibição significativa em sua atividade na presença de Cu^{+2} e Zn^{+2} e foi quase que completamente inibida pelos íons Fe^{+2} e Fe^{+3} , que reduziram sua atividade para 1,8% e 1,3%, respectivamente (LAN *et al.*, 2011). A atividade da fitase de *A. niger* CFR 335 foi reduzida para 56,7% na presença de 5mM de Fe^{+2} (GUNASHREE; VENKATESWARAN, 2015). O fungo *A. oryzae* SBS50 mostrou redução em sua atividade para 1, 10 e 17%, na presença de 5mM dos íons, Fe^{+2} , Cu^{+2} e Fe^{+3} , respectivamente (SAPNA, 2017). Ao contrário de muitas outras fitases ácidas

purificadas de fontes vegetais, as fitases de *R. oligosporus* foram inibidas pelo Zn^{+2} , Fe^{+2} e Fe^{+3} (AZEKE; GREINER; JANY, 2011).

Dessa forma, fica claro que grande parte das fitases descritas até o momento são fortemente inibidas por ferro, zinco e cobre. No entanto, não se sabe se esse efeito inibitório é resultado da formação de um complexo insolúvel resultante da ligação do fitato com esses íons metálicos e consequente, redução na concentração do ácido fítico disponível para a enzima, ou se resulta da ligação desses íons diretamente com a enzima (SINGH; SATYANARAYNA, 2009; MONTEIRO, 2011; TAN *et al*, 2016; HALLAJI *et al.*, 2019).

A influência de outros potenciais agentes moduladores da atividade da fitase, incluindo vários detergentes, desnaturantes e agentes redutores e quelantes, também foi testada, conforme demonstrado na Tabela 11.

Tabela 11 – Efeito de outros aditivos na atividade da fitase

Aditivos	Atividade enzimática relativa (%)	
Controle	100	
Detergentes e desnaturantes	0,1%	0,5%
Triton	91 ± 1,7	64 ± 1,42
Tween 20	94 ± 1,7	77 ± 0,93
Tween 80	98 ± 0,26	79 ± 2,57
SDS	5 ± 2,22	0,6 ± 0,29
Outros aditivos	1 mM	5 mM
PMSF	92 ± 2,96	35 ± 3,05
DTT	88 ± 4,24	73 ± 1,38
EDTA	78 ± 3,33	72 ± 1,06
Molibdato	64 ± 4,77	27 ± 0,84
B-mercapto	84 ± 4,97	73 ± 1,78

Fonte: Arquivo próprio

Entre os detergentes/desnaturantes testados, na concentração de 0,1% quase não houve influência na atividade da *MtPhy* na presença de Triton, Tween

20 e Tween 80, quando comparada ao controle; enquanto que o SDS reduziu intensamente sua atividade. Com aumento da concentração dos agentes, a inibição da enzima foi aumentada na presença de todos os agentes, mas quase que completamente inibida por SDS a 0,5%. Resultados semelhantes com o detergente SDS foram observados em outros estudos, no entanto, os detergentes Triton X-100 e Tween, nem sempre demonstraram efeito inibitório sobre a atividade das fitases. Os detergentes Tween 60, Tween 80 e Triton X-100 estimularam a atividade da fitase de *A. oryzae*, enquanto o SDS reduziu esta para próximo da metade (SAPNA *et al.*, 2017), assim como ocorreu com a fitase de *S. thermophile* BJTLR50 que foi fortemente inibida pelo SDS, enquanto Tween 20, 40 e 80 a estimularam (SINGH; SATYANARAYANA, 2009). Detergentes como Tween e Triton X-100 são considerados suaves, uma vez que não interagem intensamente com a superfície da proteína, enquanto que o detergente iônico SDS pode se ligar de forma inespecífica à superfície da proteína, levando à sua desnaturação. Por alterar a conformação da proteína, o SDS também pode causar mudanças na região em que se encontra o sítio ativo, e consequente a inativação da enzima (SINGH; SATYANARAYANA, 2009; SAPNA *et al.*, 2017).

Da mesma maneira que foi observada com a *MtPhy*, a fitase de *A. foetidus* MTCC 11682 permaneceu estável na presença de Triton X-100 e Tween 80 na concentração de 0,05%, mas foi severamente reduzida na presença de SDS e Tween 20 na mesma concentração (AJITH *et al.*, 2019). Fugthong *et al.* (2015) observaram que a fitase de *Eupenicillium parvum* BCC17694 expressa em *P. pastoris*, manteve sua atividade na presença do detergente Tween 20, mas foi extremamente inibida pelo detergente aniônico SDS, sugerindo que essa inibição seja devido a interações entre a carga negativa do detergente e o sítio ativo carregado positivamente das fitases classificadas como fofatases histina ácidas (HAP), tornando seu sítio ativo indisponível para o fitato.

Tan *et al.* (2016) sugerem que o efeito estabilizante dos detergentes não aniônicos, como Tween 20 e 80 seja devido a possíveis formações de pontes de hidrogênio entre a proteína e o solvente. Em relação aos demais aditivos avaliados, todos apresentaram efeito negativo em maior ou menor grau na atividade da fitase, sendo que na concentração de 1mM, o efeito mais severo foi na presença de Molibdato, seguido de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético).

Quando se aumentou a concentração para 5mM, a inibição pelo molibdato foi ainda maior (de 64% em 1mM e 27% em 5mM) e o PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil) reduziu drasticamente a atividade da *MtPhy* (35%) (Tabela 8; Figura 28). Geralmente, as fitases são inibidas pelos aditivos DTT e β -mercaptoetanol (FUNGTHONG *et al.*, 2010; MONTEIRO *et al.*, 2015; TAN *et al.*, 2016; SAPNA *et al.*, 2017, AJITH *et al.*, 2019; VILLAMIZAR *et al.*, 2019a), enquanto outras, como 2 fitases obtidas de *A. niger* NCIM 563 e outra produzida por *S. thermophile*, não apresentaram alteração em suas atividades na presença dessas substâncias (SINGH; SATYANARAYAMA, 2009; SONI; MAGDUM; KHIRE, 2010).

Considerando que a maior parte das fitases possui um determinado número de resíduos de cisteínas, que podem resultar em pontes dissulfeto, a ação inibidora dos aditivos DTT e β -mercaptoetanol pode estar relacionada ao rompimento de ligações dissulfídicas das proteínas, sugerindo que o grupo sulfidril a possa estar envolvido na atividade catalítica da enzima (SINGH; SATYANARAYAMA, 2009; MONTEIRO *et al.*, 2015, VILLAMIZAR *et al.*, 2019a).

O resultado encontrado com o molibdato na atividade da *MtPhy* também foi descrito para a fitase de *A. oryzae*, que foi significativamente inibida por esse composto nas concentrações de 1 e 5mM, cuja atividade caiu para 46 e 20% (SAPNA, 2017), bastante semelhante ao observado no presente trabalho. Azeke; Greiner; Jany (2009), descreveram o molibdato como o mais potente de todos os inibidores testados contra a atividade de duas fitases do fungo *R. oligosporus*, chegando praticamente a inibi-las.

Fugthong *et al.* (2010) observaram que o inibidor de protease PMSF, inibiu quase que completamente a atividade da fitase de *E. parvum* (BCC17694) expressa em *P. pastoris*, na concentração de 5 mM e Tan *et al.* (2016), observaram que essa a enzima é inibida, conforme se aumenta a concentração de PMSF, sendo que a 0,1 mM, não houve interferência na fitase isolada de metagenoma de fungos, mas na concentração de 10 mM, a enzima foi praticamente inibida. No caso da enzima *MtPhy*, houve uma redução em sua atividade com o aumento da concentração para 5mM, mas essa inibição não foi tão acentuada, uma vez que a enzima manteve 35% de sua atividade.

O EDTA é um composto quelante, capaz de formar complexos estáveis com vários íons metálicos e na maioria das enzimas, afeta a atividade catalítica

negativamente (SATO, 2015), o que foi comprovado para a atividade da *MtPhy* que apresentou redução em sua atividade, embora de forma mais amena que os demais aditivos. Outros autores também avaliaram a presença de EDTA em enzimas fitases e observaram apenas uma pequena redução em sua atividade (GULATI; CHADHA; SAINI, 2007; FUGTHONG *et al.*, 2010; VILLAMIZAR *et al.*, 2019a). No entanto, Monteiro *et al.* (2015) observaram aumento intenso na atividade da fitase de *A. niger* UFV-1, que chegou a 130%, comparada ao controle. Aumentos mais discretos também foram descritos por Zhang *et al.* (2010) e Sanni *et al.* (2019).

Por outro lado, algumas enzimas fitases não foram afetadas pelo agente quelante EDTA, sugerindo que essas fitases não sejam dependentes de íons metálicos para sua atividade, característica semelhante à observada na maioria das fitases, com exceção das fitases alcalinas, que são dependentes de cálcio (YAO *et al.*, 2011; SATO, 2015; SAPNA *et al.*, 2017). No entanto, essa única característica não é suficiente para caracterizar uma fitase.

5.13 Determinação da especificidade ao substrato

A habilidade da enzima *MtPhy* para desfosforilar vários substratos está descrita na figura 26, tendo como controle de reação, o substrato fitato de sódio.

Os substratos que demonstraram menor afinidade com a fitase foram a adenosina monofosfato (AMP), adenosina difosfato (ADP) e adenosina trifosfato (ATP), com 8,2, 21,5 e 14,2% de afinidade, respectivamente. Com exceção do substrato fenilfosfato de sódio, pelo qual a fitase apresentou intensa afinidade (196%), o fitato de sódio foi o substrato pelo qual a enzima mostrou a mais alta taxa de desfosforilação, comprovando ser esse o melhor substrato para a *MtPhy*, similar ao observado por vários autores (GUNASHREE; VENKATESWARAN, 2015; TAN *et al.*, 2016; SANDHYA; SRIDEVI; SUVARNALATHADEVI, 2019), o que sugere que a *MtPhy* seja uma verdadeira fitase, ao invés de uma fosfatase ácida, que possui afinidade ocasional pelo ácido fítico (TAN *et al.*, 2015).

Figura 26 – Especificidade da *MtPhy* em diferentes substratos

Fonte: Arquivo próprio

A fitase de *A. niger* ATCC 9142 mostrou boa afinidade para o fitato, principalmente o fitato de cálcio, e muito baixa afinidade para todos os outros compostos testados (CASEY; WALSH, 2003), diferente da fitase de *A. oryzae*, que demonstrou ser mais ativa no substrato fitato de cálcio, mas apresentou grande afinidade pelo ADP e ATP e fenilfosfato de sódio, além do fitato de sódio (SAPNA, 2017). Já as fitases de *A. niger* UFV-1 e *A. ficuum* NTG-23, apresentaram afinidade por uma ampla variedade de compostos fosforilados, exibindo atividades de até 3 vezes maior para alguns compostos, que para o fitato de sódio (ZHANG *et al.*, 2010; MONTEIRO *et al.*, 2015; VILLAMIZAR *et al.*, 2019b).

Ensaio *in vitro* com ração animal sugerem que enzimas que degradam o fitato, mas apresentam afinidade por vários outros substratos, são mais apropriadas para alimentos e rações, do que enzimas que degradam praticamente apenas o fitato (WISS *et al.*, 1999; SINGH; SATYANARAYANA, 2011), uma vez que outros compostos fosforilados podem estar presentes nas rações, possibilitando maior liberação de fósforo para o animal, independente da fonte desse mineral. Quando comparadas com fitases bacterianas, que são bastante específicas ao fitato, as fitases de fungos termofílicos geralmente apresentam afinidade por diversos compostos fosforilados, mas com maior

afinidade para o fitato (SINGH; SATYANARAYANA, 2011), como observado para a *MtPhy*.

5.14 Parâmetros cinéticos da *MtPhy*

Antes de se determinar as características cinéticas da enzima, foi necessário estabelecer as condições ótimas da reação catalítica, para uma correta determinação da atividade específica da enzima. Para isso, utilizando-se o pH e temperatura ótimos, foi realizada uma análise prévia da liberação do produto em relação ao tempo, a fim de comprovar se a reação de 30 minutos, utilizada até aquele momento era suficiente ou excessiva para a conversão total do substrato. A atividade da enzima foi medida em diferentes tempos de reação: 5, 15, 30, 60 e 90 min. De acordo com a Figura 27, foi possível observar uma curva linear de liberação do produto nos primeiros 5 minutos de reação até 30 minutos. Após esse tempo, a curva tendeu para estabilização, mostrando que não houve mais aumento na liberação do produto.

Figura 27 – Curva de liberação do produto da reação

Fonte: Arquivo próprio

Este comportamento da curva indica que o tempo total de 30 minutos foi o tempo suficiente para a conversão de todo o substrato em produto nestas condições. A atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar um μmol de fósforo por minuto.

O tempo de incubação foi de 5 minutos a 60°C, pH 5,0, a partir de fitato de sódio a concentração de 1,5 mM, para o cálculo da atividade específica que foi de 954,8 U/mg.

A enzima mostrou um comportamento cinético que se ajusta ao proposto por Michaelis-Menten, onde a velocidade da reação é afetada pelo aumento da concentração do substrato (Figura 28), mantendo-se constante até atingir a maior concentração de substrato, que foi de 1,5 mM.

Os parâmetros cinéticos da *MtPhy* foram determinados utilizando fitato de sódio como substrato e estão demonstrados na Tabela 12.

Figura 28 – Velocidade da reação enzimática de *MtPhy* em relação à concentração do substrato (Michaelis-Menten)

Fonte: Arquivo próprio

Tabela 12 – Parâmetros cinéticos determinados para a enzima *MtPhy*

Parâmetros cinéticos	
Atividade específica	954,8 U/mg
K _m	0,7499 ± 0,1409 mM
V _{max}	0,07078 ± 0,0037 µmol/min
K _{cat}	256,8 ± 66,68 s ⁻¹
K _{cat} /K _m	342,45 x 10 ⁵ mM ⁻¹ s ⁻¹

Fonte: Arquivo próprio

A atividade específica da *MtPhy* (954,8 U/mg) foi bastante superior a de várias outras fitases descritas na literatura, de diferentes fungos, cujas atividades específicas variaram de 10,3 a 303,7 U/mg (WYSS *et al.*, 1999; AZEKE *et al.*, 2011; GUNASHREE; VENKATESWARAN, 2015; SAPNA; SINGH, 2017; TANG *et al.*, 2018; SANNI *et al.*, 2019). Isso demonstra grande afinidade da enzima *MtPhy* ao substrato fitato de sódio.

O valor de Km encontrado (0,7499mM) ficou dentro da faixa reportada para a maioria das fitases, que se encontra entre 0,72 e 7,2 mM, assim como o valor de Kcat (256,8 s⁻¹) reportado entre 37,8 e 398 s⁻¹ (KONIETZNY; GREINER, 2002; ZHAO *et al.*, 2007; MONTEIRO, 2011; SINGH, 2014; SATO, 2015; SAPNA, 2017; SANNI *et al.*, 2019).

Quanto à eficiência catalítica, o valor de Kcat/Km da enzima *MtPhy* (3,42 x 10⁵ M⁻¹s⁻¹) foi compatível com outros descritos para fitases de diferentes organismos na literatura, que variaram de 0,7 a 2,4 x 10⁵ M⁻¹s⁻¹ (SING; SATYANARAYANA, 2009; VILLAMIZAR *et al.*, 2019), até valores mais altos, como 20, 47 e 122,8 x 10⁵ M⁻¹s⁻¹ (HUANG *et al.*, 2006; ZHAO *et al.*, 2007; MONTEIRO *et al.*, 2015).

5.15 Hidrólise *in vitro* em rações para aves

A ação da *MtPhy* na hidrólise do fitato e outros compostos fosfatados possivelmente presentes em duas diferentes rações foi avaliada.

Em relação à ração a base de milho (Figura 28), obtida junto ao Departamento de Zootecnia, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, cuja composição era 58% de milho como única fonte vegetal e, portanto, única fonte de fósforo na forma de ácido fítico, observou-se que a partir da primeira coleta da amostra, em 30 minutos, a enzima já apresentou ação sobre o fitato liberando fósforo, em comparação ao controle (ração sem adição de *MtPhy*).

Conforme se observa na Figura 29, após 7 horas de tratamento, quando foram liberados em torno de 0,5μmol de fósforo no meio, a concentração de fósforo se estabiliza, possivelmente devido à inibição pela elevada concentração do mineral no meio.

Figura 29 – Ensaio *in vitro* de ação da *MtPhy* em ração a base de milho

Fonte: Arquivo próprio

Singh; Satyanarayana (2009) também observaram que a fitase de *S. thermophile* foi parcialmente inibida a concentração de 0,5 μmol de fosfato inorgânico no meio da ração. Monteiro (2011) demonstrou que após 5 horas de tratamento de uma ração comercial com a fitase do fungo *R. stonilofer* a liberação de fosfato foi estabilizada. Wiss *et al.* (1999), observaram inibição da fitase e *A. fumigatus* após cerca de 6 horas de tratamento de uma ração comercial suplementada com 250 U da fitase e mais de 7 horas para a inibição da fitase de *A. niger* usada na mesma concentração.

Em relação à ração comercial (Figura 30), tratada sob duas condições: apenas com *MtPhy* (750U) e com *MtPhy* (750U) + xilanase (750U), foi observado que a adição da xilanase não teve qualquer efeito significativo na liberação do fósforo, discordando de estudos que afirmam haver atuação sinérgica entre as duas enzimas na hidrólise do fitato (COWIESON *et al.*, 2019; AZZAZ *et al.*, 2019).

Estudos descreveram aumentos na digestibilidade ileal de nutrientes e melhora na absorção de aminoácidos e produção de energia quando formulações enzimáticas mistas eram adicionadas às rações, ao invés de se utilizar apenas a enzima fitase (CANGUSSU *et al.*, 2018; COWIESON *et al.*, 2019). Tais resultados foram explicados pelo fato de que a maioria do fitato dos grãos de cereais se encontra nas camadas mais externas dos grãos, onde também está presente grande parte das fibras. Se estas forem degradadas, haverá aumento na

disponibilidade do fósforo para os animais (LINDBERG *et al.*, 2007). No caso das xilanases, considerando a maciça presença de arabinoxilanas na camada aleurona dos grãos de cereais, juntamente com o fitato, essas enzimas poderiam atuar em sinergia com as fitases, degradando as arabinoxilanas da parede celular, permitindo maior acesso ao fitato pelas fitases (JANG *et al.*, 2017)

Figura 30 – Ensaio *in vitro* de ação da *MtPhy* em ração comercial

Fonte: Arquivo próprio

No entanto, não foi observado qualquer efeito significativo na liberação do fósforo com a adição de xilanase na ração, mostrando que a única ação sobre o fitato causando a liberação do fósforo na ração, foi proveniente da *MtPhy*.

Alguns autores testaram o efeito na digestibilidade de nutrientes e taxa de crescimento em suínos com adição de fitase e xilanase em rações e observaram digestibilidade aumentada do cálcio com a suplementação de fitase, devido à degradação do fitato que formava complexos insolúveis com o mineral. Porém, também não observaram melhora com a adição da xilanase na ração, não conseguindo confirmar o efeito sinérgico entre as enzimas (LINDBERG *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2008; JANG *et al.*, 20117)

5.16 Resistência à proteólise

Uma vez que a fitase é comumente produzida com a finalidade de suplementação em rações animais, a resistência da *MtPhy* à proteólise pelas

enzimas pepsina e tripsina, encontradas no trato digestório dos animais monogástricos foi testada (Figura 31).

Figura 31 – Resistência da *MtPhy* à proteólise pelas enzimas pepsina e tripsina em 37°C

Fonte: Arquivo próprio

A enzima *MtPhy* demonstrou alta estabilidade na presença de enzimas proteolíticas na proporção de 1:1 (pepsina ou tripsina/fitase), retendo quase que por completo sua atividade na presença da tripsina e mais que 90% da atividade residual, na presença da pepsina, durante todo o tempo de incubação de 1 hora e 30 minutos (Figura 30), resultados semelhantes aos obtidos por Zhang *et al.* (2010) com a fitase de *Aspergillus ficuum* NTG-23 e Monteiro *et al.* (2015), com a fitase de *Aspergillus niger* UFV-1, que apresentaram mais que 90% de sua atividade na presença de ambas enzimas proteolíticas na proporção de 1:1 por 60 minutos.

Entretanto, outros trabalhos não obtiveram resultados tão satisfatórios. Huang *et al.* (2008), estudaram a resistência à pepsina de fitases recombinantes de diferentes organismos, na proporção de 1:10 (pepsina:fitases), por 60 minutos e observaram pouca variação na atividade das fitases de *Yersinia rohdei* e *Y. intermedia* após 60 minutos de incubação, mas redução de 55% de atividade da fitase de *Aspergillus niger* em 20 minutos de incubação e inibição total da fitase de *Yersinia pestis* após 10 minutos de incubação.

Apesar de demonstrar resistência à pepsina em diferentes proporções testadas, a fitase recombinante de *Eupenicillium parvum* BCC 17694 mostrou baixa resistência à tripsina, mesmo em concentrações mais baixas como a

proporção de 1:500 (tripsina/fitase, m/m) (FUGTHONG *et al.*, 2010). Da mesma forma, a fitase recombinante de *Aspergillus fumigatus* apresentou boa resistência à pepsina em várias concentrações analisadas, mas perdeu quase que toda sua atividade na proporção de 1:50 (pepsina:fitase) (RODRIGUEZ; MULANEY; LEI, 2000).

Considerando os resultados obtidos em relação à resistência à proteólise da MtPhy, pode-se considerar que a enzima possui forte resistência à ação de enzimas proteolíticas encontradas no trato digestório de animais, característica extremamente desejada para sua aplicação industrial (ZHANG *et al.*, 2010; YAO *et al.*, 2011).

6 CONCLUSÕES

A enzima fitase *MtPhy* do fungo termofílico *M. thermophila* foi clonada e expressa heterologamente no fungo *A. nidulans* com sucesso. Sua caracterização bioquímica demonstrou ser uma enzima termofílica, com máxima atividade catalítica a 60°C e extremamente estável às temperaturas de 40 e 50°C, além de apresentar temperatura de desnovoelamento de sua estrutura nas temperaturas de 63 e 67°C por análises de dicroísmo circular e ThermoFluor, respectivamente, mostrando que as que as fitases podem ser clonadas de fungos termofílicos e expressas em maiores quantidades em outros organismos.

Além disso, apresentou pH ótimo igual a 5,0 e manutenção da atividade na faixa de pH entre 4,5 e 5,5, foi efetiva na liberação do fósforo em rações e extremamente resistente às proteases, tripsina e pepsina, presentes no trato digestório de animais monogástricos, o que possibilita concluir que a *MtPhy* possui um elevado potencial para aplicação industrial na produção de rações animais.

REFERÊNCIAS

- AARHUS UNIVERSITET. Brinch-Pedersen, H. *et al.* **High expression cereal phytase gene**. US 0081648 A1, 2 Dec. 2016, 23 Mar. 2017.
- ABBASI, F.; FAKHUR-UN-NISA, T.; LIU, J.; LUO, X.; ABBASI, I. H. R. Low digestibility of phytate phosphorus, their impacts on the environment, and phytase opportunity in the poultry industry. **Environ Sci Pollut Res**. v.26, n.10, p. 9469-9479, 2019.
- AFIFY, A. E. -M. M. R.; EL-BELTAGI, H. S.; EL-SALAM, S. M. A.; OMRAN, A. A. Bioavailability of Iron, Zinc, Phytate and phytase activity during soaking and germination of white sorghum varieties. **PLoS ONE**, v.6, n.10, e25512, 2011.
- AGUILAR, V. J.; ZEA, M. O.; VÍLCHEZ, P. C. Rendimiento productivo e integridad ósea de pollos de carne en respuesta a suplementación dietaria con cuatro fuentes de fitasa comercial. **Rev Inv Vet Perú** v.29, n.1, p.169-179, 2018.
- AJITH, S.; SHET, D.; GHOSH, J.; AWACHAT, V. B.; BHAT, K.; PAL, D.; ELANGO VAN, A. V. Effect of immobilized fungal phytase on growth performance and bone traits of broilers fed with low dietary calcium and phosphorus. **Veterinary World** v.11, n.6, p.758-764, 2018.
- AJITH, S.; GHOSH, J.; SHET, D.; SHREEVIDHYA, S.; PUNITH, B. D.; LANGOVAN, A. V. Partial purification and characterization of phytase from *Aspergillus foetidus* MTCC 11682. **AMB Express**, v.9, n.3, p.1-11, 2019.
- ALAGAWANY, M.; ELNESR, S. S.; FARAG, M. R. The role of exogenous enzymes in promoting growth and improving nutrient digestibility in poultry. **IJVR**, v.19, n.3, p.157-164, 2018.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**. v.215, n.3, p.403-410, 1990.
- ALVES, N. M. **Produção de fitase por fungo endofítico**. 2014. 59f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Departamento de Biologia, Setor de Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.
- ARIF, A.; NAWAZ, M.; RABBANI, M.; IQBAL, S.; MUSTAFA, A.; YOUSUF, M. R.; MUHAMMAD, K. Screening, characterization and physicochemical optimization of phosphorus solubilization activity of potential probiotic *Lactobacillus spp.* **Pak Vet J**. 2018. <http://dx.doi.org/10.29261/pakvetj/2018.061>
- ARREDONDO, M. A.; CASAS, G. A.; STEIN, H. H. Increasing levels of microbial phytase increases the digestibility of energy and minerals in diets fed to pigs **Animal Feed Science and Technology**. v.248, p.27-36, 2019.
- AZZAZ, H. H.; ABOAMER, A. A. ALZAHAR, H.; ABDO, M. M.; MURAD, H. A. Effect of xylanase and phytase supplementation on goat's performance in early lactation. **Pakistan Journal of Biological Sciences**. v.22, n.6, 265-272, 2019.

AZEKE, M. A.; GREINER, R.; JANY, K. Purification and characterization of two intracellular phytases from the tempeh fungus *Rhizopus oligosporus*. **Journal of Food Biochemistry** v.35, p. 213-227, 2011.

BABATUNDE, O. O.; COWIESON, A. J.; WILSON, J. W.; ADEOLA, O. Influence of age and duration of feeding low-phosphorus diet on phytase efficacy in broiler chickens during the starter phase. 2019 **Poultry Science** 0:1–10 DOI: <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pez014>

BALDWIN, M. A. Protein identification by mass spectrometry. **Molecular & Cellular Proteomics** 3.1. p.1-9, 2004.

BARREIRO, C.; MARTÍNEZ-CASTRO, M. Regulation of the phosphate metabolism in *Streptomyces* genus: impact on the secondary metabolites. **Applied Microbiology and Biotechnology** v. 103, p. 1643–1658, 2019.

BELGAROU, N.; BERTHOMIEU, P.; ROUACHED, H.; HANIN, M. The secretion of the bacterial phytase PHY-US417 by *Arabidopsis* roots reveals its potential for increasing phosphate acquisition and biomass production during co-growth. **Plant Biotechnology Journal**, v.14, p.1914–1924, 2016.

BENINCASA, P.; FALCINELLI, B.; LUTTS, S.; STAGNARI, F.; GALIENI, A. sprouted grains: a comprehensive review. **Nutrients**. v.11, n. 421, 0.1-29, 2019.

BERKA, *et al.* Comparative genomic analysis of the thermophilic biomass-degrading fungi *Myceliophthora thermophila* and *Thielavia terrestris*. **Nature Biotechnology**. v. 29, n.10, p.922-927, 2011.

BERWAL, M. K.; GOYAL, P.; CHUGH, L. K. Exploitation of pearl millet germplasm for identification of low grain phytate containing parental lines. **Journal of Agriculture and Ecology**, v.6, p. 39-46, 2018.

BHAGYAWANT, S. S.; BHADKARIA, A.; GUPTA, N.; SRIVASTAVA, N. Impact of phytic acid on nutrient bioaccessibility and antioxidant properties of chickpea genotypes. **J Food Biochem**. v.12678, p.1-9, 2018.

BRODACKI, A.; BATKOWSKA, J.; DRABIK, K. The impact of phytase feed supplementation on serum parameters, carcass characteristics and tissue mineral composition in female turkeys. **Europ.Poult.Sci**. v.83, p.1-10, 2019.

BUJNA, E. **Production and characterisation of microbial phytases**. 2014. 11f. These (PhD School of Food Science) - Department of Brewing and Distilling, Corvinus University of Budapest, Budapest, 2014.

CANGUSSU, A. S. R.; ALMEIDA, D. A.; AGUIAR, R. W. S.; BORDIGNON-JUNIOR, S. E.; VIANA, K. F.; BARBOSA, L. C. B.; CANGUSSU, E. W. S.; BRANDI, I. V.; PORTELLA, A. C. F.; DOS SANTOS, G. R.; SOBRINHO, E. M.; LIMA, W. J. N. Characterization of the catalytic structure of plant phytase, protein tyrosine phosphatase-like phytase, and histidine acid phytases and their biotechnological applications. **Enzyme Research**. p.1-12, 2018

CASEY, A.; WALSH, G. Purification and characterization of extracellular phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142. **Bioresource Technology** v.86, p.183–188, 2003.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JUNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**. v.33, n.1, p.181-188, 2010.

CHAROENRAT, T.; ANTIMANON, S.; KOCHARIN, K.; TANAPONGPIPAT, S.; ROONGSAWANG, N. High cell density process for constitutive production of a recombinant phytase in thermotolerant methylotrophic yeast *Ogataea thermomethanolica* using table sugar as carbon source. **Appl Biochem Biotechnol**, v.180, p.1618-1634, 2016.

CHEN, J. C. Novel screening method for extracellular phytase-producing microorganisms. **Biotechnology Techniques**. v. 12, n. 10, p759-761, 1998.

CHEN, K. I.; CHIANG, C. Y.; KO, C. Y.; HUANG, H. Y.; CHENG, K. C. Reduction of phytic acid in soymilk by immobilized phytase system. **Journal of Food Science** v.83, n.12, p. 2963-2969, 2018.

CHEN, W.; YU, H.; YE, L. Comparative study on different expression hosts for alkaline phytase engineered in *Escherichia coli*. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 179, p.997-1010, 2016.

CHEN, X.; GAO, M.; LI, Y.; ZHANG, X.; ZHANG, F.; HU, B. Effects of freeze-thaw cycles on the physicochemical characteristics of animal manure and its phosphorus forms. **Waste Management** , v.88, p.160-169, 2019.

CHHABRA, S. Phosphorus management in agroecosystems and role and relevance of microbes in environmental sustainability. *In*: SHAH, S *et al.* (eds.), **Sustainable Green Technologies for Environmental Management**. Springer Nature Singapore Pte Ltd. p.53-66, 2019

COBAN, H. B.; DEMIRCI, A. Screening of phytase producers and optimization of culture conditions for submerged fermentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.37, p.609-616, 2014.

CORRÊA, E. M. **Expressão heteróloga, purificação e caracterização das proteínas humanas DCRA (Down Syndrome Critical Region Gene A) e DSCR8 (Down Syndrome Critical Region Gene 8)**. 2004, 142f. Tese (Doutorado em Genética e Evolução) – Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

COWIESON, J.; SMITH, A.; SORBARA, J. O. B.; PAPPENBERGER, G.; OLUKOSI, O. A. Efficacy of a mono-component exogenous protease in the presence of a high concentration of exogenous phytase on growth performance of broiler chickens. **J. Appl. Poult. Res** 0:p.1-9, 2019.

DAHDOUH, S.; GRANDE, F.; ESPINOSA, S. N.; VINCENT, A.; GIBSON, R.; BAILEY, K.; KING, J.; RITTENSCHÖBER, D.; CHARRONDIÈRE, U. R.

Development of the FAO/INFOODS/IZINCG global food composition database for phytate. **Journal of Food Composition and Analysis**. v.78, p. 42-48, 2019.

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

DERSJANT-LI, Y.; HRUBY, M.; EVANS, C.; GREINER, R. A critical review of methods used to determine phosphorus and digestible amino acid matrices when using phytase in poultry and pig diets. **Journal of Applied Animal Nutrition**, v.7, n.2, p.1-9, 2019.

DIPTA, B.; BHARDWAJ, S.; KAUSHAL, M.; KIRTI, S.; SHARMA, R. Obliteration of phosphorus deficiency in plants by microbial interceded approach. **Symbiosis**. 2019. <https://doi.org/10.1007/s13199-019-00600-y>

DUONG, Q. H.; LAPSLEY, K. G.; PEGG, R. B. Inositol phosphates: health implications, methods of analysis, and occurrence in plants foods. **J. Food Bioact.** v.1, p. 41-45, 2018.

EMMENES, L.; PIETERSE, E.; HOFFMAN, L. C. Performance, water intake, carcass characteristics and intestinal histomorphology of broilers supplemented with phytase. **South African Journal of Animal Science** v.48, n.4, p.734-742, 2018.

ERICSSON, U. B., *et al.* Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. **Analytical Biochemistry**, v.357, n.2, p. 289-298, 2006.

FALCH, E. A. Industrial enzymes-developments production and application. **Biotechnol Adv** v.9, p.643-658, 1991.

FARHADI, D.; KARIMI, A.; SADEGHI, A. A.; ROSTAMZADEH, J.; BEDFORD, M. R. Effect of a high dose of exogenous phytase and supplementary myo-inositol On mineral solubility of broiler digesta and diets subjected to in vitro digestion assay. **Poultry Science** 0:p.1–14, 2019.

FERNÁNDEZ, S. R.; CHÁRRAGA, S.; ÁVILA-GONZALEZ, E. Evaluation of a new generation phytase on phytate phosphorus release for egg production and tibia strength in hens fed a corn-soybean meal diet. **Poultry Science**. p. 1-7, 2019. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pey558>.

FRANKENBERGER JR, W. T.; JOHANSON J. B. Effect of pH on enzyme stability in solis. **Soil Bid. Biochem.** v.14, p.433-437, 1982.

FREIRE, D. M. G.; GUTARRA, M. L. E.; FERREIRA-LEITÃO, V. S.; COELHO, M. A. Z.; CAMMAROTA, M. C. Biocatalysis in environmental technology. *In*: ROMANO, F. H.; RUSSO, A. **Biocatalysis research progress**. New York: Nova Biomedical Books, p.95-153, 2008.

FONSECA-MALDONADO, R.; MALLER, A.; BONNEIL, E.; THIBAUT, P.; BOTELHO-MACHADO, C.; WARD, R. J. POLIZELI, M. L. T. M. Biochemical properties of glycosylation and characterization of a histidine acid phosphatase

(phytase) expressed in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**. v.99, p. 43-49, 2014.

FUGTHONG, A.; BOONYAPAKRON, K.; SORNLEK, W.; TANAPONGPIPAT, S.; EURWILAICHITR, L.; POOTANAKIT, K. Biochemical characterization and in vitro digestibility assay of *Eupenicillium parvum* (BCC17694) phytase expressed in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v.70, p.60-67, 2010.

GAIND, S.; SINGH, S. Production, purification and characterization of neutral phytase from thermotolerant *Aspergillus flavus* ITCC 6720. **International Biodeterioration & Biodegradation** v.99, p.15-22, 2015.

GANGOLIYA, S. S.; GUPTA, R. K.; SINGH, N. K. Phytase production through response surface methodology and molecular characterization of *Aspergillus fumigatus* NF191. **Indian J Exp Biol**. v.53, n.6, p.350-355, 2015.

GESSLER, N. N.; SERDYUK, E. G.; ISAKOV, E. P.; DERYABINA, Y. I. Phytases and the prospects for their application (review). **Applied Biochemistry and Microbiology** v.54, n.4, p. 352-360, 2018.

GIBSON, D. G. Enzymatic assembly of overlapping DNA fragments. **Methods Enzimol**, v. 498, p. 349–361, 2011.

GIBSON, D. G. Synthesis of DNA fragments in yeast by one-step assembly of overlapping oligonucleotides. **Nucleic Acids Res**, v.37, n.20, p.6984-6990, 2009.

GIZAW, B.; TSEGAY, Z.; TEFERA, G.; AYNALAM, E.; WASSIE, M.; ABATNEH, E. Phosphate solubilizing fungi isolated and characterized from *Teff rhizosphere* soil collected from North Showa zone, Ethiopia. **Afr. J. Microbiol. Res** v.11, n.17, p.687-696, 2017.

GOURLEY, K. M.; WOODWORTH, J. C.; DEROUCHEY, J. M.; TOKACH, M.D. Determining the phosphorus release for Natuphos E 5,000 G phytase for nursery pigs. **Kansas Agricultural Experiment Station Research Report**. v.2, n. 26, p 1-9, 2016.

GOURLEY, K. M.; WOODWORTH, J. C.; DEROUCHEY, J. M.; DRITZ, S. S.; TOKACH, M. D.; GOODBAND, R. D. Effect of high doses of Natuphos E 5,000 G phytase on growth performance of nursery pigs. **J. Anim. Sci**. v.96, p. 570–578, 2018.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nat Protoc**. v.1, n.6, p.2876-2890, 2006.

GREENFIELD, N. J.; FASMAN, J. D. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. **Biochemistry**. v.8, n.10, p. 4108-4116, 1969.

GREINER, R. Activity of *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* and rye phytase towards partially phosphorylated myo-Inositol phosphates. **J. Agric. Food Chem.**, 2017 DOI: 10.1021/acs.jafc.7b03897.

GRIGORIEV, I. V. et al. Mycocosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes. **Nucleic Acids Research**. v.42, p.699-704, 2014.

GRUNINGER, R. J.; THIBAUT, J.; CAPENESS, M. J.; TILL, R.; MOSIMANN, S. C.; SOCKETT, R. E.; SELINGER, B. L.; LOVERING, A. L. Structural and biochemical analysis of a unique phosphatase from *Bdellovibrio bacteriovorus* reveals its structural and functional relationship with the protein tyrosine phosphatase class of phytase. **PLOS ONE**, v.9, n.4, e94403, 2014.

GU, S.; LI, J.; CHEN, B.; SUN, T.; LIU, Q.; XIAO, D.; TIAN, C. Metabolic engineering of the thermophilic filamentous fungus *Myceliophthora thermophila* to produce fumaric acid. **Biotechnol Biofuels**, v.11, n.323, p. 1-10, 2018

GULATI, H. K.; CHADHA, B. S.; SAINI, H. S. Production and characterization of thermostable alkaline phytase from *Bacillus laevolacticus* isolated from rhizosphere soil. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 34, p. 91-98, 2007.

GUNASHREE, B. S.; VENKATESWARAN, G. Extracellular phytase from *Aspergillus niger* CFR 335: purification and characterization. **J Food Sci Technol**. v.52, n.7, p.4558-4564, 2015.

HALLAJI, M.; PARHAMFAR, M.; RAOUFI, E.; ABTAHI, H. Cloning and high-level expression of the enzymatic region of phytase in *E. coli*, 2019. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**. DOI: 10.1007/s10989-018-9788-4.

HANNIG, G.; MAKRIDES, S. C. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 54–60, 1998.

HINNEN, A.; HICKS, J. B.; FINK, G. R. Transformation yeast. **Nature Protocols**, v. 75, n. 4, p. 1929–1933, 1978.

HUANG, H.; LUO, H.; WANG, Y.; FUO, D.; SHAO, N.; YANG, P.; YAO, B. A novel phytase from *Yersinia rohdei* with high phytate hydrolysis activity under low pH and strong pepsin conditions. **Appl. Microbiol. Biotechnol**. v.80, p.417-426, 2008.

HUSSAIN, S. M.; AHMAD, N.; SHAHZAD, M. M.; JAVID, A.; ASLAM, N.; HUSSAIN, M.; ARSALAN, M. Z. H.; RIAZ, D. Efficacy of phytase enzyme and citric acid on growth performance, nutrients and mineral digestibility of *Cirrhinus mrigala* fingerlings fed guar meal-based diet. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, 2017. DOI: 10.22092/ijfs.2018.117462

HUSSIN, A. S. M.; FAROUK, A. -E.; GREINER, R.; SALLEH, H. M.; ISMAIL, A. F. Phytate-degrading enzyme production by bacteria isolated from Malaysian soil. **World J Microbiol Biotechnol**, v.23, n.12, p. 1653-1660, 2007.

JANG, Y. D.; WILCOCK, P.; BOYD, R. D.; LINDEMANN, M. D. Effect of combined xylanase and phytase on growth performance, apparent total tract digestibility, and carcass characteristics in growing pigs fed corn-based diets containing high-fiber coproducts. **J. Anim. Sci**. v.95, p.4005-4017, 2017.

JONGBLOED, A. W.; MROZ, Z.; KEMME, P. A. The effect of supplementary *Aspergillus niger* phytase in diets for pigs on concentration and apparent digestibility of dry matter, total phosphorus and phytic acid in different sections of the alimentary tract. **J. Anim. Sci.** 70, 1159–1168, 1992.

KALSI, H. K.; SINGH, R.; DHALIWAL, H. S.; KUMAR, V. Phytases from *Enterobacter* and *Serratia* species with desirable characteristics for food and feed applications. **3 Biotech.** v.6, n.64, p. 1-13, 2016.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta.** v.1751, p. 119-139, 2005.

KIM, J. C.; SANDS, J. S.; MULLAN, B. P.; PLUSKE, J. R. Performance and total-tract digestibility responses to exogenous xylanase and phytase in diets for growing pigs. **Anim. Feed Sci. Technol.** v.142, p. 163-172, 2008.

KLOSOWSKI, G.; MIKULSKI, D.; JANKOWIAK, O. Extracellular phytase production by the wine yeast *S. cerevisiae* (Finarome strain) during submerged fermentation. **Molecules**, v.23, n.848, p.1-12, 2018.

KONIETZNY, U.; GREINER, R. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). **International Journal of Food Science and Technology** v.37, 791–812; 2002.

KOSHY, J. C.; SHARABU, S. E.; FELDMAN, E. M.; HOLLIER, L. H.; PATRINELY, J. R. SOPARKAR, C. N. S. Effect of dietary zinc and phytase supplementation on botulinum toxin treatments. **J. Drugs Dermatol.** v. 11, n.4, p. 507-512, 2012.

Kringen-Scholtz, L. Vet. Report: Managing ionophore toxicity in horses. **Tri-State Neighbor,oct**

KUMAR, V.; SINHA, A. K.; KAJBAF, K. Phytic acid and phytase Enzyme. *In*: JOHNSON, J.; WALLACE, T. **Whole grains and their bioactives**: composition and health. John Wiley & Sons, p. 467-483, 2019.

LAMID, M.; AL-ARIF, A.; WARSITO, S. H. The utilization of phytase enzymes and SEM analysis in order to increase the quality of rice bran as a layer and fish feed. **IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.** v. 236, p.1-4, 2019.

LAN, G.Q.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S.; HO, Y. W. Purification and characterization of a phytase from *Mitsuokella jalaludinii*, a bovine rumen bacterium. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.59, p.12766-12776, 2011.

LEI, X. G.; WEAVER, J. D.; MULLANEY, E.; ULLAH, A. H.; AZAIN, M. J. Phytase, a new life for an “old” enzyme. **Annu. Rev. Anim. Biosci.** v.1, p.283-309, 2013.

LI, C.; LI, C.; ZHANG, H.; LIAO, H.; WANG, X. The purple acid phosphatase GmPAP21 enhances internal phosphorus utilization and possibly plays a role in symbiosis with rhizobia in soybean. **Physiol Plant**, v.159, n.2, p.215-227, 2017.

LI, D.-C.; LI, A.-N.; PAPAGEORGIOU, A. C. Cellulases from thermophilic fungi: recent insights and biotechnological potential. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1–9, 2011.

LI, J.; LI, X.; GAI, Y.; SUN, Y.; ZHANG, D. Evolution of *E. coli* phytase for increased thermostability guided by rational parameters. **JMB** Papers in Press. Feb 8, 2019. DOI: 10.4014/jmb.1811.11017.

LINDBERG, J.E.; LYBERG, K.; SANDS, J.; BAILLEUL, P.J. Influence of phytase and xylanase supplementation of a wheat-based diet on ileal and total tract digestibility in growing pigs. **Livestock Science**, v.109, p.268-270, 2007.

MALLER, A.; QUADROS, T. C. O. de; JUNQUEIRA, O. M.; GRAÑA, A. L.; MONTALDI, A. P. L.; ALARCON, R. F.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. L. M. Biochemical effect of a histidine phosphatase acid (phytase) of *Aspergillus japonicus* var. Saito on performance and bony characteristics of broiler. **SpringerPlus**. v.5, n.1418, p. 1-12, 2016.

MANTRANA, I. G. **Estrategias biotecnológicas para reducir el contenido de fitatos en productos fermentados de origen vegetal mediante fitasas de bifidobacterias**. 2015. 210 f. Tese (Doutorado) – Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Pública, Universidade de Valencia, Valencia, 2015.

MANZINI, M. C. **Efeito da carga dos lipídios na interação do BP100 em modelos de membrana**. 2011. 135 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MARIN-FELIX, Y.; STCHIGEL, A. M.; MILLER, A. N.; GUARRO, J.; CANO-LIRA, J. F. A revaluation of the genus *Myceliophthora* (Sordariales, Ascomycota): its segregation into four genera and description of *Corynascus fumimontanus* sp. **Mycologia**. v. 107, p. 619–632, 2015.

MAURYA, A. K.; PARASHAR, D.; SATYANARAYANA, T. Bioprocess for the production of recombinant HAP phytase of the thermophilic mold *Sporotrichum thermophile* and its structural and biochemical characteristics. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p.36-44, 2017.

MAZZOLA, J.R. **Fortification of commercial catfish rations with superdoses of phytase enzymes increases hematological parameters and mineral stores in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and hybrid catfish (*Ictalurus punctatus* x *Ictalurus furcatus*)**. 2017. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Auburn University, Auburn, 2017.

MEDEIROS, L. C. L. **Expressão e caracterização da proteína tirosina fosfatase de soja e análise do perfil kinômico de raízes em germinação**. 2008, 123 f. Tese (Doutorado em Biologia Funcional) Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2008.

MEYER, V. *et al.* Fungal gene expression on demand: An inducible, tunable, and metabolism-independent expression system for *Aspergillus niger*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 9, p. 2975–2983, 2011.

MITTAL, A.; GUPTA, V.; SINGH, G.; YADAV, A.; AGGARWAL, N. K. Phytase: a boom in food industry. **Octa. J. Biosci.**, v. 1, n.2, p.158-1169, 2013.

MITTAL, A.; SINGH, G.; GOYAL, V.; YADAV, A.; ANEJA, K. R.; GAUTAM, S. K.; AGGARWAL, N.K. Isolation and biochemical characterization of acidothermophilic extracellular phytase producing bacterial strain for potential application in poultry feed. **JJM**. v.4, n.4, p. 273-282, 2011.

MONTEIRO, P. S. **Produção e caracterização bioquímica de fitases de *Rhizopus stolonifer* e *Aspergillus niger* UFV-1 e suas aplicações em ração animal**. 2011. 79f. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011.

MONTEIRO, P. S.; GUIMARÃES, V. M.; DE MELO, R. R.; DE REZENDE, S. T. Isolation of a thermostable acid phytase from *Aspergillus niger* UFV - 1 with Strong proteolysis resistance. **Brazilian Journal of Microbiology** v. 46, n. 1, p.251-260, 2015

NAKASHIMA, B.A.; McALLISTER, T.A.; SHARMA, R.; SELINGER, L.B. Diversity of phytases in the rumen. **Microb Ecol**, v.53, n.1, p.82-88, 2007.

National Center for Biotechnology Information. **PubChem Database**. Phytic acid, CID=890, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phytic-acid> (accessed on July 12, 2019).

NAVES, L. P. **Atividade de fitases microbianas em diferentes condições de armazenamento, pH, temperatura e processamento térmico**. 2009. 60f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

NELSON, T. S. The availability of phytate phosphorus in soybean meal before and after treatment with a mold phytase. **Poultry Science**, v. 47, p.1842-1848, 1968.

NEVALAINEN, K. M. H.; TE'O, V. S. J.; BERGQUIST, P. L. Heterologous protein expression in filamentous fungi. **Trends in Biotechnology**. v.23, n.9, p. 468-474, 2005.

NIKOLAIVITS, E.; DIMAROGONA, M.; KARAGIANNAKI I; CHALIMA, A.; FISHMAN A.; TOPAKAS E. Characterization and protein engineering of a novel versatile fungal polyphenol oxidase with chlorophenol bioremediation potential. **Appl. Environ. Microbiol**, 2019. . DOI:10.1128/AEM.01628-18

NIU, C.; YANG, P.; LUO, H.; HUANG, H.; WANG, Y.; YAO, B. Engineering the residual side chains of HAP phytases to improve their pepsin resistance and catalytic efficiency. **Sci Rep**. v.7, n.42133, p.1-14, 2017.

NUGE, T.; HASHIM, Y. Z. H. -Y.; FAROUK, A. -E. A.; SALLEH, H. M. Cloning and Expression of a Novel Phytase Gene (*phyMS*) from *Mycobacterium smegmatis*. **Advances in Enzyme Research**, v.2, p.27-38, 2014.

OLIVEIRA, L. A. G. de; NUNES, R. C.; RUFINO, L. M.; RONE, M. N. B.; STRINGHINI, J. H.; DI CASTRO, I. C. Dry and wet diets with and without phytase

for growing and finishing pigs. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 36, n. 3, p. 291-296, 2014.

OLSTORPE, M.; SCHNURER, J.; PASSOTH, V. Screening of yeast strains for phytase activity. **FEMS Yeast Res**, v. 9, p.478-488, 2009.

PAGANO, A. R.; YASUDA, K.; RONEKER, K. R.; CRENSHAW, T. D.; LEI, X. G. Supplemental *Escherichia coli* phytase and strontium enhance bone strength of young pigs fed a phosphorus-adequate diet. **J. Nutr.** v.137, p. 1795–1801, 2007.

PETERSEN, T. N.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G.; NIELSEN, H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**. v.8, p.785-786, 2011.

PHILLIPS, K; DE LA PEÑA, A. H. The combined use of the Thermofluor assay and ThermoQ analytical software for the determination of protein stability and buffer optimization as an aid in protein crystallization. **Current Protocols in Molecular Biology**. v.10, p.10.28.1-10.28.15, 2011.

PRIYODIP, P. PRAKASH, P.Y.; BALAJI, S. Phytases of probiotic bacteria: characteristics and beneficial aspects. **Indian J Microbiol.** P. 1-7, 2017.

PROVENCHER, S. W.; GLOECKNER, J. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. **Biochemistry**. v.20, n.1 p.33-37, 1981.

PUPPALA, K. R., BHAVSAR, K., SONALKAR, V., KHIRE, J. M., Dharme, M.S., Characterization of novel acidic and thermostable phytase secreting *Streptomyces* sp. (NCIM 5533) for plant growth promoting characteristics, **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** (2019) <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101020>

QUAN, C. S.; FAN, S. D.; ZHANG L. H.; WANG, Y. J.; OHTA, Y. Purification and properties of a phytase from *Candida krusei* WZ-001. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 5, p. 419-425, Nov. 2002.

QUAN, C.; ZHANG, L.; WANG, Y.; OHTA, Y. Production of phytase in a low phosphate medium by a novel yeast *Candida krusei*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.92, n.2, p.154-160, 2001.

QVIRIST, L.; CARLSSON, N.; ANDLID, T. Assessing phytase activity-methods, definitions and pitfalls. **Journal of Biological Methods**. v.2, n.1, p. 1-7, 2015.

QVIRIST, L.; VORONTSOV, E.; VILG, J.V.; ANDLID, T. Strain improvement of *Pichia kudriavzevii* TY13 for raised phytase production and reduced phosphate repression. **Microb Biotechnol.** v.10, n.2, p. 341-353, 2017

RAGHAVENDRA, P.; HALAMI, P. M. Screening, selection and characterization of phytic acid degrading lactic acid bacteria from chicken intestine. **International Journal of Food Microbiology**. v.133, p.129-134, 2009.

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

REDDY, C. S.; VANI, K.; PANDEY, S.; GUPTA, G.; VIJAYLAKSHMI, M.; REDDY, P. C. O.; KAUL, T. Manipulating microbial phytases for heterologous expression in crops for sustainable nutrition. **Annals of Plant Sciences**, v.2, n.10, p. 436-454, 2013.

RIBEIRO, H. V. **Avaliação de diferentes fontes de fósforo sobre desempenho produtivo e características ósseas de frangos de corte criado de 1 a 42 dias de idade**. 2019, 33f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2019.

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**. v.268, p.373–378, 2000.

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

RUBINI, M. R. **Clonagem, expressão heteróloga e caracterização funcional de uma endoglicanase de *Penicillium echinulatum***. 2009. 134f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

SANDHYA, A.; SRIDEVI, A.; SUVARNALATHADEVI, P. Biochemical characterization of phytase purified from *Aspergillus niger* S2. **Eurasia J Biosci**, v.13, p.99-103, 2019.

SANNI, D. M.; LAWAL, O. T.; ENUJIUGHAB, V. N. Purification and characterization of phytase from *Aspergillus fumigatus* isolated from African Giant Snail (*Achatina fulica*). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnonology** v.17, p. 225-232, 2019.

SAPNA, B. S. Purification and characterization of a protease-resistant phytase of *Aspergillus oryzae* SBS50 whose properties make it exceptionally useful as a feed supplement. **International Journal of Biological Macromolecules** <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.077>., 2017.

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

SATO, V. S.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Characterization of a thermotolerant phytase produced by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* biofilm on an inert support using sugarcane bagasse as carbon source. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 179, p. 610–624, 2016.

SAVITA, P. D., SUVARNA, V. C.; ANNU, T.; BALAKRISHNA, A. N. KANCHANASHRI, B.; YALLAPPA, M. Isolation, characterization and identification of phytate solubilizing yeasts dwelling food grains. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.** v.6, n.4, p.1184-1192, 2017.

SEGATO, F.; DAMASIO, A. R. L.; LUCAS, R. C.; SQUINA, F. M.; PRADE, R. A. High-yield secretion of multiple client proteins in *Aspergillus*. **Enzyme Microb Technol**, v. 51, n. 2, p. 100–106, 2012.

SEGATO, F.; DAMASIO, A. R. L.; LUCAS, R. C.; SQUINA, F. M.; PRADE, R.A. Genomics review of holocellulose deconstruction by *Aspergilli*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 4, p. 588–613, 2014.

SHARIDEH, H.; ZHANDI, M.; ZAGHARI, M.; AKHLAGHI, A.; HUSSAINI, S. M. H.; YOUSEFI, A. R. Changes in broiler breeder hen's immunity by zinc oxide and phytase. **Iranian Journal of Veterinary Research**. v.20, n.2, S67, p. 120-125, 2019.

SHEVCHENKO, A. *et al.* In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2856–2860, 2006.

SHEVCHENKO, A. *et al.* Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**. v.68, n.5, p.850-858, 1996.

SINGH, B. *Myceliophthora thermophila* syn. *Sporotrichum thermophile*: a thermophilic mould of biotechnological potential **Crit Rev Biotechnol**, Early Online. p.1–11, 2014.

SINGH, B. *Myceliophthora thermophila* syn. *Sporotrichum thermophile*: a thermophilic mould of biotechnological potential, **Crit Rev Biotechnol**, v.36, n.1; p.59-69, 2016.

SINGH, B.; SATYANARAYANA, T. Applications of phytase of thermophilic mould, *Sporotrichum thermophile*: A review. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v.69, p.411-414, 2010.

SINGH, B.; SATYANARAYANA, T. Characterization of a HAP–phytase from a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile*. **Bioresource Technology**. v.100, p.2046–2051, 2009.

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

SINGH, N. K.; JOSHI, D. K.; GUPTA, R.K. Isolation of phytase producing bacteria and optimization of phytase production parameters **Jundishapur Journal of Microbiology**, v.6, n.5, e6419, 2013.

SOLHA, G. C. F. **Os Genes Interrompidos: Introdução Histórica ao Impacto da Descoberta dos Íntrons (1977) na Controvérsia sobre a Definição de Gene Molecular Clássico (1960)**. 2005, 113f. Dissertação (Mestrado em História das Ciências) – Casa de Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2005.

SONI SK, MAGDUM A, KHIRE JM. Purification and characterization of two distinct acidic phytases with broad pH stability from *Aspergillus niger* NCIM 563. **World J Microbiol Biotechnol** v.26, p. 2009-2018, 2010.

SREEDEVI, S.; REDDY, B.N. Isolation, screening and optimization of phytase production from newly isolated *Bacillus Sp.C43*. **Int J Pharm Bio Sci**, v.2, n.2, p.218-231, 2012.

SULEIMANOVA, A. D.; BEINHAEUER, A.; VALEEVA, L. R.; CHASTUKHINA, I. B.; BALABAN, N. P.; SHAKIROV, E. V.; GREINER, R.; SHARIPOVA, M. R. Novel glucose-1-phosphatase with high phytase activity and unusual metal ion activation from soil bacterium *Pantoea* sp. strain 3.5.1. **Appl Environ Microbiol**, v.81, n.19, p.6790-6799, 2015.

TANG, Z.; JIN, W.; SUN, R.; LIAO, Y.; ZHEN, T.; CHEN, H.; *et al.* Improved thermostability and enzyme activity of a recombinant phyA mutant phytase from *Aspergillus niger* N25 by directed evolution and sitedirected mutagenesis. **Enzyme and Microbial Technology**, v.108, p74-81, 2018

TAN, H.; WU, X.; XIE, L.; HUANG, Z.; PENG, W.; GAN, B. Identification and characterization of a mesophilic phytase highly resilient to high-temperatures from a fungus-garden associated metagenome. **Appl Microbiol Biotechnol**. v.100, p.2225–2241, 2016.

TINH, N. V.; DIEP, N. T. N.; GIANG, D. T. H. Studying culture conditions for high level phytase production from *Aspergillus fumigatus* ET3. **KKU Res. J.** v. 19, S, p.89-97, 2014.

TROESCH, B.; VAN STUIJVENBERG, M. E.; SMUTS, C. M.; KRUGER, H. S.; BIEBINGER, R.; *et al.* A micronutrient powder with low doses of highly absorbable iron and zinc reduces iron and zinc deficiency and improves weight-for-age Z-scores in South African children. **J. Nutr.** v.141, p. 237-242, 2011.

VASUDEVAN, U. M.; JAISWAL, A. K.; KRISHNA, S.; PANDEY, A. Thermostable phytase in feed and fuel industries. **Bioresource Technology** v.278, p. 400-407, 2019.

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

VEUM, T. L.; LIU, J. The effect of microbial phytase supplementation of sorghum-canola meal diets with no added inorganic phosphorus on growth performance, apparent total-tract phosphorus, calcium, nitrogen and energy utilization, bone measurements, and serum variables of growing and finishing swine. **Livestock Science**. v.18, p.1-30, 2018.

VIDYASAGAR; JAYANAİK; MALATHI, V.; UMASHANKAR, B. C.; KOTRESH PRASAD, C.; SAYYAD, I. A. Influence of phytase supplementation on mineral retention, blood and bone minerals content in low phosphorus diet fed in Giriraja birds. **Journal of Entomology and Zoology Studies** v.7, n.1, p. 58-62, 2019.

VIEIRA, B. S.; CARAMORI JUNIOR, J. G.; CORREA, G. S. S.; COLVARA, I. G. BRUSAMARELO, E.; PEREIRA, T. V. S.; BARBOSA, S. A. P. V.; OLIVEIRA, C. F. S. Combination of phytase and citric acid, but not phytase alone, ensures regular rates of growth and bone mineralization in quails under severe phosphorus restriction. **J Anim Physiol Anim Nutr.** p.1-9, 2019.

VIER, C. M.; DRITZ, S. S.; TOKACH, M. D. GONÇALVES, M. A. Effects of Analyzed Calcium to Phosphorus ratio on growth performance, carcass characteristics, bone mineralization, and economics of 56- to 279-lb pigs fed diets containing phytase. **Swine Day.** v.4, n.19, p.1-24, 2018b.

VIER, C. M.; DRITZ, S. S.; TOKACH, M. D.; WOODWORTH, J.C. Standardized total tract digestible phosphorus requirement of 25- to 50-lb pigs fed diets containing phytase. **Kansas Agricultural Experiment Station Research Reports.** v.4, n.16, p. 1-10, 2018a.

VILLAMIZAR, G. A. C.; NACKE, H. BOEHNING, M., HERZ, K.; DANIEL, R. Functional metagenomics reveals an overlooked diversity and novel features of soil-derived bacterial phosphatases and phytases. **Applied and Environmental Science** v.10, n.1, p.1-15, 2019a.

VILLAMIZAR, G. A. C.; NACKE; GRIESE, L.; TABERNERO, L.; FUNKNER, K.; DANIEL, ROLF. Characteristics of the first protein tyrosine phosphatase with phytase activity from a soil metagenome. **Genes** v.10, n.1, p. 1-16, 2019b.

WALLACE, B. A. The role of circular dichroism spectroscopy in the era of integrative structural biology. **Curr Opin Struct Biol.** v.52, p. 1-6, 2019.

WANG, J.; WU, Y.; GONG, Y.; YU, S.; LIU, G. Enhancing xylanase production in the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* by homologous overexpression of Mtxyr1. **J Ind Microbiol Biotechnol,** v.42, p.1233-1241, 2015.

WANG, X.; DU, J.; ZHANG, Z.; FUN, Y.; WANG, W.; LIANG, A. A rational design to enhance the resistance of Escherichia coli phytase appA to trypsin. **Appl Microbiol Biotechnol** v.102, n.22, p. 9647-9656, 2018.

WYSS, M.; BRUGGER, R.; KRONENBERGER, A.; RE'MY, R.; FIMBEL, R.; OESTERHELT, G.; LEHMANN, M.; VAN LOON, A. P. G .M. Biochemical characterization of fungal phytases (myo-Inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties. **Applied and Environmental Microbiology,** v.65, n.2, p.67-373, 1999.

XU, J.; LI, J.; LIN, L.; LIU, Q.; SUN, W.; HUANG, B.; TIAN, C. Development of genetic tools for *Myceliophthora thermophila*. **BMC Biotechnology,** v.15, n.35, p.1-10, 2015.

YAO, M. -Z.; ZHANG, Y.-H.; LU, W. -L.; HU, M. -Q.; WANG, W.; LIANG, A. -H. Phytases: crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications. **Journal of Applied Microbiology,** v.112, p.1–14, 2011.

YIN, Q. Q.; ZHENG, Q. H.; KANG, X. T. Biochemical characteristics of phytases from fungi and the transformed microorganism. **Animal Feed Science and Technology**, v.132, p.341-350, 2007.

ZELENKA, J.; MRKVICOVÁ, E.; ŠŤASTNÍK, O.; JAROŠOVÁ, M.; VLČKO, T.; OHNOUTKOVÁ, L. Effect of low- and high phytase barley on phosphorus retention and bone mineral composition in broilers. **Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis**. v. 65, n.2, p. 577–581, 2017

ZHANG, G. -O.; WU, Y. -Y.; NG, T. -B.; CHEN, Q. -J.; WANG, H. -X. A phytase characterized by relatively high pH tolerance and thermostability from the shiitake mushroom *Lentinus edodes*. **BioMed Research International**, v.2013, p.1-7, 2013

ZHANG, G. Q.; DONG, X. F.; WANG, Z. H. ZHANG, Q. WANG, H. X.; TONG, J. M. Purification, characterization, and cloning of a novel phytase with low pH optimum and strong proteolysis resistance from *Aspergillus ficuum* NTG-23. **Bioresource Technology**. v.101, p.4125–4131, 2010.

ZHAO, H. Effect of ions and other compatible solutes on enzyme activity, and its implication for biocatalysis using ionic liquids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v.37, p.16-25, 2005.

ZHAO, D.-M.; WANG, M.; UM, X.-J.; SUN, M.-L.; WANG, X.-Y. Screening, cloning and overexpression of *Aspergillus niger* phytase (phyA) in *Pichia pastoris* with favourable characteristics. **Letters in Applied Microbiology**, v.45, p. 522-528, 2007.

ZHAO, J.; GUO, C.; TIAN, C.; MA, Y. Heterologous expression and characterization of a GH3 β -glucosidase from thermophilic fungi *Myceliophthora thermophila* in *Pichia pastoris*. **Appl Biochem Biotechnol**, v.177, p.511-527, 2015.

ZHU, J.; HONG, D. D.; WAKISAKA, M. Phytic acid extracted from rice bran as a growth promoter for *Euglena gracilis*. **Open Chem.**, v.17, p.57-63, 2019

ZUO, R.; CHANG, J.; YIN, Q.; CHEN, L.; CHEN, Q.; YANG, X.; ZHENG, Q.; REN, G.; FENG, H. Phytase gene expression in *Lactobacillus* and analysis of its biochemical characteristics. **Microbiological Research**, v.165, p.329-335, 2010.

APÊNDICE A – SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA

Gel Agarose 1% (Gel de DNA)

Agarose 1%

Tampão TAE

Meio LB

1% de triptona,

0,5% de extrato de levedura,

1% de NaCl,

2% de ágar.

pH 7,0

Meio SOC

triptona 20 g/L,

extrato de levedura 5 g/L,

NaCl 10 mM,

KCl 2,5 mM,

MgCl₂ 20 mM e

glicose 20 mM

Meio mínimo/100 mL

Solução de sais 20X	5mL
---------------------	-----

Elementos traços 1000X	0,1 mL
------------------------	--------

Glicose	1,0 g
---------	-------

Ágar	1,9 g
------	-------

pH 6,5

Elementos traço/100 mL

ZnSO ₄	2,2 g
-------------------	-------

H ₃ BO ₃	1,1 g
--------------------------------	-------

MnCl ₂	0,5 g
-------------------	-------

FeSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
--------------------------------------	-------

CoCl ₂ .5H ₂ O	0,16 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,16 g
Na ₂ MoO ₄ .4H ₂ O	0,11 g
EDTA-Na	5

Solução de sais 20X, g/L

NaNO ₃	120,0 g
KCl	10,4 g
MgSO ₄	10,4 g
KH ₂ PO ₄	30,4 g

Meio MANDELS (200 mL)

Ureia	0,06 g
Peptona	0,15 g
Extrato de levedura	0,05 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,28g
KH ₂ PO ₄	0,4 g
CaCl ₂	0,06 g

SDS-PAGE 15%

Gel de corrida (para 10 mL)

Água 2,3 mL

Acrilamida 30% 5,0 mL

1,5M Tris-HCl (pH 8,8) 2,5mL

10% SDS 0,1 mL

10% persulfato de amônia 0,1mL

TEMED 0,004 mL

Gel de empilhamento (para 3 ml)

Água 2,1 ml

Acrimalida 30% 0,5 ml

1,0M Tris-HCl (pH 6,8) 0,38ml

10% SDS 0,03 ml

10% persulfato de amônia 0,03ml

TEMED 0,003 ml

DNA loading

0,25% azul de bromofenol, 0,25% xileno cianol FF, 0,25% Orange G, 30% de glicerol em água

APÊNDICE B – CURVA PADRÃO DA ATIVIDADE DA FITASE POR LIBERAÇÃO DE FÓSFORO

Curva padrão para obtenção da reta da equação para quantificação da atividade enzimática da fitase, por liberação de fosfato.