

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 03/08/2018.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA**

PEDRO HENRIQUE DE OLIVEIRA ORNELA

Co-purificação e caracterização das fosfatase e fitase alcalinas de *Rhizopus
microsporus* var. *microsporus* produzidas em Fermentação Submersa

**ARARAQUARA/SP
2017**

PEDRO HENRIQUE DE OLIVEIRA ORNELA

Co-purificação e caracterização das fosfatase e fitase alcalinas de *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* produzidas em Fermentação Submersa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Instituto de Química, UNESP, Araraquara/SP, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães

ARARAQUARA/SP
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

O74c Ornela, Pedro Henrique de Oliveira
Co-purificação e caracterização das fosfatase e fitase alcalinas de *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* produzidas em fermentação submersa / Pedro Henrique de Oliveira Ornela. – Araraquara-SP : [s.n.], 2017
104 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Luis Henrique Souza Guimarães

1. Enzimas. 2. Fungos Filamentosos. 3. Fermentação.
4. Fitases. 5. Fostase alcalina. I. Título.

PEDRO HENRIQUE DE OLIVEIRA ORNELA

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Araraquara, 03 de agosto de 2017.


BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães (Orientadora)
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras / USP / Ribeirão Preto - SP



Prof.ª Dr.ª Ariela Veloso de Paula
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP / Araraquara - SP



Prof. Dr. Hamilton Cabral
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / USP / Ribeirão Preto - SP

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Pedro Henrique de Oliveira Ornela

Nome em citações bibliográficas: ORNELA, P. H. O.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/SP. Avenida Bandeirantes, 3900, Vila Monte Alegre, 14040-901 – Ribeirão Preto, SP – Brasil.

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2015 – Atual – Mestrado em Biotecnologia (Conceito CAPES 5). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Brasil. Título: Co-purificação e caracterização das fosfatase e fitase alcalinas de *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* produzidas em Fermentação Submersa. Orientador: Dr. Luis Henrique Souza Guimarães.

2010 – 2015 – Graduação em Ciências Biológicas, modalidade Bacharelado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Brasil. Título: Produção de enzimas celulolíticas e proteína unicelular a partir do cultivo de leveduras em bagaço de cana-de-açúcar in natura e previamente tratado com hidróxido de sódio. Orientador: Dr. Pedro de Oliva Neto

2010 – 2015 – Graduação em Ciências Biológicas, modalidade Licenciatura. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Brasil.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2013 – Introdução a Fermentação Industrial. (Carga horária: 8h)

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Brasil.

2013 – Avanços na produção biotecnológica de etanol de segunda geração. (Carga horária: 4h)

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Brasil.

2011 – Entendendo as engrenagens da vida: Estudo de Macromoléculas biológicas. (Carga horária: 6h)

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Brasil.

PROJETOS DE PESQUISA/ATUAÇÃO PROFISSIONAL

2012 – 2013 – Bolsista do Programa de Instituição de Bolsas de Iniciação a Docência.

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Brasil.

2013 – 2014 – Coordenador discente do Cursinho Pré-vestibular SuperAção. Bolsista da Pró-Reitoria de Extensão da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Brasil.

2013 – 2014 – Professor de Química no Cursinho Pré-vestibular SuperAção da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Brasil.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

CAVALCANTI, R. M. F.; **ORNELA, P. H. O.**; JORGE, J. A.; GUIMARAES, L. H. S. Screening, Selection and Optimization of the Culture Conditions for Tannase Production by Endophytic Fungi Isolated from Caatinga. Journal of Applied Biology & Biotechnology, v. 5, p. 1-9, 2017.

Resumo publicados em Anais de congressos

SHINYA, T. Y.; OSHIQUIRI, H. K. ; **ORNELA, P. H. O.** ; GOES, M. C. ; OLIVA NETO, P. Avaliação da produção de celulases por leveduras em meio contendo bagaço de cana in natura ou pré-tratado. In: VII Simpósio de Microbiologia Aplicada, 2015, Rio Claro - SP. Anais do VII Simpósio de Microbiologia Aplicada, 2015.

SHINYA, T. Y.; OLIVA NETO, P. ; NUÑEZ, E. G. F. ; MATSUDA, E. Y. H ; **ORNELA, P. H. O.** ; GOES, M. C. ; CORREA, F. F. B. Cinética de crescimento da levedura 'rosa' em fermentador utilizando bagaço de cana como substrato para produção de enzimas. In: I Congresso Paranaense de Microbiologia e Simpósio Sul-americano de Escherichia coli, 2014, Londrina. Anais do I Congresso Paranaense de Microbiologia, 2014.

SHINYA, T. Y.; **ORNELA, P. H. O.** ; OLIVA NETO, P. ; MATSUDA, E. Y. H ; GOES, M. C. ; CORREA, F. F. B. ; OSHIQUIRI, H. K. Cultivo de leveduras em bagaço de cana-de-açúcar in natura ou pré-tratado quimicamente para produção de enzimas. In: I Congresso Paranaense de Microbiologia e Simpósio Sul-americano de Escherichia coli, 2014, Londrina. Anais do I Congresso Paranaense de Microbiologia, 2014.

GOES, M. C. ; MATSUDA, E. Y. H ; **ORNELA, P. H. O.** ; OSHIQUIRI, H. K. ; CORREA, F. F. B. ; SHINYA, T. Y. ; OLIVA NETO, P. Avaliação da produção de celulases por leveduras cultivadas em bagaço de cana in natura ou tratado com ácido sulfúrico. In: I Congresso Paranaense de Microbiologiae Simpósio Sul-Americano de Escherichia coli, 2014, Londrina. Anais do I CPM, 2014.

GOES, M. C. ; MATSUDA, E. Y. H ; **ORNELA, P. H. O.** ; OSHIQUIRI, H. K. ; CORREA, F. F. B. ; SHINYA, T. Y. ; OLIVA NETO, P. Cultivo de diversas linhagens de leveduras em diferentes formulações de meio de cultura contendo como substrato bagaço de cana in natura e previamente hidrolisado com H₂SO₄. In: I Congresso Paranaense de Microbiologiae Simpósio Sul-Americano de Escherichia coli, 2014, Londrina. Anais do I CPM, 2014.

SHINYA, T. Y.; LIMA JUNIOR, D. S. ; ELSNER, V. H. P. ; **ORNELA, P. H. O.** ; MORAES, F. T. ; OLIVA NETO, P. Avaliação da produção de xilanase por levedura utilizando bagaço de cana como substrato. In: II Workshop de Bioenergia - UNESP, 2014, Rio Claro/SP. Anais do II Workshop de Bioenergia - UNESP, 2014.

Apresentação de Trabalhos

ORNELA, P. H. O.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Production and partial characterization with Phytase activity of *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* under submerged fermentation. 2017 (Apresentação de Trabalho/Congresso).

ORNELA, P. H. O.; OLIVA NETO, P. Produção de enzimas celulolíticas e proteína unicelular a partir do cultivo de leveduras em bagaço de cana-de-açúcar in natura e previamente tratado com hidróxido de sódio. 2015. (Apresentação de Trabalho/Seminário).

SHINYA, T. Y. ; **ORNELA, P. H. O.** ; GÓES, M. C. ; OSHIQUIRI, H. K. ; OLIVA NETO, P. Cultivo de diversas linhagens de leveduras em diferentes formulações de meio de cultura contendo como substrato bagaço de cana in natura e previamente hidrolisado com H₂SO₄. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

GÓES, M. C. ; **ORNELA, P. H. O.** ; SHINYA, T. Y. ; OSHIQUIRI, H. K. ; OLIVA NETO, P. Avaliação da produção de celulase por leveduras cultivadas em bagaço de cana in natura ou tratado com ácido sulfúrico. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

SHINYA, T. Y. ; **ORNELA, P. H. O.** ; GÓES, M. C. ; OSHIQUIRI, H. K. ; OLIVA NETO, P. Cinética de crescimento da levedura 'rosa' em fermentador utilizando bagaço de cana como substrato para produção de enzimas. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

SHINYA, T. Y. ; **ORNELA, P. H. O.** ; GÓES, M. C. ; OSHIQUIRI, H. K. ; OLIVA NETO, P. Cultivo de leveduras em bagaço de cana-de-açúcar in natura ou pré-tratado quimicamente para produção de enzimas. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

ORNELA, P. H. O.; BARBOSA, R. L. L. Dinamizando o ensino de ciência no ensino fundamental utilizando métodos didáticos alternativos. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

ORNELA, P. H. O.; BARBOSA, R. L. L. Relato de experiência: Utilização de métodos didáticos alternativos para a dinamização do ensino de ciência para o 6º ano do ensino fundamental. 2013. (Apresentação de Trabalho/Seminário).

ORNELA, P. H. O.; BARBOSA, R. L. L. Dinamizando o ensino de ciência no ensino fundamental utilizando métodos didáticos alternativos. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS, CONGRESSOS, EXPOSIÇÕES E FEIRAS

7º Congresso de Extensão Universitária da UNESP. 2013. (Congresso).

Décimo Primeiro Congresso Aberto aos Estudantes de Biologia (XI CAEB). DINAMIZANDO O ENSINO DE CIÊNCIAS NO ENSINO FUNDAMENTAL UTILIZANDO MÉTODOS DIDÁTICOS ALTERNATIVOS. 2013. (Congresso).

II SEMEAR - Seminário de Educação de Assis e Região. RELATO DE EXPERIÊNCIA: UTILIZAÇÃO DE MÉTODOS DIDÁTICOS ALTERNATIVOS PARA A DINAMIZAÇÃO DO ENSINO DE CIÊNCIA PARA O 6º ANO DO ENSINO FUNDAMENTAL. 2013. (Seminário).

VI Simpósio de Microbiologia Aplicada. 2013. (Simpósio).

Água, Solo e Floresta: Recuperação e Conservação de Bacias Hidrográficas. 2011.
(Seminário).

I Ciclo de Debates Biológicos: Bioética em Foco. 2011. (Encontro).

X Workshop da Pós-Graduação. 2011. (Congresso).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai e
à minha tia, que me apoiaram e me
incentivaram a ser quem eu sou hoje!
Nada disso seria possível sem vocês!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, que, com sua força e seu amor, traço meus caminhos até aqui e, mesmo não entendendo seus planos, confio meu destino a ele, que me dará força para continuar, afinal, “eis que vos dou poder para pisar serpentes e escorpiões, e toda a força do Inimigo, não vos fará dano algum...”
– Lucas 10:19

Ao meu pai, Arcidio Ornela, que ao longo do tempo, foi o exemplo de homem que eu devo e não devo me tornar, me ensinando as disciplinas desta faculdade chamada vida, além de deixar claro suas qualidades e seus defeitos, para que um dia “você se torna um homem melhor que o papai”. Hoje, pai, eu sou o melhor que posso ser! Graças a você, e para você! Sempre estarei ao seu lado!

A minha tia Maria Aparecida Ornelas da Cunha, a mãe que o destino meu deu. Não cheguei aonde cheguei se não fosse por você, seu apoio dia após dia é o pilar da minha vida! Espelho-me todo dia na sua bondade, e não suportaria viver sem você! Amo você!

Ao meu tio Nilo Guerra, meu segundo pai e aprendiz de cientista. Trocou conhecimentos de mecânica e eletrônica por horas de papo sobre o universo e biologia. Nunca me sentirei desamparado enquanto souber que tenho você na minha vida. Obrigado por acreditar em mim!

As minhas primas Valéria e Daniela da Cunha, ou Tata e Dani, as quais me apoiaram quando sai de casa adolescente para estudar, me deram amor e carinho como ninguém. Adotaram-me. Dani me ensinando sua paixão por livros e séries, e a Tata como ser uma mãe sem nunca ter tido filhos. Você me deram meus primeiros passos para chegar aqui. Agradeço também ao Lupi (*in memoriam*), Lilica e Kiara por toda felicidade que me trouxe ao longo desses anos. Amo todos vocês!

Ao prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães, pela oportunidade dada. Obrigado pelos seus ensinamentos, puxões de orelha e, principalmente, por me “puxar quando estava me afogando”, como o senhor mesmo diz. Espero um dia ser 50% do pesquisador que é.

Ao meu amigo Diego Tenório, o irmão psicólogo que a vida me deu. Não sei como consigo viver longe de você, porém o que destino separou, nosso amor nos continua unindo. Logo, estaremos juntos, “lindos e maravilhosos”, como você mesmo diz. Você sempre será meu Toddynho, companheiro de aventura!

A Rayza Morganna Farias Cavalcanti, a paraibana mais arretada da minha vida, que me apoiou, me aturou, me ensinou. Obrigado pela amizade, companheirismo e carinho. Mostrou-me outro mundo chamado Nordeste enquanto estava no meu mundo, São Paulo, e logo percebemos que, juntos, esse mundo todo é nosso! Você é parte fundamental deste trabalho!

Ao Leandro Costa, meu irmão de Puxinanã/PB. Obrigado por aguentar meus desabafos da vida, ligações de Skype, músicas de alta qualidade e bebidas de maior qualidade ainda. Sempre terei um porto seguro pra relaxar enquanto estiver comigo. A vida nos reserva um futuro brilhante, eu sei!

A Rhayanne Freitas, a dramática do mestrado. Você é muito especial, não deixe que ninguém diga ao contrário! Obrigado por ouvir meus desabafos e me apoiar nas minhas escolhas, sei que posso contar com você!

A Thais Barboni, a pesquisadora criançona. Obrigado por seus ensinamentos, seu apoio na minha pesquisa. Compartilhamos brincadeiras, agonias e desesperos, e tudo isso foi muito mais divertido com seu humor. Você é uma excelente pesquisadora e pessoa!

A Maysa Parente, a indiazinha forte e matutina. Obrigado por me ajudar quando precisei e por me ensinar suas melhores caras. Nunca aceite que alguém diga que você não é muito! Uma das melhores pesquisadoras que eu pude conhecer!

A Chadia Maestrello, a companheira de crime. Obrigado por toda a descontração e traquinagens que fizemos juntos. Dividindo seus conhecimentos sobre a vida e sempre disposta a me animar. O laboratório fica muito mais leve com você!

A Isabela Amatto, a felina heroica. Obrigado por me escutar por horas falando de super-heróis e ensinar tudo sobre cabelos e gatos para o laboratório. Você é uma das melhores pessoas que eu encontrei na minha vida!

A Larissa Todero, a amazona. Obrigado por todas as catuabas, agressões e longas conversas sobre a vida. Espero muitos papos e lanches daqui pra frente. Continue sempre galopando para frente...

Fernanda Aracri, a festeira. Obrigado por todas as festas, bares e infinitas conversas sobre nossos passados. Muitas festas nos aguardam, e continue sempre sendo a pessoa amável que é.

Ao prof. Dr. João Atilio Jorge, pela disponibilidade em me ajudar quando precisei e pela disponibilidade de recursos para minha pesquisa.

Ao técnico Maurício, pelo auxílio no laboratório e apoio, além de sempre me deixar atualizado sobre as transações e placares futebolísticos do Brasil.

A faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/SP e seus funcionários, pela disponibilidade para realização desta pesquisa.

Ao Instituto de Química da UNESP – Araraquara/SP e seus funcionários, principalmente as funcionárias da pós-graduação, todos vocês possibilitaram a realização da minha pesquisa.

A CAPES e FAPESP, pelo suporte financeiro.

“Everything that downs me makes me wanna fly...”

OneRepublic

*“A vida é locomoção.
Se você não se move,
Você não está vivendo...
Mas haverá um tempo em que você terá que parar de fugir das coisas,
E você terá que correr atrás de alguma coisa...
Você tem que seguir em frente...
Mantenha-se em movimento,
mesmo que seu caminho não esteja claro.
Acredite que você encontrará o seu caminho...”*

Barry Allen – The Flash

RESUMO

A investigação biotecnológica, acompanhada da aplicação das enzimas, tem sido realizada em microrganismos para a produção de enzimas para fins industriais. Entre estas enzimas, as fosfatases, responsáveis por hidrolisar ésteres e anidridos de ácido fosfórico, e as fitases microbianas, que catalisam a hidrólise do fitato (mio-inositol hexaquifosfato) em mio-inositol e fosfato inorgânico, têm sido amplamente utilizadas em diferentes setores como, por exemplo, em experimentos de biologia molecular e na alimentação animal. De acordo com o pH ótimo de reação, as fosfatases são divididas em alcalinas (EC 3.1.3.1) e ácidas (EC 3.1.3.2). As fitases são enzimas que também pertencem à classe das fosfatases, hidrolisando, no entanto, de forma específica, o ácido fítico. Em recentes trabalhos, o fungo filamentoso *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* apresentou potencialidade na produção de fosfatases e fitases. Diante disto, este estudo visou a produção, a purificação e caracterização da fosfatase e da fitase alcalina produzidas por *R. microsporus* var. *microsporus*. No processo de otimização em Fermentação Submersa (FSbm), a maior produção enzimática foi em meio Khanna com 0,4 mM de KH_2PO_3 e adicionado de 0,5% de farinha de centeio por 76 h, 32°C, pH 6,3, a 100 rpm. Em colunas cromatográficas, a fosfatase alcalina foi purificada 10 vezes e com recuperação de 13%, e a fitase alcalina foi purificada 86 vezes com recuperação de 167%. A massa molecular nativa da fosfatase e da fitase alcalinas produzidas por *R. microsporus* var. *microsporus* foi de 122,7 e 55,5 kDa, respectivamente. A fosfatase alcalina purificada apresentou temperatura ótima de atividade de 45°C e pH ótimo de 8,5, mantendo sua atividade catalítica acima de 60% nas temperaturas de 40 e 45°C por até 210 min. Manteve sua atividade acima de 50% em pH alcalinos por até 24 horas. A fitase alcalina purificada apresentou temperatura e pH ótimos de atividade de 65°C e 9,5, respectivamente. A fitase alcalina manteve sua atividade enzimática acima de 60% nas temperaturas de 65, 70 e 80°C por 270 min. Após incubação da fitase em valores de pH alcalinos por 3 horas, houve aumento da atividade enzimática em até 50%. A fosfatase teve sua atividade aumentada na presença de 0,4 mM de FeCl_3 , e melhor hidrolisou o substrato *p*-nitrofenilfosfato, seguido pelo ATP. O K_m para a fosfatase alcalina utilizando o substrato *p*-nitrofenilfosfato na ausência e na presença de FeCl_3 foi 0,449 mM e 0,382 mM, respectivamente. Para a fitase alcalina o K_m foi 0,413 mM utilizando fitato de sódio como substrato. Deste modo, a fosfatase e a fitase alcalinas produzidas por *R. microsporus* var. *microsporus* foram co-purificadas e bioquimicamente caracterizadas, evidenciando-se importantes características de ambas as enzimas possibilitando, assim, futuras aplicações industriais.

Palavras-chave: *Rhizopus*. Fermentação submersa. Fosfatase alcalina. Fitase alcalina.

ABSTRACT

Biotechnological research, accompanied by the application of enzymes, has been carried out in microorganisms for production of enzymes for industrial purposes. Among these enzymes, microbial phosphatases, responsible for hydrolyzing phosphoric acid esters and anhydrides, and phytases, which catalyzes the hydrolysis of phytate (myo-inositol hexakisphosphate) in myo-inositol and inorganic phosphate, have been widely used in different sectors as, for example, in molecular biology experiments and in animal feed. According to the optimum reaction pH, phosphatases are divided into alkaline (EC 3.1.3.1) and acidic (EC 3.1.3.2). Phytases are enzymes that also belong to the class of phosphatases, however, hydrolyzing phytic acid. In recent works, the filamentous fungus *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* presented potential for production of phosphatases and phytases. In view of this, this study aimed at the production, purification and characterization of phosphatase and alkaline phytase produced by *R. microsporus* var. *microsporus*. In the optimization of Submerged Fermentation (FSbm), the highest enzymatic production was in Khanna medium with 0.4 mM KH_2PO_3 and added with 0.5% rye flour for 76 h, 32°C, pH 6.3, at 100 rpm. In chromatographic columns, alkaline phosphatase was purified 10 folds and recovered at 13%, and alkaline phytase was purified 86 folds with recovery of 167%. The native molecular mass of alkaline phosphatase and phytase produced by *R. microsporus* var. *microsporus* was 122.7 and 55.5 kDa, respectively. The purified alkaline phosphatase had an optimum temperature of 45°C and optimum pH of 8.5, maintaining its catalytic activity above 60% at temperatures of 40 and 45°C for up to 210 minutes. It maintained its activity above 50% in alkaline pH for up to 24 h. Purified alkaline phytase presented optimum temperature and pH of activity of 65°C and 9.5, respectively. Alkaline phytase maintained its enzymatic activity above 60% at temperatures of 65, 70 and 80°C for 270 min. After phytase incubation in alkaline pH for 3 hours, enzymatic activity increased by up to 50%. Phosphatase had increased activity in presence of 0.4 mM FeCl_3 , and better hydrolyzed the substrate *p*-nitrophenylphosphate, followed by ATP. The K_m for alkaline phosphatase using the substrate *p*-nitrophenylphosphate in the absence and presence of FeCl_3 was 0.449 mM and 0.382 mM, respectively. For alkaline Phytase, the K_m was 0.413 mM using sodium phytate as substrate. Thus, alkaline phosphatase and phytase produced by *R. microsporus* var. *microsporus* were co-purified and biochemically characterized, evidencing important characteristics of both enzymes, thereby, possibilities of future industrial applications.

Keywords: *Rhizopus*. Submerged fermentation. Alkaline phosphatase. Alkaline phytase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reação catalisada pela ação da fosfatase	29
Figura 2 - Mecanismo de ação da fosfatase alcalina sobre a extremidade 5' do DNA.	31
Figura 3 - Reação catalisada pela fitase.....	32
Figura 4 - Estrutura do ácido fítico.....	33
Figura 5 - Esquema simplificado dos experimentos realizados neste trabalho.	37
Figura 6 - Ação da fosfatase alcalina sobre o <i>p</i> -nitrofenil fosfato.....	40
Figura 7 - Produção de fosfatase alcalina intracelular e extracelular por <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i> em função da adição de sacarose, dextrose, bagaço de cana-de açúcar e farinha de centeio.....	56
Figura 8 - Efeito da concentração de bagaço de cana-de açúcar e de farinha de centeio adicionados ao meio de cultivo na produção fosfatásica alcalina extracelular por <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	58
Figura 9 - Influência da adição de diferentes concentrações de glicose como segunda fonte adicional de carbono na produção de fosfatase alcalina extracelular por <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	59
Figura 10 - Influência do meio de cultura adicionado de bagaço de cana-de-açúcar e de farinha de centeio na produção de fosfatase alcalina extracelular por <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	60
Figura 11 - Influência da concentração de fosfato de potássio no meio de cultivo para produção de fosfatase alcalina por <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	63
Figura 12 - Influência da condição de agitação orbital para produção de fosfatase extracelular alcalina por <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	64
Figura 13 - Gráfico de Pareto para o efeito médio estimado das variáveis independentes sobre a atividade específica da fosfatase alcalina produzida por <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	67
Figura 14 - Superfície de Resposta para o efeito do pH e da temperatura sobre a atividade específica (U/mg de prot.) da fosfatase alcalina extracelular produzida por <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	68

Figura 15 - Superfície de Resposta para o efeito da temperatura e do tempo sobre a atividade específica (U/mg de prot.) da fosfatase alcalina extracelular produzida por <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	69
Figura 16 - Superfície de Resposta para o efeito do tempo e pH sobre a atividade específica (U/mg de prot.) da fosfatase alcalina extracelular produzida por <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	69
Figura 17 - Perfil cromatográfico em DEAE-Celulose para a fosfatase alcalina extracelular produzida por <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	71
Figura 18 - Perfil cromatográfico em Sepharose CL-6B para a fosfatase e fitase alcalina produzida por <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	72
Figura 19 - Perfil eletroforético para a fosfatase e fitase alcalinas extracelulares produzidas por <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	74
Figura 20 - Temperatura ótima aparente para a atividade fosfatásica extracelular presente no extrato bruto e purificada do fungo <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	76
Figura 21 - Estabilidade térmica da fosfatase purificada por diferentes períodos.	77
Figura 22 - Determinação do pH ótimo aparente para a atividade fosfatásica extracelular presente no extrato bruto e purificada produzido por <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	77
Figura 23 - Estabilidade ao pH da fosfatase produzida por <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>microsporus</i> purificada por diferentes períodos.	78
Figura 24 - Temperatura ótima aparente para a atividade fitásica extracelular presente no extrato bruto e purificada produzida por <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	79
Figura 25 - Estabilidade térmica da fitase alcalina purificada por diferentes períodos.	80
Figura 26 - Determinação do pH ótimo aparente para a atividade fitásica extracelular presente no extrato bruto e purificada produzida por <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	81
Figura 27 - Estabilidade ao pH da fitase produzida por <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>microsporus</i> purificada por diferentes períodos.	82
Figura 28 - Influência da concentração de cloreto de ferro na atividade fosfatásica alcalina produzida por <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação internacional de enzimas	27
Tabela 2 - Planejamento Composto Central Rotacional para 3 fatores, 3 níveis e duplicata no ponto central por bloco	45
Tabela 3 - Atividade específica da fosfatase ácida e alcalina em FSbm por diferentes linhagens de fungos filamentosos.	51
Tabela 4 - Produção de fitase alcalina em FSbm por diferentes linhagens de fungos filamentosos.....	52
Tabela 5 - Influência das fontes adicionais de carbono utilizadas na produção de fosfatase alcalina intra e extracelular em FSbm por <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	54
Tabela 6 - Matriz do delineamento composto central rotacional para pH, tempo e temperatura de cultivo.	65
Tabela 7 - Efeitos para os fatores e os erros padrões correspondentes a atividade específica da fosfatase alcalina produzida por <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	67
Tabela 8 - Valores mínimos e máximos observados, e valores críticos de pH, tempo de cultivo e temperatura para máxima produção de fosfatase alcalina por <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i> em FSbm.....	70
Tabela 9 - Purificação da fosfatase alcalina extracelular produzida por <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	73
Tabela 10 - Purificação da fitase alcalina produzida por <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	73
Tabela 11 - Efeito de diferentes compostos na atividade fosfatásica extracelular alcalina de <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	83
Tabela 12 - Efeito de diferentes solventes e surfactantes na atividade fosfatásica extracelular alcalina de <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	84
Tabela 13 - Efeito de diferentes compostos na atividade fitásica extracelular alcalina de <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	87
Tabela 14 - Efeito de diferentes solventes e surfactantes na atividade fitásica extracelular alcalina de <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	88
Tabela 15 - Hidrólise de diferentes substratos pela fosfatase alcalina purificada produzida por <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	89

Tabela 16 - Parâmetros cinéticos para a fosfatase alcalina de <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	90
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

°C - Graus Celsius	L – Litro
ADP – Adenosina difosfato	M - Molar
AMP – Adenosina monofosfato	mA - Miliampére
Asp – Ácido aspártico	mg – Miligrama
atm – Atmosfera (Unidade de Pressão)	min - Minuto
ATP – Adenosina trifosfato	mL - Mililitro
BDA - Batata Dextrose Ágar	mM - Milimolar
BPP- β -hélice fitase	m/v - Massa por volume
BSA – Albumina de Soro Bovino	PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida
cm - Centímetros	PAP – Fosfatase ácida púrpura
CM - Carboximetil	pH - Potencial hidrogeniônico
DCCR – Delineamento composto central rotacional	prot. – Proteína
DEAE - Diethylaminoethyl	q.s.p. - Quantidade suficiente para
DNA – Ácido desoxirribonucleico	rpm -Rotações por minuto
DNS – Ácido 3,5-dinitrossalicílico	SDS - Duodecil sulfato de sódio
EC - Enzyme Commission	T ₅₀ – Tempo de meia-vida
EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético	TCA – Ácido tricloroacético
FSbm - Fermentação Submersa	V - Volts
FES - Fermentação em Estado Sólido	var. - Variedade
g - Grama	V _{máx} - Velocidade máxima
g - Aceleração da gravidade	v/v - Volume por volume
h - Hora	v/v/v – Volume por volume por volume
HAP – Histidina fosfatase ácida	U - Unidade de atividade
His - Histidina	μ L - Microlitro
kDa - Mil Daltons	μ mol - Micromol
k _{cat} – Constante de renovação	λ - Comprimento de onda
K _m - Constante de Michaelis-Menten	

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	Reino Fungi.....	25
1.1.1	Fungos filamentosos	25
1.2	Enzimas.....	26
1.2.1	Fontes de enzimas e potencialidade biotecnológica	27
1.2.2	Obtenção de enzimas através do processo de fermentação	28
1.2.3	No comércio e indústria	28
1.3	Fosfatases.....	29
1.4	Fitases	32
2	OBJETIVOS.....	35
2.1	Objetivo Geral	35
2.2	Objetivos Específicos	35
3	MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1	Microrganismos utilizados e seleção das linhagens produtoras de fosfatases e fitases	38
3.2	Manutenção dos microrganismos no laboratório	38
3.3	Preparo da suspensão de esporos	38
3.4	Produção de fosfatases e fitases em fermentação submersa (FSbm) ..	38
3.5	Obtenção das enzimas em FSbm.....	39
3.6	Determinação da atividade enzimática	39
3.6.1	Atividade <i>p</i> -nitrofenilfosfatásica	39
3.6.2	Atividade fitásica.....	40
3.7	Quantificação de proteína.....	41
3.8	Influência de diferentes fontes adicionais de carbono na produção enzimática	41
3.9	Influência de diferentes meios de cultivo na produção fosfatásica em FSbm	42
3.10	Influência da adição de fosfato de potássio monobásico na produção enzimática	44
3.11	Planejamento experimental	44
3.12	Purificação da fosfatase e fitase alcalina em FSbm	46
3.13	Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	46
3.15	Caracterização Bioquímica.....	47
3.15.1	Determinação da temperatura ótima de reação e termoestabilidade para a atividade fosfatásica e fitásica	47

3.15.2	Determinação do pH ótimo de reação e estabilidade ao pH para a atividade fosfatásica e fitásica	47
3.15.3	Efeito de diferentes compostos na atividade fosfatásica e fitásica alcalina ..	48
3.15.4	Estabilidade da fosfatase e fitase a solventes orgânicos	Erro! Indicador não definido.
3.15.5	Hidrólise de diferentes substratos.....	48
3.15.6	Determinação das constantes cinéticas.....	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1	Seleção da linhagem produtora de fosfatases e fitases	50
4.2	Efeitos de diferentes fontes adicionais de carbono na produção de fosfatase alcalina em FSbm.....	53
4.3	Produção de fosfatases em cultivos com diferentes fontes adicionais de carbono em função do tempo	55
4.4	Influência da concentração da fonte de carbono adicional na produção enzimática	57
4.5	Influência da adição de glicose como segunda fonte adicional de carbono	59
4.6	Produção de fosfatase alcalina em diferentes meios de cultura	60
4.7	Influência da concentração de fosfato de potássio no meio de cultivo	62
4.8	Influência da agitação na produção de fosfatase	63
4.9	Otimização das condições de cultivo utilizando o Planejamento Experimental	65
4.9.1	Confiabilidade do modelo matemático do planejamento	66
4.9.2	Otimização do pH, temperatura e tempo de cultivo para a produção enzimática	66
4.10	Purificação do filtrado extracelular em coluna cromatográfica DEAE-Celulose	70
4.11	Determinação da massa molecular da fosfatase e fitase alcalina	75
4.12	Influência da temperatura e do pH sobre a atividade fosfatásica	75
4.13	Influência da temperatura e do pH sobre a atividade fitásica	79
4.14	Efeito de diferentes sais e compostos na atividade fosfatásica alcalina	82
4.15	Efeito de diferentes sais e compostos na atividade fitásica alcalina	86
4.16	Hidrólise de diferentes substratos pela fosfatase alcalina	89
4.17	Parâmetros Cinéticos.....	90
4.17.1	Fosfatase alcalina.....	90
4.17.2	Fitase alcalina	91
5	CONCLUSÕES	92
	REFERÊNCIAS.....	93

1 INTRODUÇÃO

1.1 Reino Fungi

Estima-se que existam de 1,5 a 5,1 milhões de espécies pertencentes ao Reino Fungi que, apesar de sua diversidade, são pouco conhecidas devido à ação antrópica e predatória no meio ambiente, causando assim, prejuízo imensurável para o equilíbrio ecológico, além de tornar o possível potencial biotecnológico dessas espécies desconhecido e inutilizável para as futuras gerações (BLACKWELL, 2011). O Reino Fungi é formado por seres eucariotos, heterotróficos, unicelulares ou multicelulares e micro ou macroscópicos (BENNETT, 1998). Morfologicamente, são divididos em três grupos: as leveduras, que são unicelulares, apresentando forma oval ou esférica, reproduzem-se assexuadamente por brotamento e podem formar pseudohifas (cadeia de células formada após várias divisões); os fungos filamentosos, que apresentam células alongadas e ramificadas chamadas de hifas; e os dimórficos, que podem existir em ambas as morfologias, dependendo das condições de crescimento, principalmente da temperatura (JAMES et al., 2006). Os fungos podem ocorrer em associação com outras espécies, como micorrizas e líquens, e também podem ter vida livre ou atuar como patógenos em plantas e animais. Sua nutrição pode ser feita através de enzimas, onde os nutrientes liberados pela ação destas moléculas sobre o substrato são absorvidos através da parede e da membrana celular (BLACKWELL, 2011).

1.1.1 Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos, ou fungos carnosos, apresentam seu talo (corpo) composto por filamentos longos de células conectadas entre si, denominados de hifas. Entre os fungos filamentosos, as hifas podem ser divididas em septadas, que contêm paredes cruzadas denominadas de septos, dividindo-as em diferentes unidades celulares uninucleadas; e em cenocíticas, que não apresentam septos e são constituídas por células multinucleadas alongadas, e apenas são encontradas em poucas classes de fungos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

A reprodução desses microrganismos pode ser tanto assexuada quanto sexuada pela formação de esporos, que são produzidos nas hifas aéreas, ou também chamadas de hifas reprodutivas (JAMES et al., 2006). Em sua reprodução

assexuada, os esporos são formados por mitose. Já a reprodução sexuada, é constituída de três etapas: plasmogamia, ocorrendo a fusão dos citoplasmas das células envolvidas, onde o núcleo haploide da célula doadora (+) entra no citoplasma da célula receptora (-); a cariogamia, fase em que os núcleos (+) e (-) se fundem, formando um núcleo zigoto diploide; e a meiose, que há formação de um núcleo haploide, onde alguns podem ser recombinantes genéticos dos núcleos formadores (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Entre as principais espécies estudadas para fins biotecnológicos, pode-se citar as do gênero *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Rhizopus* e *Aspergillus* (BENNETT, 1998; JAMES et al., 2006). Essas linhagens podem produzir diversas classes de moléculas que podem possuir atividades hormonais, antibióticas, antitumorais, antifúngicas, citotóxicas, antivirais, imunossupressoras e antiparasitárias, entre outras (SÁNCHEZ; DEMAIN, 2002). As enzimas estão entre as moléculas de maior interesse biotecnológico produzidas por fungos.

1.2 Enzimas

As enzimas têm propriedades catalíticas usadas, direta ou indiretamente, pelo homem há milhares de anos, e sua utilização é associada à história da Grécia, onde se utilizavam enzimas de microrganismos no processo de produção de cervejas, queijos, bebidas alcoólicas e no processo de panificação (BHALLA et al., 2013). Porém, em meados do século XIX, houve uma expansão na sua área de aplicação, levada pela busca por biocatalizadores com propriedades novas e melhoradas (FISCHLECHNER et al., 2014). Desde então, o emprego destes catalizadores no setor alimentício e farmacêutico vem crescendo exponencialmente (ORLANDELLI et al., 2012). Grande parte das enzimas são proteínas com funções catalíticas específicas, aumentando a velocidade em que as reações atingem o equilíbrio (SAID; PIETRO, 2002).

Atualmente, são encontradas 7270 enzimas diferentes registradas no banco de dados BRENDA (TECHNISCHE UNIVERSITÄT BRAUNSCHWEIG, 2017) de acordo com o sistema de nomenclatura da IUBMB, o qual considera o tipo de reação que catalisada por cada enzima, dividindo-as em seis classes (Tabela 1)(NELSON; COX, 2013).

Tabela 1 - Classificação internacional de enzimas

Classe nº	Nome da classe de enzimas	Tipo de reação catalisada
1	Oxidoredutases	Transferência de elétrons (íons hídridos ou átomos de Hidrogênio)
2	Transferases	Reações de transferência de grupos
3	Hidrolases	Reações de hidrólise (transferência de grupos funcionais para a água)
4	Liases	Clivagem de C-C, C-O, C-N ou outras ligações por eliminação, rompimento de ligações duplas ou anéis, ou adição de grupos a ligações duplas.
5	Isomerases	Transferência de grupos dentro de uma mesma molécula produzindo formas isoméricas
6	Ligases	Formação de ligações C-C, C-S, C-O

Fonte: Nelson e Cox (2013).

1.2.1 Fontes de enzimas e potencialidade biotecnológica

As enzimas com potencial de aplicação biotecnológica podem ser de origem vegetal, animal ou microbiana. Dentre as enzimas de origem vegetal, pode-se citar a bromelina (utilizada na síntese de fármacos digestíveis), papaína (utilizada no amaciamento da carne e na produção de algumas cervejas), e as α e β -amilases (aplicadas na maltagem de bebidas destiladas). Quanto as enzimas de origem animal pode-se citar a pancreatina e pepsina, que são utilizadas em medicamentos digestivos. Algumas enzimas produzidas por animais são pouco utilizadas na indústria, pois, algumas delas, podem ser substituídas por similares de origem microbiana, que são de mais fácil obtenção, podem ser produzidas em maior quantidade, mais rapidamente, e utilizando substratos baratos como resíduos agroindustriais. Entre as enzimas de origem microbiana encontram-se, por exemplo, as esterases e lipases (aplicadas na fabricação de queijos, alterando o sabor) (BENNETT, 1998; YEDGAR; COHEN; SHOSEYOV, 2006; LI, S. et al., 2012; ORLANDELLI et al., 2012). Contudo, as enzimas disponíveis na natureza, geralmente, não são adequadas para aplicações industriais devido às condições dos processos fermentativos que, muitas vezes, requer o uso destas em condições extremas (FISCHLECHNER et al., 2014).

1.2.2 Obtenção de enzimas através do processo de fermentação

Com relação à produção, as enzimas microbianas podem ser obtidas utilizando-se a fermentação em substrato sólido (FSS) e a fermentação submersa (FSbm). A FSS é utilizada para microrganismos que crescem sobre madeira, palha e outros resíduos florestais ou subprodutos agrícolas, sendo utilizada principalmente para fungos filamentosos. Esse tipo de fermentação tem como vantagem a ausência de formação de espuma, menor demanda de energia, simplicidade do meio e facilidade no controle de contaminação proporcionada pela baixa quantidade de água livre no sistema (USTOK; TARI; GOGUS, 2007). A FSbm é a mais comum no âmbito industrial, pois proporciona alta eficiência na produção de enzimas e praticidade, dispensando tratamentos sofisticados de filtração, aeração, controle de temperatura e homogeneização do meio (NOROUZIAN et al., 2006).

1.2.3 No comércio e indústria

Quando o foco é a produção de enzima de interesse industrial, os fungos filamentosos têm se destacado, pois podem produzir enzimas que possuem alta especificidade e que podem ser utilizadas em pequenas quantidades, tornando seu estudo interessante sob o ponto de vista biotecnológico (SANT'ANNA JUNIOR, 2001).

O comércio de enzimas propicia altas despesas, fazendo com que as indústrias explorem maneiras de obter uma produção economicamente viável como, por exemplo, utilizando substratos com baixo custo (LI, S. et al., 2012). Microrganismos que possam crescer em resíduos agroindustriais como o bagaço de cana de açúcar e bagaço de laranja, produzindo enzimas com aplicações biotecnológicas são o foco de diversos estudos (GAIND; SINGH, 2015).

Entre os principais produtos que atualmente utiliza-se enzimas em alguns de seus processos industriais, pode-se citar: a produção de polpas (JIMÉNEZ et al., 1999), papel (NGUYEN, D. et al., 2008), tratamento do couro (KANDASAMY et al., 2012), detergentes (SAEKI et al., 2007), alimentos (CONTRERAS et al., 2011), bebidas (OKAMURA-MATSUI et al., 2003), rações animais (LI, S. et al., 2012), fármacos (WOODLEY, 2008), produtos químicos (GAVRILESCU; CHISTI, 2005),

cosméticos (LODS et al., 2000), biodiesel (HERNÁNDEZ-MARTÍN; OTERO, 2008) e têxteis (LI, S. et al., 2012).

1.3 Fosfatases

Dentre as enzimas de interesse biotecnológico, pode-se citar as fosfatases (EC 3.1.3). Estas enzimas estão amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas tanto em organismo procaríotos quanto em eucariotos (GUIMARÃES et al., 2004), sendo responsáveis por hidrolisar ésteres e anidridos de ácido fosfórico liberando fosfato inorgânico (WANG; HOULTON; FIELD, 2007) (Figura 1). São descritos na literatura diferentes mecanismos de hidrólise e especificidades ao substrato de acordo com o pH ótimo da enzima (BERNARD et al., 2002; GUIMARÃES et al., 2003).

Figura 1 - Reação catalisada pela ação da fosfatase.



Fonte: Autor

De acordo com o pH ótimo de reação, as fosfatases são divididas em alcalinas (EC 3.1.3.1) e ácidas (EC 3.1.3.2). As formas ácidas podem hidrolisar o monoéster-O-substituído de ácido fosforotióico, produzindo álcool e ácido tiofosfórico, sugerindo que o átomo de oxigênio é o radical e o fosfato é necessário para essa reação ocorrer (HOLLANDER, 1971), enquanto as alcalinas podem hidrolisar o monoéster-S-substituído de ácido fosforotióico, junto com a ligação S-P, produzindo ortofosfato e o correspondente tio-álcool, e, devido sua capacidade de hidrolisar em pH alcalino, podem atuar sobre ATP, ADP, AMP, *p*-nitrofenil fosfato, glicose-6-fosfato, glicose-1-fosfato, gliceraldeído-3-fosfato e pirofosfato (SIMÃO et al., 2007). Outra classificação também é utilizada para as fosfatases, dividindo-as em fosfatase alcalina, fosfatase ácida de alta massa molecular (maior que 90 kDa), fosfatase ácida de baixa massa molecular (menor que 50 kDa), fosfatase ácida

púrpura (metaloenzima, ou seja, enzima associada a um metal de transição) e V-proteína-fosfatase (MULLANEY; ULLAH, 2003).

Desta forma, são fundamentais para diversos processos biológicos como assimilação de fósforo, sinalização celular e metabolismo intermediário. No solo, quando os níveis de fosfato inorgânico livre estão baixos, ela é responsável pela mineralização do fosfato orgânico (AOYAMA et al., 2003). A hidrólise do fosfato no solo é predominantemente mediada por microrganismos, e, mesmo com a presença de fosfatases e fitases produzidas por plantas, as fosfatases ácidas produzidas por esses microrganismos atuam no solo mais eficientemente para obtenção de fósforo (TARAFDAR et al., 2001).

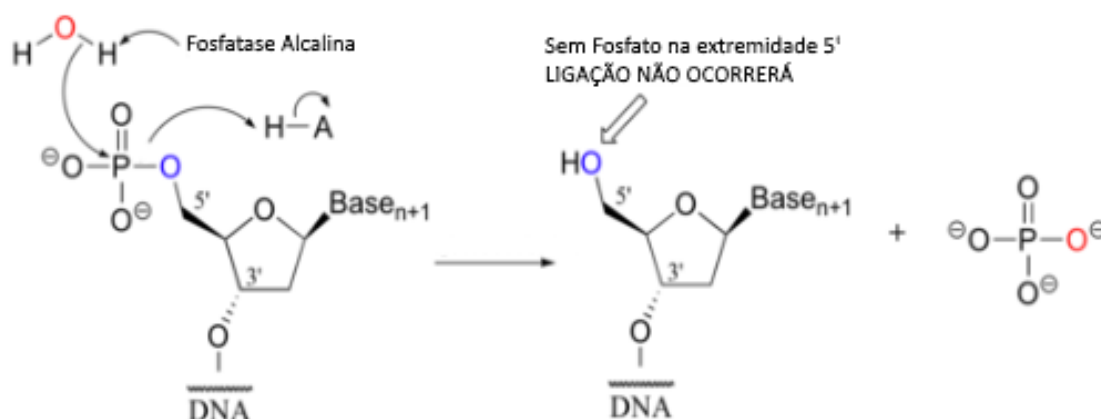
O fósforo é um macronutriente encontrado em todos os organismos, fazendo parte de diversas moléculas vitais, como o DNA, RNA, os fosfolipídios, a lectina, caseína, além de integrar membranas celulares, estruturas ósseas e moléculas de ATP (NELSON; COX, 2013). Este elemento também atua na regulação da atividade de diversas enzimas e coenzimas, além de possuir função tamponante quando presente no meio intracelular e participar da fosforilação da glicose (IDADE et al., 2001).

Este nutriente é essencial tanto para o crescimento quanto para o desenvolvimento dos seres vivos, sendo, nos animais, o segundo mineral mais abundante na composição dos tecidos vivos, onde 80% do fósforo compõem dentes e ossos, e o restante está distribuído entre os fluídos e outros tecidos (VIEIRA et al., 2009). Quando armazenados nos ossos, atua como reserva de fósforo, atendendo as exigências nutricionais do organismo (IDADE et al., 2001). Nas plantas, depois do nitrogênio, o fósforo é o segundo principal nutriente limitante para o crescimento vegetal, participando de seu metabolismo (HOLFORD, 1997).

O fósforo presente no solo é encontrado, em maior concentração, na forma de fosfato de inositol, seguido pelos fosfolipídios com ligações diéster, ácidos nucleicos, e outros ésteres de fosfato (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999; RHEINHEIMER; ANGHINONI; KAMINSKI, 2000). O fósforo presente nos fosfolipídios e ácidos nucleicos é facilmente mineralizável em sua forma inorgânica ($H_2PO_4^-$), o que facilita a decomposição destes compostos. Por outro lado, o fosfato de inositol interage com os nutrientes inorgânicos do solo, dificultando a mineralização do fósforo presente devido sua alta carga residual (SCHUMACHER; CECONI; SANTANA, 2004), tornando-o insolúvel e indisponível para as plantas (LOPEZ-BUCIO, 2002).

Entre diversas aplicações, as fosfatases alcalinas têm destaque na área clínica, pois são encontradas nos tecidos humanos, notadamente na mucosa intestinal, fígado, túbulos renais, baço, ossos e placenta (MOTTA, 2000). Testes clínicos com esta enzima são utilizados para identificar doenças e realizar tratamentos específicos, tais como: o diagnóstico e monitoramento de câncer prostático, particularmente, da forma metastizada (LI, J. et al., 2006). Além disso, está intimamente ligada à calcificação dos ossos e a ativação da produção de células NK que podem causar regressão tumoral; também são utilizadas em experimentos de clonagem removendo grupos fosfato das extremidades 5' das moléculas de DNA (Figura 2), impedindo que os vetores de DNA digeridos por endonucleases de restrição voltem a recircularizar (KAWADA et al., 2003).

Figura 2 - Mecanismo de ação da fosfatase alcalina sobre a extremidade 5' do DNA.

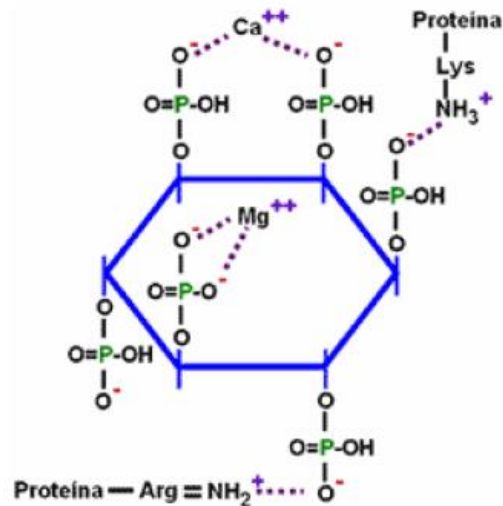


Fonte: Adaptado de Keogh et al. (2006).

Entre os microrganismos produtores de fosfatases pode-se citar a bactéria *Mycobacterium tuberculosis* (SALEH; BELISLE, 2000) e os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium* e *Enterobacter* (WHITELAW, 2000), além dos fungos *Aspergillus fumigatus* (BERNARD et al., 2002), *Scytalidium thermophilum* (GUIMARÃES et al., 2001), *Aspergillus caespitosus* (GUIMARÃES et al., 2004), *Humicola grisea* var. *thermoidea* (BUAINAIN et al., 1998), *Rhizopus microsporus* var. *rhizopodiformis* (GUIMARÃES et al., 2006), *Trichoderma harzianum* (LEITÃO et al., 2010) e *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* (SATO et al., 2014). Este último demonstrou sua eficiência na produção de fitases e fosfatases (SATO, 2015).

como o armazenamento de fósforo e cátions que, após a germinação da semente, fornece matéria-prima para a formação da parede celular (SAKAI et al., 2015).

Figura 4 - Estrutura do ácido fítico.



Fonte: FARUSI (2007).

O ácido fítico é, nos alimentos, uma molécula carregada negativamente, conferindo-lhe o potencial de formar complexos com cátions, como Zn⁺², Fe⁺², Fe⁺³, Mg⁺² e Ca⁺², (RAVINDRAN et al., 2001; COWIESON; ACAMOVIC; BEDFORD, 2006) e proteínas, desde que estas estejam acima do pH isoelétrico (LEAL et al., 2010).

Desta forma, o fitato apresenta característica antinutricional para animais monogástricos, já que não produzem fitases, ligando-se aos nutrientes, impedindo a completa absorção dos nutrientes (MUDGE; SMITH; RICHARDSON, 2003), além de interagir com a amilase, diminuindo a energia metabolizável da ração animal (SELLE et al., 2000).

As fitases são naturalmente encontradas em plantas e microrganismos, sendo estes fontes promissoras para sua produção, com destaque para os fungos. Entre os microrganismos produtores de fitase, pode-se citar as espécies de bactérias, principalmente, dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* (GRAMINHA et al., 2008), leveduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Torulopsis candida*, *Debaryomyces castellii*, *Kluyveromyces fragilis* e *Schwanniomyces castellii* (DVORÁKOVÁ et al., 1997), além dos fungos filamentosos como *Aspergillus* sp., *A. ficuum* e *A. niger* que são utilizados para obtenção destas enzimas. O principal fungo

para produção de fitase é o *Aspergillus niger*, que vem sendo empregado na indústria desde 1991 (SELLE; RAVINDRAN, 2008).

Atualmente, a fitase é acrescida na ração animal, principalmente de suínos e frangos, permitindo um melhor aproveitamento do ácido fítico ali presente, aumentando a disponibilidade de fósforo e diminuindo a necessidade de suplementação com outras fontes inorgânicas de fósforo, atendendo assim, a demanda nutricional desses animais (SELLE; RAVINDRAN, 2008; LEI; PORRES, 2011; PARK; LEE; CHO, 2012; SATO et al., 2014). O uso da fitase permite a redução de 20 a 50% do fósforo excretado, minimizando o impacto ambiental causado pela atividade agropecuária (YADAV; TARAFDAR, 2003).

Além de a indústria utilizarem as fitases para aumentar a biodisponibilidade de minerais em rações animais, o uso de fosfatos provindos da hidrólise do mio-inositol apresenta efeitos terapêuticos tanto aos animais quanto aos humanos, diminuindo o risco de doenças cardiovasculares (ANDERSON et al., 1999), reduzindo a formação de cálculos renais (URBANO et al., 2000) e vários tipos de cânceres (SHAMSUDDIN, 2002). Além disso, a fitase pode ser interessante para a indústria de papel, pois os resíduos liberados apresentam alto teor de fitato, e com a remoção do ácido fítico presente nas plantas, minimizaria o impacto ambiental causado pelo fitato liberado nos efluentes e no solo, pois este se liga a matéria orgânica, dificultando sua decomposição (KEROVUO et al., 2000).

5 CONCLUSÕES

Analisando os resultados obtidos neste estudo, é possível afirmar que o fungo *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* apresenta potencial para produção de fosfatase e fitase alcalina extracelular, sendo influenciada pela composição do meio de cultivo e pela fonte de carbono empregada, destacando-se a farinha de centeio. O processo de produção da fosfatase alcalina em escala laboratorial foi otimizado utilizando um delineamento composto central rotacional, não obtendo um aumento significativo na produção enzimática, porém acima dos encontrados na literatura para mesma enzima. A purificação da fosfatase e fitase em colunas cromatográficas de troca iônica e exclusão molecular foi eficaz. Com relação ao pH, dois picos de atividade foram encontrados no extrato bruto, um ácido e outro alcalino, para ambas fosfatase e fitase, indicando a presença de isoformas para estas enzimas. A fitase purificada pode atuar em altas temperaturas, e apresentou atividade em uma ampla faixa de pH. A fosfatase alcalina atuou melhor sobre o substrato na presença de FeCl_3 . Este é o primeiro estudo de purificação e caracterização de uma fitase alcalina de origem fúngica, o que contribui significativamente para o avanço do conhecimento a respeito destas enzimas. Em suma, esta pesquisa gerou conhecimento sobre a produção de fosfatase e fitase alcalina por fungos filamentosos, evidenciando mais uma vez o potencial biotecnológico destas enzimas para uma possível aplicação futura.

REFERÊNCIAS

- ALBRECHT, R.; LE PETIT, J.; CALVERT, V.; TERROM, G.; PÉRISSOL, C. Changes in the level of alkaline and acid phosphatase activities during green wastes and sewage sludge co-composting. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 1, p. 228-233, 2010.
- ALEKSIEVA, P.; MICHEVA-VITEVA, S. Regulation of extracellular acid phosphatase biosynthesis by phosphates in proteinase producing fungus *Humicola lutea* 120-5. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 8, p. 570-575, 2000.
- ALVES, N. M.; HENRIQUE, L.; GUIMARÃES, S.; PICCOLI, R. H. Production and partial characterization of an extracellular phytase produced by *Muscodor* sp. under submerged fermentation. **Advances in Microbiology**, v. 6, p. 23-32, 2016.
- ANDERSON, J. W.; SMITH, B. M.; WASHNOCK, C. S. Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, n. 3, p. 464-474, 1999.
- ANUPAMA, P. M.; SOMALANKA, S. R. Optimization of nutritional parameters for production of alpha amylase using *Aspergillus oryzae* MTCC 3017 by central composite design. **International Journal of Industrial Biotechnology and Biomaterials**, v. 2, n. 1, 2016. doi:10.13140/RG.2.1.4326.5520.
- AOYAMA H.; SILVA, T. M. A.; MIRANDA, A.; FERREIRA, C. V. Proteínas tirosinas fosfatases: propriedades e funções biológicas. **Química Nova**, v. 26, p. 896-900, 2003.
- AZEKE, M. A.; GREINER, R.; JANY, K. D. Purification and characterization of two intracellular phytases from the tempeh fungus *Rhizopus oligosporus*. **Journal of Food Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 213-227, 2011.
- BENNETT, J. W. Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 66, n. 2/3, p. 101-107, 1998.
- BERNARD, M.; MOUYNA, I.; DUBREUCQ, G.; DEBEAUPUIS, J. P.; FONTAINE, T.; VORGIAS, C.; FUGLSANG, C.; LATGÉ, J. P. Characterization of a cell-wall acid phosphatase (PhoAp) in *Aspergillus fumigatus*. **Microbiology**, v. 148, n. 9, p. 2819-2829, 2002.
- BHALLA, A.; BANSAL, N.; KUMAR, S.; BISCHOFF, K. M.; SANI, R. K. Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 751-759, 2013.
- BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? **American Journal of Botany**, v. 98, n. 3, p. 426-438, 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.

BUAINAIN, L. B.; KADOWAKI, M. K.; POLIZELI, M. de L.; TEREZI, H. F.; JORGE, J. A. Characterization of a conidial alkaline phosphatase from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 85-94, 1998.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G. M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P. G. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 9, p. 1327-1333, 2004.

CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. **Bioresearch Technology**, v. 101, n. 13, p. 4754-4766, 2010.

CARVALHO, G. G. P. de; PIRES, A. J. V.; VELOSO, C. M.; MAGALHÃES, A. F.; FREIRE, M. A. L.; SILVA, F. F. da; SILVA, R. R.; CARVALHO, B. M. A. de. Valor nutritivo do bagaço de cana-de-açúcar amonizado com quatro doses de uréia. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 41, n. 1, p. 125-132, 2006.

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

CHEN, W.; YE, L.; GUO, F.; LV, Y.; YU, H. Enhanced activity of an alkaline phytase from *Bacillus subtilis* 168 in acidic and neutral environments by directed evolution. **Biochemical Engineering Journal**, v. 98, p. 137-143, 2015.

CHHOKAR, V.; SANGWAN, M.; BENIWAL, V.; NEHRA, K.; NEHRA, K.S. Effect of additives on the activity of tannase from *Aspergillus awamori* MTCC9299. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 8, p. 2256-2264, 2010.

COLEMAN, E. Structure and mechanism of alkaline phosphatase. **Annual Review Biophysics and Biomolecular Structures**, n. 21, p. 441-483, 1992.

CONTRERAS, M. del M.; SEVILLA, M. A.; MONROY-RUIZ, J.; AMIGO, L.; GÓMEZ-SALA, B.; MOLINA, E.; RAMOS, M.; RECIO, I. Food-grade production of an antihypertensive casein hydrolysate and resistance of active peptides to drying and storage. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 7, p. 470-476, 2011.

COSTA, A. M.; RIBEIRO, W. X.; KATO, E.; MONTEIRO, A. R. G.; PERALTA, R. M. Production of tannase by *Aspergillus tamarisii* in submerged cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 2, p. 399-404, 2008.

COWIESON, A. J.; ACAMOVIC, T.; BEDFORD, M. R. Using the precision-feeding bioassay to determine the efficacy of exogenous enzymes-A new perspective. **Animal Feed Science and Technology**, v. 129, n. 1/2, p. 149-158, 2006.

DVORÁKOVÁ, J.; VOLFOVÁ, O.; KOPECKÝ, J. Characterization of phytase produced by *Aspergillus niger*. **Folia Microbiology**, v. 42, p. 349-352, 1997.
FARUSI, G. Monastic ink: linking chemistry and history. **Science in School**, v. 6, p. 36-40, 2007.

FERNANDEZ-LOPEZ, L.; PEDRERO, S. G.; LOPEZ-CARROBLES, N.; GORINES, B. C.; VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Effect of protein load on stability of immobilized enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 98, p. 18-25, 2017.

FISCHLECHNER, M.; SCHAERLI, Y.; MOHAMED, M. F.; PATIL, S.; ABELL, C.; HOLLFELDER, F. Evolution of enzyme catalysts caged in biomimetic gel-shell beads. **Nature Chemistry**, v. 6, n. 9, p. 791-796, 2014.

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

GARGOVA, S.; SARIYSKA, M. Effect of culture conditions on the biosynthesis of *Aspergillus niger* phytase and acid phosphatase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 2, p. 231-235, 2003.

GAVRILESCU, M.; CHISTI, Y. Biotechnology - a sustainable alternative for chemical industry. **Biotechnology Advances**, v. 23, n. 7/8, p. 471-499, 2005.

GAWAS-SAKHALKAR, P.; SINGH, S. M.; SIMANTINI, N.; RAVINDRA, R.. High-temperature optima phosphatases from the cold-tolerant Arctic fungus *Penicillium citrinum*. **Polar Research**, v. 31, 2012. doi:10.3402/polar.v31i0.11105.

GIOTS, F.; DONATON, M. C. V.; THEVELEIN, J. M. Inorganic phosphate is sensed by specific phosphate carriers and acts in concert with glucose as a nutrient signal for activation of the protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 1163-1181, 2003.

GONÇALVES, R. R.; FURRIEL, R. P. M.; JORGE, J. A.; LEONE, F. A. Rat osseous plate alkaline phosphatase: effect of neutral protease digestion on the hydrolysis of pyrophosphate and nitrophenylphosphate. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 241, n. 1-2, p. 69-79, 2002.

GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; SILVA, R. da; GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 144, n. 1, p. 1-22, 2008.

GRAS, D. E. **Regulação da expressão gênica pelo fosfato no fungo filamentoso *Neurospora crassa***. 2008. 94 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008

GREENLAND, S.; SENN, S. J.; ROTHMAN, K. J.; CARLIN, J. B.; POOLE, C.; GOODMAN, S. N.; ALTMAN, D. G. Statistical tests, P values, confidence intervals, and power: a guide to misinterpretations. **European Journal of Epidemiology**, v. 31, n. 4, p. 337-350, 2016.

GREINER, R.; KONIETZNY, U.; JANY, K. D. Purification and characterization of 2 phytases from *Escherichia coli*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 303, n. 1, p. 107-113, 1993.

GUIMARAES, L. H. S.; TEREZI, H. F.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. de L. T. de M. Thermostable conidial and mycelial alkaline phosphatases from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 265-270, 2001.

GUIMARÃES, L. H. S.; JORGE, J. A.; TEREZI, H. F.; JAMUR, M. C.; OLIVER, C.; POLIZELI, M. de L. T. de M. Effect of carbon source on alkaline phosphatase production and excretion in *Aspergillus caespitosus*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 210-217, 2003.

GUIMARÃES, L. H. S.; TEREZI, H. F.; JORGE, J. A.; LEONE, F. A.; POLIZELI, M. de L. T. de M. Characterization and properties of acid phosphatases with phytase activity produced by *Aspergillus caespitosus*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 201-207, 2004.

GUIMARÃES, L. H. S.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S. C.; MICHELIN, M.; RIZZATTI, A. C. S.; SANDRIM, V. C.; ZANOELO, F. F.; AQUINO, A. C. M. M.; BARBOSA JUNIOR, A. B.; POLIZELI, M. de L. T. de M. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 474-480, 2006.

GUIMARÃES, L. H. S.; SOMERA, A. F.; TEREZI, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M.; JORGE, J. A. Production of β -fructofuranosidases by *Aspergillus niveus* using agro industrial residues as carbon sources: characterization of an intracellular enzyme accumulated in the presence of glucose. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 237-241, 2009.

GULATI, H. K.; CHADHA, B. S.; SAINI, H. S. Production and characterization of thermostable alkaline phytase from *Bacillus laevolacticus* isolated from rhizosphere soil. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 1, p. 91-98, 2007.

HEINONEN, J. K.; LAHTI, R. J. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. **Analytical Biochemistry**, v. 113, n. 2, p. 313-317, 1981.

HERNÁNDEZ-MARTÍN, E.; OTERO, C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozymes® 435 and Lipozyme® TL IM. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 2, p. 277-286, 2008.

HILL, T. W.; KAFER, E. Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions. **Fungal Genetics Reports**, v. 48, n. 1, p. 20-21, 2001.

HOFMEYR, J.-H.; CORNISH-BOWDEN, A. The reversible Hill equation: how to incorporate cooperative enzymes into metabolic models. **Bioinformatics**, v. 13, n. 4, p. 377-385, 1997.

HOLFORD, I. C. R. Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants. **Australian Journal of Soil Research**, v. 35, n. 35, p. 227-239, 1997.

HOLLANDER, V. P. 19 acid phosphatases. **The Enzymes**, v. 4, p. 449-498, 1971.

HOWSON, S. J.; DAVIS, R. P. Production of phytate-hydrolyzing enzyme by some fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 5, n. 5, p. 377-382, 1983.

HUBER, L. S.; RODRIGUES-AMAYA, D. B.; RODRIGUES, M. I. Otimização e validação de metodologia analítica para determinação de flavonóis e flavonas por CLAE em hortaliças. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 2, p. 142-151, 2007.

IDADE, D. de; RUNHO, R. C.; GOMES, P. C.; ROSTAGNO, H. S.; FERNANDO, L.; ALBINO, T.; LOPES, P. S.; POZZA, P. C. Exigência de fósforo disponível para frangos de corte machos e fêmeas de 21 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 1, p. 187-196, 2001.

JAMES, T. Y.; KAUFF, F.; SCHOCH, C. L.; MATHENY, P. B.; HOFSTETTER, V.; COX, C. J.; CELIO, G.; GUEIDAN, C.; FRAKER, E.; MIADLIKOWSKA, J.; LUMBSCH, H. T.; RAUHUT, A.; REEB, V.; ARNOLD, A. E.; AMTOFT, A.; STAJICH, J. E.; HOSAKA, K.; SUNG, G.-H.; JOHNSON, D.; O'ROURKE, B.; CROCKETT, M.; BINDER, M.; CURTIS, J. M.; SLOT, J. C.; WANG, Z.; WILSON, A. W.; SCHÜSSLE, A.; LONGCORE, J. E.; O'DONNELL, K.; MOZLEY-STANDRIDGE, S.; PORTER, D.; LETCHER, P. M.; POWELL, M. J.; TAYLOR, J. W.; WHITE, M. M.; GRIFFITH, G. W.; DAVIES, D. R.; HUMBER, R. A.; MORTON, J. B.; SUGIYAMA, J.; ROSSMAN, A. Y.; ROGERS, J. D.; PFISTER, D. H.; HEWITT, D.; HANSEN, K.; HAMBLETON, S.; SHOEMAKER, R. A.; KOHLMAYER, J.; VOLKMANN-KOHLMEYER, B.; SPOTTS, R. A.; SERDANI, M.; CROUS, P. W.; HUGHES, K. W.; MATSUURA, K.; LANGER, E.; LANGER, G.; UNTEREINER, W. A.; LÜCKING, R.; BÜDEL, B.; GEISER, D. M.; APTROOT, A.; DIEDERICH, P.; SCHMITT, I.; SCHULTZ, M.; YAHR, R.; HIBBETT, D. S.; LUTZONI, F.; MCLAUGHLIN, D. J.; SPATAFORA, J. W.; VILGALYS, R. Reconstructing the early evolution of fungi using a six-gene phylogeny. **Nature**, v. 443, n. 7113, p. 818-822, 2006.

JIMÉNEZ, L.; NAVARRO, E.; FERRER, J. L.; LOPÉZ, F.; ARIZA, J. Biobleaching of cellulose pulp from wheat straw with enzymes and hydrogen peroxide. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 1/2, p. 149-157, 1999.

JUMA, N. G.; TABATABAI, M. A. Effects of trace elements on phosphatase activity in soils. **Soil Science Society of America Journal**, v. 41, n. 2, p. 343-346, 1977.

KANDASAMY, N.; VELMURUGAN, P.; SUNDARVEL, A.; RAGHAVA, R. J.; BANGARU, C.; PALANISAMY, T. Eco-benign enzymatic dehairing of goatskins utilizing a protease from a *Pseudomonas fluorescens* species isolated from fish visceral waste. **Journal of Cleaner Production**, v. 25, p. 27-33, 2012.

KAR, B.; BANERJEE, R.; BHATTACHARYYA, B. C. Effect of additives on the behavioural properties of tannin acyl hydrolase. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 9, p. 1285-1293, 2003.

KAWADA, M.; MIZUNO, M.; NASU, J.; UESU, T.; OKAZAKI, H.; OKADA, H.; SHIMOMURA, H.; YAMAMOTO, K.; TSUJI, T.; FUJITA, T.; SHIRATORI, Y. Release of decayaccelerating factor into stools of patients with colorectal cancer by means of cleavage at the site of glycosylphosphatidylinositol anchor. **Journal of Laboratory Clinical Medicine**, v. 142, n. 5, p. 306-312, 2003.

KEOGH, M.-C.; KIM, J.-A.; DOWNEY, M.; FILLINGHAM, J.; CHOWDHURY, D.; HARRISON, J. C.; ONISHI, M.; DATTA, N.; GALICIA, S.; EMILI, A.; LIEBERMAN, J.; SHEN, X.; BURATOWSKI, S.; HABER, J. E.; DUROCHER, D.; GREENBLATT, J. F.; KROGAN, N. J. Corrigendum: a phosphatase complex that dephosphorylates γ H2AX regulates DNA damage checkpoint recovery. **Nature**, v. 439, p. 497-501, 2006.

KEROVUO, J.; ROUVINEN, J.; HATZACK, F. Analysis of myo-inositol hexakisphosphate hydrolysis by *Bacillus* phytase: indication of a novel reaction mechanism. **Biochemical Journal**, v. 352, n. 3, p. 623-628, 2000.

KEROVUO, J.; LAURAEUS, M.; NURMINEN, P.; KALKKINEN, N.; APAJALAHTI, J. Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 6, p. 2079-2085, 1998.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; AHMAD, M.; OVES, M.; WANI, P. A. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi – current perspective. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 56, n. 1, p. 73-98, 2010.

KHANNA, P.; SUNDARI, S. S.; KUMAR, N. J. Production, isolation and partial purification of xylanases from an *Aspergillus* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 242-243, 1995.

KIM, Y. O.; KIM, H. K.; BAE, K. S.; YU, J. H.; OH, T. K. Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, n. 1, p. 2-7, 1998.

KUMAR, M.; SINGH, A.; BENIWAL, V.; SALAR, R. K. Improved production of tannase by *Klebsiella pneumoniae* using Indian gooseberry leaves under submerged fermentation using Taguchi approach. **AMB Express**, 2016. doi:10.1186/s13568-016-0217-9.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LEAL, A. S.; GONÇALVES, C. G.; VIEIRA, I. F. R.; CUNHA, M. R. R.; GOMES, T. C. B. Avaliação da concentração de minerais e dos fatores antinutricionais fitato e oxalato em multimisturas da região metropolitana de Belo Horizonte/MG. **Nutrire**, v. 35, p. 39-52, 2010.

LEI, X. G.; PORRES, J. M. Phytase: an enzyme to improve soybean nutrition. In: EL-SHEMY, H. (Ed.). **Soybean and nutrition**. Rijeka: InTech, 2016. Chap. 4, p. 67-80.

LEITÃO, V. O.; LIMA, R. C. M.; VAINSTEIN, M. H.; ULHOA, C. J. Purification and characterization of an acid phosphatase from *Trichoderma harzianum*, **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 8, p. 1083-1088, 2010.

LEÓN, A. E.; ROSELL, C. M. (Ed.). **De tales harinas, tales panes**: granos, harinas y productos de panificación em Iberoamérica. Córdoba: Hugo Báez Editor, 2007.

LEONE, F. A.; BARANAUSKAS, J. A.; FURRIEL, R. P. M.; BORIN, I. A. SigrafW: an easy-to-use program for fitting enzyme kinetic data. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 33, n. 6, p. 399-403, 2005.

LI, J.; MARIONNEAU, C.; ZHANG, R.; SHAH, V.; HELL, J.W.; NERBONNE, J.M.; ANDERSON, M.E. Calmodulin kinase II inhibition shortens action potential duration by upregulation of K⁺ currents. **Circulation Research**, v. 99, n. 10, p. 1092-1099, 2006.

LI, P.; LIU, W.; GAO, K. Effects of temperature, pH, and UV radiation on alkaline phosphatase activity in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc flagelliforme*. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 4, p. 1031-1038, 2013.

LI, S.; YANG, X.; YANG, S.; ZHU, M.; WANG, X. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, n. 3, 2012. doi:10.5936/csbj.201209017.

LIM, D.; GOLOVAN, S.; FORSBERG, C. W.; JIA, Z. Crystal structures of *Escherichia coli* phytase and its complex with phytate. **Nature Structural Biology**, v. 7, n. 2, p. 108-113, 2000.

LODS, L. M.; DRES, C.; JOHNSON, C.; SCHOLZ, D. B.; BROOKS, G. J. The future of enzymes in cosmetics. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 22, n. 2, p. 85-94, 2000.

LOPEZ-BUCIO, J. Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. **Plant Physiology**, v. 129, n. 1, p. 244-256, 2002.

MARABEZI, K. **Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de lignina e holocelulose em amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar**. 2009. 158 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

MAZÓN, M. J. Regulation of yeast fructose-1, 6-bisphosphatase by phosphorylation-dephosphorylation. **Modulation by Covalent Modification**, v. 27, p. 159-169, 2014.

MILLER, G. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MORNET, E. Structural evidence for a functional role of human tissue nonspecific alkaline phosphatase in bone mineralization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 33, p. 31171-31178, 2001.

MOTTA, V, T. **Bioquímica clínica: princípios e interpretações**. 4. ed. Porto Alegre: Médica Massau, 2003. 419 p.

MUDGE, S. R.; SMITH, F. W.; RICHARDSON, A. E. Root-specific and phosphate-regulated expression of phytase under the control of a phosphate transporter promoter enables *Arabidopsis* to grow on phytate as a sole P source. **Plant Science**, v. 165, n. 4, p. 871-878, 2003.

MULLANEY, E. J.; ULLAH, A. H. J. The term phytase comprises several different classes of enzymes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 312, n. 1, p. 179-184, 2003.

NAHAS, E.; TERENCE, H. F.; ROSSI, A. Effect of carbon source and pH on the production and secretion of acid phosphatase (EC 3.1. 3.2) and alkaline phosphatase (EC 3.1. 3.1) in *Neurospora crassa*. **Microbiology**, v. 128, n. 9, p. 2017-2021, 1982.

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

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v. 170, p. 265-270, 1999.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 6th ed. New York: W. F. Freeman, c2013. 1216 p.

NEPA-UNICAMP (Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação). **Tabela brasileira de composição de alimentos**. 4. ed. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2011. 161 p.

NGUYEN, D.; ZHANG, X.; JIANG, Z. H.; AUDET, A.; PAICE, M. G.; RENAUD, S.; TSANG, A. Bleaching of kraft pulp by a commercial lipase: accessory enzymes degrade hexenuronic acids. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 2, p. 130-136, 2008.

NGUYEN, H. C.; WU, S.; SU, C.; HWANG, T. Biochemical, biophysical, and thermal properties of alkaline phosphatase from thermophile *Thermus* sp. **Biotechnologia, Agronomia, Soiété et Environment**, v. 21, n. 2, p. 117-126, 2017.

- NIU, C.; LUO, H.; SHI, P.; HUANG, H.; WANG, Y.; YANG, P.; YAO, B. N - glycosylation improves the pepsin resistance of HAP phytases by enhancing their stability at acidic pH and reducing the pepsin accessibility to cleavage sites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 4, p. 1004-1014, 2016.
- NOROUZIAN, D.; AKBARZADEH, A.; SCHARER, J. M.; YOUNG, M. M. Fungal glucoamylases. **Biotechnology Advance**, v. 24, n. 1, p. 80-85, 2006.
- OH, B. C.; CHOI, W. C.; PARK, S.; KIM, Y. O.; OH, T. K. Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n. 4, p. 362-372, 2004.
- OKAMURA-MATSUI, T.; TOMODA, T.; FUKUDA, S.; OHSUGI, M. Discovery of alcohol dehydrogenase from mushrooms and application to alcoholic beverages. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 23, n. 2/6, p. 133-144, 2003.
- ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios: Revista Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, p. 97-109, 2012.
- PANDEY, A.; SZAKACS, G.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; SOCCOL, V. T. Production, purification and properties of microbial phytases. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 3, p. 203-214, 2001.
- PARK, I.; LEE, J.; CHO, J. Degradation of phytate pentamagnesium salt by *Bacillus* sp. T4 phytase as a potential eco-friendly feed additive. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 25, n. 10, p. 1466-1472, 2012.
- PASAMONTES, L.; HAIKER, M.; WYSS, M.; TESSIER, M.; VAN LOON, A. P. Gene cloning, purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 5, p. 1696-1700, 1997.
- RANJAN, B.; SATYANARAYANA, T. Recombinant HAP phytase of the thermophilic mold *Sporotrichum thermophile*: expression of the codon-optimized phytase gene in *Pichia pastoris* and applications. **Molecular Biotechnology**, v. 58, n. 2, p. 137-147, 2016.
- RAVINDRAN, V.; SELLE, P. H.; RAVINDRAN, G.; MOREL, P. C. H.; KIES, A. K.; BRYDEN, W. L. Microbial phytase improves performance, apparent metabolizable energy, and ileal amino acid digestibility of broilers fed a lysine-deficient diet. **Poultry Science**, v. 80, n. 3, p. 338-344, 2001.
- REZÁCOVÁ, P.; BOREK, D.; MOY, S. F.; JOACHIMIÁK, A.; OTWINOWSKI, Z. Crystal structure and putative function of small toprim domain-containing protein from *Bacillus stearothermophilus*. **Proteins**, v. 70, n. 2, p. 311-319, 2008.

- RHEINHEIMER, D. S.; ANGHINONI, I.; KAMINSKI, J. Depleção do fósforo inorgânico de diferentes frações provocada pela extração sucessiva com resina em diferentes solos e manejos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, n. 2, p. 345-354, 2000.
- RIBEIRO, D. A.; COTA, J.; ALVAREZ, T. M.; BRUCHLI, F.; BRAGATO J.; PEREIRA, B. M.; PAULETTI, B. A.; JACKSON, G.; PIMENTA, M. T.; MURAKAMI, M. T.; CAMASSOLA, M.; RULLER, R.; DILLON, A. J.; PRADELLA, J. G.; LEME, A. F. P.; SQUINA, F. M. The *Penicillium echinulatum* secretome on sugar cane bagasse. **Plos One**, v. 7, n. 12, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0050571.
- RIBEIRO JUNIOR, V. R.; RIBEIRO, C. L. N.; MESSIAS, R. K. G.; ROCHA, T. C. Importância da enzima fitase na nutrição animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 4, p. 4127-4137, 2015.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2 ed. Campinas: Casa do Pão Editora, 2009.
- RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, n. 4/5, p. 319-339, 1999.
- RUSTIGUEL, C. B.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S.. Characterization of a thermo-tolerant mycelial β -fructofuranosidase from *Aspergillus phoenicis* under submerged fermentation using wheat bran as carbon source. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 362-369, 2015.
- SAEKI, K.; OZAKI, K.; KOBAYASHI, T.; ITO, S. Detergent alkaline proteases: enzymatic properties, genes, and crystal structures. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, n. 6, p. 501-508, 2007.
- SAID, S.; PIETRO, R. L. R. **Enzimas de interesse industrial e biotecnológico**. Rio de Janeiro: Editora Eventos e Livraria, 2002. 121 p.
- SAKAI, H.; IWAI, T.; MATSUBARA, C.; USUI, Y.; OKAMURA, M.; YATOU, O.; TERADA, Y.; AOKI, N.; NISHIDA, S.; YOSHIDA, K. T. A decrease in phytic acid content substantially affects the distribution of mineral elements within rice seeds. **Plant Science**, v. 238, p. 170-177, 2015.
- SALEH, M. T.; BELISLE, J. T. Secretion of an acid phosphatase (sapM) by *Mycobacterium tuberculosis* that is similar to eukaryotic acid phosphatases. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 23, p. 6850-6853, 2000.
- SÁNCHEZ, S.; DEMAIN, A. L. Metabolic regulation of fermentation processes. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 31, p. 895-906, 2002.
- SANT'ANNA JUNIOR, G. L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coord.). **Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Blucher, 2001. Cap. 14, p 351-362. (Biotecnologia industrial, v. 3).

SANTOS, F. A.; QUEIROZ, J. H. de; COLODETTE, J. L.; MANFREDI, M.; QUEIROZ, M. E. L. R.; CELSO, S.; SOARES, F. E. F. Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando à produção de etanol celulósico. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 56-62, 2014.

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 produced by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* biofilm on an inert support using sugarcane bagasse as carbon source. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.179, n. 4, p. 610-624, 2016.

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

SCHUMACHER, M. V.; CECONI, D. E.; SANTANA, C. A. Influência de diferentes doses de fósforo no crescimento de mudas de angico-vermelho (*Parapiptadenia rigida* (Bentham) Brenan). **Revista Árvore**, v. 28, n. 1, p. 149-155, 2004.

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

SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V.; CALDWELL, A.; BRYDEN, W. L. Phytate and phytase: consequences for protein utilisation. **Nutrition Research Reviews**, v. 13, n. 2, p. 255-278, 2000.

SELVAMOHAN, T.; RAMADAS, V.; REJIBEULA, M. Optimization of phytase production by *Pseudomonas* sp. isolated from poultry faces. **International Journal of Modern Engineering Research**, v. 2, p. 1326-1330, 2012.

SHAMSUDDIN, A. M. Anti-cancer function of phytic acid. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 37, n. 7, p. 769-782, 2002.

SHRADDHA; SHEKHER, R.; SEHGAL, S.; KAMTHANIA, M.; KUMAR, A. Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. **Enzyme Research**, 2011. doi:10.4061/2011/217861.

SILVA, T. A. S. E.; KNOB, A.; TREMACOLDI, C. R.; BROCHETTO-BRAGA, M. R.; CARMONA, E. C. Purification and some properties of an extracellular acid protease from *Aspergillus clavatus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 11, p. 2491-2497, 2011.

SIMÃO, A. M. S.; BELOTI, M. M.; CEZARINO, R. M.; ROSA, A. L.; PIZAURO, J. M.; CIANCAGLINI, P. Membrane-bound alkaline phosphatase from ectopic mineralization and rat bone marrow cell culture. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p. 679-687, 2007.

SONI, S. K.; MAGDUM, A.; KHIRE, J. M. Purification and characterization of two distinct acidic phytases with broad pH stability from *Aspergillus niger* NCIM 563. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 11, p. 2009-2018, 2010.

STANFORD, S. M.; KRISHNAMURTHY, D.; KULKARNI, R. A.; KARVER, C. E.; BRUENGER, E.; WALKER, L. M.; MA, C. T.; CHUNG, T. D. Y.; SERGIENKO, E.; BOTTINI, N.; BARRIOS, A. M. PCAP-based peptide substrates: the new tool in the box of tyrosine phosphatase assays. **Methods**, v. 65, n. 2, p. 165-174, 2014.

SUTARDI; BUCKLE, K. A. Characterization of extra- and intracellular phytases from *Rhizopus oligosporus* used in tempeh production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 67-79, 1988.

TARAFDAR, J. C., YADAV, R. S., MEENA, S. C. Comparative efficiency of acid phosphatase originated from plant and fungal sources. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 164, p. 279-282, 2001.

TECHNISCHE UNIVERSITÄT BRAUNSCHWEIG. **BRENDA**: the comprehensive enzyme information system. Version 2017.2. Disponível em: <http://www.brenda-enzymes.org/all_enzymes.php>. Acesso em: 10 jun. 2017.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934 p.

URBANO, G.; LOPEZ-JURADO, M.; ARANDA, P.; VIDAL-VALVERDE, C.; TENORIO, E.; PORRES, J. The role of phytic acid in legumes: antinutrient or beneficial function? **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 56, n. 3, p. 283-294, 2000.

USTOK, F. I.; TARI, C.; GOGUS, N. Solid-state production of polygalacturonase by *Aspergillus sojae* ATCC 20235. **Journal of Biotechnology**, v. 127, n. 2, p. 322-334, 2007.

VATS, P.; BANERJEE, U. C. Production studies and catalytic properties of phytases an overview. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 3-14, 2004.

VIEIRA, P. A.; FARIA, S.; VIEIRA, R. B.; FRANÇA, F. P. de; CARDOSO, V. L. Statistical analysis and optimization of nitrogen, phosphorus, and inoculum concentrations for the biodegradation of petroleum hydrocarbons by response surface methodology. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 3, p. 427-438, 2009.

VOGEL, H. J. Distribution of lysine pathways among fungi evolutionary implications. **American Naturalist**, v. 98, n. 903, p. 435-446, 1964.

WANG, Y. P.; HOULTON, B. Z.; FIELD, C. B. A model of biogeochemical cycles of carbon, nitrogen, and phosphorus including symbiotic nitrogen fixation and phosphatase production. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 21, n. 1, p. 1-15, 2007.

WHITELAW, M. A. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. **Advances in Agronomy**, v. 69, p. 99-151, 2000.

WISEMAN, A. (Ed.) **Handbook of enzyme biotechnology**. Chichester: John Wiley & Sons, 1977. 276 p.

WISS, M.; PASAMONTES, L.; FRIEDLEIN, A.; RÉMY, R.; TESSIER, M.; KRONENBERGER, A.; MIDDENDORF, A.; LEHMANN, M.; SCHNOEBELEN, L.; ROTHLSBERGER, U.; KUSZNIR, E.; WAHL, G.; MULLER, F.; LAHM, H. W.; VOGEL, K.; LOON, A. P. G. M. Biophysical characterization of fungal phytases: molecular size, glycosylation pattern, and engineering of proteolytic resistance. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 359-366, 1999.

WOODLEY, J. M. New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 6, p. 321-327, 2008.

WYSS, M.; PASAMONTES, L.; RÉMY, R.; KOHLER, J.; KUSZNIR, E.; GADIENT, M.; MÜLLER, F.; VAN LOON, A. P. G. M. Comparison of the thermostability properties of three acid phosphatases from molds: *Aspergillus fumigatus* phytase, *A. niger* phytase, and *A. niger* pH 2.5 acid phosphatase. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 11, p. 4446-4451, 1998.

WYSS, M.; BRUGGER, R.; KRONENBERGER, A.; RE, R.; FIMBEL, R.; OESTERHELT, G.; LEHMANN, M. Biochemical characterization of fungal phytases (myo-Inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): catalytic properties. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 367-373, 1999.

YADAV, R. S.; TARAFDAR, J. C. Phytase and phosphatase producing fungi in arid and semi-arid soils and their efficiency in hydrolyzing different organic P compounds. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, n. 6, p. 745-751, 2003.

YANKE, L. J.; SELINGER, L. B.; CHENG, K. J. Phytase activity of *Selenomonas ruminantium*: A preliminary characterization. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, n. 1, p. 20-25, 1999.

YEDGAR, S.; COHEN, Y.; SHOSEYOV, D. Control of phospholipase A2 activities for the treatment of inflammatory conditions. **Biochimica et Biophysica Acta: Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1761, n. 11, p. 1373-1382, 2006.

YEUNG, S. L.; CHENG, C.; LUI, T. K.; TSANG, J. S.; CHAN, W. T.; LIM, B. L. Purple acid phosphatase-like sequences in prokaryotic genomes and the characterization of an atypical purple alkaline phosphatase from *Burkholderia cenocepacia* J2315. **Gene**, v. 440, n. 1, p. 1-8, 2009.