

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Produção de fitase por *Rhizopus microsporus* var.
microsporus: Purificação, Caracterização Bioquímica e
Aplicação**

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães

Vanessa Sayuri Sato

**ARARAQUARA/SP
2015**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

VANESSA SAYURI SATO

**Produção de fitase por *Rhizopus microsporus* var.
microsporus: Purificação, Caracterização Bioquímica e
Aplicação**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, do Instituto de Química, UNESP, Araraquara, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Souza
Guimarães

**ARARAQUARA/SP
2015**

FICHA CATALOGRÁFICA

S158p	Sato, Vanessa Sayuri Produção de fitase por <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>microsporus</i>: purificação, caracterização bioquímica e aplicação / Vanessa Sayuri Sato. – Araraquara : [s.n], 2015 122 f. : il. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Luis Henrique Souza Guimarães 1. Biotecnologia. 2. Enzimas. 3. Fungos filamentosos. 4. Fermentação. 5. Enzimas – aplicações industriais. I. Título.
-------	--

Elaboração: Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

DADOS CURRICULARES

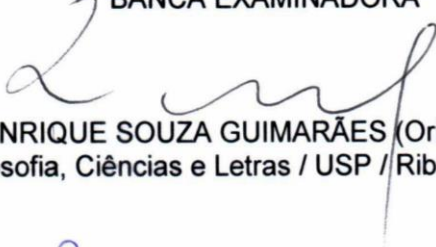
Vanessa Sayuri Sato graduou-se em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul Campo Grande/MS no ano de 2008. Mestre em Microbiologia Agropecuária pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Jaboticabal/SP (2011). Atualmente é membro do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” no curso de Doutorado, desenvolveu a sua tese intitulada “Produção de fitases por *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*: Purificação, Caracterização Bioquímica e Aplicação” no Laboratório de Biologia Celular e Microbiologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP/SP, sob orientação do Professor Dr. Luis Henrique Souza Guimarães. Tem experiência na área de Microbiologia com ênfase em bioquímica e fisiologia de micro-organismos, destacando-se as enzimas fosfatases e fitases.

VANESSA SAYURI SATO

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

Araraquara, 27 de fevereiro de 2015.

BANCA EXAMINADORA



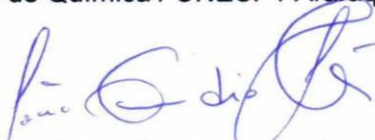
Prof. Dr. LUIS HENRIQUE SOUZA GUIMARÃES (Orientador)
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras / USP / Ribeirão Preto.



Prof.ª Dr.ª DANIELA ALONSO BOCCHINI MARTINS
Instituto de Química / UNESP / Araraquara



Prof. Dr. JOSÉ ROBERTO ERNANDES
Instituto de Química / UNESP / Araraquara



Prof. Dr. JOÃO CLÁUDIO THOMÉO
Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas / UNESP / São José Rio Preto.



Prof.ª Dr.ª PATRICIA GOMES CARDOSO
Universidade Federal de Lavras / UFLA / Lavras.

“Não existem sonhos impossíveis para aqueles que realmente acreditam que o poder realizador reside no interior de cada ser humano, sempre que alguém descobre esse poder algo antes considerado impossível se torna realidade.”

Albert Einstein

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

Leonardo da Vinci

Dedico este trabalho aos meus pais,
Takashi e Tereza, pelo apoio,
compreensão, carinho,
em todos os meus passos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter proporcionado esta oportunidade, pela força nos momentos difíceis que me permitiram chegar até aqui.

Ao meu orientador, Professor Dr. Luis Henrique Souza Guimarães, pelos conhecimentos adquiridos, pela oportunidade, confiança depositada e por aceitar minhas idéias e incentiva-las. Muito obrigada!

Ao Professor Wanderley Pereira Oliveira, a Claudia Regina Fernandes Souza, a Professora Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro e a Professora Nilva Kazue Sakomura que abriram as portas de seus laboratórios e me receberam de forma amável para a realização de parte deste trabalho.

Ao Professor João Martins Pizauro Junior por sempre estar me ajudando; por acreditar em mim, pelo exemplo de dedicação e competência profissional.

Ao Professor João Atílio Jorge, por estar sempre disposto a nos ajudar e pelos conselhos científicos.

Aos técnicos Ricardo, Maurício e Mariana, pelo auxílio na preparação do material, equipamentos, e também pela convivência e amizade.

Agradeço imensamente à técnica e amiga Fátima Harnich, pela amizade, carinho, ensinamentos; além da ajuda na execução dos experimentos de aplicação em frangos.

À querida amiga Ciça pelos bons momentos sempre de determinação e amizade.

Aos amigos de laboratório: Thaís, Larissa, Gabi, José Carlos, André Lucca, Cynthia, Heloísa, Josana e Paulo pelo companheirismo, amizade e dedicação, e tantos outros que estagiaram por lá.

Aos amigos que me ajudaram no desenvolvimento dos experimentos com frango: Larissa, José Carlos, Josana, Clarissa, Cynthia, Diego, Paulo, Ciça, Fá, Ketherson e Elaine. Em especial aos meninos Gabriel, Matheus Pim, Marcel, Bicudo, Bruno, Leandro e meu irmão Rafael pela disposição e força nas manhãs para bater ração. Agradeço muito, só foi possível realizar esse experimento com a ajuda de vocês!

Agradeço aos meus irmãos Rafael e Leonardo, pela força, sustentação e carinho nos momentos bons e difíceis dessa e tantas outras etapas da minha vida.

Ao Leandro, pelo carinho, respeito e paciência por estar sempre ao meu lado me apoiando e incentivando.

Aos amigos Elaine, Guilherme, Márcia, Gabriela, Bicudo, Daniel, Polyane pelos bons momentos compartilhados.

Aos funcionários da USP e Unesp que contribuíram com esse trabalho, em especial aos funcionários da seção de Pós-graduação em Biotecnologia pela paciência, esclarecimentos e auxílio nas tarefas de atendimento às normas regulamentares do programa.

A CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

À todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1.FITASES	3
1.1.1 Fitato.....	5
1.1.2 Classificação.....	6
1.2 FUNGOS.....	11
1.3 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA.....	13
1.4 A TECNOLOGIA DE SPRAY DRYER.....	14
1.5 APLICAÇÃO DAS FITASES	15
2.OBJETIVOS	20
2.1 GERAL.....	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 SELEÇÃO DA LINHAGEM PRODUTORA DE FITASE	25
3.2 MANUTENÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS	25
3.3 PRODUÇÃO DE FITASES EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA (FSbm).....	25
3.4 PRODUÇÃO DE FITASES PELA LINHAGEM SELECIONADA <i>Rhizopus</i> <i>microsporus</i> var. <i>microsporus</i> EM FERMENTAÇÃO POR BIOFILMES (FB).....	26
3.4.1 Influência da agitação na formação do biofilme de <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	26
3.4.2 Uso de diferentes suportes de adesão para obtenção do biofilmes de <i>R.</i> <i>microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	27
3.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS BIOFILMES DE <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	27
3.6 OBTENÇÃO DA ENZIMA EXTRACELULAR EM FSbm e FB.....	28
3.7 MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA PELA FB	28
3.7.1 Influência de diferentes meios de cultivo na produção enzimática em FB.....	28
3.7.2 Influência do KH ₂ PO ₄ e do fitato na produção de fitases por biofilmes.....	31
3.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	31
3.8.1 Atividade <i>p</i> -nitrofenilfosfatásica	31
3.8.2 Atividade fitásica	32

3.9 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA	32
3.10 PURIFICAÇÃO DA FITASE PRODUZIDA POR BIOFILMES de <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	32
3.11. ELETROFORESE	33
3.12 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA.....	33
3.12.1 Determinação da temperatura e pH ótimos de reação, estabilidade térmica ao pH	33
3.12.2 Efeitos de vários compostos sobre a atividade da fitase	34
3.12.3 Determinações dos parâmetros cinéticos	34
3.13 PRODUÇÃO DE FITASES POR BIOFILMES DE <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i> EM BIORREATOR	34
3.14 SECAGEM DA FITASE PRODUZIDA POR BIOFILMES DE <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i> EM SPRAY DRYER.....	35
3.14.1 Caracterização bioquímica dos extratos secos por <i>Spray Dryer</i>	37
3.15 APLICAÇÃO DA ENZIMA SECA POR SPRAY DRYER NA COMPOSIÇÃO DE RAÇÕES PARA FRANGOS DE CORTE	38
3.15.1 Instalações e equipamentos	38
3.15.2 Aves experimentais.....	38
3.15.3 Rações experimentais	38
3.15.4 Delineamento experimental	40
3.15.5 Características avaliadas	40
3.16 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
Parte I.....	44
4.1. SCREENING E PRODUÇÃO DE FITASES EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA (FSbm).....	45
4.2 ESTUDO MORFOLÓGICO DOS BIOFILMES DE <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	50
4.3 INFLUÊNCIA DA AGITAÇÃO NA PRODUÇÃO DO BIOFILME DE <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	52
4.4 USO DE DIFERENTES SUPORTES DE ADESÃO PARA A OBTENÇÃO DOS BIOFILMES DE <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	53
4.5 PRODUÇÃO DE FITASE POR BIOFILMES DE <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	55
4.5.1 Efeito da adição de diferentes concentrações de fosfato ao meio de cultivo	59
4.5.2 Produção da fitase em diferentes meios de cultivo com 0,5 mM de KH_2PO_4	61

4.5.3 Efeito da adição de diferentes concentrações de fitato de sódio ao meio de cultivo.....	62
4.6 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA FITASE EXTRACELULAR PRODUZIDA POR BIOFILMES DE R. microsporus var. microsporus.....	64
4.7 PRODUÇÃO DE FITASES POR BIOFILMES DE R. microsporus var. microsporus EM BIORREATORES.....	66
Parte II.....	70
4.8 PURIFICAÇÃO DA FITASE PRODUZIDA POR BIOFILMES DE R. microsporus var. microsporus.....	71
4.9 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA FITASE DE R. microsporus var. microsporus PURIFICADA.....	74
4.9.1 Influência da temperatura e do pH sobre a atividade fitásica	74
4.9.2 Parâmetros cinéticos e efeito de diferentes sais e outros compostos sobre a atividade fitásica	77
Parte III.....	81
4.10 SECAGEM DA AMOSTRA ENZIMÁTICA OBTIDA POR SPRAY DRYER	82
4.11 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO EXTRATO BRUTO SECO CONTENDO FITASE EXTRACELULAR PRODUZIDA POR BIOFILMES DE R. microsporus var. microsporus	88
Parte IV	93
4.12 APLICAÇÃO DA FITASE PRODUZIDA POR BIOFILMES R. microsporus var. microsporus E SECA EM POR SPRAY DRYER.....	94
5.CONCLUSÕES	98
6.REFERÊNCIAS.....	100
ANEXO.....	121

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do ácido fítico. Representação do complexo formado com cálcio, proteínas e aminoácidos_____	5
Figura 2. Reação de hidrólise do fitato pela enzima fitase. (Fonte Enviropig™, 2011 modificado) _____	7
Figura 3. Classificação das fitases _____	8
Figura 4. Modelos moleculares para uma histidino fosfatase ácida (1HP, phyA) (A), uma fitase β hélice (1H6L Ts-Phy) (B), uma cisteína fitase (1U26, SrPhy) (C)_____	10
Figura 5. pH dos diferentes segmentos do trato digestivo de frango de corte alimentado durante 6 semanas _____	17
Figura 6. Desenho experimental e representativo das proposta e objetivos realizados nesse trabalho _____	24
Figura 7. Biorreator modelo TECBIO-4,5 utilizado para fermentação submersa (FSbm) e fermentação por biofilmes (FB) no Laboratório de Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Unesp Araraquara _____	35
Figura 8. Produção de fitase extracelular por <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i> em FSbm em função do tempo de cultivo _____	48
Figura 9. Determinação do pH ótimo aparente (A) e temperatura ótima aparente (B) para fitase extracelular produzida por <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i> em meio Khanna contendo como fonte de carbono farinha de centeio 2% _____	49
Figura 10. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do biofilme de <i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>microsporus</i> . Esporos aderidos ao suporte de polietileno (A,B); Estrutura do biofilme (48 h) (C,D) _____	52
Figura 11. Biofilmes de <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i> em diferentes suportes: (A) tela de polietileno, (B) viscose, (C) EVA, (D) nylon, (E) TNT, (F) poliéster e (G) espuma _____	54
Figura 12. Biofilme de <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i> obtido em meio Khanna utilizando como fonte de carbono farinha de centeio 2% mantido sob agitação (50 rpm), por 48 h _____	56

Figura 13. Produção de fitase extracelular por biofilmes de <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i> em função do tempo de cultivo em meio contendo bagaço de cana como fonte de carbono	59
Figura 14. Produção de fitase por biofilmes de <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i> em diferentes concentrações de fosfato adicionadas ao meio	60
Figura 15. Produção de fitase por biofilmes de <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i> em diferentes concentrações de fitato de sódio adicionadas ao meio NBRIP e Khanna modificado	63
Figura 16. Determinação do pH ótimo aparente (A) e temperatura ótima aparente (B) Estabilidade ao pH (C) durante 30 min (■) e 60 min (●), e estabilidade térmica (D) em (■) 30 °C, (●) 37 °C, (▲) 50 °C, (◄) 60 °C para fitase extracelular produzida por biofilmes de <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i> .	66
Figura 17. Produção de fitase extracelular por <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i> em biorreator (FSbm) em função do tempo de cultivo	67
Figura 18. Biofilme de <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i> em biorreator utilizando viscose como suporte de adesão	68
Figura 19. Produção de fitase por biofilmes de <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i> em biorreator em função do tempo de cultivo	68
Figura 20. Perfis cromatográficos em colunas DEAE-celulose (A) e CM-celulose (B) para a fitase produzida por <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i> em FB utilizando bagaço de cana de açúcar como fonte de carbono. Símbolos: (■) Absorbância 280 nm, (●) Atividade <i>p</i> -nitrofenilfosfatásica (U/mL)	72
Figura 21. Perfis eletroforéticos em SDS-PAGE 12% (A) e PAGE 6% (B) para a fitase produzida por biofilmes de <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i> corados com Comassie Brilliant-Blue R250	73
Figura 22. Determinação do pH ótimo aparente (A) e temperatura ótima aparente (B) Estabilidade ao pH (C) durante 30 min (■) e 60 min (●), e estabilidade térmica (D) em (■) 30 °C, (●) 40 °C, (▲) 50 °C, (◄) 60 °C para fitase parcialmente purificada produzida por biofilmes de <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	76
Figura 23. Efeito da concentração de substrato sobre a atividade fitásica produzida por biofilmes de <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i> . As condições padrão de ensaio foram tampão acetato de sódio 100 mM, 50 uL de enzima em pH 4,5, contendo concentrações crescentes de substrato de 0,01 mM até 4 mM	78

Figura 24. Pós contendo fitase após secagem por *spray dryer* utilizando diferentes adjuvantes: amido 2% (A), fubá 2% (B), farelo de soja 2% (C), e farelo de milho 2% (D)_____87

Figura 25. Influência do pH (A e C) e temperatura (B e D) sobre a atividade da fitase seca por *Spray Dryer* na presença de farelo de soja (A e B) e fubá (C e D) como adjuvantes_____89

Figura 26. Estabilidade ao pH (A e C) durante 30 min (■) e 60 min (●), e estabilidade térmica (B e D) em (■) 30 ° C, (●) 37 ° C, (▲) 40 ° C, (▼) 50 ° C, e (◄) 60 ° C, e em (■) 37 ° C, (●) 40 ° C, (▲) 50 ° C, (▼) 60 ° C, e (◄) 70 ° C da fitase seca por pulverização na presença de farelo de soja (A e B) e fubá (C e D), respectivamente_____91

Figura 27. Variação da temperatura do ar (A) e umidade relativa do ar (B) no galpão para manutenção dos frangos de corte durante_____97

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Histórico da comercialização das fitases	4
Tabela 2. Fungos produtores de fitases	11
Tabela 3. Composições utilizadas para secagem do extrato bruto obtido de FB em <i>Spray Dryer</i>	36
Tabela 4. Ingredientes e composição nutricional das dietas experimentais	39
Tabela 5. Produção de fosfatases alcalina e ácida em FSbm por diferentes linhagens de fungos filamentosos	46
Tabela 6. Determinação da atividade fitásica no extrato enzimático obtido pelo cultivo das 10 linhagens de fungos filamentosos, previamente selecionados e crescidas em FSbm	47
Tabela 7. Influência da agitação na obtenção de biofilmes de <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	53
Tabela 8. Produção de fitase por biofilmes de <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i> em diferentes suportes de adesão	55
Tabela 9. Fontes de carbono utilizadas para produção de fitase por biofilmes do fungo <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	57
Tabela 10. Produção de fitases por biofilmes de <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i> em diferentes meios de cultivo	62
Tabela 11. Purificação da fitase produzida por biofilmes de <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	73
Tabela 12. Efeito de diferentes compostos sobre a atividade fitásica de <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i> produzida em FB	79
Tabela 13. Efeitos do tipo e concentração dos adjuvantes de secagem no rendimento do processo	83
Tabela 14. Propriedades físicas dos pós contendo fitase na presença de diferentes adjuvantes	86
Tabela 15. Propriedades bioquímicas da fitase produzida por <i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	92

Tabela 16. Efeito da adição da fitase produzida por biofilme de *R. microsporus* var. *microsporus* sobre o desempenho de frangos de corte machos no período de 21 dias de idade_____94

Tabela 17. Efeito da adição da fitase produzida por biofilme de *R. microsporus* var. *microsporus* sobre o desempenho de frangos de corte machos no período de 42 dias de idade_____95

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs - absorbância
BDA - batata dextrose ágar
DEAE - Diethylaminoethyl
EC - Enzyme Commission
EDTA - ácido etilenodiaminotetracético
FB - Fermentação por Biofilmes
FSbm - Fermentação Submersa
FSS - Fermentação em Substrato Sólido
g - grama
g - aceleração da gravidade
GP - ganho de peso
kDa - mil Daltons
 K_m - constante de Michaelis-Menten
mL - mililitro
min - minutos
mM - milimolar
nm - nanômetros
m/v - massa por volume
PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida
pH - potencial hidrogênioônico
rpm - rotações por minuto
SDS - duodecil sulfato de sódio
 T_{50} - tempo de meia vida
V -volts
 $V_{m\acute{a}x}$ - velocidade máxima
U - unidade de atividade

RESUMO

A investigação biotecnológica acompanhada da aplicação das enzimas, combinada com o uso da engenharia genética tem sido realizada em micro-organismos para a produção de enzimas para fins industriais. Entre estas enzimas, as fitases microbianas, que catalisam a hidrólise do fitato (mio-inositol hexaquisfosfato) a mio-inositol e fosfato inorgânico, têm sido amplamente utilizadas na alimentação animal. Neste contexto, o fungo *R. microsporus* var. *microsporus* foi selecionado como bom produtor de fitases, com maiores níveis de produção encontrados na Fermentação por Biofilmes (FB) (261,30 U/mg), utilizando bagaço de cana de açúcar como fonte de carbono adicional. A morfologia do biofilme sobre suporte inerte foi analisada por MEV observando-se múltiplas hifas interligadas formando um conjunto ordenado na presença de inúmeros canais que permitem a troca eficiente de nutrientes e oxigenação. A fitase extracelular obtida foi purificada 4,18 vezes com recuperação de 4,78%, obtendo-se uma única banda de 34 kDa em SDS PAGE 12%. A temperatura ótima de atividade para a enzima purificada foi de 55°C e o pH ótimo 4,5, sendo estável entre 30 °C e 40 °C por 120 min. Apresentou baixa estabilidade ao pH com atividade residual acima de 50% entre pH 3,0 e 5,0 por 60 min. A fitase foi ativada por íons Ca^{2+} e inibida por K^+ . A enzima foi capaz de hidrolisar fitato de sódio (K_m de 0,72 mM e $V_{\max}$ de 94,55 U/mg). O extrato bruto contendo fitase foi seco em *Spray Dryer* com diferentes adjuvantes (farelo de milho, farelo de soja, fubá, amido e maltodextrina). O farelo de soja possibilitou a maior recuperação da atividade fitásica (60%), assim como o fubá (59,5%). Considerando o uso destes dois adjuvantes, o pH ótimo de atividade para a fitase contida no extrato seco foi 4,5 e 8,5, respectivamente e a temperatura ótima de atividade de 45-50 °C. Quando utilizado fubá, a estabilidade foi mantida acima de 90% nos pH 2,5-10,0 durante 60 min. A fitase seca em *Spray Dryer* utilizando fubá como adjuvante foi adicionada a ração para frangos de corte levando a um bom desempenho para frangos com 42 dias de idade, especialmente com adição de 750 FTU/kg quando comparado a dieta basal que atende as necessidades nutricionais para frangos de corte. Em conclusão, a fitase de *R. microsporus* var. *microsporus* foi seca com sucesso utilizando *Spray Dryer* apresentando importantes propriedades e bom potencial biotecnológico na aplicação em rações para frangos de corte sendo promissoras para o emprego industrial, além de serem produzidas utilizando fontes de nutrientes de baixo custo.

ABSTRACT

Biotechnological research, and the application of enzymes in combination with the use of genetic engineering has been carried out in microorganisms for the production of enzymes for industrial purposes. Among these enzymes, microbial phytases, which catalyze the hydrolysis of phytate (myo-inositol hexakisphosphate) to myo-inositol and inorganic phosphate, have been widely used in animal feed. In this context, the fungus *R. microsporus* var. *microsporus* was selected as a good producer of the phytase with higher production levels when grown on Biofilm Fermentation (FB) (261,30 U/mg), using sugarcane bagasse as carbon additional source. The morphology of biofilms on inert support was examined by SEM observing interconnected hyphae forming an ordered array in the presence of many channels which enables efficient exchange of nutrients and oxygen. The extracellular phytase was purified 4.18 fold with 4.78% recovery. A single protein band was obtained in 6% PAGE and confirmed by 12% SDS-PAGE as a single protein band with 34 kDa. The optimum temperature for activity was 55 °C and the optimum pH 4.5. It was completely stable at temperatures between 30 °C and 40 °C for 120 min had low pH with a residual activity of over 50% between pH 3.0 and 5.0 for 60 min. The enzyme was activated by Ca^{2+} and inhibited by Zn^{2+} . The enzyme was able to hydrolyze sodium phytate with a $K_m=0.72$ mM, $V_{\max}= 94.55$ U/mg of protein. The crude extract containing phytase was dried using Spray Dryer with different adjuvants. Soybean meal and corn meal allowed the best recovery of phytase activity 60% and 59.5%, respectively. Considering the use of these two adjuvants, the optimum pH of activity for phytase in the dry extract was 4.5 and 8.5, respectively, and the optimum of temperature of 45-50 °C. When used corn meal, the stability was maintained above 90% at pH 2.5-10.0 for 60 min. The dry phytase (corn meal) was applied to the feed of broilers with good performance for animals of 42 days old especially using 750 FTU/kg, compared with basal diet that meets the nutritional requirements for broilers. In conclusion, the phytase *R. microsporus* var. *microsporus* successfully dried using Spray Dryer with improved property, and showed good potential biotechnological application in broilers diets being promising for industrial employment, and are produced using sources of inexpensive nutrients.

1. INTRODUÇÃO

Estudos funcionais, estruturais e de aplicação de enzimas, aliados ao emprego de técnicas de Engenharia Genética, tem gerado maior interesse na utilização de micro-organismos para a produção de enzimas com fins industriais (Said e Pietro, 2004). O mercado mundial de enzimas movimentou cerca de US\$ 2,3 bilhões em 2007, US\$ 2,7 bilhões em 2012 e US\$ 2,7 bilhões em 2014 (Santos, 2012).

Entre a grande diversidade de enzimas existentes, obtidas a partir de micro-organismos como, por exemplo, celulasas (Bayer *et al.*, 1998), pectinases (Polizeli *et al.*, 1991) e invertases (Montiel-Gonzalez *et al.*, 2002), as fosfatases e as fitases obtidas de fungos filamentosos podem ser destacadas, as quais estão envolvidas em vários processos metabólicos e aplicações biotecnológicas. As novas aplicações têm ajudado a impulsionar a procura por enzimas, sendo que grande parte desta contribuição é dada pelo aumento da utilização de fitases em combate a poluição por fosfato (Khan *et al.*, 2013).

A fitase tem sido amplamente utilizada na alimentação animal (Pandey *et al.*, 2001). Estudos e caracterização cinética da fitase de diferentes origens mostraram que a enzima microbiana é cerca de 100.000 vezes mais eficiente se comparada às demais fontes (Wyss *et al.*, 1999). Na maioria dos animais monogástricos, inclusive em humanos, a fitase está ausente no trato digestório. Assim a hidrólise do ácido fítico advindo da dieta ocorre na mucosa do intestino, sendo um processo totalmente dependente das enzimas produzidas pela microbiota (Beterchini, 2006).

1.1.FITASES

As pesquisas com a enzima fitase se estendem por mais de 107 anos a partir de sua descoberta por Suzuki *et al.* (1907) até a sua comercialização na Europa nos anos de 1993-1994 por Gist-Brocades. e Nelson *et al.* (1968). Estes foram os primeiros a adicionar fitase produzida por uma cultura de *Aspergillus ficuum* a uma ração líquida à base de soja, em dietas de frango de corte, obtendo um aumento linear no ganho de peso e no conteúdo de cinzas nos ossos, concluindo que as aves conseguiram utilizar o fósforo do fitato tão bem como o fósforo inorgânico.

Apesar disso, somente no final da década de 80 a produção de fitase atingiu escala comercial, reduzindo seu custo e tornando viável sua utilização nas dietas para monogástricos (Conte *et al.*, 2002). Os principais marcos históricos desta enzima são apresentados na Tabela 1. A comercialização só foi possível quando métodos para produção da enzima com alto rendimento foram desenvolvidos. A história de comercialização das fitases foi desenvolvida a longo prazo sendo possível identificar os princípios que são necessários para o desenvolvimento comercial de produtos microbianos (Lei *et al.*, 2013).

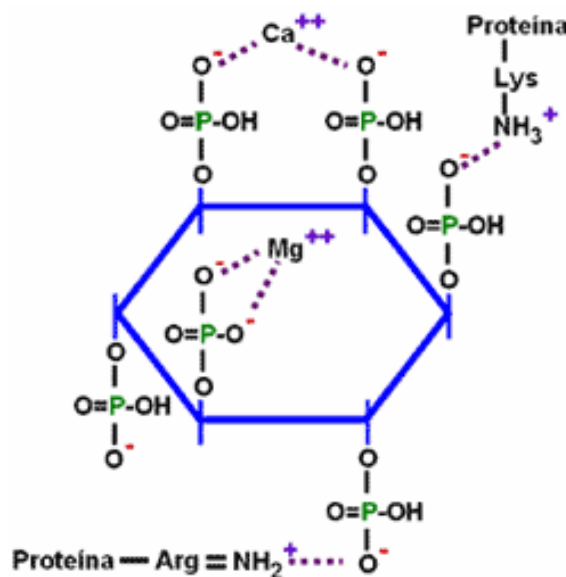
Tabela 1. Histórico da comercialização das fitases.

Histórico	Referências
Descrição do ácido fítico	Posternak, 1903
Descrição e extração da fitase de arroz	Suzuki <i>et al.</i> , 1907
Descoberta da fitase no gênero <i>Aspergillus</i>	Dox e Golden, 1911
Determinação da estrutura do ácido fítico	Plimmer e Anderson, 1913
Lista de 20 linhagens fúngicas produtoras de fitase.	Casida, 1959
Primeira tentativa de desenvolver uma fitase comercial	1962-1961
Patente de uma fitase ácida	Ware e Shieh, 1967
Uso direto da fitase produzida por <i>A. niger</i> NRRL 3135 para frangos de corte em rações	Shieh e Ware <i>et al.</i> , 1968
Purificação, caracterização e determinação da sequência parcial de <i>A. niger</i> NRRL 3135 phyA	Ullah e Gibson, 1988
Início do projeto de comercialização da fitase na Finlândia e Holanda	Alko Ltd Finlândia 1987
Demonstração da eficiência das fitases em suínos e frangos de corte	Simons <i>et al.</i> , 1990
Aplicação de uma patente pela superprodução de phyA por clonagem das cepas de <i>A. niger</i> NRRL 3135 e <i>A. niger</i> CBS 513.88	Van Gorcom <i>et al.</i> , 1991
Expressão de uma fitase fúngica phyA em tabaco	Pen <i>et al.</i> , 1993
Clonagem, sequenciamento e expressão de uma fofatase ácida/gene para fitase (AppA2) em <i>E.coli</i>	Rodriguez, Han e Lei., 1999
Atividade fitásica em isoldos de <i>A. fumigatus</i>	Mullaney <i>et al.</i> , 2000
Secreção de fitases β -propeller phytase de tabaco e <i>Arabidopsis</i>	Lung <i>et al.</i> , 2005
Eficácia de uma enzima comercial diferente e desenvolvimento de uma curva de liberação de fósforo disponível pela ação da fitase de <i>E. coli</i> em suínos	Jones <i>et al.</i> , 2010

1.1.1 Fitato

O fitato ou ácido fítico é a maior forma de estocagem de fósforo (P) na maioria das plantas, grãos de cereais e sementes oleaginosas (Pandey *et al.*, 2001). Este é constituído por seis grupamentos fosfato ligados a molécula de seis átomos de carbonos (Figura 1) e apresenta várias funções fisiológicas importantes para as plantas durante o seu ciclo de vida, incluindo o armazenamento de fósforo e cátions que fornecem a matéria-prima para a formação das paredes celulares, após a germinação da semente.

Figura 1. Estrutura do ácido fítico. Representação do complexo formado com cálcio, proteínas e aminoácidos.



Fonte: (Thompson *et al.*, 1988)

Nos alimentos, sob condições naturais, o ácido fítico encontra-se carregado negativamente, o que lhe confere alto potencial para complexar com moléculas carregadas positivamente como cátions (Zn⁺², Fe⁺², Fe⁺³, Mg⁺² e Ca⁺²) e proteínas (Ravindran *et al.*, 1999; Cowieson, Acamovic e Bedford, 2006). Entretanto, o ácido fítico pode formar complexos com proteínas em pH ácido ou alcalino, desde que, as proteínas estejam abaixo ou acima do pH isoeletrico (Leal *et al.*, 2010).

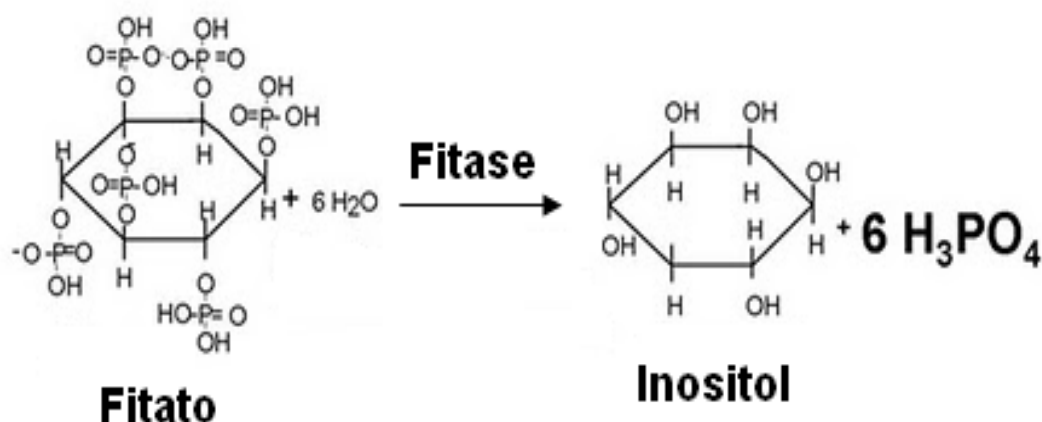
Sendo assim, a molécula de fitato é um fator antinutricional para animais monogástricos já que possui em sua molécula grupos ortofosfatos altamente ionizáveis o que impede a absorção de nutrientes por esses animais (Lei *et al.*, 1993). Tem sido ainda demonstrado que o fitato pode afetar a digestibilidade do amido interagindo com a amilase, o que influenciaria negativamente na digestão de nutrientes diminuindo a energia metabolizável da ração animal (Thompson e Yoon, 1984).

Dentre as formas de aumentar o aproveitamento do ácido fítico está o uso da enzima fitase que permite melhor aproveitamento da dieta oferecida por animais monogástricos, aumentando a biodisponibilidade do fósforo (P) pela hidrólise do ácido fítico, o que diminui a necessidade de suplementação com fontes inorgânicas de P. Dessa forma, facilita o atendimento à demanda nutricional dos frangos, bem como reduz de 20 a 50% o P excretado, minimizando o impacto ambiental causado pela atividade agropecuária (Dari, 2004).

1.1.2 Classificação

Fitase (mio-inositol-hexaquisfosfato fosfohidrolase, EC 3.1.3.8) é uma enzima que catalisa a liberação do fosfato do fitato (mio-inositol hexaquisfosfato) (Figura 2) formando sequencialmente, mio-inositol pentaquis-, tetraquis-, tris-, bis-, e monofosfatos, assim como fosfato inorgânico (Vats e Banerjee, 2004).

Figura 2. Reação de hidrólise do fitato pela enzima fitase.

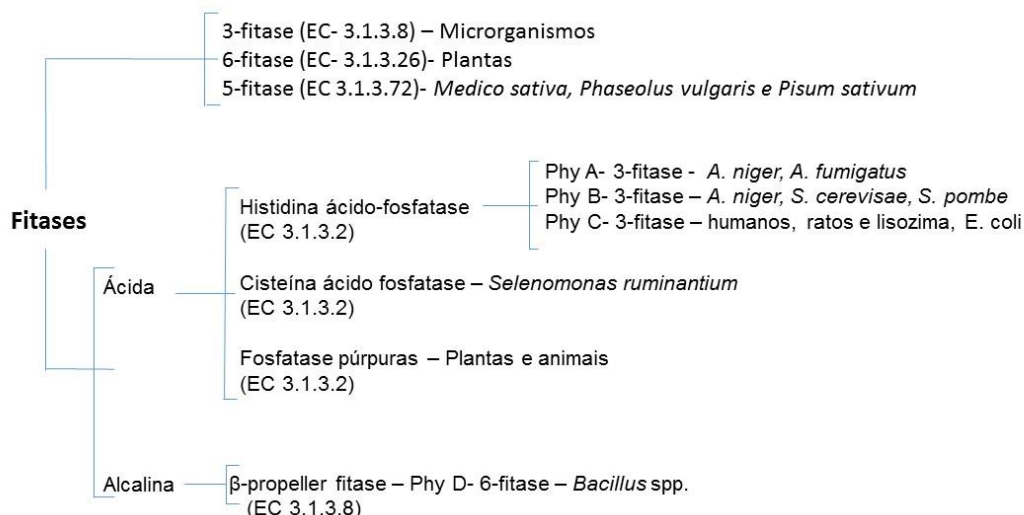


Fonte: (Modificado de Enviropig™, 2011)

As fitases constituem um grupo diversificado de enzimas que possuem diferentes tamanhos, estruturas e mecanismos catalíticos. Atualmente, a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), em consulta com a IUPAC-IUB, Comissão Mista em Nomenclatura Bioquímica (JCBN) classifica as fitases de acordo com a forma que iniciam a desfosforilação do ácido fítico em diferentes posições no anel de inositol (Figura 3). Listam três classes:

- a) 3-fitase (EC 3.1.3.8): mio-inositol hexaquis fosfato-3-fosfohidrolase hidrolisa a ligação éster na terceira posição de mio-inositolhexaquisfosfato em mio-inositol-1,2,4,5,6-pentaquisfosfato e ortofosfato.
- b) 5-fitase (EC 3.1.3.72): mio-inositol hexaquis fosfato-5-fosfohidrolase, hidrolisa a ligação éster na quinta posição do mio-inositolhexaquisfosfato em mio-inositol-1,2,3,4,6-pentaquisfosfato e ortofosfato.
- c) 6-fitase (EC 3.1.3.26): mio-inositol hexaquis fosfato-6-fosfohidrolase, hidrolisa a ligação éster na sexta posição do mio-inositolhexaquisfosfato em dmio-inositol-1,2,3,4,5-pentaquisfosfato e ortofosfato.

Figura 3. Classificação das fitases.



Fonte: (Bhavsar, Kumar e Khire, 2011)

Com base em diferenças estruturais e no mecanismo catalítico, as fitases ainda podem ser classificadas como fitases ácido histidina (HAP), sendo o grupo mais extensivamente estudado. Os outros três grupos de fitases são classificadas como β -propeller fitase (BPP), fitases fosfatases ácido púrpuras (PAP) e fitases cisteína (Vats e Banerjee, 2004) (Figura 3).

As HAP são as fitases mais amplamente estudadas e utilizadas, podendo ser encontradas em animais, plantas e micro-organismos (Wodzinski e Ullah, 1996). Os representantes dessa classe possuem um sítio ativo com um domínio proteico comum a todas as HAPs (Ullah e Dischinger, 1992). As fitases fúngicas (HAP) mais estudadas são de *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus*. Estudos revelaram que existem duas classes de HAPs, sendo que a primeira possui ampla especificidade de substratos, mas uma atividade específica sobre o ácido fítico reduzida; a segunda classe tem baixa especificidade para substratos, e uma atividade específica elevada para o fitato (Wyss *et al.*, 1999).

As fitases β -propeller possuem funções catalíticas que tem sido atribuídas as proteínas que possuem a arquitetura molecular de β -hélice (Pons *et al.*, 2003). Um

desenho 3-D da molécula BPP mostra uma forma que se assemelha a uma hélice com seis lâminas (Ha *et al.*, 2000). Esta classe de fitases está presente no gênero *Bacillus* e não possui o motivo proteico como as HAPs, requerem Ca^{2+} tanto para a atividade como estabilidade térmica (Kim *et al.*, 1998). As fitases β -hélice compartilham uma faixa de pH ideal com algumas fitases vegetais alcalinas.

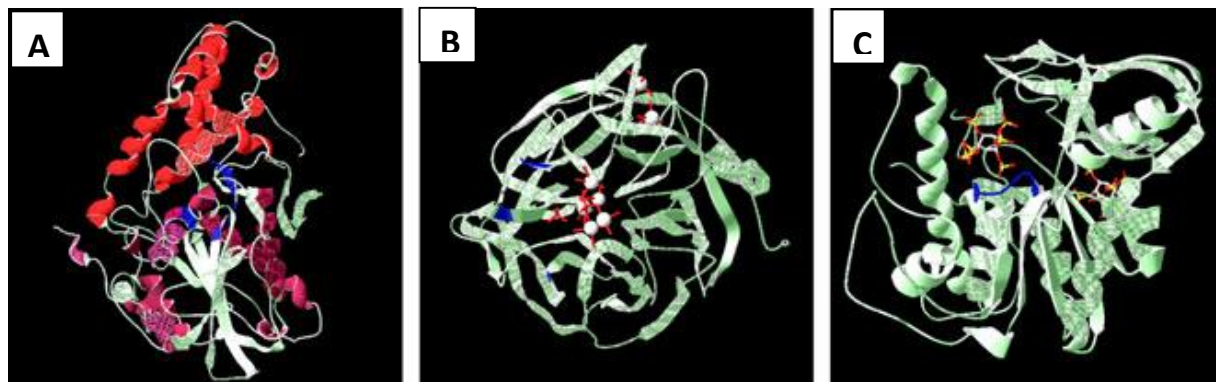
As fosfatases ácido púrpuras (PAP) foram inicialmente isoladas de cotilédones de soja em germinação (*Glycine max* L. Merr.) A fitase GmPhy aparentemente contém o mecanismo catalítico associado a grande classe de metaloenzimas (Hegeman e Grabau, 2001). Em comparação com as fitases fúngicas, estas possuem uma atividade específica relativamente baixa para o ácido fítico (Ullah e Cummins, 1988b). O modelo tridimensional da fitase GmPhy não está disponível, mas sim o modelo PAP de feijão. Tanto as fitases GmPhy como a PAP de feijão compartilham o mesmo motivo e mecanismo catalítico (Mullaney e Ullah, 2003).

Por similaridade as fitases ainda podem ser agrupadas em ácidas e alcalinas, dependendo do seu pH ótimo de atividade. Porém, todas as fitases possuem estereoespecificidade e alta preferência pelos grupos fosfato (Lei e Porres, 2003).

Análises estruturais das fitases tem revelado uma série de dobras diferentes para estas enzimas. A estrutura cristalina da fitase de *Aspergillus ficuum* em resolução 2-5 Å revelou três domínios distintos, incluindo um grande domínio α -helicoidal, um domínio β -folha, e um domínio α -helicoidal pequeno (Yao *et al.*, 2012). A análise da estrutura cristalina da fitase de *Escherichia coli* também mostrou dois domínios, um contendo cinco α -hélices e duas folhas β , e a outro incluindo seis α -hélices e nove β -folhas (Lim *et al.*, 2000) Fig. 4A.

As fitases β -proppeler foram isoladas e seus genes clonados a partir do *Bacillus subtilis* (Phyc) (Oh *et al.*, 2001) e *Bacillus amyloliquefaciens* (TS-PHY) (Kim *et al.*, 1998). Análises na base de dados revelaram que não existe qualquer outro tipo de fosfatase conhecida com este tipo de estrutura. A dependência Ca^{2+} está ligada a termo estabilidade e a atividade catalítica que faz com que a phyc se diferencie ainda de outras subclasses de fitases. Os íons cálcio facilitam a ligação ao substrato, criando uma força eletrostática favorável ao ambiente (Kerovuo *et al.*, 1998) Fig. 4B.

Figura 4. Modelos moleculares para uma histidino fosfatase ácida (1HP, phya) (A), uma fitase β hélice (1H6L Ts-Phy) (B), uma cisteína fitase (1U26, SrPhy) (C).



Fonte: National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Yao *et al.*, 2011)

A fosfatase de *Selenomonas ruminantium* (SrPhy) representa um outro grupo de fitases, de dupla especificidade que possui uma cisteína conservada (C241) em seu chamado loop P (Chu *et al.*, 2004). Foram observados dois arranjos de cristal diferentes do complexo de SrPhy com o inibidor de mio-inositol hexasulfato (Fig. 4C). Além disso, estudos de mutagênese indicaram que a fitase contendo cicuito P atrai e hidrolisa o substrato sequencialmente (fitato) através de um complicado mecanismo (Chu *et al.*, 2004). Segue abaixo na Tabela 2 alguns dos principais fungos produtores de fitases.

Tabela 2. Fungos produtores de fitases

Micro-organismos	Referência
<i>Penioffora lycii</i>	Lassen <i>et al.</i> , 2001
<i>Trametes pubescens</i>	Lassen <i>et al.</i> , 2001
<i>Ceriporia</i> sp.	Lassen <i>et al.</i> , 2001
<i>Rhizomucor pusilus</i>	Chadha <i>et al.</i> , 2004
<i>Cladosporium</i> sp. FP-1	Quan <i>et al.</i> , 2004
<i>Aspergillus ficuum</i>	Sariyska <i>et al.</i> , 2005
<i>Aspergillus niger</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2005
<i>Aspergillus niger</i> van Teighem	Vats e Banerjee, 2005
<i>Aspergillus oryzae</i>	Uchida <i>et al.</i> , 2006
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Wang <i>et al.</i> , 2007
<i>Penicillium oxalicum</i> PJ3	Lee <i>et al.</i> , 2007
<i>Aspergillus ficcum</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2010
<i>Rhizopus oryzae</i>	Rani e Ghosh, 2011
<i>Schizophyllum commune</i>	Xavier Salmon <i>et al.</i> , 2012
<i>Penicillium oxalicum</i> PJ3	Lee <i>et al.</i> , 2015

1.2 FUNGOS

Os micro-organismos, de forma geral, apresentam uma grande diversidade genética e desempenham funções únicas e essenciais na manutenção de ecossistemas como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos (Schimel, Balser e Wallenstein, 2007). Entre eles, podem ser destacados aqueles pertencentes ao Reino Fungi.

O Reino Fungi é formado por seres unicelulares ou multicelulares, microscópico e macroscópicos incapazes de realizar fotossíntese. Podem ocorrer em associação com outras espécies, como líquens ou micorrizas, e como patógenos de animais e plantas ou espécies de vida livre. Sua nutrição é realizada por meio da produção de enzimas que são lançadas aos substratos onde colonizam, possibilitando que os nutrientes sejam absorvidos através da parede e membrana celular (Blackwell, 2011;

Silva e Coelho, 2006; Blackwell, 2011). A reprodução assexuada ocorre pelo brotamento, fragmentação e produção de esporangiósporos ou conídios. A reprodução sexuada neste grupo envolve a produção de zigósporos, ascósporos, oosporos ou basidiósporos.

Até o momento, foram descritas cerca de 100 mil espécies de fungos, entretanto o número total de espécies estipulado é cerca de 1,5 milhões (Kirk et al., 2008). Isso mostra que o Reino Fungi é um dos reinos menos conhecidos do nosso planeta. Infelizmente, devido à ação predatória no meio ambiente várias espécies estão sendo extintas antes mesmo de serem conhecidas, causando prejuízo imensurável para o equilíbrio ecológico, além de não se obter conhecimento do potencial biotecnológico dessas espécies (Silva e Coelho, 2006).

Dentro do Reino Fungi são reconhecidos dois grupos distintos: fungos filamentosos e leveduriformes. Alguns dos fungos conhecidos têm um papel negativo no bem estar humano como agentes que causam doenças em plantas, biodeteriorização e como patógenos de animais, tanto na produção de micotoxinas como causadores de micose. Entretanto, muitos são reconhecidos principalmente pelo impacto positivo para os humanos como os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Saccharomyces*, considerados fungos microscópicos (Bennet, 1998). Entre as espécies macroscópicas os cogumelos comestíveis possuem atributos medicinais como antivirais, antibacterianos, antitumorais, antidiabéticos, entre outros (Philippoussis, 2009).

Os fungos filamentosos têm se destacado quanto à produção de enzimas de interesse industrial. Enzimas que possuam alta especificidade e que possam ser usadas em pequenas quantidades são extremamente interessantes sob o ponto de vista biotecnológico. Entre os filos de fungos conhecidos, Ascomycota e Basidiomycota, os que abrigam maior número de espécies, que produzem enzimas de interesse biotecnológico.

Os ascomicetos incluem fungos com hifas septadas e algumas leveduras podendo atuar como decompositores de matéria orgânica, reciclando elementos vitais através do uso de enzimas extracelulares, como celulasas (Bayer et al., 1998), pectinases (Polizeli et al., 1991) e invertases (Montiel-Gonzalez et al., 2002). Os basidiomicetos também apresentam hifas septadas, incluindo fungos que produzem

cogumelos. Os esporos sexuais conhecidos como basidiósporos são formados externamente em uma estrutura denominada basídio (Tortora, Funke e Case, 2012).

Representantes destes dois grupos têm se tornado alvos de investigação química biomonitorada visando à obtenção de metabólitos ativos, interessantes principalmente para indústria farmacêutica devido à presença de substâncias biologicamente ativas (Esposito e Azevedo, 2004).

A busca por novas fontes de fitases, especialmente as produzidas por fungos filamentosos, faz-se necessária para o melhor conhecimento de suas propriedades e possíveis aplicações industriais

1.3 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA

A produção de enzimas de interesse biotecnológico por micro-organismos tem sido realizada utilizando-se dois tipos de processos, a Fermentação Submersa (FSbm) e a Fermentação em Estado Sólido (FES). Apesar das enzimas industriais de origem microbiana serem produzidas, principalmente por FSbm, a FES representa um método tradicional e favorável em alguns países (Pandey *et al.*, 2005). A FES é cada vez mais considerada como uma alternativa da FSbm para a produção de enzimas para aplicações industriais e agro biotecnológicas, pois requer baixa tecnologia e maior economia de processo quando comparada a FSbm (Mahadik *et al.*, 2002).

Contudo, novas alternativas para a produção enzimática por micro-organismos têm sido buscadas como, por exemplo, a utilização de biofilmes, uma forma inovadora de cultivar fungos filamentosos (Villena e Gutierrez-Correa, 2007). Os biofilmes são sistemas biológicos desenvolvidos sobre matrizes poliméricas, de maneira que permitem uma alta organização estrutural destes organismos, importante para os processos de produção. Os biofilmes desempenham papel importante na natureza e em processos tecnológicos e podem se desenvolver em quaisquer superfícies bióticas ou inertes como espécies individuais ou como uma comunidade derivada de várias espécies (Donlan, 2001).

Os biofilmes utilizados em Biotecnologia Ambiental promovem ótimos resultados no tratamento de efluentes, removendo poluentes orgânicos e inorgânicos de águas contaminadas, assim como na produção de biopolímeros e enzimas, em processos fermentativos e na produção de antibióticos (Arcuri, 2000).

Embora o conceito de biofilme tenha sido desenvolvido para bactérias, fungos filamentosos são adaptados para crescer em superfícies, o que é evidenciado pelo seu modo de nutrição por absorção, e secreção de enzimas para digerir moléculas complexas e seu modo de crescimento apical, por hifas, assim também podem formar verdadeiros biofilmes. Foi com o trabalho desenvolvido na América do Sul com *Aspergillus niger* (Villena, Moreno e Correa, 2001; Villena e Gutierrez-Correa, 2006) e na Europa com *A. fumigatus* (Ramage *et al.*, 2009; Martinez e Fries, 2010) que esta proposta foi aceita pelos pesquisadores sendo sistemas altamente relevantes na área da saúde e da indústria (Wang, Meng e Zhang, 2009).

Na literatura, informações relativas à interferência de diferentes temperaturas sobre os biofilmes e também ao potencial de liberação de enzimas dessa estrutura, principalmente em fungos, são escassas.

Em biofilmes constata-se a presença de células aderidas com alta taxa metabólica (Ramage *et al.*, 2009), além de intensa produção enzimática (Sauer *et al.*, 2002). Estudos detalhados sobre modificações de perfil qualitativo e quantitativo em cada fase de desenvolvimento dos biofilmes, em amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, demonstraram que existem mudanças na regulação dessas proteínas (PAO1) em cada fase (Sauer *et al.*, 2002).

1.4 A TECNOLOGIA DE SPRAY DRYER

Após a produção enzimática, uma das principais prioridades na comercialização das enzimas é manter a estabilidade da molécula em solução aquosa, bem como o desenvolvimento de formulações que são estáveis durante o acondicionamento, transporte e armazenamento a longo prazo (Millqvist-Fureby, Malmsten e Bergenstahl, 1999).

A secagem por *Spray Dryer* é uma tecnologia considerada como uma boa alternativa para manter a estabilidade de enzimas. Neste processo, pequenas gotículas de líquido são rapidamente secas a medida que entram em contato com uma corrente de ar quente no interior de uma câmara de secagem. Dessa forma, embora as gotículas sejam submetidas a temperaturas elevadas, o tempo é muito curto conservando as características nutricionais e organolépticas do produto (Stahl *et al.*, 2002; Gava, 2009; Jayasundera *et al.*, 2011).

A alta eficiência de secagem e o custo reduzido em comparação com o a secagem por congelamento deve ser também considerada (Oomah e Mazza, 2001). Este método é amplamente utilizado na indústria de laticínios e farmacêuticos para a desidratação de várias substâncias, tais como leite, soro de leite, antibióticos e vitaminas (Millqvist-Fureby, Malmsten e Bergenstahl, 1999).

A adição de agentes de estabilização é um procedimento comum usado para proteger a proteína nativa submetida a secagem (Carpenter e Crowe, 1989). Os hidratos de carbono, polímeros, açúcares e polióis (por exemplo, manitol, sacarose, trealose, lactose, ciclodextrinas e maltodextrina) são amplamente utilizados. Algumas enzimas secas por *Spray Dryer* foram caracterizadas como, por exemplo, a lipase de *Cercospora kikuchii* (Costa-Silva *et al.*, 2011) e a β -frutofuranosidase de *Fusarium graminearum* (Gonçalves *et al.*, 2013).

Entretanto, são escassos os trabalhos que descrevem as propriedades de fitases fúngicas secas pelo processo de *Spray Drying*. Além disso, o conhecimento de tais propriedades é substancial na busca de produtos de interesse industrial obtidos pela ação desta enzima, bem como a redução de custos de produção pela utilização de produtos industriais.

1.5 APLICAÇÃO DAS FITASES

Os animais monogástricos, tais como suínos, peixes e aves não possuem a capacidade de sintetizar a enzima fitase em seu trato digestório. A digestão e o aproveitamento do alimento podem ser aumentados pela adição de fitase microbiana, que hidrolisa o fitato para mio-inositol e ácido ortofosfórico, necessário ao processo metabólico de biossíntese celular. Desta forma, parte do fósforo, antes não disponível, passa a ser aproveitado pelo organismo, tornando possível reduzir em até 30% o fósforo suplementado na alimentação (Kumar *et al.*, 2010).

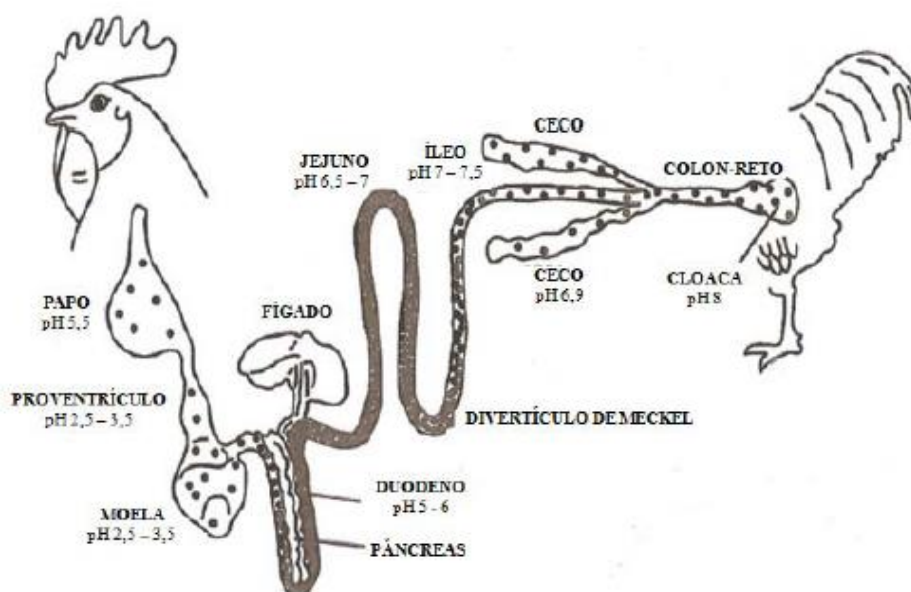
A suplementação da ração animal com fitase permite a assimilação do fosfato nos ingredientes da ração, diminui a presença de fosfato nas fezes e, subsequente contaminação do ambiente (Gomide *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2008; Nagata *et al.*, 2009). A preocupação com o meio ambiente, aliada ao aspecto econômico, faz com que a suplementação de fitase em dietas avícolas seja uma realidade na avicultura moderna.

Para que as fitases sejam efetivas, precisam resistir à ação do pH do trato gastrointestinal que é maior no pré-estômago (papo, proventrículo e moela) no caso das aves (Figura 5). Estudos demonstraram que a fitase de *E. coli* foi mais ativa no intestino delgado, apresentando maior resistência a enzima proteolíticas do que para a fitase de *Peniophora lycii* (Onyango, Bedford e Adeola, 2005). Essas enzimas ainda devem ser termoresistentes para que não sejam inativadas pela temperatura do processamento do alimento e ainda estáveis durante o processo de estocagem (Nunes *et al.*, 2001).

A busca de fitases com maior estabilidade térmica resultou na clonagem do gene de fitase de *A. fumigatus*, sendo que esta enzima purificada apresentou 90% da sua atividade inicial mantida a 100 °C durante 20 min., enquanto, a fitase de *Aspergillus niger* permanece apenas 30% ativa depois de ter sido aquecida a 70 °C durante 20 min (Pasamontes *et al.*, 1997; Wyss *et al.*, 1999).

A primeira fitase disponível comercialmente foi obtida a partir do cultivo do fungo *Aspergillus niger* Natuphos® (BASF, Mount Olive, NJ), em 1991, mas agora já existem várias fitases no mercado como, a fitase Finase® (Alko Ltda. Biotechnology, Rajamäki, Finland), adicionada à dieta a base de soja para suínos, que é capaz de converter aproximadamente um terço da fração não-assimilável para assimilável (Crowell *et al.*, 1993). De forma similar atuam outros produtos como Allzyme Phytase® (Alltech, Nicholasville, KY), para suínos e galinhas. Estudos relatados por Pandey *et al.*, (2001), evidenciam que diversos autores têm pesquisado a produção de fitase através do uso de diferentes micro-organismos, destacando-se os fungos filamentosos.

Figura 5. pH dos diferentes segmentos do trato digestório de frango de corte alimentados durante 6 semanas



Fonte: (Gauthier *et al.*, 2002).

A tecnologia para a produção em escala comercial dessas enzimas evoluiu, tanto referente as técnicas de produção como na Engenharia Genética. Este avanço permitiu a produção de enzimas por vários micro-organismos, geneticamente modificados ou não, resultantes da expressão do gene de *Aspergillus ficum* expressado em outros fungos ou bactérias (Zhang *et al.*, 2010)

Os estudos de aplicação *in vivo* têm como principal objetivo a utilização das enzimas para reduzir os custos das dietas e melhorar o aproveitamento dos nutrientes pelos animais. Sendo assim, as dietas teriam os níveis reduzidos de minerais, proteínas e/ou aminoácidos e energia, e seriam suplementadas com fitase, buscando obter o mesmo desempenho de uma dieta com os níveis nutricionais normais (Zanella, 1998).

A atividade da fitase é normalmente expressa em unidade de atividade fitase (FTU) sendo que 1 FTU é a quantidade de P inorgânico liberado (μmol) durante um minuto de reação em uma solução de fitato de sódio, pH 5,5 a 37 °C (Engelen *et al.*, 1994). Estudos de avaliação de duas enzimas comerciais na forma líquida e sólida

permitiram a observação de diferenças no desempenho de frangos de corte à medida que a inclusão de fitase na ração era aumentada (Payne, Lavergne e Southern, 2005). Ravindran *et al.* (2001) verificaram a melhora no ganho de peso de pintos de sete a 28 dias, alimentados com dieta deficiente em lisina e suplementada com 500 FTU/kg de fitase, sendo a melhor conversão alimentar atingida com a suplementação de 750 FTU/kg, enquanto que o consumo de ração não foi afetado pela suplementação enzimática.

O Brasil tem se destacado mundialmente pela sua forte produção no setor agropecuário e do agronegócio. Neste contexto, o ramo da avicultura tem evoluído nos últimos anos, o que torna a busca por novas fontes de fitases e o conhecimento de suas propriedades cada vez mais interessantes, especialmente as produzidas por fungos filamentosos.

Além disso, as fitases possuem um papel importante no solo. Fitases extracelulares foram relatadas para algumas plantas como tabaco, cevada (Lung e Lim, 2006), tomate e alfafa (Anderson, 1980) submetidas a condições de estresse de fosfato. A inoculação de micro-organismos produtores de fitases no solo melhora a capacidade das plantas em utilizar o fósforo presente no solo. Segundo Silva Filho (2001), uma parcela importante da comunidade microbiana edáfica possui habilidade em mineralizar fosfatos orgânicos e solubilizar fosfatos inorgânicos, permitindo a liberação de fósforo assimilável pelas plantas. Tais micro-organismos apresentam potencial de utilização como inoculantes, podendo maximizar o desenvolvimento vegetal (Sahin, Cakmakci e Kantar, 2004; Souchie *et al.*, 2006) e, ainda, atuar no controle biológico de inúmeras doenças vegetais (Hallmann *et al.*, 1997; Mpiga *et al.*, 1997).

Na alimentação humana, as dietas ricas em fibras de cereais, legumes e proteína de soja resultam numa alta ingestão de fitato. O fitato tem um grande potencial para ligar-se de forma positiva a proteínas carregadas, aminoácidos, e/ou cátions multivalente nos alimentos. Os complexos resultantes são insolúveis, difíceis para os seres humanos hidrolisarem durante a digestão, sendo assim são nutricionalmente menos disponíveis para absorção (Nouredдини e Dang, 2009).

Os minerais estão envolvidos na ativação intracelular de enzimas extracelulares, na regulação do pH e dos níveis de fluidos corporais necessários para o controle de reações metabólicas e equilíbrio osmótico entre a célula e o seu meio

ambiente. Uma deficiência de qualquer um dos minerais essenciais podem resultar em graves distúrbios metabólicos e comprometer a saúde do organismo humano (Lopez *et al.*, 2002).

Na literatura foram relatados poucos estudos direcionados para a aplicação da fitase na alimentação humana. Alguns destes trabalhos mostram a capacidade de algumas fitases em liberar ferro a partir do farelo de trigo ou pão (Porres *et al.*, 2001). O efeito da adição de fitase exógena em quatro formulações diferentes de pão contendo fibra no processo de panificação foi analisado por Haros, Rosell e Benedito (2001). Todas as formulações testadas promoveram uma aceleração do processo de fermentação. Além disso, o teor de fitato em massas de pão fresco foi reduzido pela adição de fitase, com os benefícios nutricionais subsequentes que implicam na redução do teor de anti-nutrientes dos pães contendo fibras. Apesar dos benefícios da fitase, existem preocupações sobre sua aplicação que merecem mais investigações com o intuito de determinar a dose e a forma adequada de aplicação das fitases na alimentação humana.

Outra aplicação que tem recebido muita atenção é a produção de intermediários de fosfato de mio-inositol devido ao potencial de notáveis benefícios à saúde oferecidos pelos compostos. A síntese química de mio-inositol apresenta várias complicações e dificuldades, incluindo a utilização de pressões e temperaturas extremas, pois a fitase hidrolisa a sequência de hexafosfatos de mio-inositol.

Os derivados de mio-inositol podem ser utilizados para prevenir ou aliviar doenças ou quadros associados com níveis anormais de Neuropeptídio Y (NPY), entre outras doenças inflamatórias como artrite e doenças respiratórias como asma, e ainda serem utilizados como substratos enzimáticos em reações metabólicas (Kerovuo 2000).

Além disso, outras funções como hipercolesterêmicas e analgésica também podem ter sido propostas para fosfatos de inositol específicos (Jariwalla *et al.*, 1990). Surpreendentemente, ésteres trifosfatados de inositol têm demonstrado ação inibitória significativa contra infecções retrovirais como HIV (Kerovuo, 2000).

2.OBJETIVOS

2.1 GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi selecionar a linhagem fúngica com maior produção de fitases, realizar a secagem do extrato enzimático em *Spray Dryer* e aplicá-lo na ração de frangos de corte.

2.2 ESPECÍFICOS

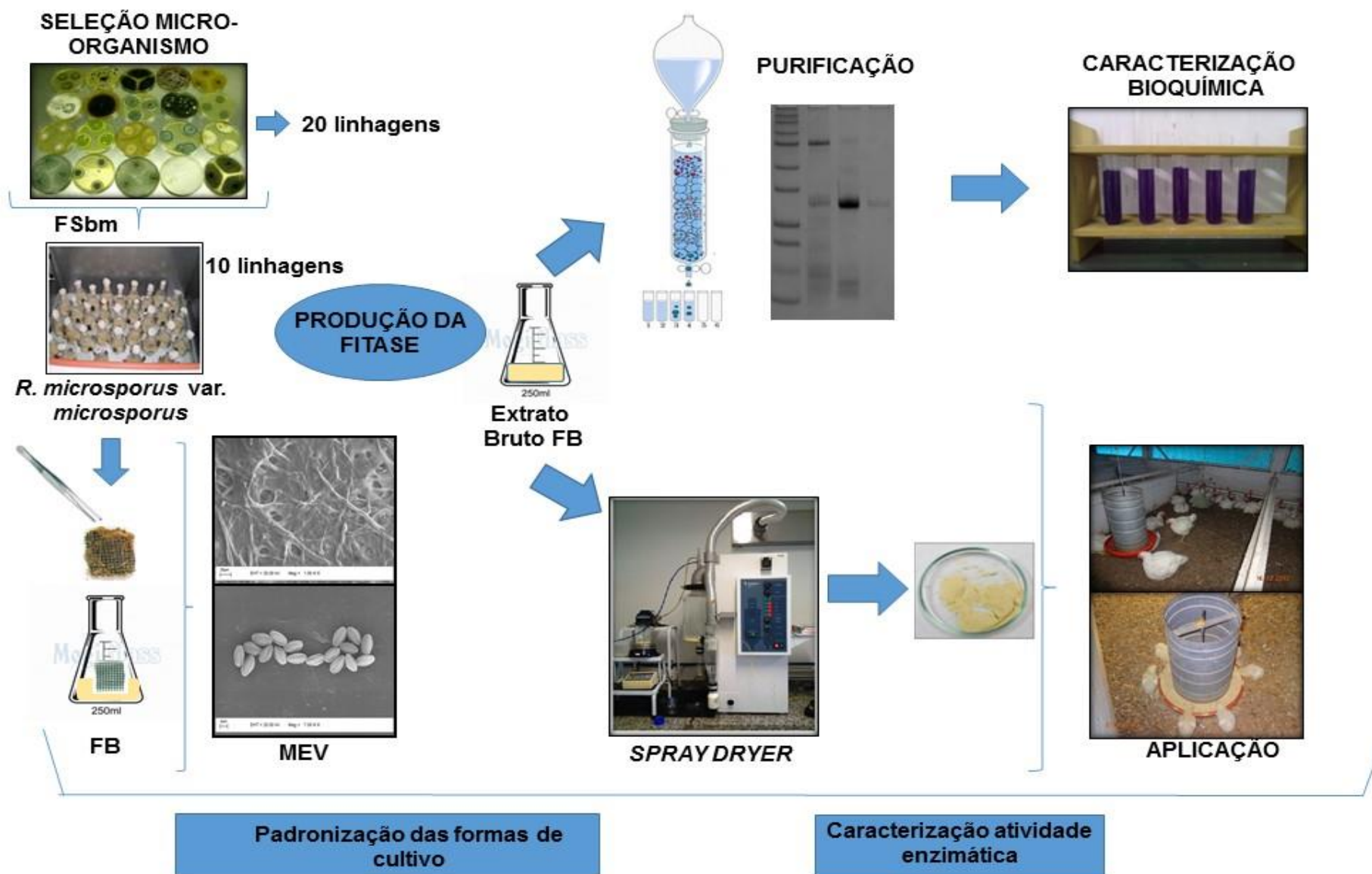
- Selecionar, dentre as linhagens fúngicas presentes na micoteca do Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular, da FFCLRP-USP a melhor produtora de fitase;
- Otimizar as condições de cultivo em fermentações submersa (FSbm) e em fermentação por biofilmes (FB) para a produção de fitases;
- Avaliar diferentes suportes de adesão para formação dos biofilmes pela linhagem selecionada;
- Verificar as condições ótimas de crescimento e produção de fitases em biorreatores: Fermentação submersa (FSbm) e Fermentação por biofilmes (FB) para linhagem selecionada;
- Secar os extratos contendo fitases em *Spray Dryer*;
- Caracterizar os extratos secos quanto à umidade, diâmetro médio da partícula, atividade residual fitásica e as características físico-química;
- Aplicar a fitase seca por *Spray Dryer* em ração de frangos de corte;
- Avaliar o desempenho dos frangos de corte após a aplicação da fitase na ração.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Na figura 6 pode ser observado o resumo experimental deste trabalho. Inicialmente, foi realizado a seleção em meio “Phytase Screening Media”, entre 20 linhagens isoladas e mantidas na micoteca do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão - USP. Sendo observado melhor crescimento para 10 linhagens de fungos filamentosos, estes então foram submetidos a seleção para produção de fosfatase ácida e alcalina, e produção fitásica, sendo selecionado o fungo *R. microsporus* var. *microsporus*. A produção enzimática por este micro-organismo foi conduzida em e realizado seu cultivo na Fermentação por Bbiofilmes.

O biofilme do fungo *R. microsporus* var. *microsporus* foi analisado por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). O extrato bruto da FB foi utilizado para os experimentos de purificação, caracterização bioquímica e secagem em Spray Dryer. O pó seco na presença de fubá como agente protetor, foi então aplicado em rações de frangos de corte, os quais tiveram o desempenho avaliado.

Figura 6. Desenho experimental e representativo da proposta e objetivos realizados nesse trabalho



3.1 SELEÇÃO DA LINHAGEM PRODUTORA DE FITASE

A seleção (*screening*) das linhagens de fungos filamentosos com alta produção de fitases foi realizada entre 20 linhagens já isoladas e mantidas na micoteca do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP. Inicialmente, os isolados foram inoculados em meio de cultura PSM (“Phytase Screening Media”) (Howson e Davis, 1983), a 30 °C, por 2-3 dias.

Os 10 isolados que apresentaram maior crescimento em meio de cultura PSM foram submetidos a uma segunda seleção, a determinação da atividade p-nitrofosfatásica (como descrito no item 3.8.1) tanto ácida como alcalina quando os micro-organismos foram cultivados por Fermentação Submersa (FSbm) em meio Khanna (Khanna et al., 1995) com adição de farinha de centeio 20 g/L como fonte de carbono por 72 h., a 30 °C, 100 rpm.

3.2 MANUTENÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS

As linhagens foram mantidas em meio de cultivo BDA (Batata Dextrose Agar), incubados em estufa a 27 °C, por um período de 6 a 8 dias. Posteriormente, foram armazenadas em refrigerador, a 4 °C, até a utilização. Os repiques foram realizados periodicamente a cada 30 dias em placas de Petri contendo o meio BDA, previamente autoclavado a 120°C, 1,5 atm por 30 min.

3.3 PRODUÇÃO DE FITASES EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA (FSbm)

Foi utilizado meio de cultura Khanna (Khanna *et al.*, 1995), em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio, pH inicial 6,0, adicionados de farinha de centeio (2% m/v) como fonte de carbono. Os meios foram previamente autoclavados a 120 °C a 1,5 atm por 30 min e depois inoculados com suspensão de

esporos (10^6 esporos/mL), sendo os cultivos incubados a 30 °C, sob agitação orbital de 100 rpm, por 72-144 h.

3.4 PRODUÇÃO DE FITASES PELA LINHAGEM SELECIONADA *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* EM FERMENTAÇÃO POR BIOFILMES (FB)

O fungo *R. microsporus* var. *microsporus* foi selecionado pela melhor produção fitásica. Desta forma, preparados os biofilmes foram preparados utilizando-se material inerte como suporte para fixação e desenvolvimento do micro-organismo. Inicialmente pedaços de tela de polietileno de dimensões de 2,3 cm x 2,3 cm foram cortados, lavados extensivamente com água destilada e submetidos à secagem em estufa a 40 °C. Paralelamente foi preparada uma solução de esporos (10^6 esporos/mL), em água destilada previamente autoclavada a 120 °C e 1,5 atm, por 30 min. Após secagem das telas estéreis, estas foram inseridas nos frascos Erlenmeyer contendo a solução de esporos e mantidos a 30 °C, sob agitação a 100 rpm por 2 h para a adesão dos esporos ao suporte. Após este período, as telas foram removidas com o auxílio de uma pinça estéril e submetidas a duas lavagens consecutivas (30 mins cada) com água destilada estéril para remoção dos esporos não aderidos com agitação 50 rpm. Após lavagem, as telas com os esporos aderidos foram colocadas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de diferentes meios de cultivo, como descrito no item 3.7.1. Os cultivos foram mantidos a 30 °C, sob agitação 50 rpm, por diferentes períodos conforme determinado para cada experimento.

3.4.1 Influência da agitação na formação do biofilme de *R. microsporus* var. *microsporus*

Foram realizados experimentos para determinação da melhor faixa de agitação para os cultivos utilizando biofilmes de *R. microsporus* var. *microsporus*. Os biofilmes foram cultivados em meio Khanna e inicialmente foi utilizado como fonte de carbono farinha de centeio 2% (m/v), sendo padronizado para os experimentos posteriores bagaço de cana de açúcar 2% (m/v) como fonte, sob diferentes faixas de agitação (40-80 rpm).

3.4.2 Uso de diferentes suportes de adesão para obtenção do biofilmes de *R. microsporus* var. *microsporus*

Diferentes suportes inertes foram utilizados para formação de biofilmes do fungo *R. microsporus* var. *microsporus*, sendo os cultivos realizados em meio NBRIP modificado utilizando como fonte de carbono bagaço de cana de açúcar 20 g/L, sob agitação de 50 rpm, a 30 °C. Os materiais estudados foram selecionados a partir dos seguintes critérios: disponibilidade e baixo custo, distribuição homogênea de tamanho de partículas, rugosidade superficial (que permite maior superfície disponível para a adesão de micro-organismos). Foram utilizados os seguintes suportes: TNT (100% prolipropileno), espuma de poliuretano, nylon, viscose, poliéster, EVA (etileno vinil acetato), e a tela de polietileno utilizada anteriormente. Os biofilmes foram obtidos como descrito anteriormente no item 3.4.

3.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS BIOFILMES DE *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*

Os biofilmes obtidos no meio Khanna, utilizando como fonte de carbono farinha de centeio 20 g/L, foram analisados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Para tanto, os biofilmes foram desidratados usando solução aquosa de etanol em concentrações crescentes (10-90%, v/v) e etanol absoluto, como já padronizado em nosso laboratório. Posteriormente, os biofilmes assim tratados foram recobertos com ouro coloidal e submetidos à análise em MEV utilizando-se um equipamento Zeiss EVO50 com sistema IXRF-500 e processador digital. O processo de adesão do esporo ao suporte também foi acompanhado por MEV. O suporte inerte bem como os biofilmes obtidos foram também fotografados, de modo convencional, utilizando-se uma câmera digital Sony Cyber Shot W110. As análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Química da FFCLRP-USP.

3.6 OBTENÇÃO DA ENZIMA EXTRACELULAR EM FSbm e FB

As culturas obtidas em meio líquido foram filtradas a vácuo em funil Büchner, obtendo-se um filtrado livre de células. O filtrado foi dialisado contra água destilada, por 24 h, a 4 °C e utilizado para a determinação da atividade enzimática extracelular. No caso da fermentação por biofilmes, estes foram removidos com o auxílio de uma pinça estéril e o meio contendo a enzima extracelular, foi dialisado contra água destilada, por 24 h, a 4 °C, e utilizado para a dosagem enzimática.

3.7 MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA PELA FB

Foram testados diferentes fontes de carbono adicionadas ao meio Khanna (Khanna *et al.*, 1995), dentre elas, fontes complexas como resíduos ou produtos agroindustriais de baixo custo (bagaço de cana de açúcar, bagaço de laranja). Tanto para os açúcares, galactose, glicose, sacarose, frutose e maltose como para as demais fontes, concentrações de 20 g/L foram adicionadas ao cultivo isoladamente. Como controle, foi utilizado meio sem adição da fonte de carbono. Os cultivos foram mantidos a 30 °C, por 48 h, a 50 rpm. A análise do teor de macro nutrientes presente nos substratos utilizados foi realizada segundo Bataglia *et al.* (1983) no Laboratório de Nutrição de Plantas da UNESP de Jaboticabal.

3.7.1 Influência de diferentes meios de cultivo na produção enzimática em FB

Com o objetivo de melhorar a produção de fitase por biofilmes de *R. microsporus* var. *microsporus* foi realizado o inóculo do fungo em seis diferentes meios de cultivo.

Os meios de cultivo testados e sua composição estão descritos a seguir:

Meio Khanna (Khanna *et al.*, 1995)

- Solução de sais de Khanna [20x]-.....5,0mL
- Extrato de levedura.....0,1g
- Água destilada q.s.p.....100mL

Solução de sais de Khanna [20X]

• NH_4NO_3	2,0g
• KH_2PO_4	1,3g
• $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,362g
• KCl	0,098g
• $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,007g
• $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,0138g
• $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0066g
• $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0062g
• Água destilada q.s.p.....	100mL

Meio Vogel (Vogel, 1964)

• Solução de sais de Vogel [50X].....	2,0mL
• Solução de biotina.....	20 μ L
• Pectina.....	1,0g
• Água destilada q.s.p.....	100mL

Solução de sais de Vogel [50X]

• Citrato de sódio pentahidratado.....	15g
• KH_2PO_4	25g
• NH_4NO_3	10g
• $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0g
• $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,5g
• Solução de traços de elementos.....	0,5mL
• Clorofórmio.....	0,5mL
• Água destilada q.s.p.....	100mL

Solução de biotina

• Biotina.....	0,05g
• Etanol 50%.....	100mL

Solução traços de elementos

- Ácido cítrico. H₂O.....5g
- ZnSO₄.7H₂O.....5g
- Fe₂(NH₄)².(SO₄)₂.6H₂O.....1g
- CuSO₄.5H₂O.....0,25g
- H₃BO₃.....0,05g
- MnSO₄.H₂O.....0,05g
- Na₂MoO₄.2H₂O.....0,05g
- Clorofórmio.....1mL

Meio Czapek (Wiseman, 1975)

- NaNO₃.....0,3g
- KH₂PO₄0,1g
- MgSO₄.7H₂O.....0,05g
- KCl.....0,05g
- Fe₂(SO₄)³.7H₂O.....0,001g
- Extrato de levedura.....0,1g
- Água destilada q.s.p.....100mL

Meio SR (Rizzatti *et al.*, 2001)

- Solução de sais SR [20X] -.....5,0mL
- Peptona.....0,02g
- Extrato de levedura.....0,45g
- Água destilada q.s.p.....100mL

Solução de sais SR [20X]

- MgSO₄.7H₂O.....0,24g
- KH₂PO₄.....0,3g
- NH₄H₂PO₄.....1,0g
- Água destilada q.s.p.....100mL

Meio NBRIP modificado (Nautiyal, 1999)

•MgCl ₂ .6H ₂ O.....	1,0g
•Mg SO ₄ .7H ₂ O.....	0,25g
•KCl.....	0,2g
•(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0g
•Água destilada q.s.p.....	1,0L

3.7.2 Influência do KH₂PO₄ e do fitato na produção de fitases por biofilmes

Rhizopus microsporus var. *microsporus* foi cultivado em meio Khanna em diferentes concentrações de fosfato de potássio KH₂PO₄ (entre 0,1 e 20 mM), pH 6,0. A influência de diferentes concentrações de fitato de sódio (Sigma®) (0-20mM) nos meios de cultivo NBRIP modificado e Khanna utilizando 2% de bagaço de cana de açúcar como fonte de carbono também foi analisada.

3.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

3.8.1 Atividade *p*-nitrofenilfosfatásica

A atividade *p*-nitrofenilfosfatásica foi determinada descontinuamente utilizando-se 5 µL do *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP), a 1 mM como substrato em tampão acetato de Sódio 100 mM, pH 5,0. A reação foi interrompida pela adição de 2,0 mL de solução saturada de tetraborato de sódio, em diferentes intervalos de tempo. Uma unidade (U) de atividade enzimática foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para hidrolisar um micromol do substrato em um minuto, nas condições de ensaio e a atividade específica foi expressa em U/mg de proteína. Em cada experimento foram incluídos controles de enzima inativada para se estimar a hidrólise não enzimática do substrato

3.8.2 Atividade fitásica

Foi escolhida a metodologia descrita por Gulati et al. (2007) modificada, sendo o meio reacional composto por 50 µL de amostra enzimática incubada com 50 µL da solução de ácido fítico (dodecasódico hidratado, $C_6H_6Na_{12}O_4P_6 \cdot H_2O$ Sigma®) 1% (m/v), dissolvido em tampão acetato de sódio 0,2 M, pH 5,5. Após 30 min de reação, foram adicionados 100 µL de TCA 15% (ácido tricloroacético) e 300 µL de água destilada em cada tubo de ensaio. Após o tempo de incubação, foi adicionado 0,9 µL do reagente cromogênico, composto por ácido sulfúrico 0,76M, ácido ascórbico 10% e molibdato de amônio 2,5%, (3:1:0,5 v/v/v). Os tubos foram posteriormente incubados a 50 °C, por 20 min, e após esfriarem foi feita a leitura em espectrofotômetro a 820 nm. Em cada experimento foram incluídos controles de enzima inativada para se estimar a hidrólise não enzimática do substrato. Uma unidade de atividade enzimática foi definida e expressa como a quantidade de enzima que libera um µmol de fosfato por minuto, nas condições de ensaio. A atividade específica foi expressa como U/mg de proteína do extrato bruto.

3.9 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA

A dosagem de proteínas foi realizada como descrito por Bradford et al. (1976), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão, e expressa como mg de proteína por mL de amostra.

3.10 PURIFICAÇÃO DA FITASE PRODUZIDA POR BIOFILMES de *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*

O extrato bruto contendo a enzima extracelular produzida em FB utilizando bagaço de cana de açúcar como fonte de carbono/substrato, após ser dialisado *overnight* (4 °C) contra água destilada foi aplicado em coluna cromatográfica de troca iônica DEAE-Celulose (1 cm x 12 cm) equilibrada previamente com tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,0. Foi utilizado um gradiente linear de NaCl (0-1M) para eluição das frações. Foram coletados 3mL/fração e a vazão foi mantida em 1 mL/min. Foram obtidos dois picos com atividade enzimática, sendo as frações do segundo pico

reunidas em um pool, o qual foi dialisado *overnight* contra água destilada, foi aplicado em coluna de troca iônica CM-Celulose (1 cm x 8 cm), previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0. Foi utilizado um gradiente linear de NaCl (0-1M) para eluição das frações. Foram coletadas frações de 3 mL e a vazão foi mantida em 0,5 mL/min. As frações contendo atividade fitásica foram recolhidas em um único pool e então dialisada *overnight* (4 °C) contra água destilada. Após diálise, o pool foi centrifugado a 8.000 xg por 15 min, a 4 °C, em membrana (Amicon-Millipore) de 30 kDa.

3.11. ELETROFORESE

Após concentrada, a amostra purificada foi aplicada em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes (PAGE 6%) (Davis, 1964) e em condições desnaturantes (SDS-PAGE 10%) (Laemmli, 1970), utilizando-se uma fonte ajustada para 120 V e 40 mA, corados com Comassie Brilliant-Blue R250. Foi utilizado o padrão de massa molecular comercial da marca Bio-Rad®, modelo Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope, com 10 bandas de variação entre 250 KDa e 10 KDa. Para cálculo da massa molecular da fitase foi utilizado o Log da massa molecular de cada marcador em função da mobilidade relativa (Rf).

3.12 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

3.12.1 Determinação da temperatura e pH ótimos de reação, estabilidade térmica ao pH

O ensaio de determinação da temperatura ótima de atividade para a fitase intracelular e extracelular foi realizado em diferentes temperaturas (30 °C a 80 °C). Para determinação do pH ótimo de atividade foram utilizadas solução tampão acetado de sódio 100 mM (pH 3,5 a 6,0), solução tampão ampol 100 mM (pH 6,0 a 7,0) e solução Tris-HCl 100 mM (pH 7,0 a 10,0).

O estudo da estabilidade térmica da fitase foi realizado incubando-se o extrato enzimático em diferentes temperaturas (40-80 °C), por pelo menos 120 min. As amostras coletadas foram em seguida adicionadas ao banho de gelo para posterior

dosagem da atividade enzimática. A estabilidade ao pH foi realizada na faixa de pH 3,5 a 10,0 utilizando-se as mesmas soluções tampões citadas para determinação do pH ótimo de atividade, por 30-60 min, em temperatura ambiente (29 °C). Foi considerado como 100% de atividade relativa o maior valor de atividade fitásica obtido.

3.12.2 Efeitos de vários compostos sobre a atividade da fitase

As atividades fitásicas foram determinadas na presença e na ausência de diferentes compostos como: KH_2PO_4 (5 mM), EDTA (5 mM), arsenato (0,5 mM), MgCl_2 (2 mM), CaCl_2 (1 mM), ZnSO_4 (1mM), CuCl_2 (2 mM), CoCl_2 (1 mM), FeSO_4 (1 mM). A atividade fitásica foi determinada conforme descrito anteriormente.

3.12.3 Determinações dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos K_m , $V_{\max}$ para fitase purificada foram determinados utilizando concentrações crescentes (0,01 a 4mM) do substrato fitato de sódio (Sigma®) em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0. Os cálculos foram realizados utilizando o programa OringInPro 8.0.

3.13 PRODUÇÃO DE FITASES POR BIOFILMES DE *R. microsporus* var. *microsporus* EM BIORREATOR

A produção de fitases por biofilmes de *R. microsporus* var. *microsporus* foi realizada em biorreator (Tecnal) modelo TECBIO-4,5 (Figura 7). As fermentações foram realizadas em um biorreator com capacidade de 3 L, sendo o volume útil médio de 2 L utilizado nas fermentações. A temperatura foi mantida em 30 °C, e sem agitação para que não ocorresse danos a estrutura do biofilme. O biofilme foi obtido utilizando viscose como suporte, a qual foi cortada e costurada para encaixe ao suporte do biorreator e previamente esterilizada. Posteriormente, foi adicionada a suspensão de esporos (10^6 esporos/mL) como descrito anteriormente (item 3.4), e mantido sob agitação a 50 rpm, a 30 °C por 3 h para a adesão dos esporos ao suporte. Após este período, a viscose foi removida com o auxílio de uma pinça estéril e submetida a duas lavagens com água destilada estéril para remoção dos esporos não aderidos. Esta foi

adicionada ao suporte do biorreator com a ajuda de pinças estéreis e inoculada em biorreator com meio Khanna, utilizando bagaço de cana 2% (m/v) como fonte de carbono para formação dos biofilmes. A temperatura foi mantida em 30 °C, com pH inicial 6,0, com agitação 50 rpm para que não ocorresse danos a estrutura do biofilme, com aeração 2,5 vvm (volume de ar por volume de meio, por minuto).

Figura 7. Biorreator modelo TECBIO-4,5 utilizado para fermentação submersa (FSbm) e fermentação por biofilmes (FB) no Laboratório de Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Unesp Araraquara.



3.14 SECAGEM DA FITASE PRODUZIDA POR BIOFILMES DE *R. microsporus* var. *microsporus* EM SPRAY DRYER

Os experimentos de secagem foram realizados no Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento em Processos Farmacêuticos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP.

O extrato bruto extracelular obtido do cultivo de *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* por FB, utilizando bagaço de cana de açúcar como substrato, foi submetido a secagem utilizando o equipamento Spray Dryer SD 05 – (Lab-Plant Reino Unido) com câmara de secagem de 215 mm de diâmetro e 500 mm de altura. A

temperatura de entrada do ar foi padronizada em 100 °C e a temperatura de saída do ar variou entre 68 °C e 71 °C. Para a proteção da amostra enzimática durante o processo de secagem foram adicionados ao extrato bruto diferentes agentes protetores em diferentes proporções (Tabela 3). As condições experimentais para secagem foram: W_g (vazão do ar de secagem) 60 m³/h, W_{susp} (vazão de alimentação da amostra) 4 g/min, P_{atm} (pressão de atomização) 1,5 kgf/ cm², W_{atm} (vazão de atomização) 17 lpm e diâmetro do bico atomizador de 1 mm.

A operação teve início com a alimentação e aquecimento do gás de secagem, e, assim que atingiu-se regime estacionário, foi iniciada a alimentação do extrato bruto enzimático já preparado com as diferentes concentrações dos adjuvantes. Uma vez a solução enzimática na câmara de secagem, foram efetuadas medidas em intervalos regulares, da temperatura de saída do gás (T_{gs}) verificando-se a estabilidade do processo. A retirada de amostra do produto seco foi realizada aproximadamente 30 min após o início da operação.

Tabela 3. Composições utilizadas para secagem do extrato bruto obtido de FB em Spray Dryer

Código amostra	Adjuvante de secagem	Proporção (%) (m/v)
AM2	Amido	2%
AM5		5%
AM10		10%
FM2	Farelo de milho	2%
FM5		5%
FM10		10%
FS2	Farelo de soja	2%
FS5		5%
FS10		10%
FB2	Fubá	2%
FB5		5%
FB10		10%
EFMT2	Maltodextrina	2%
EFMT5		5%
EFMT10		10%

AM: amido; FM: farelo de milho; FS: farelo de soja; FB: fubá e MT: maltodextrina

A extração da enzima seca no pó foi realizada em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, por um período de 3 h mantendo a amostra sempre em banho de gelo com agitação contínua.

As amostras secas foram utilizadas para análises físico-químicas do produto de secagem, sendo determinados a umidade, distribuição granulométrica, atividade de água e atividade fitásica residual da amostra seca. A determinação do teor de umidade residual das amostras foi realizada em titulador de Karl Fischer, modelo Titrino Plus 870, (Metrohm®), o qual determina o teor de água total através do método químico. Para distribuição granulométrica foi dispersa uma quantidade da amostra seca sobre uma lâmina de vidro e as imagens foram obtidas em microscópio óptico acoplado com câmera fotográfica (Olympus – modelo BX60MIV). As fotos foram analisadas por sistema de análise de imagens (Image Pro-Plus®, 2009) utilizando o diâmetro médio para a contagem das partículas (o que se refere ao comprimento médio dos diâmetros medidos em intervalos de dois graus e passando através do centro da partícula). A taxa de recuperação do produto ou o rendimento do processo foi calculado através do percentual entre a massa de pó total coletada e a massa de sólidos alimentada no equipamento (Souza, 2003).

3.14.1 Caracterização bioquímica dos extratos secos por *Spray Dryer*

Foram realizados experimentos para avaliar as características bioquímicas da enzima fitase após secagem por *Spray Dryer*, em presença do adjuvante farelo de soja. As reações para verificação da melhor temperatura de atividade e determinação do pH ótimo para atividade fitásica após secagem foram realizadas entre 30°C e 80°C, e o pH entre 2,5 e 8,5, utilizando tampão citrato de sódio 100 mM (2,5-3,5), tampão acetado de sódio 100 mM (pH 3,5-6,0), tampão Tris-HCl 100 mM (pH 6,0-8,5) e tampão ampol 100mM (pH 8,5-10,5).

O estudo da estabilidade térmica da fitase seca foi realizado incubando-se o pó contendo a enzima em diferentes temperaturas (40-80 °C) por pelo menos 120 min. As amostras coletadas foram mantidas em banho de gelo para posterior dosagem da atividade enzimática. A estabilidade ao pH foi realizada na faixa de pH 3,5 a 10,0 utilizando-se as mesmas soluções tampões citadas anteriormente por um período de 30-60 min, a 29 °C.

3.15 APLICAÇÃO DA ENZIMA SECA POR *SPRAY DRYER* NA COMPOSIÇÃO DE RAÇÕES PARA FRANGOS DE CORTE

O trabalho de pesquisa intitulado “Eficiência da fitase produzida por *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* sobre o desempenho de frangos de corte” foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA) como número de Protocolo 0184337/13.

O experimento foi conduzido no Setor de Avicultura da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/Jaboticabal-UNESP.

3.15.1 Instalações e equipamentos

Os pintinhos foram alojados em 36 boxes de 3,0 m², com 30 aves por box, em um galpão com 3,2m de pé direito. Os fornecimentos de água e ração iniciais foram através de bebedouro e comedouro inicial e tubular infantil, respectivamente, um para cada box. Estes equipamentos foram substituídos gradativamente por bebedouro pendular e comedouro tubular definitivos. O monitoramento da temperatura e umidade relativa do ar no interior do galpão foi feito por meio de termo higrômetro, colocado à altura intermediária das gaiolas. As leituras foram realizadas três vezes por dia, às 8h, 15h e 18h.

3.15.2 Aves experimentais

Foram utilizados 1080 pintos de corte, com 1 dia de idade, machos, de linhagem comercial Cobb 500, vacinados no incubatório contra as doenças de Marek, Bouda Aviária e Gumboro.

3.15.3 Rações experimentais

Foram formuladas à base de milho e de farelo de soja, seguindo-se as recomendações de ROSTAGNO et al. (2011), para frangos de corte machos, e o programa de arraaçamento foi dividido em 2 fases, inicial (1-21 dias) e final (22-42 dias) (Tabela 4).

Tabela 4. Ingredientes e composição nutricional das dietas experimentais.

INGREDIENTES (%)	<u>INICIAL (%)</u>			<u>FINAL (%)</u>		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3
Milho	63,050	62,802	62,553	65,095	64,846	64,597
Farelo de soja	32,888	32,939	32,990	29,367	29,418	29,469
Óleo	0,610	0,694	0,778	2,768	2,851	2,935
Fosfato Bi cálcico	0,606	0,931	1,256	0,363	0,688	1,013
Calcário	1,543	1,333	1,123	1,337	1,127	0,917
Sal	0,433	0,433	0,433	0,399	0,400	0,400
DL-Metionina	0,321	0,321	0,322	0,255	0,255	0,255
L-Lisina	0,317	0,316	0,315	0,234	0,233	0,232
L-Treonina	0,122	0,122	0,122	0,072	0,072	0,072
Premix	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100	0,100
Fitase	-	-	-	-	-	-
Inerte	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Composição Calculada dos Nutrientes						
EM (kcal/kg)	3000	3000	3000	3170	3170	3170
PB (%)	21,6	21,6	21,6	20,0	20,0	20,0
Cálcio (%)	0,867	0,867	0,867	0,717	0,717	0,717
Fósforo (%)	0,225	0,285	0,345	0,175	0,235	0,295
Sódio (%)	0,213	0,213	0,213	0,198	0,198	0,198
Potássio (%)	0,794	0,794	0,794	0,735	0,735	0,735
Metionina (%)	0,606	0,606	0,606	0,524	0,524	0,524
Met.+Cist. (%)	0,902	0,902	0,902	0,804	0,804	0,804
Lisina (%)	1,253	1,253	1,253	1,101	1,101	1,101
Treonina (%)	0,814	0,814	0,814	0,715	0,715	0,715
Triptofano (%)	0,218	0,218	0,218	0,199	0,199	0,199

EM: energia metabolizável; PB: proteína bruta; Met.: metionina; Cist: cisteína

3.15.4 Delineamento experimental

O delineamento foi inteiramente casualizado com 6 tratamentos e 6 repetições.

T1 – Dieta Basal deficiente em fósforo 0,225% de fosfato inorgânico na fase inicial 0,175% na fase final.

T2 – Dieta Basal + 0,06% de fosfato inorgânico

T3 – Dieta Basal + 0,12% de fosfato inorgânico (atendimento total às exigências nutricionais das aves)

T4 – T1 + Fitase 250 FTU/kg.

T5 – T1 + Fitase 500 FTU/kg.

T6 – T1 + Fitase 750 FTU/kg.

3.15.5 Características avaliadas

O desempenho das aves foi avaliado por meio do ganho de peso, do consumo de ração e da conversão alimentar, para cada período estudado.

Os dados foram obtidos para os períodos acumulados de 1-21 e 22-42 dias de idade.

- Para determinação do peso corporal, as aves de cada boxe foram pesadas, juntas, no alojamento, nas trocas de rações e 42 dias de idade.
- O ganho de peso foi obtido pela diferença entre o peso ao final de cada período e o peso inicial no alojamento.
- O consumo de ração foi calculado pela diferença entre o total de ração fornecida e as sobras de ração no final de cada período.
- A conversão alimentar foi calculada pela razão entre o total de ração fornecida e o ganho de peso no período, e corrigida pelo peso das aves mortas (considerou-se a média obtida pela soma das aves vivas a cada dia dividindo pelo período total de dia).

Conversão alimentar (CA): $CA = CR/GP$

Sendo: CR= Média do número de aves de cada dia do experimento

Em que:

CR = consumo de ração (kg);

GP = ganho de peso (kg)

- A mortalidade foi anotada diariamente e expressa em percentual, pela relação entre o número de aves mortas no período e o número inicial de aves.

3.16 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa “SAS system” versão 9.0, considerando-se três repetições. Foram realizados testes de homocedasticidade, de normalidade dos erros, análise de variância e teste de Tukey para comparação das médias com intervalo de confiança de 95%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor entendimento os resultados, foram separados em 4 seções a saber:

Parte I- Produção enzimática em FSbm e FB

Parte II- Purificação e Caracterização Bioquímica

Parte III- Secagem por *Spray Dryer*

Parte IV- Aplicação da fitase seca em *Spray Dryer*

Parte I
Produção enzimática
em FSbm e FB

4.1. SCREENING E PRODUÇÃO DE FITASES EM FERMENTAÇÃO SUBMERSA (FSbm)

A seleção (*screening*) das linhagens de fungos filamentosos com alta produção de fitases foi realizada entre 20 linhagens já isoladas e mantidas na micoteca do Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular da FFCLRP-USP. As linhagens fúngicas foram testadas inicialmente, quanto à solubilização de fitato em meio de cultura PSM ("Phytase Screening Media") (Howson e Davis, 1983), a 30 °C por 2-3 dias. Após o período de incubação foram selecionadas as linhagens que apresentaram melhor crescimento no meio de cultura PSM: Cinza Novo, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus*, *Aspergillus phoenicis*, *Paecilomyces variotti*, *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*, *Trichoderma* sp. e *Trichoderma harzianum*.

Sendo assim, os 10 isolados com melhor crescimento em meio de cultura PSM foram submetidos a uma segunda seleção, a determinação da atividade *p*-nitrofosfatásica tanto ácida como alcalina. As linhagens foram crescidas em Fermentação Submersa (FSbm) em meio Khanna (Khanna, Sundari e Kumar, 1995), com adição de farinha de centeio 2% como fonte de carbono, por 72 h, a 100 rpm (Tabela 5).

A maioria das linhagens fúngicas apresentaram uma produção de fosfatase alcalina intracelular significativa destacando-se *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus phoenicis*. Todas as linhagens analisadas produziram fosfatase ácida intracelular, destacando-se novamente as linhagens citadas anteriormente e *A. niger*. O fungo *Trichoderma* sp. foi o menos eficiente na produção (5,4 U totais) desta fosfatase. Quanto à produção da fosfatase alcalina extracelular foram poucos os fungos que apresentaram uma boa produção como *A. phoenicis*, *A. flavus* e *A. niger* se comparados aos demais na produção de fosfatase ácida extracelular mais uma vez destacaram-se *A. niger* e *A. phoenicis*.

As fosfatases produzidas pelos fungos do gênero *Aspergillus* já foram amplamente estudadas (Ullah e Cummins, 1988a; Ullah e Dischinger, 1993; Ehrlich et al., 1994; Mullaney et al., 1995; Ullah e Sethumadhavan, 2003; Vats e Banerjee, 2005; Pawar e Thaker, 2009) como a fosfatase ácida de *Aspergillus caespitosus* caracterizada em nosso laboratório (Guimarães et al., 2004) e a fosfatase ácida de *Aspergillus niger* (Gargova et al., 2006). A produção de fosfatase alcalina por *R.*

microsporus var. *rhizopodiformis*, também mereceu destaque em outro *screening* realizado em nosso laboratório (Guimarães *et al.*, 2006).

Tabela 5. Produção de fosfatases alcalina e ácida em FSbm por diferentes linhagens de fungos filamentosos.

Fungos	Fosfatase Alcalina (U totais)		Fosfatase Ácida (U totais)	
	Intracelular	Extracelular	Intracelular	Extracelular
Cinza Novo	61,4 ^F ± 0,33	1,3 ^G ± 0,88	67,8 ^D ± 0,34	5,0 ^{EF} ± 0,67
<i>Aspergillus fumigatus</i>	53,2 ^G ± 0,88	0 ^H	59,3 ^F ± 0,58	6,0 ^{EF} ± 0,67
<i>Aspergillus flavus</i>	162,0 ^A ± 0,67	38,5 ^B ± 0,67	100,8 ^B ± 0,67	6,7 ^E ± 0,33
<i>Aspergillus niger</i>	113,7 ^C ± 0,33	31,0 ^C ± 0,67	106,6 ^A ± 0,67	59,6 ^B ± 0,67
<i>Aspergillus niveus</i>	97,8 ^D ± 0,33	0 ^H	95,5 ^C ± 0,89	5,4 ^E ± 0,88
<i>Aspergillus phoenicis</i>	150,3 ^B ± 0,33	60,6 ^A ± 0,88	63,6 ^E ± 0,34	81,7 ^A ± 0,67
<i>Paecilomyces variotii</i>	22,2 ^H ± 0,33	0 ^H	24,2 ^G ± 0,89	13,5 ^C ± 0,67
<i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	64,3 ^E ± 0,33	8,3 ^F ± 0,67	25,8 ^H ± 0,34	13,9 ^C ± 0,58
<i>Trichoderma</i> sp.	22,4 ^H ± 0,88	19,7 ^D ± 0,58	5,4 ^J ± 0,34	4,4 ^F ± 0,33
<i>Trichoderma harzianum</i>	22,6 ^H ± 0,58	10,8 ^E ± 0,67	12,2 ^I ± 0,58	9,1 ^D ± 0,67

FSbm em meio Khanna suplementado com farinha de centeio 2%, por 72h, sob agitação 100 rpm, a 30 °C. Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na coluna diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Como a maioria dos isolados apresentou atividade tanto para fosfatase ácida como alcalina, todos os extratos enzimáticos obtidos da FSbm foram submetidos à determinação da atividade fitásica (Tabela 6). A maioria das linhagens fúngicas apresentou atividade fitásica intracelular destacando-se *A. phoenicis*, *A. niger* e Cinza Novo. No entanto, considerando a produção fitásica extracelular o fungo, *R. microsporus* var. *microsporus* apresentou a melhor produção (11,2 U totais). O gênero

Rhizopus já foi anteriormente descrito como bom produtor de fitases como, por exemplo, *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus oligosporus* e *Rhizopus stolonifer* (Howson e Davis, 1983).

Outro gênero fúngico que merece destaque quanto a produção de fitase, especialmente a extracelular, é o *Aspergillus*, como observado para *A. ficcum* (Ehrlich *et al.*, 1994), *A. fumigatus* (Mullaney, Daly e Ullah, 2000), *A. terreus* (Mitchell *et al.*, 1997), *A. niger* NCIM 563 (Bhavsar, Kumar e Khire, 2011).

Tabela 6. Determinação da atividade fitásica no extrato enzimático obtido pelo cultivo das 10 linhagens de fungos filamentosos, previamente selecionados em FSbm.

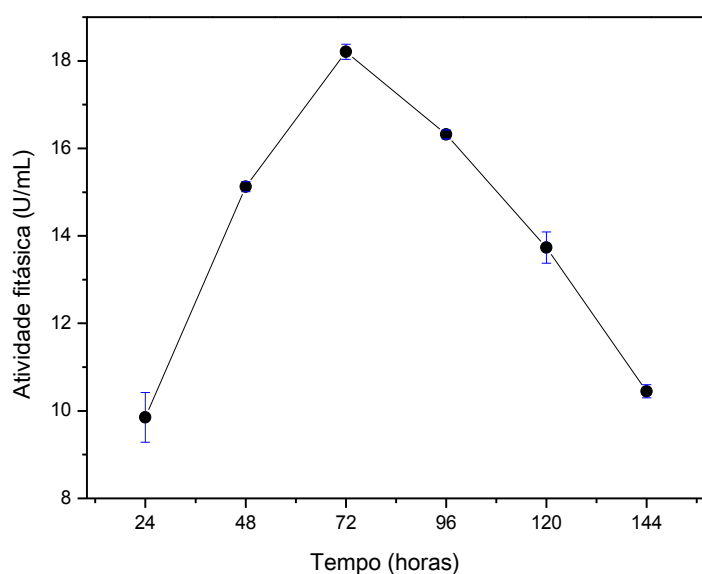
Fungos	Fitase (U/mL)		Proteína total (mg)
	Intracelular	Extracelular	
Cinza Novo	28,1 ^C ± 0,22	5,61 ^{DE} ± 0,08	1,405
<i>Aspergillus fumigatus</i>	18,8 ^H ± 0,28	4,99 ^{DE} ± 0,47	0,522
<i>Aspergillus flavus</i>	26,6 ^D ± 0,62	2,74 ^F ± 0,47	0,778
<i>Aspergillus niger</i>	35,6 ^A ± 0,15	5,12 ^E ± 0,09	0,985
<i>Aspergillus niveus</i>	22,5 ^E ± 0,13	7,26 ^B ± 0,26	1,094
<i>Aspergillus phoenicis</i>	29,6 ^B ± 0,47	6,35 ^C ± 0,13	0,894
<i>Paecilomyces variotii</i>	19,1 ^H ± 0,22	7,53 ^B ± 0,06	0,847
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	2,24 ^I ± 0,39	11,2 ^A ± 0,23	0,789
<i>Trichoderma</i> sp.	20,1 ^G ± 0,17	5,89 ^{C^D} ± 0,27	0,635
<i>Trichoderma harzianum</i>	21,4 ^F ± 0,14	5,32 ^{DE} ± 0,06	1,338

FSbm em meio Khanna suplementado com farinha de centeio 2% por 72h sob agitação 100 rpm a 30 °C. Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na coluna diferem pelo teste de Tukey (P<0,05).

Considerando, que o gênero *Aspergillus* já foi amplamente estudado para produção de fitases e que um dos principais objetivos deste estudo é a produção da enzima extracelular por biofilmes, *R. microsporus* var. *microsporus* foi selecionado para dar continuidade aos experimentos posteriores, já que apresentou uma melhor produção fitásica extracelular, e também porque não há trabalhos que relatam a produção de fitases por esta variedade.

A seleção de micro-organismos bons produtores de fitases constituiu uma etapa importante neste trabalho. Utilizando-se várias espécies, foi possível identificar organismos bons produtores. Sendo assim, selecionado *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* como fungo de interesse, a produção da fitase em FSbm, assim como por biofilmes foi analisada. Para a produção enzimática em FSbm foi utilizado meio Khanna com adição de farinha de centeio 2% como fonte de carbono. A produção máxima (18,2 U/mL) de fitases extracelulares por *R. microsporus* var. *microsporus* foi obtida com 72 h de cultivo (Figura 8). Resultados semelhantes foram observados para fitase produzida por *Bacillus* sp. C43 (Sreedevi e Reddy, 2012) e para fitase de *Pseudomonas* sp. (Selvamohan *et al.*, 2012) com adição de farinha de nachinim como substrato.

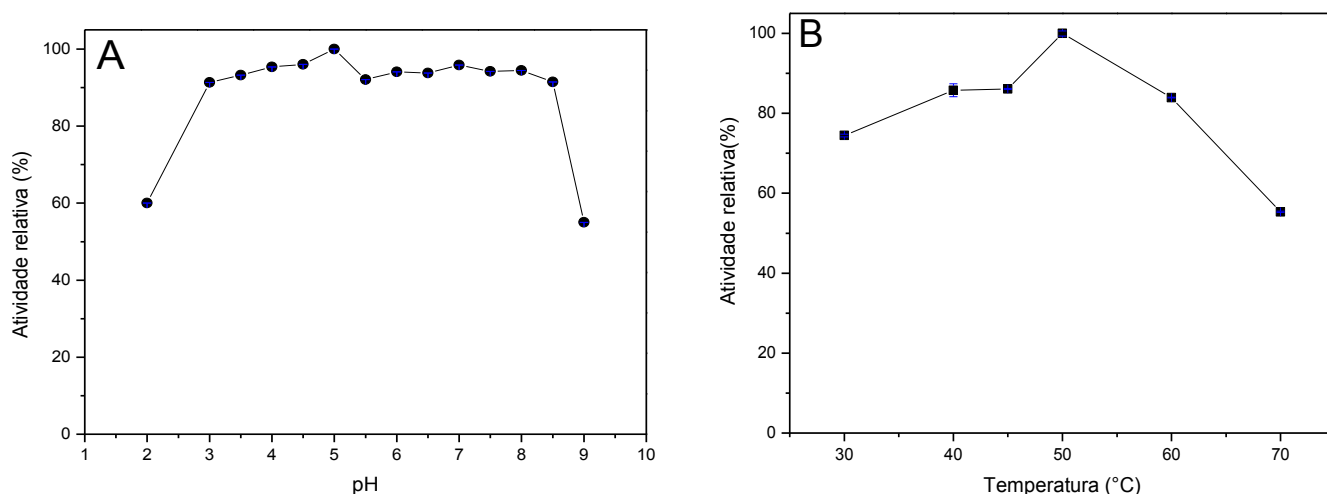
Figura 8. Produção de fitase extracelular por *R. microsporus* var. *microsporus* em FSbm em função do tempo de cultivo.



A enzima produzida por *R. microsporus* var. *microsporus* em FSbm apresentou atividade máxima em 50 °C e pH ótimo aparente de 5,0 (Figura 9). Diversos trabalhos na literatura investigaram a temperatura ótima e o pH ótimo de atividade de diversas fitases, entre eles uma revisão feita por George *et al.*, (2007) que compara uma fitase de *A. niger* com uma fitase bacteriana de *Peniophora lycii*, para as quais foram obtidas temperatura ótima de 58 °C, e pH ótimos de 5 e 5,5, respectivamente. Outro aspecto que merece destaque é a capacidade da fitase de *R. microsporus* var. *microsporus* atuar em valores de pH alcalinos, o que não foi registrado para fitases fúngicas até o presente momento.

Os resultados obtidos para fitase de *R. microsporus* var. *microsporus* assemelham-se com os dados descritos na literatura, como observado para fitase de *Aspergillus niger* (pH ótimo 2,62 e 5,05 e temperatura ótima entre 55 e 58 °C (Sariyska *et al.*, 2005), *Rhizopus oligosporus* (pH ótimo 4,5 e temperatura ótima 55 °C) (Azeke, Greiner e Jany, 2011) e *Bacillus* sp. C43 (pH ótimo 4,0 e temperatura ótima 45 °C) (Sreedevi e Reddy, 2013).

Figura 9. Determinação do pH ótimo aparente (A) e temperatura ótima aparente (B) para fitase extracelular produzida por *R. microsporus* var. *microsporus* em FSbm, meio Khanna contendo como fonte de carbono farinha de centeio 2%.



Os resultados obtidos para FSbm são de grande importância para dar continuidade ao nosso trabalho, já que este visa a produção de fitase por biofilmes, sendo interessante que o micro-organismo selecionado secrete a proteína de

interesse com alta atividade enzimática, e o conhecimento das características bioquímicas da enzima em estudo. A fermentação por biofilmes, pode ainda representar uma alternativa para o sistema de fermentação submersa, que resulta numa elevada produção.

4.2 ESTUDO MORFOLÓGICO DOS BIOFILMES DE *R. microsporus* var. *microsporus*

R. microsporus var. *microsporus* foi cultivado como descrito no item 3.5. Após a desidratação do biofilme deste fungo em diferentes concentrações de etanol (10-90%), estes foram analisados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Química da FFCLRP-USP.

A formação e a manutenção dos biofilmes são processos dinâmicos que envolvem as interações complexas de processos físicos e biológicos. Propriedades físicas de suporte como a hidrofobicidade, carga eletrostática e rugosidade da superfície são importantes na etapa inicial de aderência de bactérias, leveduras e fungos filamentosos (Cunliffe *et al.*, 1999; Webb *et al.*, 1999; Dufrene, 2000; Bigerelle *et al.*, 2002).

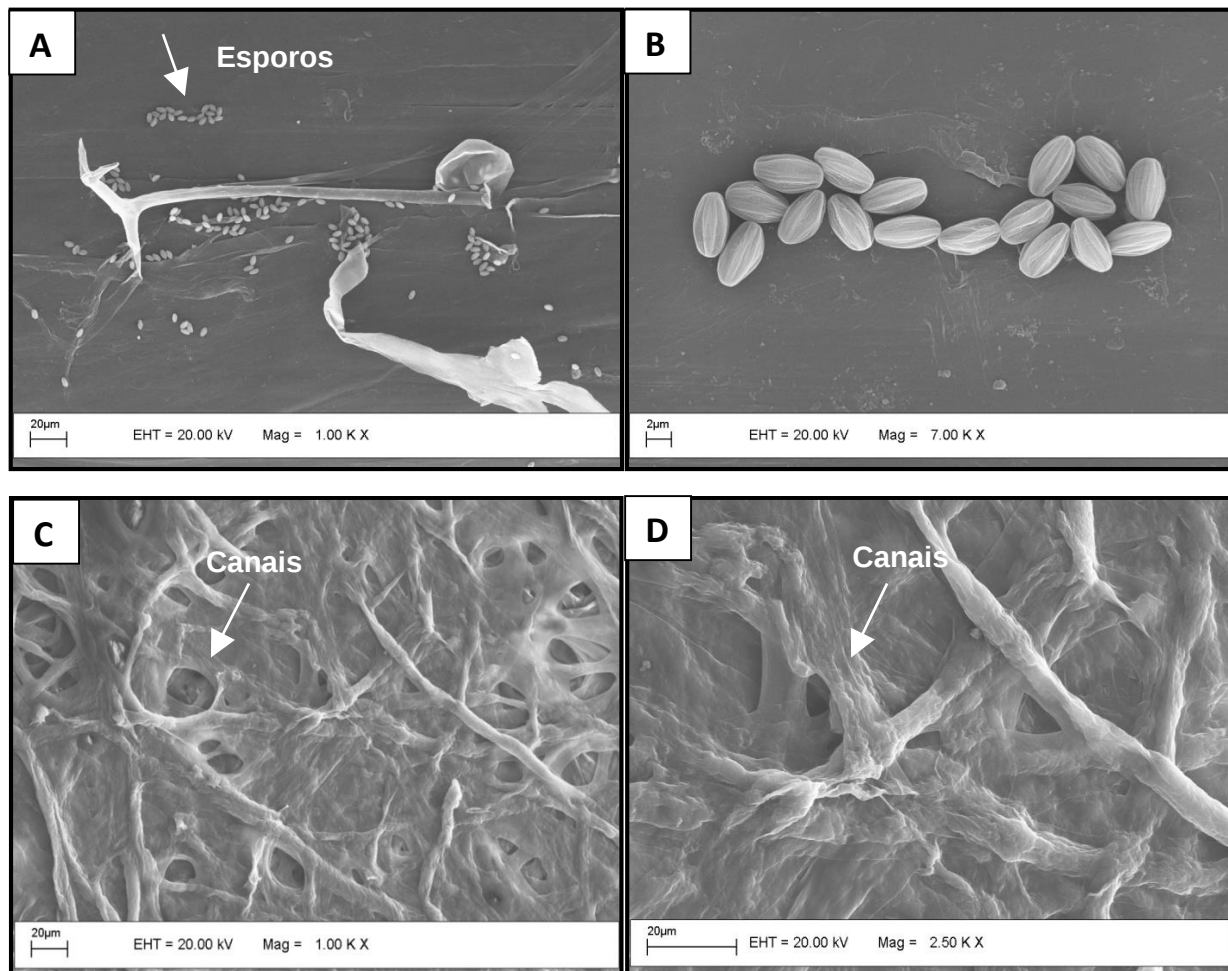
A adesão em fungos filamentosos é mediada principalmente por uma classe de pequenas proteínas anfipáticas chamadas hidrofobinas, que estabilizam a adesão de esporos e micélio a superfícies hidrofóbicas naturais e artificiais (Scholtmeijer, Wessels e Woster, 2001; Mankel, Krause e Kothe, 2002). Outras moléculas tais como glicoproteínas participam na adesão como encontrado em *Colletotrichum lindemuthianum* (Hughes *et al.*, 1999).

A adesão dos esporos de *R. microsporus* var. *microsporus* ao suporte de polietileno é apresentada na Figura 10, sendo possível observar a rugosidade da superfície dos esporos que, segundo alguns autores, pode estar relacionada com o processo de adesão ao suporte (Fig. 10B). Em condições naturais, o contato com superfícies é necessário para que os fungos possam absorver nutrientes e secretar enzimas e, ainda, para o crescimento apical das hifas. Em várias espécies de fungos, principalmente os que aderem através da produção de adesinas, a adesão pode ser considerada como um processo metabolicamente ativo (Osheroov e May, 2001; Tuckey

e Talbot 2001) envolvendo mecanismos de sinalização e expressão diferencial de genes (Gutierrez-Correa e Villena 2003). Estudos realizados com *Aspergillus niger* demonstraram uma alta capacidade de adesão a superfícies sólidas (Skowronek e Fiedurek, 2006), o que sugere uma maior produção dos biofilmes nessas condições.

O padrão morfológico do biofilme de *R. microsporus* var. *microsporus* após 48 h de crescimento (Fig. 10C e D), é caracterizado primeiro por uma agregação de esporos e depois por um crescimento de várias hifas entrelaçadas, que formam uma matriz ordenada com a formação de vários canais que permitem eficiente troca de nutrientes entre a população microbiana e o ambiente. Há também evidências que a produção de uma matriz extracelular pode aumentar a adesão (Doss, 1999). Padrões morfológicos semelhantes ao de *R. microsporus* var. *microsporus* foram observados em outros estudos com biofilmes como demonstrados para o biofilme de *A. niger* em tecido de poliéster (Villena e Gutierrez-Correa, 2007; Villena *et al.*, 2010).

Figura 10. Fotomicrografias eletrônicas de varredura do biofilme de *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*. Esporos aderidos ao suporte de polietileno (A,B); Estrutura do biofilme (48 h) (C,D).



4.3 INFLUÊNCIA DA AGITAÇÃO NA PRODUÇÃO DO BIOFILME DE *R. microsporus* var. *microsporus*

Foram realizados experimentos para determinação da melhor faixa de agitação para os cultivos utilizando biofilmes de *R. microsporus* var. *microsporus*. Os biofilmes foram cultivados em meio Khanna utilizando como fonte de carbono bagaço de cana 2%, com KH_2PO_4 0,5 mM, sob diferentes faixas de agitação (40-80 rpm). Após 48 h de crescimento, foi realizada a determinação da biomassa total e da biomassa que se soltava (livre), conforme o aumento da agitação, impossibilitando a formação do biofilme. A melhor faixa de agitação foi de 40 a 60 rpm (Tabela 7), pois os valores de biomassa total não diferiram entre eles e houve um bom desenvolvimento e maior

resistência do biofilme de *R. microsporus* var. *microsporus*. Quando utilizado a agitação 70 e 80 rpm, observou-se a diminuição da biomassa (0,90 g e 0,35 g) e uma menor resistência dos biofilmes. Desta forma, para continuidade dos estudos, foi selecionada a agitação de 50 rpm.

Tabela 7. Influência da agitação na obtenção de biofilmes de *R. microsporus* var. *microsporus*.

Agitação (rpm)	Biomassa total do biofilme (g)	Biomassa livre (g)
40	2,15	-
50	2,48	-
60	2,10	-
70	0,90	0,39
80	0,35	0,16

Para a fitase produzida por *Aspergillus niger*, em fermentação submersa a produção enzimática total de aumentou com o aumento da velocidade de agitação, 150 a 300 rpm. Além disso, a morfologia fúngica foi grandemente influenciada pela agitação, com as formas morfológicas de pequenos *pellets* e emaranhados predominantes no micélio a 150 rpm, enquanto que a forma filamentosa livre foi obtida a 300 rpm (Papagianni *et al.*, 2001). Outros estudos com biofilmes utilizaram agitação de 175 rpm e 100 rpm para celulase produzida por *Aspergillus niger* (Villena *et al.*, 2001) e para os frutooligosacarídeos de *Aspergillus phoenicis* (Aziani *et al.*, 2012) produzido no Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular, respectivamente. Para os experimentos posteriores, utilizou-se a faixa de agitação de 50 rpm para os cultivos utilizando biofilmes de *R. microsporus* var. *microsporus*.

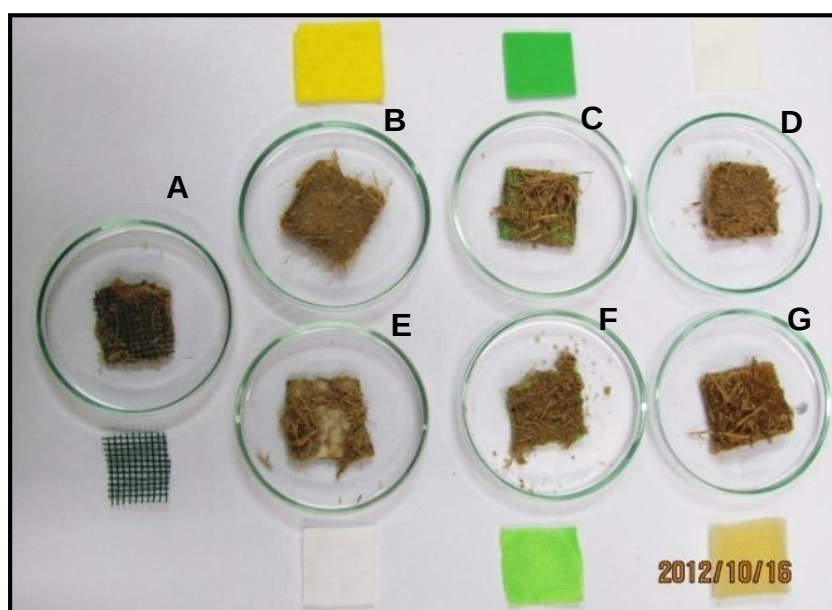
4.4 USO DE DIFERENTES SUPORTES DE ADESÃO PARA A OBTENÇÃO DOS BIOFILMES DE *R. microsporus* var. *microsporus*

Diferentes suportes inertes foram utilizados para formação de biofilmes de *R. microsporus* var. *microsporus*, sendo os cultivos realizados em meio NBRIP modificado

utilizando como fonte de carbono bagaço de cana 2% (m/v) sob agitação 50 rpm, a 30 °C. Os materiais estudados foram selecionados a partir dos seguintes critérios: disponibilidade e baixo custo, distribuição homogênea de tamanho de partículas e rugosidade superficial que permite maior superfície disponível para a adesão de micro-organismos.

Segundo Petre *et al.* (1999) e Couto *et al.* (2004), fungos filamentosos apresentam grande afinidade por superfícies inorgânicas e orgânicas, porém os mecanismos de aderências ainda não se encontram muito bem esclarecidos. Como observado na Figura 11, houve adesão e formação do biofilme de *R. microsporus* var. *microsporus* em todos os suportes. Os materiais mais utilizados para adesão de micro-organismos são espumas sintéticas de polieuretano e nylon (Couto *et al.*, 2004), mantas geotêxteis de poliamida e telas de poliéster (Villena e Gutiérrez-Correa 2003).

Figura 11. Biofilmes de *R. microsporus* var. *microsporus* em diferentes suportes: (A) tela de polietileno, (B) viscose, (C) EVA, (D) nylon, (E) TNT, (F) poliéster e (G) espuma.



A melhor produção fitásica (Tabela 8) foi observada para os biofilmes em viscose (24,09 U/mL) e tela de polietileno (24,23 U/mL). Estudos recentes em nosso laboratório utilizaram também a tela de polietileno como suporte e mostraram bons resultados para produção de frutooligossacarídeos por biofilmes de *Aspergillus*

phoenicis (Aziani *et al.*, 2012). Para os experimentos posteriores, foi padronizado o uso dos suportes tela de polietileno e viscose.

Tabela 8. Produção de fitase por biofilmes de *R. microsporus* var. *microsporus* em diferentes suportes de adesão.

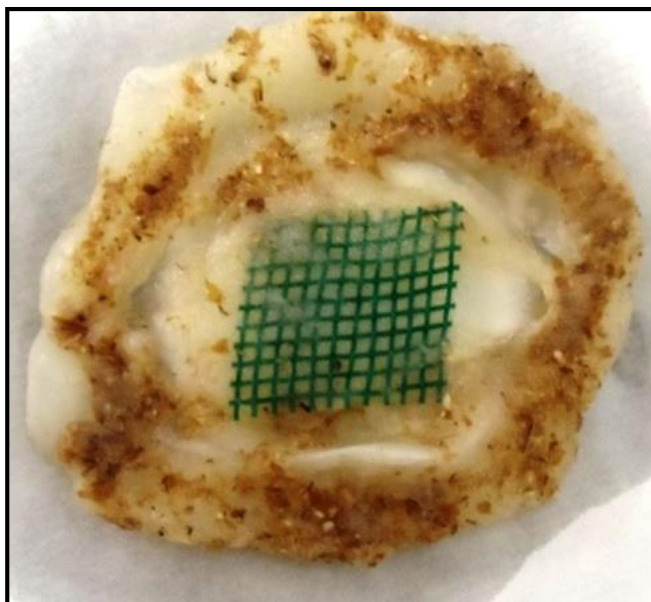
Suportes	Atividade fitásica	
	U/mL	U/mg de proteína
TNT	18,47 ± 0,23	138,5 ± 0,20
Espuma de poliuretano	20,47 ± 0,20	71,6 ± 0,67
Nylon	17,42 ± 0,67	79,5 ± 0,80
Viscose	24,09 ± 0,80	169,61 ± 0,70
Poliéster	15,85 ± 0,13	128,0 ± 0,80
Tela de polietileno	24,23 ± 0,23	163,0 ± 0,20
EVA	15,23 ± 0,70	53,3 ± 0,67

Cultivo adicionado de meio NBRIP modificado suplementado com bagaço de cana 2%, por 48h, sob agitação 50 rpm, a 30 °C.

4.5 PRODUÇÃO DE FITASE POR BIOFILMES DE *R. microsporus* var. *microsporus*

A formação dos biofilmes de *R. microsporus* var. *microsporus* sobre suporte inerte de polietileno foi inicialmente realizada em meio Khanna suplementado com farinha de centeio 2% (m/v) como fonte de carbono, sob agitação (50 rpm), por 48 h a 30° C. Nesta condição, observou-se o aumento de biomassa sobre o suporte (Figura 12), bem como a produção de fitases secretadas para o meio extracelular (7,61 U/mL).

Figura 12. Biofilme de *R. microsporus* var. *microsporus* obtido em meio Khanna utilizando como fonte de carbono farinha de centeio (20 g/L) mantido sob agitação (50 rpm), por 48 h.



Uma vez que os esporos são adsorvidos ao suporte, germinam ligados a ele, formando assim um filme. Os biofilmes podem ser desenvolvidos em superfícies bióticas ou abióticas e podem ser constituídos por uma população de uma única espécie ou por uma comunidade de múltiplas espécies (O'toole, Kaplan e Kolter, 2000; Fenchel, 2002). Os fungos filamentosos são naturalmente adaptados ao crescimento em superfícies e, nestas condições, mostram um comportamento fisiológico particular que é diferente do que em cultura submersa. Este comportamento fisiológico diferencial de fungos corresponde principalmente a uma maior produção e secreção de enzimas e também a uma diferenciação morfológica, que está ausente em culturas submersas (Akao *et al.*, 2002; Biesebeke *et al.*, 2002). As vantagens desta forma de crescimento têm sido exploradas industrialmente por dois sistemas de cultura: fermentação no estado sólido e imobilização de células em superfícies inertes.

Com o objetivo de melhorar a produção de fitases extracelulares por biofilmes do fungo *R. microsporus* var. *microsporus*, diferentes fontes de carbono foram adicionadas ao meio Khanna, dentre elas, fontes complexas como resíduos ou produtos agroindustriais de baixo custo (Tabela 9).

Tabela 9. Produção de fitase e biomassa por biofilmes do fungo *R. microsporus* var. *microsporus* utilizando diferentes fontes de carbono

Fontes de carbono	Biomassa		
	Atividade fitásica		seca
	U/mL	U/mg de proteína	g
Controle	10,8 ± 0,47	89,4 ± 0,23	0,06
Bagaço de cana	9,02 ± 0,11	34,9 ± 0,99	1,29
Bagaço de laranja	2,67 ± 0,09	2,12 ± 0,11	2,14
Farelo de Trigo	6,72 ± 0,28	10,9 ± 0,17	2,81
Farinha de Aveia	6,98 ± 0,52	11,5 ± 0,32	1,61
Farinha de Centeio	7,61 ± 0,28	12,8 ± 0,17	1,62
Soja moída	5,89 ± 0,33	5,05 ± 0,20	1,13
Frutose	6,77 ± 0,14	33,6 ± 0,09	0,13
Galactose	7,79 ± 0,70	69,1 ± 0,43	0,34
Glicose	7,58 ± 0,33	74,3 ± 0,20	0,28
Maltose	7,28 ± 0,20	52,5 ± 0,13	0,47
Sacarose	8,29 ± 0,89	94,8 ± 0,55	0,51

Meio Khanna, 48h sob agitação 50 rpm, a 30 °C

O fungo produziu baixas quantidades de fitase quando utilizados bagaço de laranja (2,12 U/mg proteína) e soja moída (5,05 U/mg proteína). O fungo *R. microsporus* var. *microsporus* produziu bons níveis de fitase extracelular utilizando açúcares, considerando-se a atividade específica, especialmente com sacarose (94,8 U/mg proteína) e glicose (74,3 U/mg proteína) como fontes de carbono. Por outro lado, a melhor produção usando resíduos agroindustriais foi obtida quando utilizado bagaço de cana (34,9 U/mg proteína) e farinha de centeio (12,8 U/mg proteína) como fonte de carbono. Apesar da melhor produção utilizando açúcares, a biomassa seca do biofilme foi menor do que a biomassa obtida na presença de produtos agro-industriais como fontes de carbono. Além disso, o desenvolvimento do biofilme na ausência da fonte de carbono foi extremamente reduzido (0,06 g).

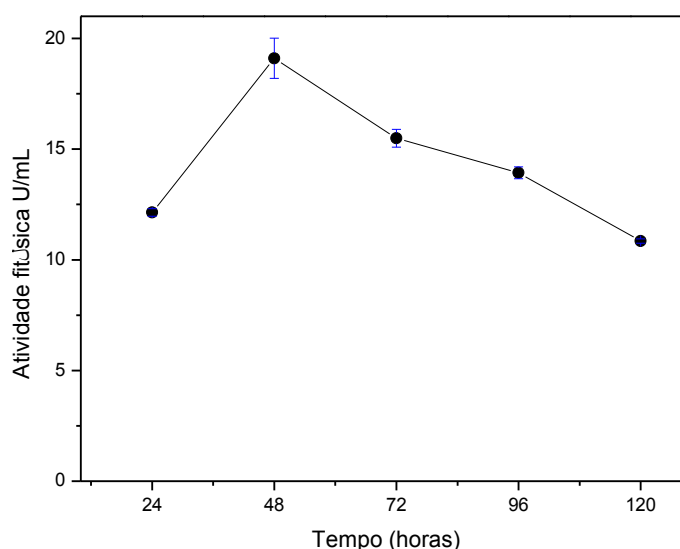
Considerando este aspecto, bem como que a produção de fitases utilizando bagaço de cana foi 2,7 vezes mais elevado do que o obtido para a farinha de centeio, e este foi selecionado como fonte de carbono para a produção de fitase. Além disso, a atividade específica obtida quando açúcares foram utilizados como fontes de carbono apresentaram valores mais elevados, devido os baixos níveis de proteína. O bagaço de cana é um resíduo gerado em grandes quantidades pelas indústrias de açúcar e álcool no Brasil (Cardona, Quintero e Paz, 2010) e vários autores têm utilizado bagaço de cana como fonte de carbono para a produção de enzimas (Guimarães *et al.*, 2007; Guimarães *et al.*, 2009; Ribeiro *et al.*, 2012). De acordo com Pandey *et al.* (2001), a energia necessária, bem como o suporte físico (em fermentação e estado sólido), para o crescimento do fungo e a consequente produção de metabólitos desejados são fornecidos principalmente pela fonte de carbono. Assim, provavelmente, o bagaço de cana contendo sacarose promove um melhor desenvolvimento do fungo e, conseqüentemente, um aumento na produção da enzima.

Há na literatura relatos da utilização de outros tipos de resíduos como fonte de carbono visando a produção de enzimas, como o trabalho de Spier *et al.* (2011), que padronizou a produção de fitase em cultivo com polpa cítrica. O farelo de trigo é bastante relatado na produção de diversas enzimas com aplicabilidade industrial, tais como celulases, xilanases e fitases por *Aspergillus japonicus* (Guimarães *et al.*, 2013). Roopesh *et al.* (2006) otimizaram a produção de fitases por *Mucor racemosus* em farelo de trigo, porém nesta fonte a produção de fitase por *R. microsporus* var. *microsporus* não destacou-se. Sendo um resíduo agroindustrial, o bagaço de cana apresenta baixos custos, proporcionando condições mais viáveis para produção em larga escala.

A produção máxima de fitases por biofilmes de *R. microsporus* var. *microsporus*, foi obtida com 48 h de cultivo (Figura 13), sendo o tempo de cultivo menor quando comparado a produção em FSbm (72 h). A atividade máxima da fitase de *Saccharomyces cerevisiae* CY também foi obtida com 48 h de cultivo com 10% de galactose como fonte de carbono (In, Seo e Oh, 2008). Outros períodos diferentes para produção de fitase por micro-organismos foram relatados como, por exemplo, 14 h. para fitase de *E. coli* (Kleist *et al.*, 2003) e 120 h para a de *Bacillus* sp. KHU-10

(Choi, Suh e Kim, 2001). Para os experimentos posteriores foi padronizado bagaço de cana como fonte de carbono.

Figura 13. Produção de fitase extracelular por biofilmes de *R. microsporus* var. *microsporus*, em função do tempo de cultivo, em meio contendo bagaço de cana como fonte de carbono.



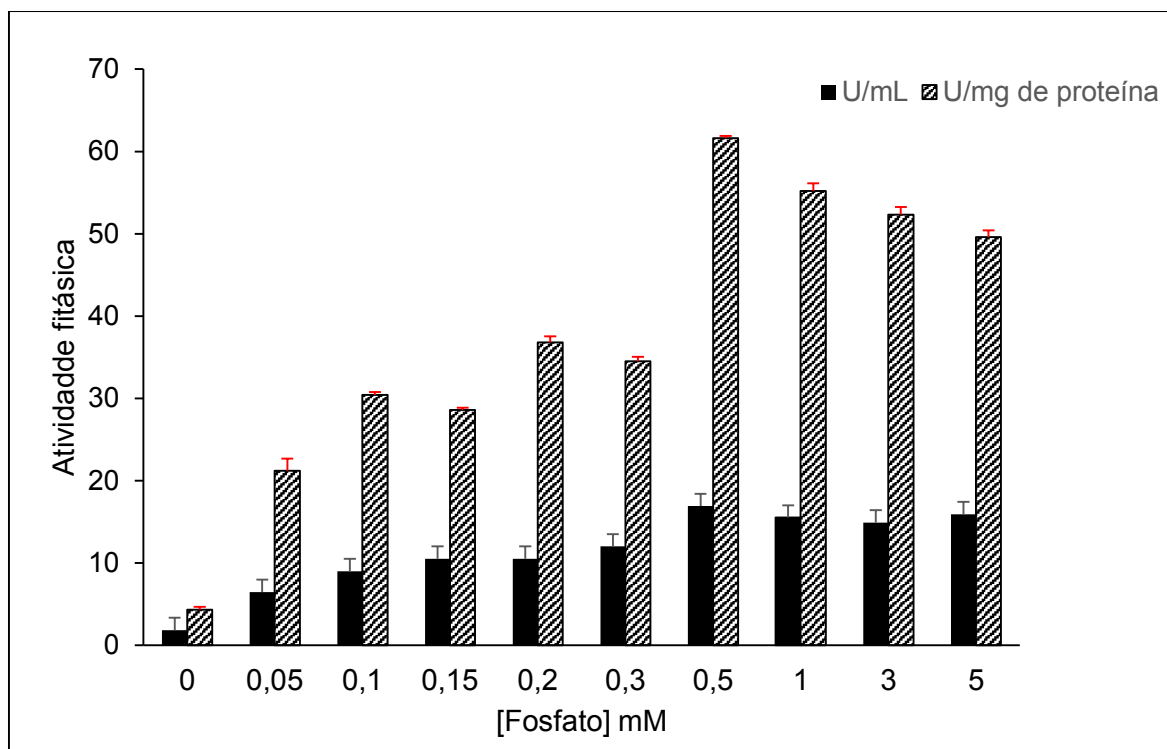
4.5.1 Efeito da adição de diferentes concentrações de fosfato ao meio de cultivo

Após a determinação da melhor fonte de carbono, a influência de diferentes concentrações de KH_2PO_4 (0-5 mM) adicionadas ao meio Khanna modificado (sem adição de extrato de levedura) na produção enzimática por biofilmes foi avaliada. A maior produção, fitásica (Figura 14) foi observada em 0,5 mM de KH_2PO_4 (61,6 U/mg) e diminuição da expressão quando cultivada em altas concentrações de fosfato de potássio. Os comportamentos observados demonstraram que a fitase foi produzida quando células em multiplicação foram submetidas a limitações de KH_2PO_4 nutricional, sugerindo que existe uma forte ligação entre a utilização de fosfato exógeno, a mobilização das reservas endógena e a produção dessas fitases. Tendo em vista que a presença de fosfato no meio de cultivo induziu a síntese de fitases, nossos resultados sugerem que sua expressão pode ser regulada por meio das concentrações de fosfato no meio de crescimento, e que esta enzima é sintetizada exclusivamente sob condições limitantes de KH_2PO_4 . Resultados similares foram

obtidos para fosfatases e fitases produzida por outros micro-organismos (Howson e Davis, 1983; Vohra e Satyanarayana, 2003; Yeung, S.-L. *et al.*, 2009). Essa afirmação pode ser reforçada quando analisado o teor de macronutrientes (Bataglia *et al.*, 1983) dos substratos (fontes de carbono) utilizados, sendo obtida a maior atividade fitásica em presença de bagaço de cana que, continha menor quantidade de fosfato inorgânico (0,12 g/kg) quando comparado a farinha de centeio (2,21 g/kg) e a soja moída (4,57 g/kg).

As concentrações de fosfato inorgânico superiores a 5 µg/mL são capazes de inibir a síntese de fitases em muitos fungos (Vats e Banerjee, 2004; Quan *et al.*, 2001). Por outro lado, baixas concentrações de fosfato inorgânico podem induzir a síntese de fitase, como é o caso da fitase de *A. niger* FS3 (Spier *et al.*, 2009). Já a fitase da levedura *Cryptococcus laurentii* foi completamente inibida com 0,5 mM de fosfato inorgânico (Van Staden *et al.*, 2007). Dvorakovà *et al.* (1997) relataram que a fitase de *A. niger* foi inibida por fosfato inorgânico a 2,85 mmol/L, uma inibição não-competitiva. Para os experimentos posteriores, foi padronizado a utilização de 0,5 mM de KH_2PO_4 .

Figura 14. Produção de fitase por biofilmes de *R. microsporus* var. *microsporus* em diferentes concentrações de fosfato adicionadas em meio Khanna modificado, bagaço de cana 2%, por 48h, sob agitação 50 rpm, a 30 °C.



4.5.2 Produção da fitase em diferentes meios de cultivo com 0,5 mM de KH_2PO_4

Como determinado anteriormente, a maior produção fitásica foi observada em meio Khanna adicionando de 0,5 mM de KH_2PO_4 utilizando como fonte de carbono bagaço de cana 2% (m/v). Com o objetivo de melhorar a produção de fitase por biofilmes de *R. microsporus* var. *microsporus* foi realizado o inóculo do fungo em seis diferentes meios de cultivo, sendo: Khanna (Khanna et al, 1995), Czapeck (Wiseman, 1975), Vogel (Vogel, 1964), SR (Rizatti et al., 2001) e NBRIP (Nautiyal, 1999) modificado.

A maior produção de fitase (Tabela 10) foi detectada em meio NBRIP modificado (sem adição de glicose) (69,9 U/mg proteína), seguido pelo meio Khanna (46,3 U/mg proteína). Os meios de cultivo testados distinguem-se pelas quantidades de sais utilizados e verificou-se grande diferença na produção fitásica. O meio NBRIP destacou-se ainda, por proporcionar uma produção enzimática 20 vezes maior que o meio SR (3,41 U/mg). Sendo assim, considerando a ótima produção obtida em meio NBRIP modificado e que este é utilizado em vários trabalhos para busca e seleção de micro-organismos solubilizadores de fosfato (Panhwar et al., 2009; Walpola et al., 2012; Xiao et al., 2013; Lu et al., 2014; Zhu et al., 2014), e que o meio Khanna foi utilizado em todos os experimentos anteriores sendo obtida uma boa atividade fitásica, ambos foram selecionados para os experimentos posteriores.

Tabela 10. Produção de fitases por biofilmes de *R. microsporus* var. *microsporus* em diferentes meios adicionados com bagaço de cana 2%, 50 rpm, mantidos a 30 °C, 48 h.

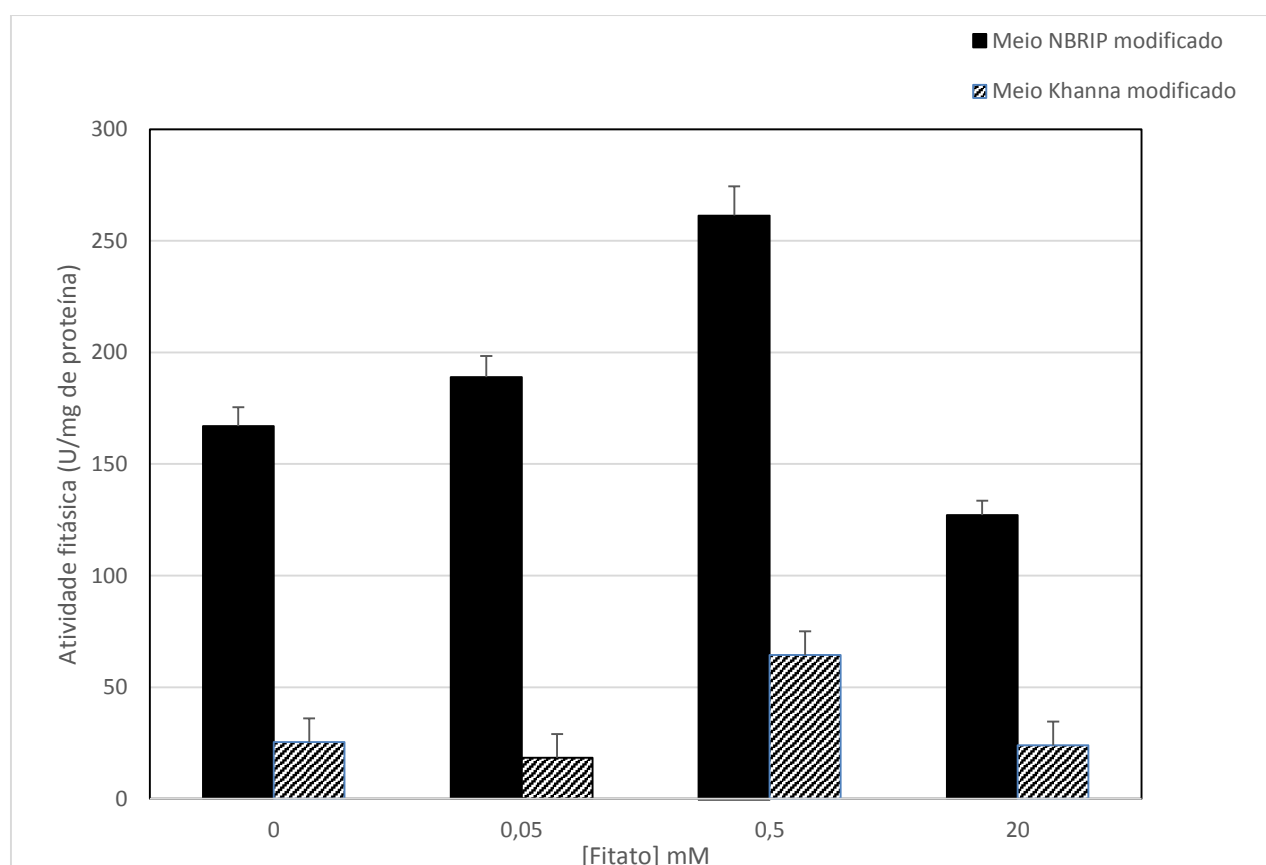
Meios	Atividade fitásica	
	U/mL	U/mg de proteína
Khanna	3,04	46,3
Czapeck	5,07	8,79
Vogel	3,98	11,5
M5	3,53	15,7
SR	1,57	3,41
NBRIP modificado	3,63	69,9

4.5.3 Efeito da adição de diferentes concentrações de fitato de sódio ao meio de cultivo

Após a determinação dos melhores meios de cultivo para produção de fitases por biofilmes de *R. microsporus* var. *microsporus*, a influência de diferentes concentrações de fitato de sódio (Sigma®) nos meios de cultivo NBRIP modificado (sem adição de glicose) e Khanna modificado (sem adição de extrato de levedura) utilizando 2% de bagaço de cana como fonte de carbono, foi analisada. Em meio Khanna, contendo 0,5 mM de fitato como fonte de fósforo orgânico, observou-se um aumento de 1,4 vezes na produção enzimática (Figura 15) e de 2,6 vezes para o meio NBRIP modificado se comparado ao meio sem adição de fitato (Figura 15). A produção enzimática em meio NBRIP modificado foi 4 vezes maior que a obtida em meio Khanna modificado, considerando a adição de 0,5 mM de fitato. Quando utilizadas altas concentrações de fosfato (20 mM) houve diminuição da produção. Tem-se relatado que a atividade das fosfatases de micro-organismos pode ser reprimida por concentrações crescentes de fosfato (Nahas, 1989; Freitas-Mesquita e Meyer-Fernandes, 2014). Estes resultados sugerem mais uma vez que a expressão da fitase

de *R. microsporus* var. *microsporus* pode ser regulada por meio das concentrações de fosfato no meio de crescimento, e que esta enzima é sintetizada exclusivamente sob condições limitantes de fosfato. Resultados similares foram obtidos para fosfatases e fitases produzidas por outros micro-organismos (Howson e Davis, 1983; Ehrlich *et al.*, 1994; Tu *et al.*, 2011; Yeung, *et al.*, 2009; Rombola *et al.*, 2014). Para os experimentos posteriores, optou-se pela utilização de meio NBRIP modificado, com 0,5 mM de KH_2PO_4 , considerando, que este reagente possui um custo bem menor que o fitato de sódio. Porém, como a atividade fitásica foi máxima em meio NBRIP modificado com 0,5 mM de fitato de sódio, este foi utilizado para facilitar os trabalhos posteriores de purificação da enzima de interesse.

Figura 15. Produção de fitase por biofilmes de *R. microsporus* var. *microsporus* em diferentes concentrações de fitato de sódio adicionadas ao meio NBRIP modificado e Khanna modificado.



4.6 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA FITASE EXTRACELULAR PRODUZIDA POR BIOFILMES DE *R. microsporus* var. *microsporus*

As reações para verificação da melhor temperatura de atividade e determinação do pH ótimo para atividade fitásica foram realizadas entre 30°C e 80°C, e o pH entre 2,5 e 8,5. Quanto a temperatura de atividade fitásica observa-se um ótimo em 40 °C (Figura 16B). A fitase produzida por *R. microsporus* var. *microsporus* apresentou dois picos de atividade, um mais acentuado em pH 4,5, e outro em pH 6,5 (Figura 16A).. Na literatura, não existem trabalhos que relatam a caracterização bioquímica de fitases produzidas por biofilmes. Porém em outras formas de cultivo, a maioria das fitases é ativa em uma faixa de pH de 4,5 a 6,0. George *et al.* (2007) compararam uma fitase de *A. niger* com uma de *Peniophora lycii*, sendo observados valores de pH ótimos de 5 e 5,5. Quando se trata de fitases é difícil encontrar mais de um pico de atividade, como para a linhagem mesófila *A. niger* NRRL 3135 que produziu duas fitases diferentes designadas como phyA e phyB, uma com pH ótimo de 5,5 e a outra com pH ótimo de 2,0, respectivamente (Howson e Davis, 1983).

Diversos trabalhos investigaram a temperatura ótima de reação das fitases, e relataram fitases com atividade ótima entre 40 °C e 60 °C, como as obtidas para os fungos *A. fumigatus* e *A. niger* NRRL 3135, com atividade ótima em 37°C (Pasamontes *et al.*, 1997) e em 55°C (Howson e Davis, 1983), respectivamente. No entanto, fitases de *Aerobacter aerogenes* e *Candida krusei* Wz-001 mostraram temperaturas ótimas de 25 °C e 40 °C, respectivamente (Greaves *et al.*, 1967; Quan *et al.*, 2002). Sendo assim, isso demonstra que essas enzimas podem atuar em diversas temperaturas, podendo ser aplicadas em processos industriais que requerem baixas ou altas temperaturas.

Foram ainda realizados testes de estabilidade ao pH e a temperatura da fitase produzida por biofilmes de *R. microsporus* var. *microsporus*. Neste caso, a fitase mostrou-se estável nas temperaturas de 30 °C e 37 °C durante 120 min de incubação (Figura 16D). Entretanto, a atividade foi menor quando submetida a temperaturas elevadas (50 e 60 °C) com meia vida (t_{50}) de 120 min em 60 °C. Jermutus *et al.* (2001) obtiveram meia vida de 138 min a 49 °C para fitase de *A. niger* e 53 min para fitase de *A. terreus*. Estudos de estabilidade da enzima produzida por *A. niger* mostraram uma meia vida de 30 min a 65°C (Vats e Banerjee, 2005). A fitase de *R. microsporus*

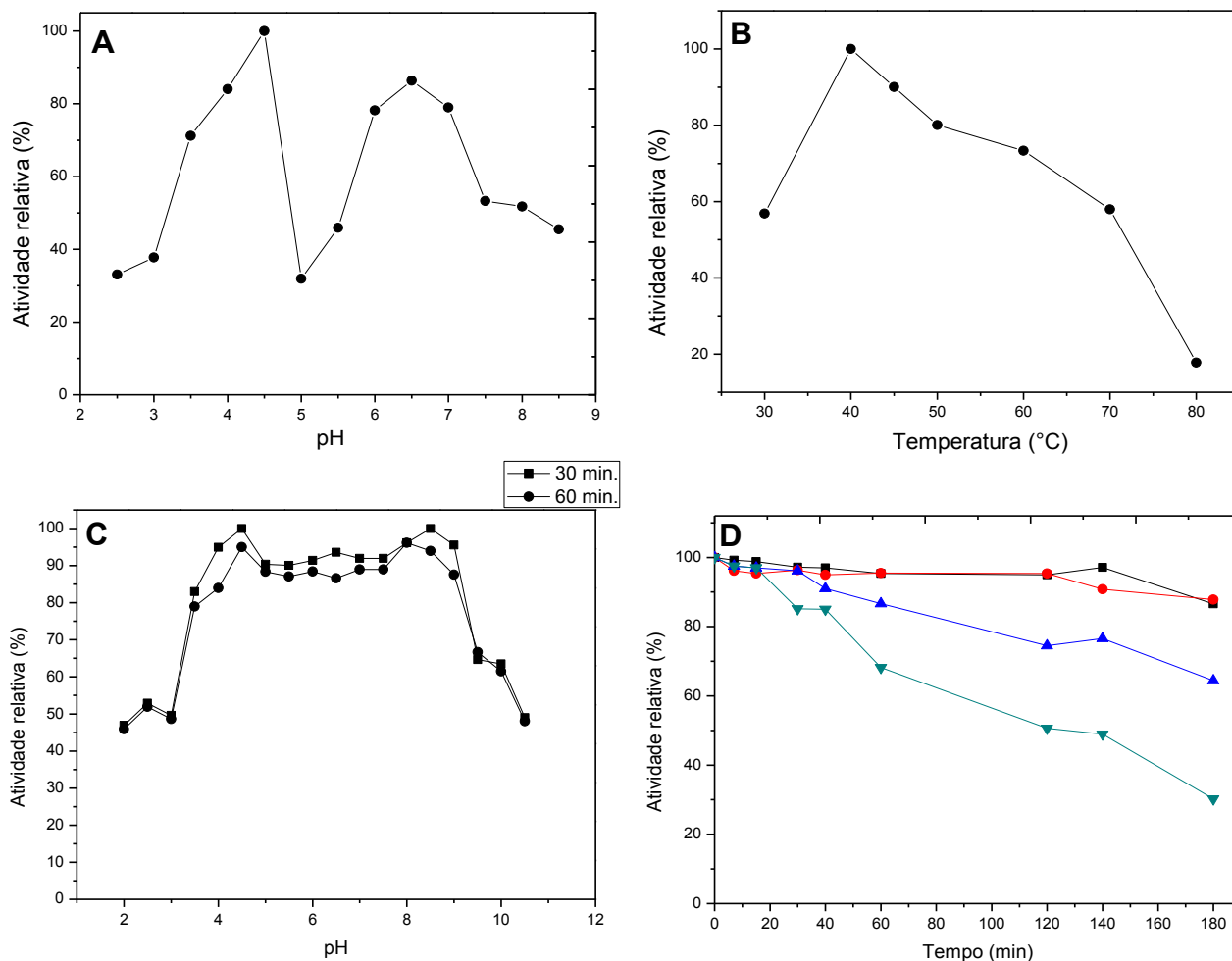
var. *microsporus* apresentou maior estabilidade a temperaturas maiores quando comparada as estabilidades para fitases de outras fontes. Já a enzima do fungo termófilo *Sporotrichum thermophile* foi estável a 60 °C com uma meia vida de 16 h (Singh e Satyanarayana, 2009).

Quanto a exposição a diferentes valores de pH, esta mostrou-se estável com atividade residual acima de 50% na faixa de 4,0 a 8,5 por 30-60 min (Figura 16C). Porém, em pH muito ácido (2,0; 3,0) ou alcalino (9,5-10,5) a fitase de *R. microsporus* var. *microsporus* não apresentou boa estabilidade.

A fitase Phyll de *A. niger* mostrou estabilidade na faixa de pH 3,5-9,0 em temperatura ambiente por um período de 12 h de incubação (Soni, Magdum e Khire, 2010). A atividade da fitase recombinante r-APPA de *Yersinia kristeensenii* reteve mais que 90% da atividade inicial depois de incubada em pH 1.5-11,0 a 37 °C por 3 h (FU et al., 2008).

Para que as fitases sejam efetivas, estas precisam resistir à ação do pH estomacal, ser termorresistentes para que não sejam inativadas pela temperatura do processamento do alimento e ainda estáveis durante a estocagem (Nunes et al., 2001). A fitase produzida por *R. microsporus* var. *microsporus* mostrou-se estável em pH ácidos e na temperatura de 50 °C, sendo bastante viável a sua aplicação em rações para dieta de aves

Figura 16. Determinação do pH ótimo aparente (A) e temperatura ótima aparente (B) Estabilidade ao pH (C) durante 30 min (■) e 60 min (●), e estabilidade térmica (D) em (■) 30 °C, (●) 37 °C, (▲) 50 °C, (◄) 60 °C para fitase extracelular produzida por biofilmes de *R. microsporus* var. *microsporus*.



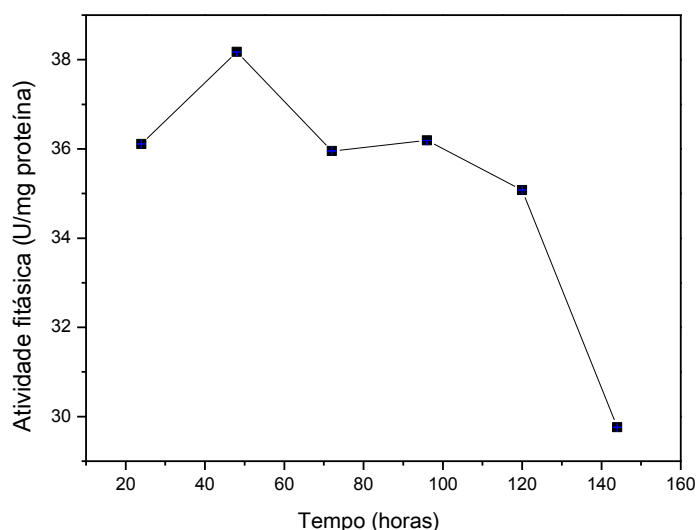
4.7 PRODUÇÃO DE FITASES POR BIOFILMES DE *R. microsporus* var. *microsporus* EM BIORREATORES

Os biofilmes do fungo *R. microsporus* var. *microsporus* já formados foram adicionados ao biorreator contendo meio Khanna, com KH_2PO_4 0,5 mM, utilizando bagaço de cana como fonte de carbono, como anteriormente padronizado. Após 48 h de crescimento em biorreator para um primeiro teste de produção da enzima, foi realizada a dosagem da atividade enzimática, obtendo-se 10 U/mL (33,3 U/mg de proteína), sendo este valor representado tanto pela FB como por FSbm já que foi

observado também formação de micélio livre no biorreator, o que não é interessante. Desarranjo estrutural das telas de polietileno com apenas o movimento gerado pela aeração foi também observado. No cultivo com fungos filamentosos, a alta frequência de agitação e aeração pode provocar ruptura do micélio, gerando redução tanto da biomassa quanto da produção enzimática (Baley e Pessa, 1990). Assim, padronizações para fixação do biofilme de *R. microsporus* var. *microsporus* foram realizados juntamente com estudos comparativos para FSbm em biorreatores.

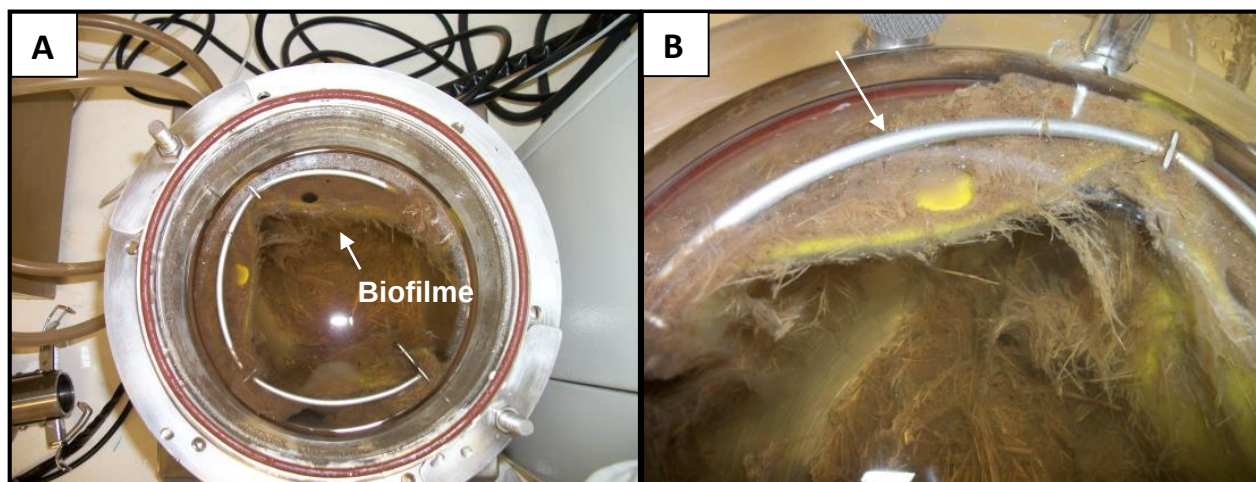
A produção máxima (38,17 U/mL) de fitases extracelulares por *R. microsporus* var. *microsporus* em biorreator (FSbm) foi obtida com 48 h de cultivo. A produção fitásica foi menor em 144 h (Figura 17). Para produção utilizando frascos agitados, foi necessário o tempo de 72 h para atingir a produção máxima (18,2 U/mL), o que demonstra que a utilização de biorreatores para FSbm por este fungo proporciona produção maior em um tempo menor. Sendo assim a produção máxima da enzima fitase foi obtida quando realizada em biorreator.

Figura 17. Produção de fitase extracelular por *R. microsporus* var. *microsporus* em biorreator (FSbm) em função do tempo de cultivo.



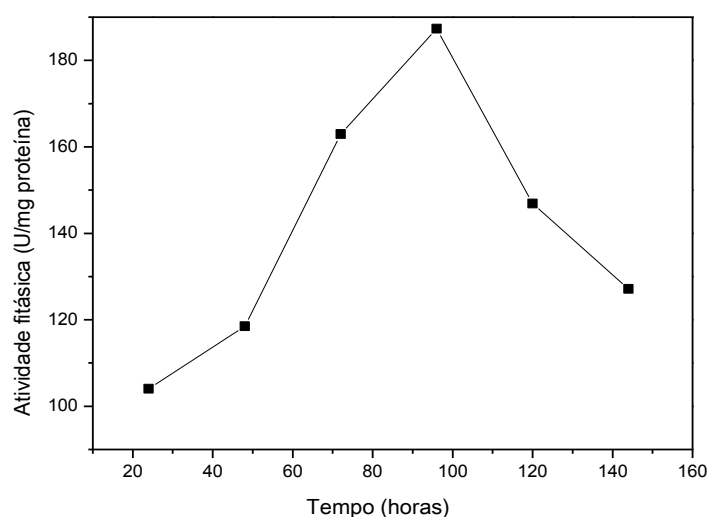
Considerando que os experimentos iniciais para produção fitásica por biofilmes de *R. microsporus* var. *microsporus* em biorreator não foram muito satisfatórios foram realizados testes para produção do biofilme fixado a um suporte no fundo do biorreator (Figura 18), objetivando a redução do desarranjo estrutural dos biofilmes e a eliminação de micélio livre. Neste caso, a viscose foi utilizada como suporte para formação do biofilme de *R. microsporus* var. *microsporus*, como descrito no item 3.4.2.

Figura 18. Biofilme de *R. microsporus* var. *microsporus* em biorreator utilizando viscose como suporte de adesão.



Após 48 h de crescimento, já foi possível observar a formação do biofilme de *R. microsporus* var. *microsporus*, sem a formação de micélio livre. Alíquotas foram coletadas do biorreator, de 24-144 h, e usadas para determinação da atividade fitásica. A melhor produção fitásica foi obtida com 96 h de crescimento (187,3 U/mg de proteína) (Figura 19).

Figura 19. Produção de fitase por biofilmes de *R. microsporus* var. *microsporus* em biorreator em função do tempo de cultivo.



Diversos trabalhos descrevem produção de fitases em biorreator, como a fitase de *Aspergillus ficuum*, que foi covalentemente imobilizada e aplicada em biorreator de leito fluidizado. Quando a solução de substrato foi recirculada durante 5 h no biorreator, cerca de 50% de ortofosfato inorgânico foi liberado e mioinositol-difosfato e mono-fosfato foram os únicos produtos restantes (Ullah e Cummins, 1988b). Kleist *et al.* (2003) estudaram a fitase de *Escherichia coli* sob diferentes estratégias de alimentação de glicose em cultivos realizados em biorreatores, mantendo baixos níveis de oxigênio dissolvido no meio de cultura. Na literatura, não foram encontrados trabalhos que relatam a produção desta enzima por biofilmes em biorreatores, sendo uma alternativa vantajosa, já que o potencial de liberação de enzimas dessa estrutura é pouco conhecido.

As maiores aplicações de biofilmes estão na remoção de partículas e contaminantes dissolvidos em águas naturais em estações de tratamento de água e esgoto, por intermédio de vários tipos de processos como filtros biológicos, bio-discos e reatores de leito fluidizado. Sendo assim, isso demonstra que o estudo de biofilmes em biorreatores para a produção de enzimas de interesse biotecnológico é bastante promissor.

Parte II
Purificação e Caracterização
Bioquímica

4.8 PURIFICAÇÃO DA FITASE PRODUZIDA POR BIOFILMES DE *R. microsporus* var. *microsporus*

A fitase do fungo *R. microsporus* var. *microsporus* foi produzida em FB utilizando como fonte de carbono bagaço de cana 2%, agitação 50 rpm, 48 h, 30 °C.

Para purificação da fitase produzida por biofilmes de *R. microsporus* var. *microsporus*, foi feita a determinação enzimática das frações por meio do método de atividade *p*-nitrofenilfosfatásica (descrito anteriormente no item 3.8.1). Após reunidas as frações (pools) com atividade fosfatásica foi realizada a determinação da atividade fitásica como descrito no item 3.8.2.

O extrato bruto extracelular obtido em FB por *R. microsporus* var. *microsporus* foi aplicado em coluna cromatográfica DEAE-Celulose. Nesta condição, dois picos de atividade foram obtidos, sendo pico I a fração que não interagiu com a resina e o pico II a fração que interagiu com a resina (Figura 20A). Tanto o pico I quanto o pico II apresentaram atividade fitásica, sendo a fração fitásica eluída (pico II) com 0,25 M de NaCl através de um gradiente linear (0-1 M).

As frações com atividade fitásica do pico I (não interagiu) foram reunidas em um *pool*, dialisado contra água destilada *overnight*, a 4 °C, e aplicado em coluna CM-Celulose (Figura 20B), sendo eluída com 0,5 M NaCl como única forma. Por estes dois passos cromatográficos, a enzima foi purificada 4,18 vezes com recuperação de 4,78% (Tabela 11). Em PAGE, revelou-se uma banda proteica e em SDS-PAGE, foi revelada uma única banda proteica de aproximadamente 34 kDa (Figura 21).

Fitases são proteínas de massa molecular bastante variável de 40 a 500 kDa (Yao *et al.*, 2012). A fitase de *A. niger* van *Teighem* possui 66 kDa (Vats e Banerjee, 2005) a de *A. ficcum* 67 kDa (Zhang *et al.*, 2010), a de *C. krusei* Wz-001, 330 kDa (Quan *et al.*, 2002) e a de *Selenomonas ruminantium*, 46 kDa (Yanke, Selinger e Cheng, 1999).

Figura 20. Perfis cromatográficos em colunas DEAE-celulose (A) e CM-celulose (B) para a fitase produzida por *R. microsporus* var. *microsporus* em FB utilizando bagaço de cana de açúcar como fonte de carbono. Símbolos: (■) Absorbância 280 nm, (●) Atividade *p*-nitrofenilfosfatásica (U/mL).

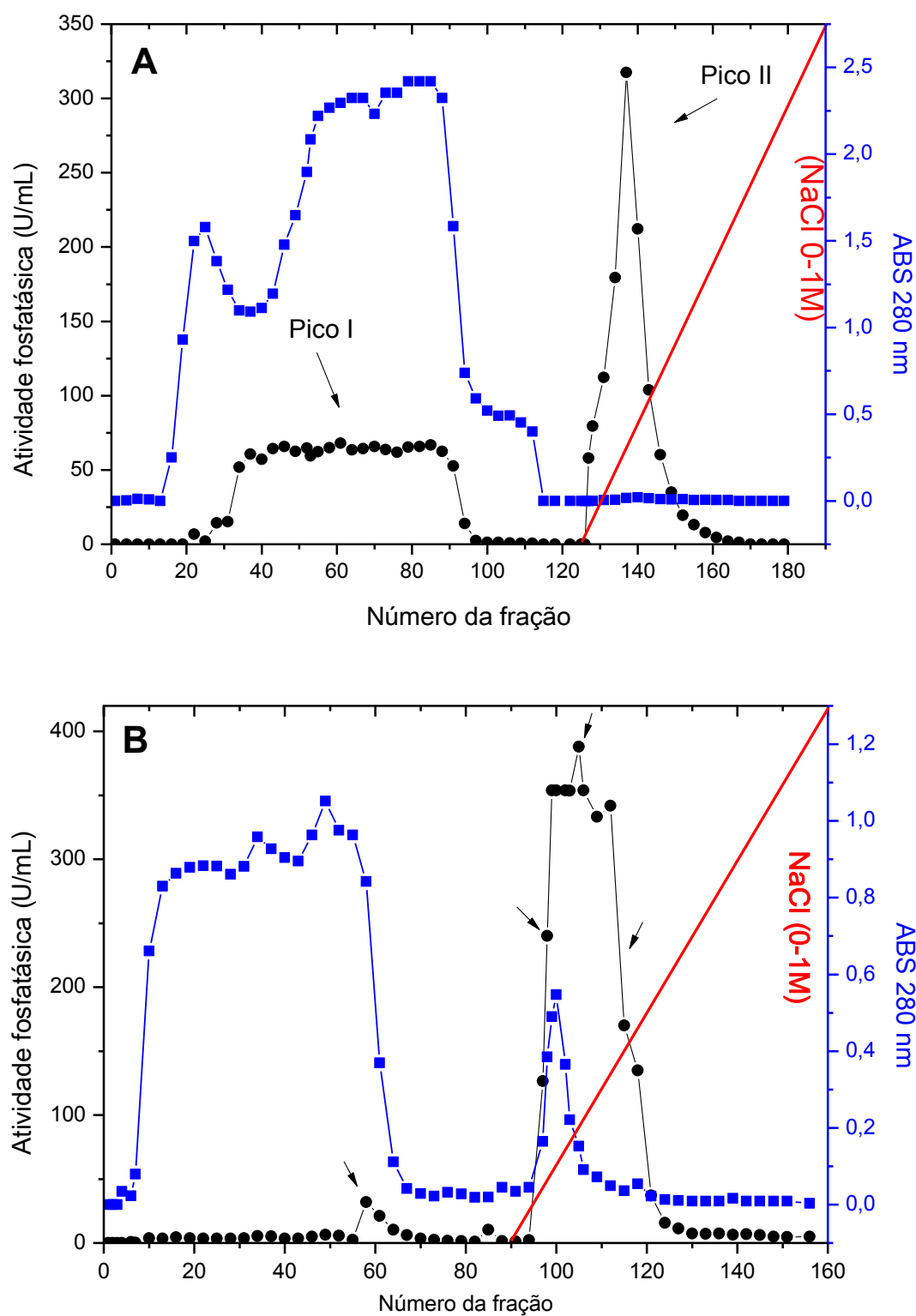


Figura 21. Perfis eletroforéticos em SDS-PAGE 12% (A) e PAGE 6% (B) para a fitase produzida por biofilmes de *R. microsporus* var. *microsporus* corados com Comassie Brilliant-Blue R250.

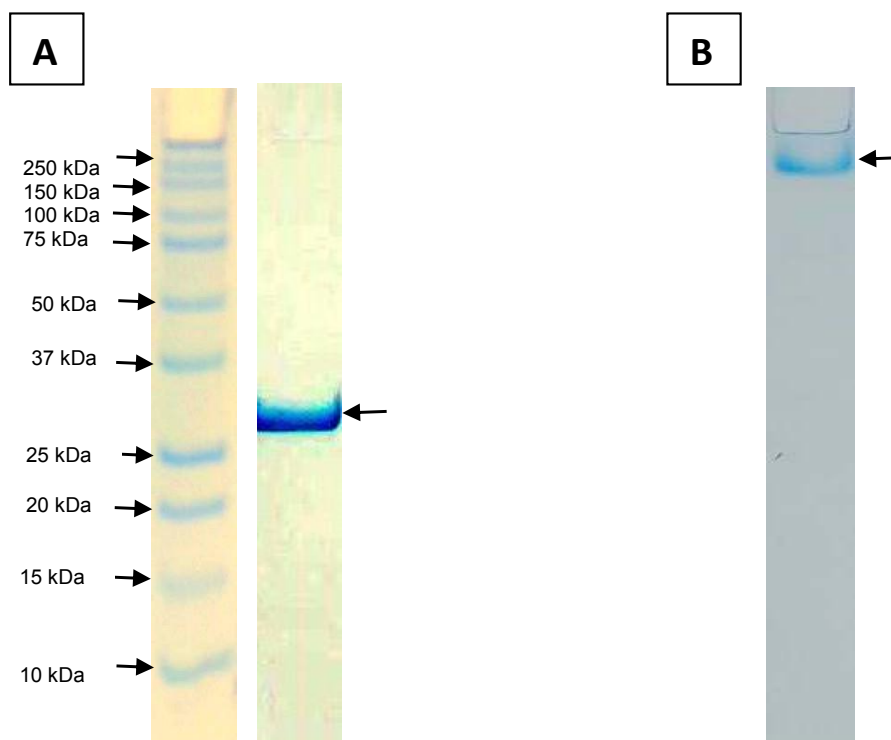


Tabela 11. Purificação da fitase produzida por biofilmes de *R. microsporus* var. *microsporus*.

Passo de purificação	Vol. (mL)	Atividade U totais	Proteína (mg total)	Ativ. Esp. (U/mg)	Rec. (%)	Fator purific. (vezes)
Extrato Bruto	180	9546,0	17,5	545,5	100	1
DEAE-Celulose	95	2098,5	8,3	252,8	22,0	0,5
CM- Celulose	25	457,0	0,2	2285,0	4,78	4,18

Vol=volume; Ativ. Esp= atividade específica; Rec.=recuperação; Fator purific.= fator de purificação

A fitase de *E. coli* foi purificada usando precipitação por sulfato de amônio (25 a 80% de saturação), seguida por cromatografia em CM-sepharose CL6 B, DEAE-sepharose CL6B, fenil sepharose CL4B e MonoS HR, 5/5 (Greiner, Konietzny e Jany, 1993). Lim *et al.* (2000) purificaram a fitase de *E. coli*, a qual foi separada por *chromatofocusing* em duas isoformas de tamanhos idênticos com pontos isoelétricos de 6,5 e 6,3.

4.9 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA FITASE DE *R. microsporus* var. *microsporus* PURIFICADA

4.9.1 Influência da temperatura e do pH sobre a atividade fitásica

A fitase produzida por *R. microsporus* var. *microsporus* purificada apresentou um único pico para atividade em pH 4,5 (Figura 22A) enquanto o extrato bruto apresentou dois picos de atividade, um mais acentuado em pH 4,5, e outro em pH 6,5 (descrito no item 4.6). A fitase produzida por *R. microsporus* var. *microsporus* também foi ativa em pH alcalino, o que é bastante interessante já que não há estudos que relatem fitases em pH alcalino para fungos, tendo sido registradas fitases do gênero *Bacillus* (Gulati *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2011).

Quanto à temperatura de atividade fitásica observou-se uma temperatura ótima de 55 °C (Figura 22B) enquanto para o extrato bruto foi observada uma temperatura ótima de 40 °C. Isso se deve ao fato de que o extrato bruto contém uma série de outras proteínas, metabólitos e componentes do próprio meio de cultivo que influenciam na proteção térmica da enzima.

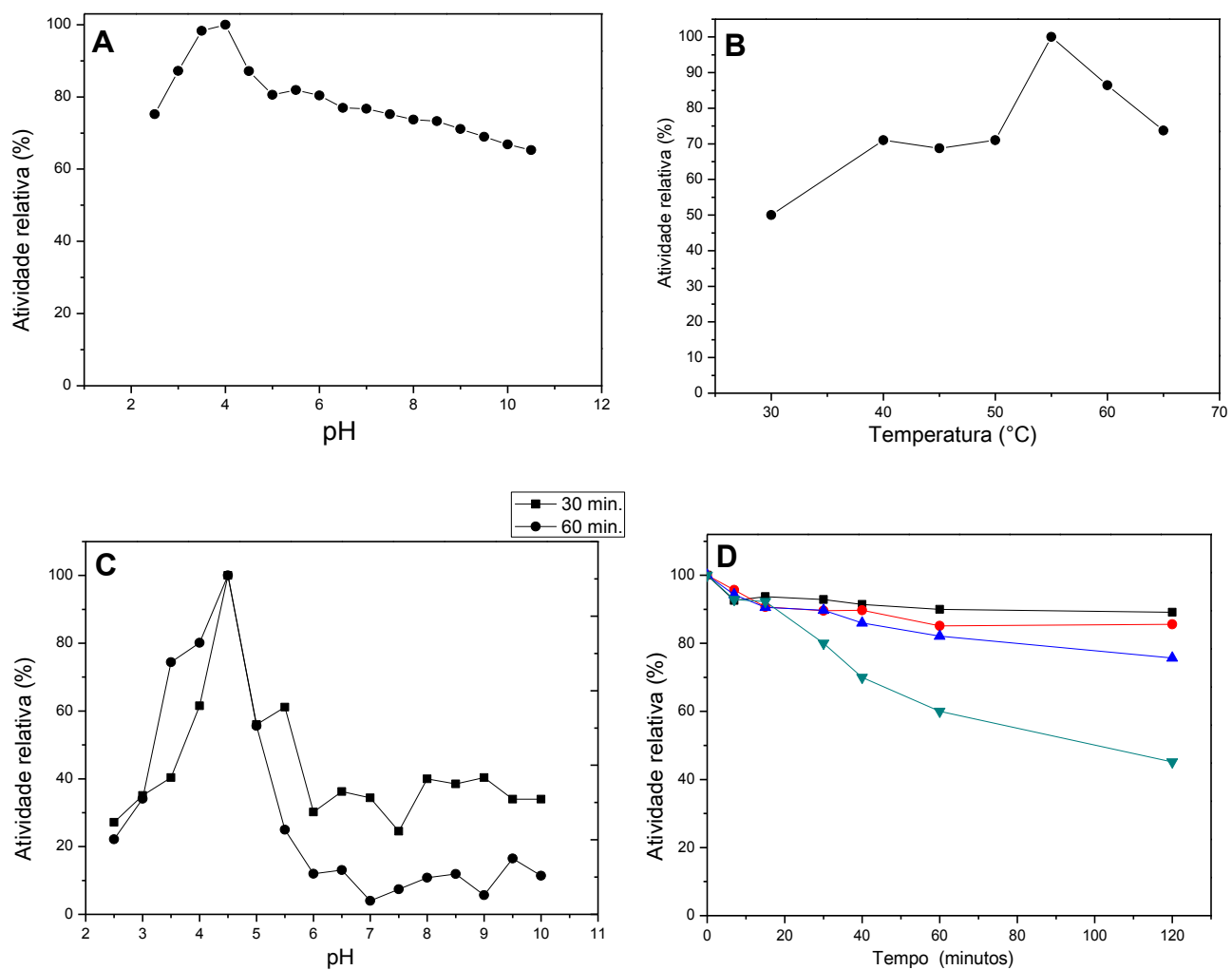
Na literatura, não existem trabalhos que relatam a caracterização bioquímica de fitases produzidas por biofilmes. Porém em outras formas de cultivo, a maioria das fitases é ativa em uma faixa de pH de 4,5 a 6,0. George *et al.* (2007) compararam uma fitase de *A. niger* com uma de *Peniophora lycii*, sendo observados valores de pH ótimos de 5 e 5,5. A fitase de *A. niger* expressa em *E. coli* apresentou pH ótimo de 6,5 (Ushasree, Vidya e Pandey, 2014). *Schizophyllum commune* produziu uma fitase em fermentação no estado sólido utilizando resíduos agroindustriais com pH ótimo 5,0 (Xavier Salmon *et al.*, 2012).

Vários trabalhos têm investigado a temperatura ótima de fitases purificadas que varia de 40-70 °C (Yao *et al.*, 2012). A enzima produzida por *Cladosporium* sp. FP-1 apresentou temperatura ótima de 40 °C, enquanto as fitases de *A. oryzae* (Uchida *et al.*, 2006) e *Rhizomucor pusillus* (Chadha *et al.*, 2004) apresentaram temperatura ótima de 50 °C e 70 °C, respectivamente.

A fitase produzida por biofilmes de *R. microsporus* var. *microsporus* purificada foi totalmente estável nas temperaturas de 30 °C e 40 °C por um período de 120 min (Figura 22D). Entretanto, a atividade foi menor quando submetida a temperaturas mais elevadas com meia vida (t_{50}) de 120 min a 60 °C o que não diferiu do extrato bruto antes caracterizado (item 4.6). Estudos de estabilidade da fitase de *A. niger* mostraram uma meia vida de 30 min a 65 °C (Vats e Banerjee, 2005). *R. microsporus* var. *microsporus* demonstrou uma boa estabilidade a temperaturas maiores quando comparado a estabilidade de outras fitases. Já as fitases termoestáveis de diferentes fontes mostram graus distintos de estabilidade ao calor e meia vida em temperaturas elevadas (acima de 80 °C) (Kim *et al.*, 1998; Pandey *et al.*, 2001).

Quanto a exposição a diferentes valores de pH, esta mostrou menor estabilidade com atividade residual acima de 50% na faixa de 3,5 a 5,0 por 30-60 min (Figura 22C). A estabilidade da enzima em pH alcalinos (7,5-10) foi reduzida.

Figura 22. Determinação do pH ótimo aparente (A) e temperatura ótima aparente (B) Estabilidade ao pH (C) durante 30 min (■) e 60 min (●), e estabilidade térmica (D) em (■) 30 °C, (●) 40 °C, (▲) 50 °C, (▼) 60 °C para fitase parcialmente purificada produzida por biofilmes de *R. microsporus* var. *microsporus*.



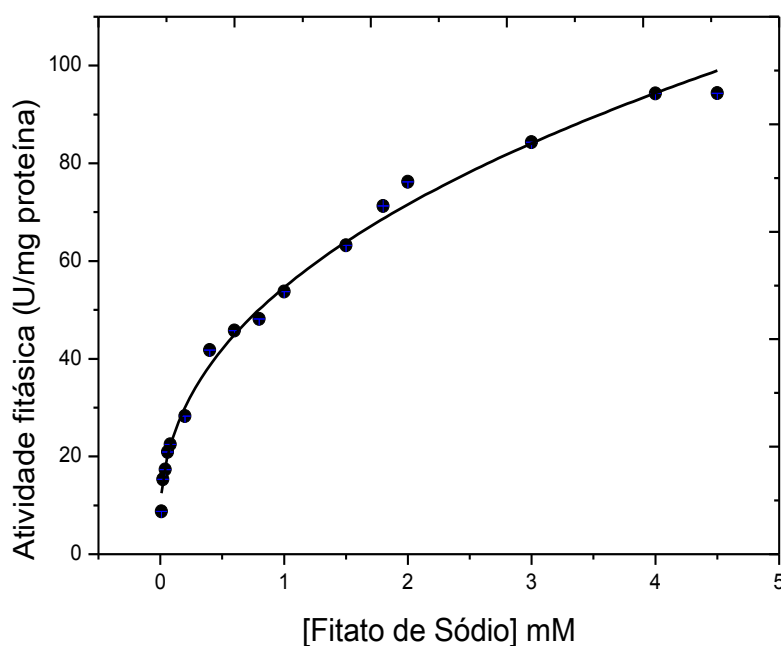
4.9.2 Parâmetros cinéticos e efeito de diferentes sais e outros compostos sobre a atividade fitásica

A fitase produzida por biofilmes de *R. microsporus* var. *microsporus* foi capaz de hidrolisar o fitato de sódio em pH 4,5 (Figura 23). A atividade específica de hidrólise do fitato de sódio foi 94,55 U/mg de proteína com $K_m = 0,72$ mM, demonstrando que a hidrólise deste substrato segue uma cinética michaeliana (Figura 23).

Os parâmetros cinéticos para a fitase *R. oligosporus* foram $K_m = 1,6$ mM (SR1) e 0,13 mM (RO2) e $V_{max} = 0,044$ U para SR1 e 0,155 U para RO2 (Azeke, Greiner e Jany, 2011). A fitase produzida por *A. niger* mostrou uma afinidade maior para o fitato de sódio (K_m de 0,92 μ M) (Sariyska et al., 2005) quando comparada a fitase de *R. microsporus* var. *microsporus* (Sariyska et al., 2005), que por sua vez teve maior afinidade pelo substrato do que a enzima SR1 de *R. oligosporus* citada anteriormente. O valor de K_m para enzima purificada de *Candida krusei* WZ-001 foi 0,02 mM (Quan et al., 2002).

As fitases geralmente mostram ampla especificidade de substrato, com maior afinidade por fitato (Vohra e Satyanarayana, 2003). A especificidade de substrato pela fitase pode variar, devido às diferenças nas características moleculares das enzimas purificadas de diferentes fontes (Liu et al., 1998).

Figura 23. Efeito da concentração de substrato sobre a atividade fitásica produzida por biofilmes de *R. microsporus* var. *microsporus*. As condições padrão de ensaio foram tampão acetato de sódio 100 mM, 50 uL de enzima em pH 4,5, contendo concentrações crescentes de substrato de 0,01 mM até 4 mM.



Avaliando o efeito das diversas substâncias sobre a atividade enzimática (Tabela 12), o Ca^{2+} foi o íon que mais ativou a fitase estudada (142,92%). Estudos com *Bacillus subtilis* VTTE-68013 demonstram que a atividade e/ou estabilidade também exigiu o íon cálcio (Kerovuo *et al.*, 1998).

Houve diminuição na atividade fitásica na presença dos íons K^+ , Zn^{2+} , Cu^{2+} e Co^{2+} , destacando-se os íons K^+ (49,69%) e Co^{2+} (54,60%). Assim como a fitase de *A. niger* (Ullah e Gibson, 1987), a de *R. microsporus* var. *microsporus* foi inibida em presença de Zn^{2+} . Outros autores também apontaram a inibição da atividade fitásica extracelular de uma linhagem mesófila de *A. niger* por Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Sn^{2+} , Cd^{2+} e ativação por íons Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} (Dvorakova, Volfova e Kopecky, 1997). Já a fitase de *E. coli* também foi ativada por Ca^{2+} e inibida por Co^{2+} , Cu^{2+} e K^+ (Huang *et al.*, 2009).

Tabela 12. Efeito de diferentes compostos sobre a atividade fitásica de *R. microsporus* var. *microsporus* produzida em FB.

Reagentes	Atividade fitásica relativa (%)	
KCl (1 e 2 mM)	60,20 ± 0,33	49,69 ± 0,12
MgCl ₂ (1 e 2mM)	102,82 ± 0,44	108,46 ± 0,13
ZnSO ₄ (1 e 2 mM)	60,12 ± 0,89	15,38 ± 0,35
CuCl ₂ (1 e 2mM)	95,24 ± 0,66	88,46 ± 0,33
CoCl ₂ (1 e 2 mM)	98,32 ± 0,28	54,60 ± 0,88
FeSO ₄ (0,2 e 0,4 mM)	99,45 ± 0,66	109,8 ± 0,62
CaCl ₂ (1 e 2 mM)	124,4 ± 0,44	142,92 ± 0,42
EDTA (5 e 10 mM)	98,34 ± 0,48	96,92 ± 0,88
Arsenato de sódio (0,25 -1 mM)	0,978 ± 0,66	
Fosfato de potássio (1-5 mM)	0 ± 0,04	

Atividade fitásica 100%- 161,69 U/mg proteína

Os resultados obtidos mostram que a não foi significativamente afetada pelos íons: ferro, magnésio. A fitase de *Aspergillus niger* van *Teighem* não foi afetada pela maioria dos íons metálicos e solventes orgânicos (Vats e Banerjee, 2005).

O EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético) é um composto quelante, capaz de formar complexos estáveis com vários íons metálicos e na maioria das enzimas afeta a atividade catalítica negativamente. Diferente ao observado para as enzimas obtidas de diferentes origens (Kerovuo *et al.*, 1998), a atividade enzimática não foi afetada pelo EDTA, o que sugere que a fitase de *R. microsporus* var. *microsporus* não é uma metaloenzima.

Dentre os compostos testados, o fosfato e o arsenato foram os que apresentaram maior porcentagem de inibição da atividade fitásica. Tendo em vista que eles são considerados análogos estruturais, parece razoável admitir que o mecanismo de atuação deve-se à ligação ao sítio catalítico da enzima. Resultados similares foram obtidos para a inibição da atividade da fosfatase obtida de diferentes

origens (Pizauro *et al.*, 1998; Durmus *et al.*, 1999; Freitas-Mesquita e Meyer-Fernandes, 2014).

A inibição da enzima pelo produto da reação sugere que a concentração do fosfato inorgânico, além de regular a sua síntese e induzir a expressão, também pode ser importante no processo de regulação da sua atividade enzimática. Um fato que apóia essa suposição é o comportamento inibitório do arsenato de sódio, um análogo estrutural do fosfato (Pizauro *et al.*, 1988; Durmus *et al.*, 1999).

Parte III

Secagem por *Spray Dryer*

4.10 SECAGEM DA AMOSTRA ENZIMÁTICA OBTIDA POR SPRAY DRYER

Foram utilizados como adjuvantes, os carboidratos que têm a função de reduzir a perda da atividade enzimática da proteína em altas temperaturas e, pensando em uma aplicação viável para a fitase produzida por biofilmes desse fungo, foram testados adjuvantes não convencionais como farelo de milho e farelo de soja, utilizado na alimentação de aves (Rostagno *et al.*, 2011)

Os adjuvantes mais utilizados neste processo são: amido, ciclodextrinas, dióxido de silício coloidal, fosfato tricálcico, gelatina, goma arábica, lactose e maltodextrina, entre outros (Vasconcelos *et al.*, 2005; Silva Júnior *et al.*, 2006). O mecanismo que explica a função dos carboidratos na proteção da enzima seria que estes entrariam no lugar da água para preservar a estrutura nativa da proteína, uma vez que, em meio aquoso, água e proteína estabelecem ligações de hidrogênio, que devem ser refeitas quando em estado sólido. Os carboidratos mostram-se satisfatórios na formação de tais ligações com as proteínas. A secagem em geral, pode alterar a estrutura secundária da proteína (Griebenow e Klibanov, 1995), uma vez que a hidratação da proteína é parcialmente perdida. Ao substituir a água com excipientes, como por exemplo, a sacarose ou a lactose, que são capazes de formar ligações de hidrogênio com a proteína, este efeito pode ser em grande parte compensado (Carpenter e Crowe, 1989).

A Tabela 13 apresenta o rendimento do processo de secagem como a temperatura de secagem de gás (T_{gs}), vazão de alimentação real (w_{real}), recuperação do produto (R_{EC}), eficiência térmica de secagem (X) e a atividade fitásica (R_{PA}).

Tabela 13. Efeitos do tipo e concentração dos adjuvantes de secagem no rendimento do processo.

Resultados					
Adjuvantes	T _{gs} (°C)	W _{real} (g/min)	R _{ec} (%)	X (%)	R _{PA} (%)
AM10	68	4,3	63,1	41,2	44,8
AM5	69	4,1	60,2	39,9	40,8
AM2	68	4,1	53,6	41,2	10,7
FM10	69	4,4	20,6	38,9	40,5
FM5	69	4,1	22,1	39,8	30,5
FM2	69	4,0	24,0	36,1	25,7
FS10	71	4,1	32,6	37,6	60,4
FS5	69	4,1	30,6	37,7	59,2
FS2	69	4,2	22,4	36,5	59,6
FB10	71	4,1	55,7	39,4	49,3
FB5	71	4,2	57,5	38,1	59,5
FB2	70	4,0	41,2	37,0	59,6
MT10	72	4,1	46,2	39,1	58
MT5	72	3,	5,6	37,8	57,9
MT2	71	4,0	6,9	37,8	56,6

T_{gs}: temperatura de saída do ar; W_{real}: vazão de alimentação real; R_{ec}: Recuperação; **Ac+E**: perdas durante o processo; X: eficiência térmica de secagem. Meio Khanna. Quantidade de sólidos no extrato enzimático 0,15 g

Durante o processo de secagem, a temperatura do ar de saída foi mantida entre 68 °C e 72 °C. Resultados semelhantes foram observado em estudos de outros autores (Costa-Silva *et al.*, 2010; Costa-Silva *et al.*, 2011; Gonçalves *et al.*, 2013), usando condições de secagem semelhantes. De acordo com os resultados obtidos

por Namaldi, Calik e Uludag, (2006), a perda da atividade enzimática torna-se mais pronunciada quando a temperatura de entrada do ar de secagem é aumentada. Apesar das condições drásticas de secagem por aspersão, a estrutura nativa da enzima pode ser mantida e preservada pela utilização de adjuvantes de proteção. Isso faz com que a secagem por pulverização seja um método conveniente para a secagem de enzimas. A α -amilase (Fungamyl 800L, Novozymes A/S) obtida a partir de *Aspergillus oryzae* dissolvida em uma solução de maltodextrina foi submetida à secagem por pulverização e mostrou uma variação na temperatura do ar de saída e entrada de 50 °C a 107 °C e 160 °C a 220 °C, respectivamente (Samborska, Witrowa-Rajchert e Goncalves, 2005). Para a serina protease alcalina seca também por pulverização, a temperatura de entrada do ar foi de 70 °C a 130 °C, e a temperatura de saída do ar variou de 56 °C a 90 °C (Namaldi, Calik e Uludag, 2006).

A melhor recuperação do produto, após a secagem, foi encontrada utilizando amido (60-63,1%) e fubá (55,7-57,1%) como adjuvantes. Por outro lado, o menor rendimento do processo de secagem (5,6% e 6,9%) foi obtido quando utilizado maltodextrina. Isto pode estar relacionado com as propriedades físicas da mistura resultante do extrato enzimático com a maltodextrina. Em estudos realizados por Costa-Silva *et al.* (2011), a deposição de pó na câmara durante a secagem também foi citada como um possível fator responsável por rendimentos reduzidos. Alto índice de recuperação é desejável, uma vez que as indústrias tendem a utilizar produtos com recuperação maior ou igual a 90%.

A maior atividade fitásica foi encontrada para os pós contendo farelo de soja em todas as concentrações (média 59,7%), e fubá (média 59,5 %) a 2 % e 5 % (m/v), respectivamente. O pó contendo maltodextrina também apresentou boa atividade fitásica residual, mas a recuperação foi reduzida, como anteriormente apresentado. Para α -amilase de *Aspergillus oryzae*, a atividade residual obtida para a enzima seca na presença de maltodextrina variou de 51,9 % a 91,8 % (Samborska, Witrowa-Rajchert e Goncalves, 2005). O extrato contendo β -frutofuranosidase de *F. graminearum* foi melhor quando seco em amido modificado (10 % m/v) e trealose (2 % m/v), com 63,6% e 56,9% de recuperação, respectivamente (Gonçalves *et al.*, 2013). De acordo com (Stahl *et al.*, 2002), a redução do fluxo de alimentação pode reduzir o tamanho das partículas. Se o mesmo valor de líquido é pulverizado em partículas menores, a superfície total da área de gotículas é aumentada, resultando

em um maior contato com a alta temperatura. Isso pode levar a uma redução na atividade da enzima. Além disso, outros fatores foram reconhecidos como importantes para a redução da atividade enzimática durante a secagem por *spray dryer*. As proteínas são presumivelmente expostas a forças de cisalhamento elevadas durante o processo de atomização e contato com o fluxo de ar de alta temperatura, e, portanto, sofrem de estresse por calor, resultando em mudanças estruturais irreversíveis de desnaturação térmica, entre outros (Yoshii *et al.*, 2005).

As amostras secas foram utilizadas para análises físico-químicas, sendo determinados a atividade de água (A_w), umidade (X_p), e diâmetro médio da partícula (d_p) (Tabela 14). Os diâmetros médios das partículas do extrato seco por pulverização usando fubá (28,45 μm) foram significativamente mais elevados do que observado para os pós obtidos com maltodextrina (17,86 μm) e com amido (13,25 μm) (Tabela 14).

Tabela 14. Propriedades físicas dos pós contendo fitase na presença de diferentes adjuvantes.

Amostras	Resultados		
	A_w	$X_p(\%)$	$dp (\mu m)$
AM2	ND	$10,70 \pm 0,67$	$13,83 \pm 8,33$
AM5	ND	$9,78 \pm 0,75$	$13,54 \pm 5,37$
AM10	ND	$7,62 \pm 0,65$	$12,39 \pm 5,05$
FM2	ND	$10,24 \pm 0,40$	ND
FM5	ND	$8,90 \pm 0,38$	ND
FM10	ND	$7,72 \pm 0,63$	ND
FS2	ND	$9,73 \pm 0,30$	ND
FS5	ND	$8,85 \pm 0,62$	ND
FS10	$0,2 \pm 0,01$	$7,66 \pm 0,36$	ND
FB2	ND	$9,30 \pm 0,14$	$23,13 \pm 22,8$
FB5	ND	$7,78 \pm 0,46$	$32,87 \pm 25,8$
FB10	$0,24 \pm 0,01$	$6,96 \pm 0,69$	$29,37 \pm 23,8$
MT2	ND	$10,60 \pm 0,77$	$15,45 \pm 17,05$
MT5	ND	$8,46 \pm 0,22$	$18,24 \pm 30,72$
MT10	$0,23 \pm 0,01$	$6,54 \pm 0,49$	$19,90 \pm 37,31$

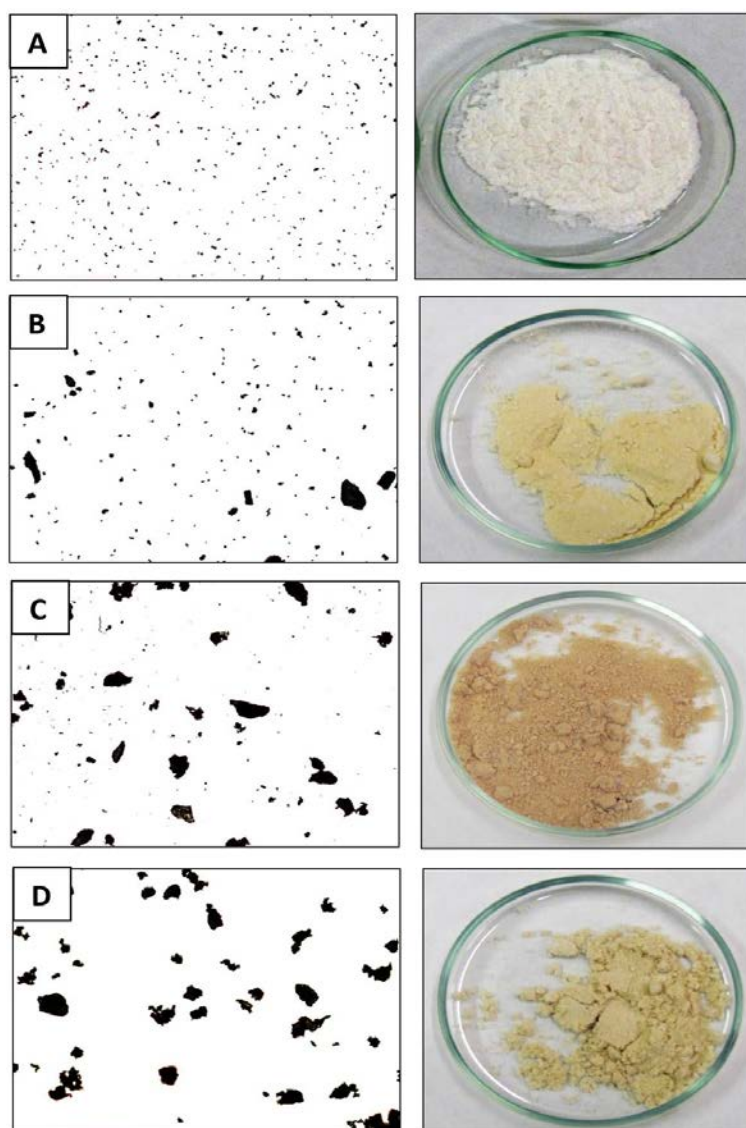
AM: amido; **FM:** farelo de milho; **FS:** farelo de soja; **FB:** fubá; **MT:** maltodextrina; **A_w :** atividade de água **X_p :** umidade; **dp :** diâmetro médio da partícula; **ND:** não disponível

Os aspectos microscópicos e macroscópicos dos pós foram claramente observados. O farelo de soja e milho são visualmente substâncias de forma indefinida, quando comparados ao amido e ao fubá (Figura 24). Sendo assim, não foi possível determinar o diâmetro médio dos pós obtidos com farelo de milho e farelo de soja devido à formação de agregados na amostra.

A atividade da água (A_w) e a umidade (X_p) do produto são aspectos importantes que devem ser considerados para a estabilidade de alguns alimentos processados e para a inibição do crescimento microbiano. Os extratos secos que obtiveram a melhor atividade fitásica e recuperação do produto tiveram valores mínimos de atividade de

água (0,2-0,24), o que é desejado para garantia da estabilidade e qualidade do produto. O crescimento de bactérias que influencia a deterioração do produto tem um valor de A_w abaixo de 0,9. A maioria dos fungos filamentosos e leveduras não crescem, com A_w abaixo de 0,85 e 0,70, respectivamente. Sendo assim, estes valores são mais elevados do que os encontrados no pó seco por pulverização contendo fitase. O teor de umidade variou de 6,54-10,5, dependendo da concentração e tipo de adjuvante adicionado.

Figura 24. Pós contendo fitase após secagem por *spray dryer* utilizando os adjuvantes: amido 2% (A), fubá 2% (B), farelo de soja 2% (C), e farelo de milho 2% (D).



Para continuidade dos estudos, foram utilizados os adjuvantes farelo de soja e fubá que mantiveram uma boa atividade fitásica e boas propriedades físicas após o processo de secagem por *spray drying*, sendo ingredientes utilizados em ração de aves, visando possíveis aplicações desta enzima.

4.11 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DO EXTRATO BRUTO SECO CONTENDO FITASE EXTRACELULAR PRODUZIDA POR BIOFILMES DE *R. microsporus* var. *microsporus*

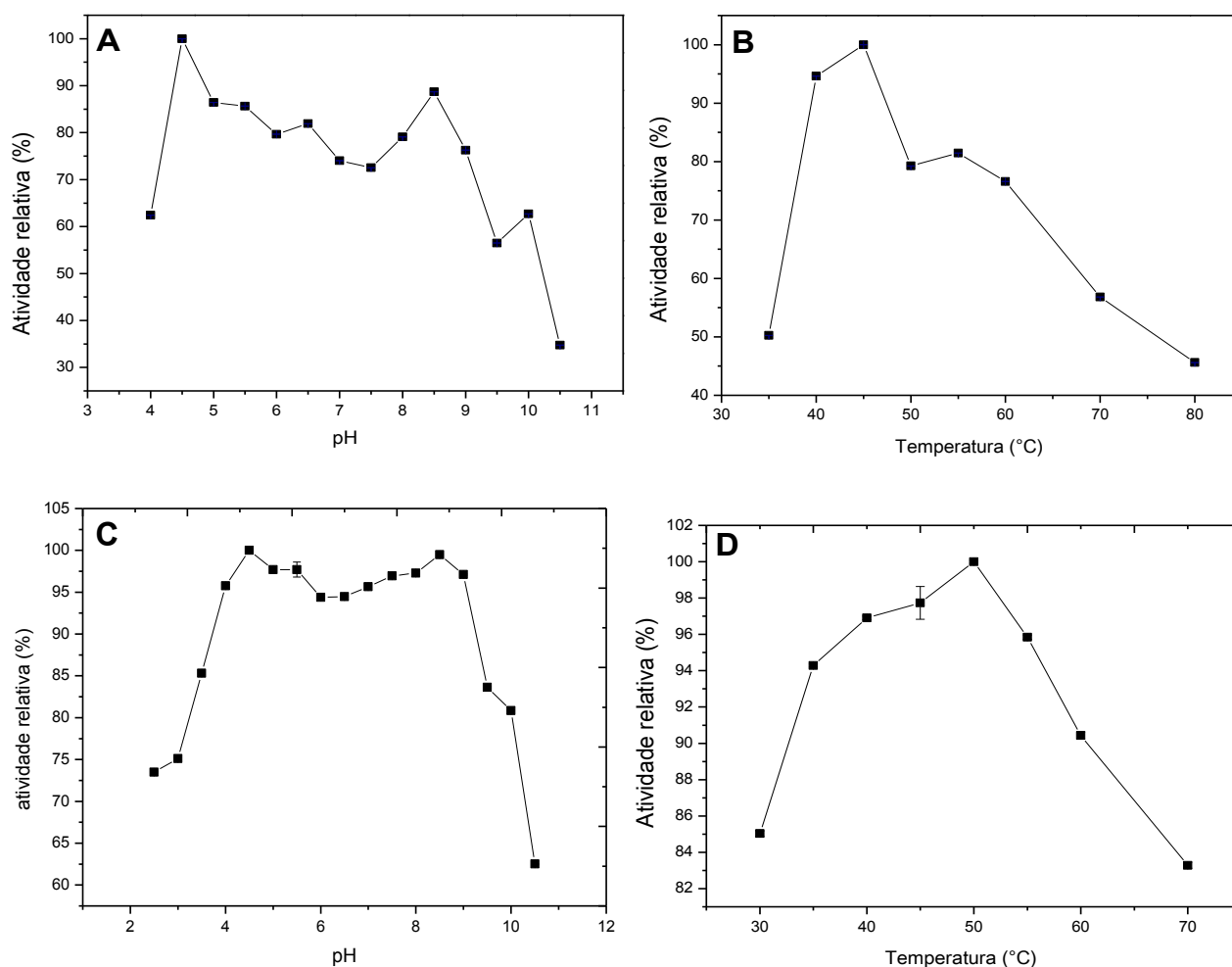
Foram realizados experimentos para avaliar as características bioquímicas da enzima fitase após *spray Drying*, em presença dos adjuvantes farelo de soja e fubá tais como temperatura e pH ótimos para atividade fitásica extracelular. Foram observados dois picos para atividade fitásica, um no pH 4,5 e outro em pH 8,5, tanto para o farelo de soja como para fubá (Figuras 25 A e 25C), assim como observado para a enzima obtida em FSbm (pH 4,5 e 6,5). Fitases alcalinas foram relatadas em bactérias tais como *Bacillus* (Gulati, Chadha e Saini, 2007). Entretanto, a atividade fitásica em pH alcalino é uma característica rara e interessante para fitases fúngicas como já comentado anteriormente.

Além disso, atividade fitásica significativa (>70 %) foi também encontrada no intervalo de pH 5,0-8,0. É possível que *R. microsporus* var. *microsporus* produza duas fitases: uma ácida e outra alcalina. Outra explicação seria a produção de uma enzima bifuncional que é capaz de atuar em ambas as condições. A produção de duas enzimas diferentes foram relatados no estudo do fungo mesófilo *Aspergillus ficuum* NRRL 3135, que produziu duas fitases diferentes designadas como phyA e phyB, com valores de pH ótimo de 5,5 e 2,0, respectivamente (Howson e Davis, 1983). Como exemplo de uma enzima bifuncional, a fitase de *Rhizopus oryzae* produzida sob fermentação em estado sólido, que atua em pH 1,5 e 5,5 pode ser citada (Rani e Ghosh, 2011).

A temperatura ótima para a atividade da fitase, após a secagem foi de 45 °C quando usado farelo de soja (Figura 25B) e 50 °C quando usado o fubá (Figura 25D), um pouco mais elevado do que o encontrado para enzima livre (40 °C). Vários estudos têm investigado a melhor temperatura de reação para fitases microbianas, com atividade ótima relatada entre 40 °C e 60 °C, tal como obtida para as enzimas de

Aspergillus fumigatus (37 °C) (Pasamontes *et al.*, 1997) e *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 (55 °C) (Howson e Davis, 1983). Assim, a tecnologia de *spray drying* pode ser utilizada para melhorar algumas propriedades enzimáticas, quando comparada com a enzima livre, considerando a ação protetora dos adjuvantes.

Figura 25. Influência do pH (A e C) e temperatura (B e D) sobre a atividade da fitase seca por *Spray Dryer* na presença de farelo de soja (A e B) e fubá (C e D) como adjuvantes.



A estabilidade ao pH e a temperatura da fitase produzida por biofilmes de *R. microsporus* var. *microsporus* após a secagem usando farelo de soja e fubá como adjuvantes foi analisada. A atividade da fitase seca na presença de farelo de soja foi mantida superior a 60% durante 60 min nos valores de pH de 4,5 a 8,5 (Figura 26A). Para o pó utilizando fubá como adjuvante, a atividade de fitase foi mantida acima de

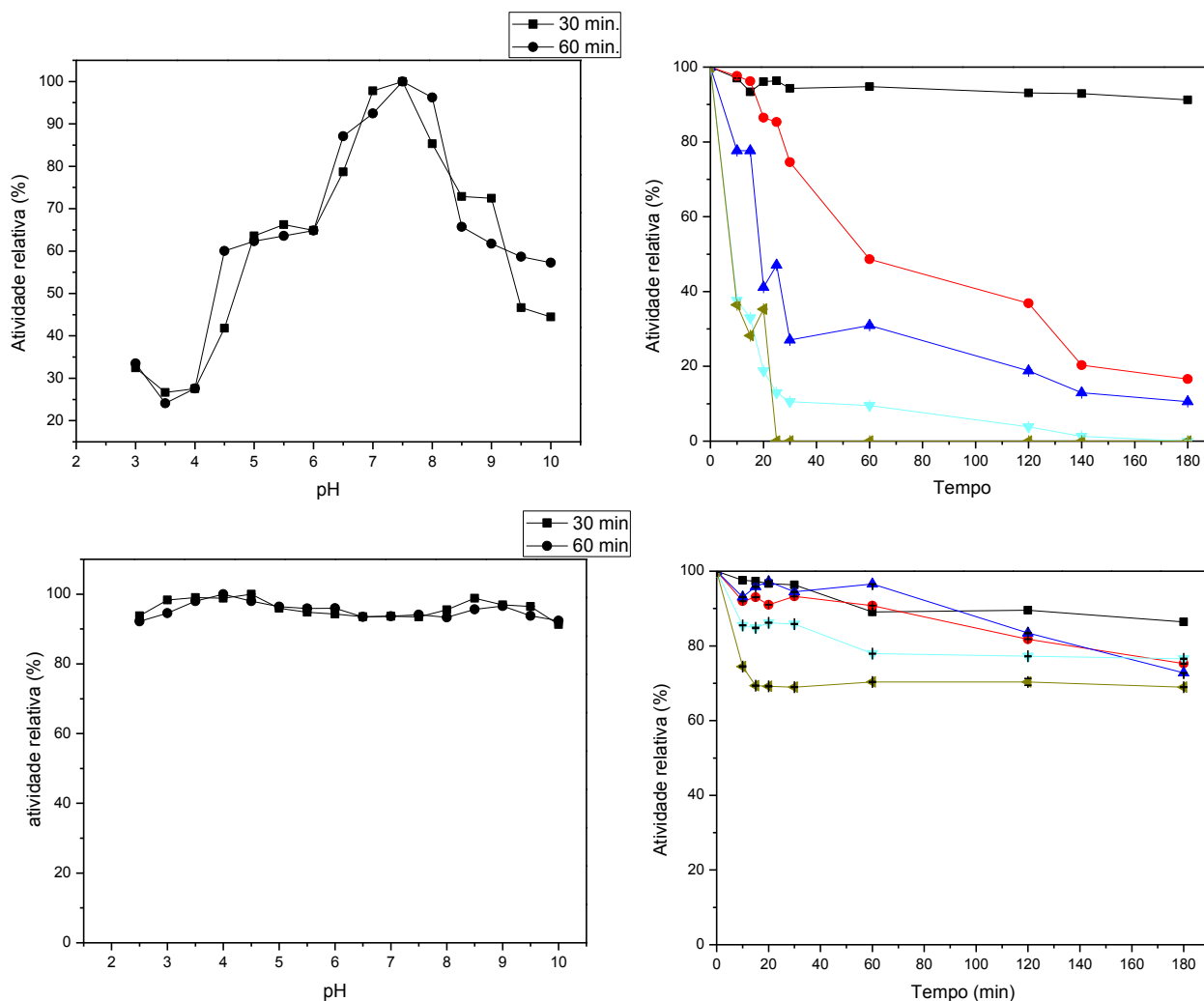
90% no valor de pH 2,5-10,0 (Figura 26C). Não houve diferenças significativas nos perfis de estabilidade a 30 e 60 min, considerando ambos os adjuvantes. Para a enzima livre, a estabilidade foi reduzida em pH extremos com uma meia vida (t_{50}) de 120 min em pH 2,0, 3,0, e 10,5 (como descrito anteriormente), um perfil bem diferente ao encontrado na presença de farelo de soja como adjuvante. As diferenças observadas entre as estabilidades obtidas na presença de ambos os adjuvantes farelo de soja e fubá podem ser explicadas pelas interações destes com a molécula de enzima. A fitase *Schizophyllum commune* manteve 100 % de sua atividade em pH 6,0 após 72 h. (Xavier Salmon *et al.*, 2012). De acordo com Rani e Ghosh (2011), a temperatura e o pH ótimos para a atividade da fitase de *Rhizopus oryzae* foi de 55 °C, e de 1,5 e 5,5, respectivamente.

A atividade de fitase seca em farelo de soja como adjuvante foi completamente estável a 30-37 °C durante 30 min (Figura 26B). Por outro lado, a atividade da enzima foi reduzida quando o extrato seco foi mantido a 50 °C e 60 °C, com meia-vida (t_{50}) de 8 min (Figura 26B). O uso de fubá como adjuvante permitiu uma boa estabilidade térmica, com 75 % da atividade fitásica mantida em 180 min de 37 °C a 60 °C, e 70% de atividade a 70 °C (Figura 26D). A fitase de *A. niger* ATCC 9142 reteve 22 % da atividade residual após 3 min a 80 °C (Casey e Walsh, 2003). A fitase seca de *R. microsporus* var *microsporus* por *spray dryer* mostrou ser mais estável do que os outras fitases relatadas.

Apesar dos poucos estudos sobre a estabilidade de fitases secas bem como os dados sobre o armazenamento da enzima à temperatura ambiente ou a temperaturas mais elevadas, os resultados aqui obtidos por *spray drying* da fitase de *R. microsporus* var. *microsporus* são promissores para aplicação futura.

Para a ação correta, estas enzimas devem ser resistentes a ação do pH do estômago, temperatura de processamento de alimentos, bem como capaz de suportar as condições de armazenamento (Nunes *et al.*, 2001).

Figura 26. Estabilidade ao pH (A e C) durante 30 min (■) e 60 min (●), e estabilidade térmica (B e D) em (■) 30 ° C, (●) 37 ° C, (▲) 40 ° C, (▼) 50 ° C, e (◄) 60 ° C, e em (■) 37 ° C, (●) 40 ° C, (▲) 50 ° C, (▼) 60 ° C, e (◄) 70 ° C da fitase seca por pulverização na presença de farelo de soja (A e B) e fubá (C e D), respectivamente.



Na presença do adjuvante fubá a proteção da fitase foi melhor do que a observada para a utilização de farelo de soja como adjuvante. A adição de alguns agentes de estabilização pode impedir o contato direto da proteína com elevadas temperaturas e assim, manter a estabilidade da estrutura conformacional da proteína (Costa-Silva *et al.*, 2011). Neste contexto, a enzima extracelular de *R. microsporus* var. *microsporus* foi seca com sucesso em *Spray Dryer* e as suas propriedades de estabilidade foram melhoradas em comparação com a enzima solúvel, o que permite a utilização desta enzima para aplicações biotecnológicas, especialmente em dietas para aves. Segue abaixo (Tabela 15) um resumo comparativo das propriedades

bioquímicas da fitase em FSbm e FB, bem como submetida a spray drying e purificação produzida por *R. microsporus* var. *microsporus*.

Tabela 15. Propriedades bioquímicas da fitase produzida por *R. microsporus* var. *microsporus*.

Propriedades	FSbm	FB	Spray Dryer (adjuvante fubá)	Purificada
Temperatura ótima (°C)	50	40	50	55
pH ótimo	5,0	4,5	4,5	4,5
Estabilidade térmica (°C)	nd	30-37 (120 min)	37-60 (180 min)	30-40 (120min).
Estabilidade ao pH	nd	4,0-8,5 (60 min)	2,5-10 (60 min)	3,5-5,0 (60 min)

FSbm-Fermentação submersa, FB-Fermentação por biofilmes, nd-não determinado

Parte IV

Aplicação da fitase
seca em *Spray Dryer*

4.12 APLICAÇÃO DA FITASE PRODUZIDA POR BIOFILMES *R. microsporus* var. *microsporus* E SECA EM POR SPRAY DRYER

O extrato bruto obtido da Fermentação por biofilmes foi seco em Spray Dryer e aplicado em ração de frangos de corte.

Os valores de ganho de peso médio (GP), consumo de ração (CR) conversão alimentar (CA) e viabilidade estão apresentados na Tabela 16. Pelos resultados obtidos, quando considerada a fase inicial de 21 dias de idade (Tabela 16), observou-se que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos quanto ao ganho de peso. Porém, nos tratamentos onde foi adicionada a enzima fitase (T1+250 FTU/kg, T1+500 FTU/kg e T1+750 FTU/kg) não diferiram significativamente do tratamento T1 no qual houve redução da quantidade de fosfato inorgânico, enquanto para T3 (dieta basal) foi obtido o melhor desempenho.

Tabela 16. Efeito da adição da fitase produzida por biofilme de *R. microsporus* var. *microsporus* sobre o desempenho de frangos de corte machos no período de 21 dias de idade.

% de P suplementar	Peso médio (kg)	Ganho de peso (kg)	Conversão alimentar	Consumo de ração total (kg)	Viabilidade (%)
T1	0,60 ^c	0,56 ^c	1,63	0,91 ^b	100,0
T2 0,06	0,71 ^b	0,67 ^b	1,58	1,06 ^{ab}	99,4
T3 0,12	0,76 ^a	0,72 ^a	1,54	1,11 ^a	98,3
T1 + 250 FTU/kg	0,61 ^c	0,57 ^c	1,72	0,98 ^{ab}	97,2
T1 + 500 FTU/kg	0,61 ^c	0,56 ^c	1,71	0,97 ^{ab}	99,4
T1 + 750 FTU/kg	0,60 ^c	0,56 ^c	1,64	0,92 ^b	98,9
dms	0,04	0,04	0,20	0,14	3,13
Valor F	55,38 ^{**}	56,19 ^{**}	2,15 ^{ns}	5,21 ^{**}	1,90 ^{ns}
CV(%)	3,5	3,7	7,0	8,2	1,8

ns=não significativo, * = significativo ao nível de 5% de probabilidade, ** = significativo ao nível de 1% de probabilidade. Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$).

Item 3.15.4 (siglas dos tratamentos)

Em concordância com esses resultados, diferentes autores (Sebastian *et al.*, 1996; Tejedor, Albino, Rostagno, 2001; Brandao *et al.*, 2007; Meneghetti *et al.*, 2011) também não verificaram efeito significativo ($p > 0,05$) para a adição de fitase nas rações sobre o desempenho das aves com 21 dias de idade. Quanto ao consumo de ração,

não houve grande variação entre os tratamentos, demonstrando dessa maneira, que a enzima fitase não influenciou neste parâmetro pesquisado. Resultados semelhantes foram encontrados por Sebastian *et al.* (1996) e Tejedor, Albino e Rostagno, (2001).

A conversão alimentar não foi influenciada ($p>0,05$) pelos tratamentos enquanto para viabilidade foi detectada significância, porém na comparação de médias não foi observada diferença entre os tratamentos.

Por outro lado, observou-se diferença significativa ($p\leq 0,05$) nos resultados obtidos quando considerada a fase final de 42 dias de idade (Tabela 17) entre os tratamentos quanto ao consumo de ração e ao ganho de peso.

Tabela 17. Efeito da adição da fitase produzida por biofilme de *R. microsporus* var. *microsporus* sobre o desempenho de frangos de corte machos no período de 42 dias de idade.

% de P suplementar	Peso médio (kg)	Ganho de peso (kg)	Conversão alimentar	Consumo de ração total (kg)	Viabilidade (%)
T1 0	2,17 ^d	2,12 ^d	1,25	2,64 ^d	87,8 ^a
T2 0,06	2,55 ^{abc}	2,52 ^{abc}	1,29	3,23 ^{bc}	89,5 ^a
T3 0,12	2,80 ^a	2,77 ^a	1,25	3,44 ^{ab}	87,8 ^a
T1 + 250 FTU/kg	2,41 ^{cd}	2,37 ^{cd}	1,35	3,20 ^{bc}	82,8 ^a
T1 + 500 FTU/kg	2,53 ^{bc}	2,49 ^{bc}	1,24	3,07 ^c	81,7 ^a
T1 + 750 FTU/kg	2,69 ^{ab}	2,65 ^{ab}	1,39	3,63 ^a	79,5 ^a
dms	0,256	0,256	2,07	0,34	10,65
Valor F	14,03 ^{**}	14,01 ^{**}	0,18 ^{ns}	18,22 ^{**}	2,74 [*]
CV(%)	5,77	5,87	8,02	6,07	7,06

ns=não significativo, * = significativo ao nível de 5% de probabilidade, ** = significativo ao nível de 1% de probabilidade. Letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ($p\leq 0,05$).

O ganho de peso das aves que receberam o T3 (Dieta Basal) foi significativamente maior ($p<0,05$) do que aquelas que consumiram as rações T1 e T1+250 FTU/kg. Entretanto, a suplementação da dieta T1 com a enzima fitase (+ 750 FTU/kg) e a dieta e T2 proporcionaram aumentos no GP, não diferindo estatisticamente do mesmo obtido com a ração T3. Estes resultados encontram-se em acordo com os de Costa *et al.* (2007) que estudaram frangos de corte na fase de 8 a 21 dias de idade e encontraram aumento no ganho de peso para as aves que consumiram ração suplementada com fitase. Silva Júnior *et al.* (2006), adicionaram a

quantidade de 500 FTU/kg de ração de fitase com níveis reduzidos de fósforo disponível e de cálcio, na fase de 1 a 21 dias e encontraram resultados de consumo de ração, ganho de peso e conversão alimentar semelhantes aos das rações sem fitase e com níveis adequados de fósforo disponível e de cálcio.

Resultados contrários foram encontrados por Strada *et al.* (2005) que utilizando a adição de complexo enzimático em rações à base de milho e farelo de soja, não observaram melhoras significativas nos índices de desempenho para frangos de corte até 42 dias de idade. Diversos autores verificaram efeitos positivos dos níveis crescentes de fitase na dieta sobre o desempenho de frangos em crescimento (Tejedor *et al.*, 2001; Pintar *et al.*, 2004) sendo que os primeiros autores recomendaram como nível ótimo a inclusão de 500 a 700 FTU/kg como demonstrado em nosso trabalho.

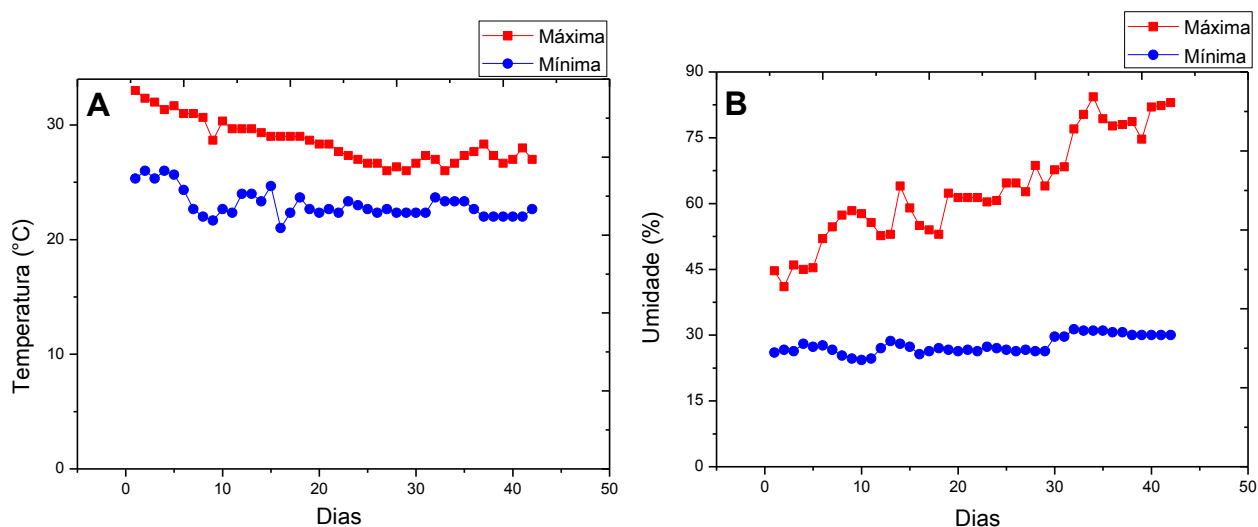
Houve efeito significativo ($p \leq 0,05$) dos tratamentos sobre o consumo de ração. O tratamento T1+750 FTU/kg levou ao maior consumo de ração, o que não diferiu do tratamento T3, enquanto para T1 foi obtido o pior consumo de ração, como esperado, sendo este o tratamento com redução de fosfato inorgânico. Resultados semelhantes foram descritos por Namkung e Leeson, (1999) e Conte *et al.* (2003) quando constaram aumento no consumo de ração com a inclusão da enzima fitase. A adição da enzima fitase, em níveis adequados, promove a ruptura do complexo P-ácido fítico, tornando o fósforo disponível para o organismo animal e, assim, superando o efeito depressor de sua deficiência sobre o consumo de ração (Fukayama *et al.*, 2008).

A conversão alimentar não foi influenciada ($p > 0,05$) pelos tratamentos o que foi semelhante aos trabalhos relatados por Schoulten *et al.* (2003) e Santos *et al.* (2004), enquanto para viabilidade foi detectada significância, porém na comparação de médias não foi observada diferença entre os tratamentos.

O Brasil é um país de clima tropical, onde a maioria das regiões tem médias de temperatura elevadas todo o ano. O estresse pelo calor sofrido pelas aves é uma das preocupações devido as perdas na produção. Os fatores ambientais, temperatura, umidade e movimentação do ar, são os que afetam mais diretamente as aves, uma vez que comprometem a manutenção da homeotermia (Oliveira Neto *et al.*, 2000).

Durante o período experimental, os valores de temperatura do ar mantiveram-se entre $32,33 \pm 0,57$ e $26,66 \pm 1,15$ °C e a umidade relativa entre $84,33 \pm 13,21$ e $24,66 \pm 4,93$ %, correspondente ao período total de 42 dias (Figura 27).

Figura 27. Variação da temperatura do ar (A) e umidade relativa do ar (B) no galpão para manutenção dos frangos de corte durante 42 dias.



A temperatura manteve-se como recomendado para um bom desempenho das aves, no período de 1 a 21 dias de idade, sendo a temperatura ideal para criação de frangos de corte, recomendada na faixa de 32 a 34 °C. Na segunda semana de vida, a faixa recomenda está entre 28 e 32 °C e, na terceira semana, entre 26 a 28 °C (Miranda De Oliveira *et al.*, 2006). Já para aves adultas, a temperatura indicada está entre 20 a 27 °C (Abreu *et al.*, 2007).

Desta forma, com base nos resultados apresentados, observa-se que a fitase de *R. microsporus* var. *microsporus* não foi efetiva para desempenho de frangos na fase 1 a 21 dias, entretanto na fase de 1 a 42 dias de idade, ocorreu um bom desempenho nos tratamentos contendo a fitase de *R. microsporus* var. *microsporus*, destacando-se a adição de 750 FTU/kg, quando comparado ao tratamento T3 (Dieta Basal) que atende as necessidades nutricionais para frangos de corte (Rostagno *et al.*, 2011).

5.CONCLUSÕES

A linhagem *R. microsporus* var. *microsporus* mereceu destaque na produção fitásica por biofilmes apresentando melhores níveis de produção utilizando-se bagaço de cana de açúcar como fonte de carbono em meio NBRIP modificado contendo 0,5 mM de fitato de sódio. Adicionalmente, a produção da fitase em biorreatores foi superior a obtida em FSbm para frascos agitados.

A caracterização bioquímica da fitase produzida por *R. microsporus* var. *microsporus* em diferentes formas de cultivo (FSbm e FB) apresentou pH ótimo aparente de 4,5 a 5,0 e temperatura ótima entre 45 e 55 °C. Foi observado atividade fitásica em pH alcalino o que é uma característica rara e bastante interessante para fitases fúngicas. A fitase mostrou-se bastante estável nas temperatura de 30 °C e 37 °C. Já a temperatura ótima de atividade da fitase purificada foi de 55°C e o pH ótimo 4,5, sendo estável em temperaturas entre 30 °C e 40 °C.

A fitase foi ativada por íons Ca^{2+} e inibida por K^+ e hidrolisou o fitato de sódio obtendo uma maior afinidade quando comparada a outras fontes fúngicas.

A enzima extracelular obtida sob esta condição foi seca em *Spray Dryer* e sua estabilidade foi maior que a enzima solúvel. A fitase seca em *Spray Dryer* utilizando fubá como adjuvante ainda foi adicionada em rações para frangos de corte permitiu um bom desempenho no período de 1 a 42 dias de idade, especialmente pela adição de 750 FTU/kg, quando comparado a dieta basal que atende as necessidades nutricionais para frangos de corte. Sendo assim, a fitase seca de *R. microsporus* var. *microsporus* apresentou bom potencial biotecnológico na aplicação em frangos de corte sendo promissora para o emprego industrial.

6.REFERÊNCIAS

ABREU, P. G.; ABREU, V. M. N.; COLDEBELLA, A.; JAENISCH, F.R.F.; PAIVA, D. P. Environmental thermal conditions and performance of broilers raised in aviaries with and without the use of polyethylene lining. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 4, p. 1014-1020, Aug. 2007.

AKAO, T. ;GOMI K.; GOTO K.; OKAZAKI, N.; AKITA, O. Subtractive cloning of cDNA from *Aspergillus oryzae* differentially regulated between solid-state culture and liquid (submerged) culture. **Current Genetics**, v. 41, n. 4, p. 275-281, July 2002.

ANDERSON, G. Assessing soil organic phosphorous in soil. In: KHASAWNEH, F. E. **The role of phosphorous in agriculture**. Madison: American Society of Agronomy, 1980. p. 411-431.

ARCURI, E. F. Biofilmes bacterianos na indústria de alimentos. **Revista Leite e Derivados**, v. 9, n. 53, p. 40-45, 2000.

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, Feb. 2011.

AZEVEDO, C. M. A. **Bioprospecção**: coleta de materiais biológicos com a finalidade de explorar os recursos genéticos. 2. ed. rev. São Paulo: CETESB, 2003. (Série ciência e pesquisa, caderno n. 17).

AZIANI, G.; TERENCE, H. F.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Production of fructooligosaccharides by *Aspergillus phoenicis* biofilm on polyethylene as inert support. **Food Technology and Biotechnology**, v. 50, n. 1, p. 40-45, Jan./Mar. 2012.

BATAGLIA, O. C.; FURLANI, A. M. C.; TEIXEIRA, J. P. F.; FURLANI, P. R.; GALLO, J. R. **Métodos de análise química de plantas**. Campinas: Instituto Agrônomo, 1983. 48 p. (Boletim técnico, 78).

BAYER, E. A.; CHANZY, H.; LAMED, R.; SHOHAM, Y. Cellulose, cellulases and cellulosomes. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 8, p. 548-557, 1988.

BENNET, J. W. Mycothecology: the role of fungi in biotechnology. **Journal of Biotechnology**, v. 66, p. 101-107, 1998.

BERTECHINI, A. G. **Nutrição de monogástricos**. Lavras. Ed. UFLA, 2006.

BHAVSAR, K.; KUMAR, V. R.; KHIRE, J. M. High level phytase production by *Aspergillus niger* NCIM 563 in solid state culture: response surface optimization, up-scaling, and its partial characterization. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 1407-1417, Sept. 2011.

BIESEBEKE, R.; RUIJTER G.; RAHARDJO, Y. S. P.; HOOGSCHAGEN, M. J.; HEERIKHUISEN, M.; LEVIN, A.; VAN DRIEL, K. G. A.; SCHUTYSER, M. A. L.; DIJKSTERHUIS, J.; ZHU, Y.; WEBER, F. J.; DE VOS, W. M.; VAN DEN HOLDEN, K. A. M. J. J.; VAN DEN HONDEL, J.; RINZEMA, A. *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentations: progress report on a multidisciplinary project. **FEMS Yeast Research**, v. 2, p. 245-248, 2012.

BIGERELLE, M.; ANSELME, K.; DUFRESNE, E.; HARDOUIN, P. An unscaled parameter to measure the order of surfaces: a new surface elaboration to increase cells adhesion. **Biomolecular Engineering**, v. 19, n. 26, p. 79-83, Aug. 2002.

BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? **American Journal of Botany**, v. 98, n. 3, p. 426-438, Mar. 2011.

BRANDAO, P. A.; COSTA, F. G. P.; BRANDÃO, J. S. ; Silva, J. H. V. da. Effect of phytase addition in broiler rations, during grower and final phases. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 2, p. 492-498, Mar. 2007.

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

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C. **The fungi**. London: Academic Press, 1997.

CARPENTER, J. F.; CROWE, J. H. An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. **Biochemistry**, v. 28, n. 9, p. 3916-3922, May 1989.

CASEY, A.; WALSH, G. Purification and characterization of extracellular phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142. **Bioresource Technology**, v. 86, n. 2, p. 183-188, Jan. 2003.

CHADHA, B. S.; HARMEET, G.; MANDEEP, M.; SAINI, H. S. Phytase production by the thermophilic fungus *Rhizomucor pusillus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 105-109, Feb. 2004.

CHOI, Y. M.; SUH, H. J.; KIM, J. M. Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus* sp KHU-10. **Journal of Protein Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 287-292, May 2001.

CHU, H. M.; GUO, R. T.; LIN, T. W.; CHOU, C. C.; SHR, H. L.; LAI, H. L.; TANG T. Y.; CHENG, K. J.; SELINGER, B. L.; WANG, A. H. J. Structures of *Selenomonas ruminantium* phytase in complex with persulfated phytate: DSP phytase fold and mechanism for sequential substrate hydrolysis. **Structure**, v. 12, n. 11, p. 2015-2024, Nov. 2004.

CONTE, A. J.; TEIXEIRA, A. S.; BERTECHINI, A. G.; FIALHO, E. T.; MUNIZ, J. A. Efeito da fitase e xilanase sobre a energia metabolizável do farelo de arroz integral em frangos de corte. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, v. 26, n. 6, p. 1289-1296, 2002.

CONTE, A. J.; TEIXEIRA, A. S.; FIALHO, E. T.; SCHOULTEN, N. A.; BERTECHINI, A. G. Effect of phytase and xylanase on the performance and bone characteristics of broiler chicks fed diets with rice bran. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 5, p. 1147-1156, Sept./Oct. 2003.

COSTA-SILVA, T. A. da; OLIVEIRA, W. P.; SOUZA, C. R. F.; SAID, S. Partial purification and drying by spray dryer of extracellular lipases from the endophytic fungus *Cercospora kikuchii*. **Journal of Biotechnology**, v. 150, p. 377-377, Nov. 2010.

COSTA-SILVA, T. A. da; NOGUEIRA, C. R. F.; SOUZA, W. P.; OLIVEIRA, S. Lipase production by endophytic fungus *Cercospora kikuchii*: stability of enzymatic activity after spray drying in the presence of carbohydrates. **Drying Technology**, v. 29, n. 9, p. 1112-1119, 2011.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A.; HOFER, D.; GUBITZ, G. M. Stainless steel sponge: a novel carrier for the immobilisation of the white-rot fungus *Trametes hirsuta* for decolourization of textile dyes. **Bioresource Technology**, v. 95, n. 1, p. 67-72, Oct. 2004.

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, Aug. 2006.

CUNLIFFE, D.; SMART, C. A.; VULFSON, E. N. Bacterial adhesion at synthetic surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 11, p. 4995-5002, Nov. 1999.

DARI, L. R. Utilização da fitase na alimentação de aves. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2004, Santos. **Anais...** Campinas: FACTA, 2004. p. 127-143.

DONLAN, R. M. Biofilms and device-associated infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, p. 277-281, 2001.

DOSS, R. P. Composition and enzymatic activity of the extracellular matrix secreted by germlings of *Botrytis cinerea*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 404-408, Feb. 1999.

DOX, A. W.; GOLDEN, R. Phytase in lower fungi. **Journal of Biological Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 183-186, Oct. 1911.

DUFRENE, Y. F. Direct characterization of the physicochemical properties of fungal spores using functionalized AFM probes. **Biophysical Journal**, v. 78, n. 6, p. 3286-3291, June 2000.

DURMUS, A.; EICKEN, C.; SIFT, B. H.; KRATEL, A.; KAPPL, R.; HUTTEERMANN, J.; KREBS, B. The active site of purple acid phosphatase from sweet potatoes (*Ipomoea batatas*) metal content and spectroscopic characterization. **European Journal of Biochemistry**, v. 260, n. 3, p. 709-716, Mar. 1999.

DVORAKOVA, J.; VOLFOVA, O.; KOPECKY, J. Characterization of phytase produced by *Aspergillus niger*. **Folia Microbiologica**, v. 42, n. 4, p. 349-352, 1997.

EHRlich, K. C.; MONTALBANO, B. G.; MULLANEY, E. J.; DISCHINGER, H. C.; ULLAH, A. H. An acid-phosphatase from *Aspergillus ficuum* has homology to *Penicillium chrysogenum* phoA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 204, n. 1, p. 63-68, Oct. 1994.

ENGELN, A. J.; VAN DER HEEFT, F. C.; RANDSDORP, P. H.; SMIT, E. L. Simple and rapid-determination of phytase activity. **Journal of AOAC International**, v. 77, n. 3, p. 760-764, May/June 1994.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. **Fungos**: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. 2. ed. rev. Caxias do Sul: Educs, 2004. 510 p.

FENCHEL, T. Microbial behavior in a heterogeneous world. **Science**, v. 296, n. 5570, p. 1068-1071, May 2002.

FLEMING, D. J.; TUCKER, K. L.; JACQUES, P. F.; DALLAL, G. E.; WILSON, P. W.; WOOD, R. J. Dietary factors associated with the risk of high iron stores in the elderly framingham heart study cohort. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, n. 6, p. 1375-1384, Dec. 2002.

FREDRIKSON, M.; ANDLID, T.; HAIKARA, A.; SANDBERG, A. S. Phytate degradation by micro-organisms in synthetic media and pea flour. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, n. 2, p. 197-204, 2002.

FREITAS-MESQUITA, A. L.; MEYER-FERNANDES, J. R. Biochemical properties and possible roles of ectophosphatase activities in fungi. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 2, p. 2289-2304, Feb. 2014.

FU, D.; HUANG, H.; LUO, H.; H.; WANG, Y.; YANG, P.; MENG, K.; BAIA, Y.; WUB, N.; YAO, B. A highly pH-stable phytase from *Yersinia kristensenii*: cloning, expression, and characterization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, n. 6, p. 499-505, 2008.

FUKAYAMA, E. H.; SAKOMURA, N. K.; DOURADO, R. L.; NEME, R.; FERNANDEZ, J. B. K.; MARCATO, M. M. Effect of phytase supplementation on the performance and feed digestibility of nutrients. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 3, p. 802-808, May/June 2001.

FUKAYAMA, E. H.; DOURADO, L. R. B.; NEME, R.; FERNANDES, J. B. K.; MARCATO, S. M. Effect of phytase supplementation on performance and nutrient digestibility in diets of broilers. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 4, p. 629-635, Apr. 2008.

GARGOVA, S.; SARIYSKA, M.; ANGELOV, A.; STOILOVA, I. *Aspergillus niger* pH 2.1 optimum acid phosphatase with high affinity for phytate. **Folia Microbiologica**, v. 51, n. 6, p. 541-545, 2006.

GAUTHIER R. Intestinal health, the key to productivity: the case of organic acids. In: CONVENCION ANECA-WPDC, 27., 2002, Puerto Vallarta. [Anais]...[S.l.]: [s.n.], 2002. p. 8-10.

GAVA, A. J.; SILVA, C. A.; B., FRIAS, J. R. G. **Tecnologia de alimentos**: princípios e aplicações. São Paulo: Nobel, 2009.

GEORGE, T. S.; SIMPSON, R. J.; GREGORY, P. J.; RICHARDSON, A. E. Differential interaction of *Aspergillus niger* and *Peniophora lycii* phytases with soil particles affects the hydrolysis of inositol phosphates. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 39, n. 3, p. 793-803, Mar. 2007.

GIST-BROCADES (Europe). F. M. Van Gorden; W. Van-Hartingsveldt; P. A. B. Van parldon; A. E. N. Veestra; R. G. M. Lulten; G. C. M Selten. **Cloning and expression of microbial phytase**. EP 0420358A1, 27 Sept. 1990, 3 Abr. 1991.

GOLOVAN, S. P.; MEIDINGER R. G.; AJAKAIYE A.; COTROTRIM I. M.; WIDERKEHR M. Z. Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. **Natural Biotechnology**, v. 19, p. 741-745, 2001.

GOMIDE, E. M.; RODRIGUES, P. B.; FREITAS, R. T. F.; FIALHO, T. Nutritional plans with use of amino acids and phytase for broiler chickens maintaining the ideal protein profile in the diets. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 6, p. 1769-1774, Nov./Dec. 2007.

GONÇALVES, H. B.; JORGE, J. A.; OLIVEIRA, W. P.; SOUZA, C. R.; GUIMARÃES, L. H. Extracellular β -fructofuranosidase from *Fusarium graminearum*: stability of the spray-dried enzyme in the presence of different carbohydrates. **Journal of Microencapsulation**, v. 20, n. 7, p. 624-631, 2013.

GREAVES, M. P.; ANDERSON, G.; WEBLEY D. M. The hydrolysis of inositol phosphates by *Aerobacter aerogenes*. **Biochemistry Biophysics Acta**, v. 132, p. 412-418, 1997.

GREINER, R.; ALMINGER, M. L. Stereospecificity of myo-inositol hexakisphosphate dephosphorylation by phytate-degrading enzymes of cereals. **Journal of Food Biochemistry**, v. 25, n. 3, p. 229-248, June 2001.

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, May 1993.

GRIEBENOW, K.; KLIBANOV, A. M. Lyophilization-induced reversible changes in the secondary structure of proteins. **Proceeding of the National Academy of Science**, v. 92, n. 24, p. 10969-10976, Nov. 1995.

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

GUIMARÃES, L. H. S.; TERENCEI, H. F.; POLIZELI, M. L. T. M.; JORGE, J. A. Production and characterization of a thermostable β -D-fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agro-industrial residues as carbon source. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, p. 52-57, 2007.

GUIMARÃES, L. H. S.; SOMERA, A. F.; TERENCEI, 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 & Biotechnology**, v. 34, n. 1, p. 91-98, Jan. 2007.

GUTIERREZ-CORREA, M.; VILLENA, G. K. Surface adhesion fermentation: a new fermentation category. **Revista Peruana de Biologia**, v. 10, p. 113-124, 2002.

HA, N. C.; OH, B. C.; SHIN, S.; KIM, H. J.; OH, T. K.; KIM, Y. O.; CHOI, K. Y.; OH, B. H. Crystal structures of a novel, thermostable phytase in partially and fully calcium-loaded states. **Nature Structural Biology**, v. 7, n. 2, p. 147-153, Feb. 2000.

HALLMANN, J.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPPER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 895-914, Oct. 1997.

HAROS, M.; ROSELL, C. M.; BENEDITO, C. Fungal phytase as a potential breadmaking additive. **European Food Research and Technology**, v. 213, n. 45, p. 317-322, Oct. 2001.

HEGEMAN, C. E.; GRABAU, E. A. A novel phytase with sequence similarity to purple acid phosphatases is expressed in cotyledons of germinating soybean seedlings. **Plant Physiology**, v. 126, n. 4, p. 1598-1608, Aug. 2001.

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.

HUANG, M.; XU, H.; CAO, Y.; ZHU, J.; ZHANG, F. W.; YOU, F. F.; QIAO, D. R.; CAO, Y. Characteristics of phytase from *Escherichia coli*. **Chinese Journal of Applied and Environmental Biology**, v. 15, n. 3, p. 371-375, 2009.

IN, M. J.; SEO, S. W.; OH, N. S. Fermentative production and application of acid phytase by *Saccharomyces cerevisiae* CY strain. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 17, p. 3115-3120, Sept. 2008.

JARIWALLA, R. J.; SABIN, R.; LAWSON, S.; HERMAN, Z. S. Lowering of serum cholesterol and triglycerides and modulation of divalent cations by dietary phytate. **Journal of Applied Nutrition**, v. 42, p. 18-28, 1990.

JAYASUNDERA, M.; ADHIKARI, B.; ADHIKARI, R.; ALDRED, P. The effects of proteins and low molecular weight surfactants on spray drying of model sugar-rich foods: powder production and characterisation. **Journal of Food Engineering**, v. 104, n. 2, p. 259-271, May 2011.

JONES, C. K.; TOKACH M. D.; DRITZ S. S.; RATLIFF B. W.; HORN, N. L. Efficacy of different commercial phytase enzymes and development of an available phosphorus release curve for *Escherichia coli* derived phytases in nursery pigs. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 11, p. 3631-3644, 2010.

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, June 1998.

KHAN, S. A.; CHANUDHRY, H. R.; BUTT Y. S.; JAMEEL, T.; AHAMD, F. The effect of phytase enzyme on the performance of broiler flock (a-review). **Poultry Science Journal**, v. 1, n. 2, p. 117-125, Nov. 2013.

KHANNA, P.; SUNDARI, S. S.; KUMAR, N. J. Production, isolation and partial purification of xylanase from an *Aspergillus* sp. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 242-243, Mar. 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, Jan. 1998.

KIRK, P. M.; CANNON, P. F.; MINTER, D. W.; STALPERS J. A. **Dictionary of the fungi**. 10th ed. Wallingford: CAB International, 2008.

KLEIST, S.; MIKSCH, G.; HITZMANN, B.; ARNDT, M.; FRIEHS, K.; FLASCHEL, E. Optimization of the extracellular production of a bacterial phytase with *Escherichia coli* by using different fed-batch fermentation strategies. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, n. 56, p. 456-462, June 2003.

KUMAR, V.; BEHL, R. K.; NARULA, N. Establishment of phosphate- solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under greenhouse conditions. **Microbiology Research**, v.156, p. 87-93, 2001.

KUMAR, V.; SINHA, A. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: a review. **Food Chemistry**, v. 120, n. 4, p. 945-959, June 2010.

LASSEN, S. F.; BREINHOLT, J.; OSTERGAARD, P. R.; BRUGGER, R.; BISCHOFF, A.; WYSS, M.; FUGLSANG, C. C. Expression, gene cloning, and characterization of five novel phytases from four basidiomycete fungi: *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, *Ceriporia* sp., and *Trametes pubescens*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4701-4707, Oct. 2001.

LEAL, A. S.; GONÇALVES, C. G.; VIERIA, I. F. R.; CUNHA, M. R. R.; GOMES, T. C. B.; MARQUES, F. R. Avaliação da concentração de minerais e dos fatores antinutricionais do fitato e oxalato em multimisturas da região metropolitana de Belo Horizonte/MG. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, n. 5, v. 2, p. 39-52, 2010.

LEE, J.; CHOI, Y.; CHANGWAN, P.; KANG, S.; BOK, J.; CHO, J. Recombinant production of *Penicillium oxalicum* PJ3 phytase in *Pichia pastoris*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 443-446, Mar. 2007.

LEE, S. H.; CHO, J.; BOK, J.; KANG, S.; CHOI, Y.; LEE, P. C. Characterization, gene cloning, and sequencing of a fungal phytase, phyA, from *Penicillium oxalicum* PJ3. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 45, n. 4, p. 336-347, 2015.

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

LEI, X. G.; KU, P. K.; MILLER, E. R.; YOKOYAMA, M. T. Supplementing corn-soybean meal diets with microbial phytase linearly improves phytase phosphorus utilization by weanling pigs. **Journal Animal Science**, v. 71, p. 3359-3367, 1993.

LEI, X. G.; WEAVER, J. D.; MULLLANEY, E.; ULLAH, A. H.; AZAIN, J. Phytase, a new life for an "Old" enzyme. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 1, p. 283-309, 2013.

LEMAGREX, E.; JACQUELIN, L.; CARQUIN, J.; BONNAVEIRO, N.; CHOISY, C. Susceptibility to antibacterials and compared metabolism of suspended bacteria versus embedded bacteria biofilms. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 2, n. 13, p. 89-95, Mar. 1994.

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, Feb. 2000.

LINDERS, L. J. M.; MEERDINK, G.; VANTRIET, K. Influence of temperature and drying rate on the dehydration inactivation of *Lactobacillus plantarum*. **Food and Bioproducts Processing**, v. 74, n. 2, p. 110-114, June 1996.

LIU, B. L.; RAFIQ, A.; TZENGA, Y.; ROBBET, A. The induction and characterization of phytase and beyond. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, n. 5, p. 415-424, Apr. 1998.

LOPEZ, H. W.; LEENHARDT, F.; COUDRAY, C.; REMESY, C. Minerals and phytic acid interactions: is it a real problem for human nutrition? **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, n. 7, p. 727-739, Oct. 2002.

LU, H.; LONGQING, S.; YASHU, W.; XIAOSHU, Z.; JIANYAN, W.; XIAOYAN, K. Isolation and characterization of a salt-tolerant, phosphate-solubilizing bacterium isolated from yellow river delta saline-alkali, China. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 3451-3457, Oct. 2014.

LUNG, S. C.; LIM, B. L. Assimilation of phytate-phosphorus by the extracellular phytase activity of tobacco (*Nicotiana tabacum*) is affected by the availability of soluble phytate. **Plant and Soil**, v. 279, n. 12, p. 187-199, Feb. 2006.

LUNG, S. C.; CHAN, W. L.; YIP, W.; WANG, L.; YEUNG, E. C.; LIM, B. L. Secretion of beta-propeller phytase from tobacco and *Arabidopsis* roots enhances phosphorus utilization. **Plant Science**, v. 49, p. 169-341, 2005.

MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 715-721, Dec. 2002.

MANDEL, A.; KRAUSE, K.; KOTHE, E. Identification of a hydrophobin gene that is developmentally regulated in the ectomycorrhizal fungus *Tricholoma terreum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 1408-1413, Mar. 2002.

MARTINEZ, L. R.; FRIES, B. C. Fungal biofilms: relevance in the setting of human disease. **Current Fungal Infection Reports**, v. 4, p. 266-275, 2010.

MENEGHETTI, C.; BETERCHINI, A. G.; RODRIGUES, P. B.; FASSANI, E. J.; BRITO, J. A. G.; REIS, M. P.; GARCIA JUNIOR, A. A. P. High levels of phytase in diets for broilers. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 63, n. 3, p. 624-632, June 2011.

MILLQVIST-FUREBY, A.; MALMSTEN, M.; BERGENSTAHL, B. Spray-drying of trypsin surface characterisation and activity preservation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 188, n. 2, p. 243-253, Oct. 1999.

MITCHELL, D. B.; VOGEL, K.; WEIMANN, B. J.; PASAMONTES, L.; VAN LOON, A. P. The phytase subfamily of histidine acid phosphatases: isolation of genes for two novel phytases from the fungi *Aspergillus terreus* and *Myceliophthora thermophila*. **Microbiology**, v. 143, p. 245-252, Jan. 1997.

MONTIEL-GONZALEZ, A. M.; FERNÁNDEZ, F. J.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, B.; LOERA, O. Invertase production on solid-state fermentation by *Aspergillus niger* strains improved by parasexual recombination. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 102, p. 63-70, July/Dec. 2002.

MPIGA, P.; BELANGER, R. R.; PAULITZ T. C.; BENHAMOU, N. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28.

Physiological and Molecular Plant Pathology, v. 50, n. 5, p. 301-320, May 1997.

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, Dec. 2003.

MULLANEY, E. J.; DALY, C. B.; ULLAH, A. H. J. Advances in phytase research. **Advances in Applied Microbiology**, v. 47, p. 157-199, 2000.

MULLANEY, E. J.; DALY, C. B.; EHRLICH, K. C.; ULLAH, A. H. J. The *Aspergillus niger* (ficcum) aphA gene encode a pH optimum acid-phosphatase. **Gene**, v. 162, n. 1, p. 117-121, Aug. 1995.

MULLANEY, E. J.; DALY, C. B.; SETHUMADHAVAN, K.; RODRIQUEZ, E.; LEI, X. G.; ULLAH, A. H. Phytase activity in *Aspergillus fumigatus* isolates. **Biochemistry Biophysics Research Communication**, v. 63, p. 275, p. 759-763, 2000.

NAGATA, A. K.; RODRIGUES, P. B.; RODRIGUES, K. F.; FONSECA, R. T. F.; ALBINO, L. F. T.; FIALHO, E. T. Use of the ideal protein concept in diets with different energy levels supplemented with phytase for broiler chickens of 1 to 21 days of age. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 2, p. 599-605, mar./abr. 2009.

NAHAS, E. Control and localization of the phosphatases in conidia of *Neurospora crassa*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 9, p. 830-835, Sept. 1989.

NAMALDI, A.; CALIK, P.; ULUDAG, Y. Effects of spray drying temperature and additives on the stability of serine alkaline protease powders. **Drying Technology**, v. 24, n. 11, p. 1495-1500, 2006.

NAMKUNG, H.; LEESON, S. Effect of phytase enzyme on dietary nitrogen-corrected apparent metabolizable energy and the ileal digestibility of nitrogen and amino acids in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 78, n. 9, p. 1317-1319, Sept. 1999.

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**: princípios de bioquímica. 5. ed. São Paulo: Sarvier, 2011.

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.

NOGUEIRA, S. D. C. P.; MICHELIN, M.; BETINI, J. H.; JORGE J. A.; TERENCE, H. F.; POLIZELI, M. L. Production of xylanase by *Aspergillus* using alternative carbon sources: application of the crude extract on cellulose pulp biobleaching. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 1, p. 149-155, Jan. 2009.

NOUREDDINI, H.; DANG, J. Degradation of phytates in distillers grains and corn gluten feed by *Aspergillus niger* phytase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 159, n. 1, p. 11-23, Oct. 2009.

NUNES, R. C.; KRONKA, R. N.; PRADO, C. S.; ALBENONES, J. M.; NUNES, V. Q. Retirada dos suplementos micromineral e/ou vitamínico da ração de suínos em fase de terminação: característica de carcaça e vida de prateleira da carne suína. **Ciência Animal Brasileira**, v. 2, p. 79-86, 2001.

OH, B. C.; CHANG, B. S.; PARK, K. H.; HA, N. C.; KIM, H. K.; OH, B. H.; OH, T. K. Calcium-dependent catalytic activity of a novel phytase from *Bacillus amyloliquefaciens* DS11. **Biochemistry**, v. 40, n. 32, p. 9669-9676, Aug. 2001.

OLIVEIRA, R. F. M de.; DONZELET, J. L.; ABREULL, M. L. T. de.; FERREIRA, R. A.; VAZ, R. G. M. V.; CELLA, P. S. Effects of temperature and relative humidity on performance and yield of noble cuts of broilers from 1 to 49 days old. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 3, p. 797-803, May/June 2006.

OLIVEIRA NETO, A. R.; OLIVEIRA, R. F. M.; DONZELE, J. L.; ROSTAGNO, H. S.; FERREIRA, R. A.; MAXIMIANO, H. C.; GASPARINO, E. Efeito da temperatura ambiente sobre o desempenho e características de carcaça de frangos de corte alimentados com dieta controlada e dois níveis de energia metabolizável. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 1, p. 183-190, 2000.

ONYANGO, E. M.; BEDFORD, M. R.; ADEOLA, O. Phytase activity along the digestive tract of the broiler chick: a comparative study of an *Escherichia coli* derived and *Peniophora lycii* phytase. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 85, n. 1, p. 61-68, Mar. 2005.

OOMAH, B. D.; MAZZA, G. Optimization of a spray drying process for flaxseed gum. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 36, n. 2, p. 135-143, Feb. 2001.

OSHEROV, N.; MAY, G. S. The molecular mechanisms of conidial germination. **Fems Microbiology Letters**, v. 199, n. 2, p. 153-160, May. 2001.

O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 49-79, 2000.

PANDEY, A.; SZAKACS, G.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ, J. A. L.; SOCCOL, V. T. Production, purification and properties of microbial phytases. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 3, p. 203-214, May 2001.

PANDEY, A.; WEBVB, C.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Enzyme technology**. New Delhi: Asiatech, 2005.

PANHWAR, Q. A.; RADZIAH, O.; SARIAH, M.; ISMAIL, M. R. Solubilization of different phosphate forms by phosphate solubilizing bacteria isolated from aerobic rice. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 11, n. 6, p. 667-673, Nov. 2009.

PAPAGIANNI, M.; PSOMAS, S. K.; BATSILAS, L.; PARAS, S. V.; KYRIAKIDIS, D. A.; LIAKOPOULOUKYRIAKIDES, M. Xanthan production by *Xanthomonas campestris* in batch cultures. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 1, p. 73-80, Sept. 2001.

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, May 1997.

PAWAR, V. C.; THAKER, V. S. Acid phosphatase and invertase activities of *Aspergillus niger*. **Mycoscience**, v. 50, n. 5, p. 323-330, Sept. 2009.

PAYNE, R. L.; LAVERGNE, T. K.; SOUTHERN, L. L. A comparison of two sources of phytase in liquid and dry forms in broilers. **Poultry Science**, v. 84, n. 2, p. 265-272, Feb. 2005.

PEN, J.; VERWOERD, T. C.; VAN PARIDON, P. A.; BEUDEKER, R. F.; VAN DEN ENZEN, P. J. M.; GEERSE K.; VAN DER KLIS, J. D.; VERSTEEGH, H. A. J.; VAN OUYEN, A. J. J.; JOEKEMA, A. Phytase-containing transgenic seeds as a novel feed additive for improved phosphorus utilization. **Biotechnology**, v. 11, p. 811-814, 1993.

PETRE, M.; ZARNEA, G.; ADRIAN, P.; GHEORGHIU, E. Biodegradation and bioconversion of cellulose wastes using bacterial and fungal cells immobilized in radiopolymerized hydrogels. **Resources Conservation and Recycling**, v. 27, n. 4, p. 309-332, Oct. 1999.

PHILIPPOUSSIS, A. N. Production of mushrooms using agro-industrial residues as substrates. In: NIGAM, P. S.-N.; PANDEY, A. (Ed.). **Biotechnology for agro-industrial residues utilization**. New York: Springer, 2009. p. 163-196.

PINTAR, J.; BUJAN, M.; HOMEN, B.; GAZIC, K.; SIKIRIC, M.; CERNY, T. Effects of supplemental phytase on performance and tibia ash of broilers fed different cereals based diets. **Czech Journal of Animal Science**, v. 49, n. 12, p. 542-548, Dec. 2004.

PIZAURO, J. M.; DEMENIS, M. A.; CIANCAGLINI, P.; LEONE, F. L. Kinetic characterization of a membrane-specific ATPase from rat osseous plate and its possible significance on endochondral ossification. **Biochimica et Biophysica Acta: Biomembranes**, v. 1368, n. 1, p. 108-114, 1998.

PLIMMER, R. H. A. The metabolism of organic phosphorus compounds. Their hydrolysis by the action of enzymes. **Biochemistry**, v. 7, p. 43-71, 1913.

POLIZELI M. L.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F. Pectinase production by *Neurospora crassa*: purification and biochemical characterization of extracellular polygalacturonase activity. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 1815-1823, Aug. 1991.

PONS, J. L.; DE LAMOTTE, F.; GAUTIER, M. F.; DELSUC, M. A. Refined solution structure of a liganded type 2 wheat nonspecific lipid transfer protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 16, p. 14249-14256, Apr. 2003.

PORRES, J. M.; STAHL, C. H.; CHENG, W. H.; FU, Y.; RONEKER, K. R.; POND, W. G.; LEI, X. G. Dietary intrinsic phytate protects colon from lipid peroxidation in pigs with a moderately high dietary iron intake. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 221, n. 1, p. 80-86, May 1999.

PORRES, J. M.; ETCHEVERRER, P.; MILLER D. D.; LEI, X. G. Phytase and citric acid supplementation in whole-wheat bread improves phytate-phosphorus release and iron dialyzability. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 4, p. 614-619, May 2001.

POSTERNAK, S. Sur la matiere phospho-organique de reserve des plantes a chlorophylle. Procédé de preparation. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences**, v. 137, p. 202-204, 1903.

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.

RAMAGE, G.; MOWAT, E.; JONES, B.; WILLIAMS, C.; LOPEZ-RIBOT, J. Our current understanding of fungal biofilms. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 340-355, 2009.

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

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, Mar. 2001.

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.; PAES LEME, A. F.; SQUINA, F. M. The *Penicillium echinulatum* secretome on sugar cane bagasse. **Plos One**, v. 7, n. 12, Dec. 2012.

RIZZATI, A. C. S.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F.; RECHIA, C. G. V.; POLIZELI, M. L. T. M. Purification and properties of a thermostable extracellular β -D-xylosidase produced by thermotolerant *Aspergillus phoenicis*. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 26, p. 156-160 2001.

RODRIGUEZ, E.; HAN, Y.; LEI, X. G. Cloning, sequencing, and expression of an *Escherichia coli* acid phosphatase/phytase gene (appA2) isolated from pig colon. **Biochemistry. Biophysics Research Communication**, v. 23, p. 257-117, 1999.

ROOPESH, K.; RAMACHANDRAN, S.; NAMPOOTHIRI, K. M.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparison of phytase production on wheat bran and oilcakes in solid-state fermentation by *Mucor racemosus*. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 3, p. 506-511, Feb. 2006.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; DONZELE, J. L. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2011.

ROMBOLA, T. H.; PEDRINHO, E. A. N.; LEMOS, E. G. M.; GONÇALVES, A. G.; SANTOS, L. F.; PIZAURO, J. M. Identification and enzymatic characterization of acid phosphatase from *Burkholderia gladioli*. **BMC Research Notes**, v. 7, 2014. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1756-0500-7-221.pdf>>. Acesso em 09 mar. 2015.

SAHIN, F.; CAKMAKCI, R.; KANTAR, F. Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N(2)-fixing and phosphate solubilizing bacteria. **Plant and Soil**, v. 265, n. 12, p. 123-129, Aug. 2004.

SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004.

SAMBORSKA, K.; WITROWA-RAJCHERT, D.; GONCALVES, A. Spray-drying of alpha-amylase: the effect of process variables on the enzyme inactivation. **Drying Technology**, v. 23, n. 4, p. 941-953, 2005.

SANTOS, R. R. **Caracterização e aplicação de borras do refino de óleos vegetais para produção de lipase fúngica por fermentação no estado sólido**. 2012. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2012.

SANTOS, F. R.; HRUBY, M.; PIERSON, E. E. M.; REMUS, J. C.; SAKOMURA, N. K. Effect of phytase supplementation in diets on nutrient digestibility and performance in broiler chicks. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 17, n. 2, p. 191-201, 2008.

SANTOS, R. D.; ZANELLA, I.; BONATO, E. L.; PIRES, A. R.; MAGON, L.; GASPARINI, S. P.; PADILHA, L. B. B. Diminuição dos níveis de cálcio e fósforo em dietas com farelo de arroz integral e enzimas sobre o desempenho de frangos de corte. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 517-521, 2004.

SARIYSKA, M. V.; GARGOVA, S. A.; KOLEVA, L. A.; ANGELOV, A. I. *Aspergillus niger* phytase: purification and characterization. **Biotechnological Equipment**, v. 19, p. 98-105, 2005.

SAUER, K.; CAMPER, A. K.; EHLICH, G. D.; COSTERTON, J. W.; DAVIES, D. G. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 4, p. 1140-1154, Feb. 2002.

- SCHIMEL, J.; BALSER, T. C.; WALLENSTEIN, M. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. **Ecology**, v. 88, n. 6, p. 1386-1394, June 2007.
- SCHOLTMEIJER, K.; WESSELS, J. G. H.; WOSTER, H. A. B. Fungal hydrophobins in medical and technical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 1/2, July 2001. doi:10.1007/s002530100632.
- SCHOULTEN, N. A.; TEIXEIRA, A. S.; FONSECA, R. T. F.; BETERCHINI, A. G.; CONTE, A. J.; SILVA, H. O. Levels of calcium in diets supplemented with phytase for broilers in the initial phase. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 5, p. 1190-1197, Sept./Oct. 2003.
- SEBASTIAN, S.; TOUCHBURN, S. P.; CHAVEZ, E. R.; LAGUE, P. C. Efficacy of supplemental microbial phytase at different dietary calcium levels on growth performance and mineral utilization of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 75, n. 12, p. 1516-1523, Dec. 1996.
- SELVAMOHAN, T.; RAMADAS, V.; REJIBEULA, M. Optimization of phytase production by *Pseudomonas* sp. isolated from poultry faces. **International Journal Modern Engineering**, v. 2, p. 1326-1330, 2012.
- SHIEH, T. R.; WARE, J. H. Survey of microorganisms for the production of extracellular phytase. **Applied Microbiology**, v. 16, p. 1348-1351, 1968.
- SILVA, R. R.; COELHO, G. D. **Fungos: principais grupos e aplicações biotecnológicas**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2006.
- SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 2, p. 1495-1508, 2001.
- SILVA JÚNIOR, J. O. C.; VIEIRA, J. L. F.; BARBOSA, W. L. R.; PEREIRA, N. L. Caracterização físico-química do extrato fluido e seco por nebulização de *Symphytum officinale* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 671-677, 2006.
- SIMONS, P. C. M.; VERSTEEGH, H. A.; JONGBLOED, A.W.; KEMME, P. A.; SLUMP, P.; BOS, K. D.; WOLTERS, M. G.; BEUDEKER, R. F.; VERSCHOOR, G. J. Improvement of phosphorus availability by microbial phytase in broiler and pigs. **British Journal of Nutrition**, v. 64, n. 2, p. 525-540, Sept. 1990.
- SINGH, B.; SATYANARAYANA, T. Characterization of a HAP-phytase from a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile*. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 6, p. 2046-2051, Mar. 2009.
- SKOWRONEK, M.; FIEDUREK, J. Inulinase biosynthesis using immobilized mycelium of *Aspergillus niger*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 12, p. 162-167, Jan. 2006.

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 & Biotechnology**, v. 26, n. 11, p. 2009-2018, Nov. 2010.

SOUCHIE, E. L.; SAGGIN JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R.; CAMPELLO, E. F. C.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M. Communities of P-solubilizing bacteria, fungi and arbuscular mycorrhizal fungi in grass pasture and secondary forest of Paraty, RJ Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 78, n. 1, p. 183-193, Mar. 2006.

SOUZA, C. R. F. **Estudo comparativo da produção de extrato seco de *Bauhinia forficata* Link pelos processos *spray-dryer* e leito de jorro**. 2003. 165 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

SPIER, M. R.; LETTI, L. A. J.; WOICIECHOWSKI, A. L.; SOCCOL, C. R. A simplified model for *A.Niger* FS3 growth during phytase formation in solid state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 151-158, Nov. 2009.

SPIER, M. R.; SCHEIDT, G. N.; PORTELLA, A. C.; RODRIGUEZ-LÉON, J. A.; WOICIECHOWSKI, A. L.; GREINER, R.; SOCCOL, C. R. Increase in phytase synthesis during citric pulp fermentation. **Chemical Engineering Communications**, v. 198, n. 2, p. 286-297, 2011.

SREEDEVI, S.; REDDY B. N. Isolation, screening and optimization of phytase production from newly isolated *Bacillus* sp.C43. **International Journal Pharmacology Biological Science**, v. 2, p. 218-231, 2012.

STAHL, K.; CLAEISSON, M.; LILLIEHORN, P.; LINDÉN H.; BACKSTROM, K. The effect of process variables on the degradation and physical properties of spray dried insulin intended for inhalation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 233, n. 12, p. 227-237, Feb. 2002.

SUZUKI, U.; YOSHIMURA, K.; TAKAISHI, M. About the enzyme "phytase", which splits "anhydro-oxy-methylene diphosphoric acid". **Bulletin of the College of Agriculture**, v. 7, p. 503-512, 1907.

TEJEDOR, A. A.; ALBINO, L. F. T.; ROSTAGNO, H. S. Effect of enzymes supplementation in corn soybean meal broiler diets on heal digestibility of nutrients. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 3, p. 809-816, May/June 2001.

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

THOMPSON, L. U. Antinutrients and blood glucose. **Food Technology**, v. 42, p. 123-131, 1988.

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

TIAN, W. J.; FAN, S. D.; KIKUCHI, J. Purification and properties of a low-molecular-weight phytase from *Cladosporium* sp. FP-1. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 97, n. 4, p. 260-266, Apr. 2004.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 335 p.

TU, W. Y.; HUANG, Y. C.; LIU, L. F.; CHANG, L. H.; TAM, M. F. Rpl12p affects the transcription of the PHO pathway high-affinity inorganic phosphate transporters and repressible phosphatases. **Yeast**, v. 28, n. 6, p. 481-493, June 2011.

TUCKEY, S. L.; TALBOT, N. J. Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. **Annual Review Phytopathology**, v. 39, p. 385-417, 2001.

UCHIDA, H.; RAKIDAA, S.; SKAMOTOB, T.; KAWASAKIB, H. Expression of *Aspergillus oryzae* phytase gene in *Aspergillus oryzae* RIB40 niaD. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 102, n. 6, p. 564-567, Dec. 2006.

ULLAH, A. H. J.; CUMMINS, B. J. Extracellular pH-2.5 optimum acid-phosphatase from *Aspergillus ficuum*: immobilization on modified fractogel. **Preparative Biochemistry**, v. 18, n. 4, p. 473-481, 1988a.

ULLAH, A. H.; CUMMINS, B. J. *Aspergillus ficuum* extracellular pH 6.0 optimum acid phosphatase: purification, N-terminal amino acid sequence, and biochemical characterization. **Preparative Biochemistry**, v. 18, n. 1, p. 37-65, 1988b.

ULLAH, A. H. J.; DISCHINGER, H. C. Complete primary structure determination of *Aspergillus ficum* phytase by chemical. **Faseb Journal**, v. 6, n. 1, p. 63-63, Jan. 1992.

ULLAH, A. H. J.; DISCHINGER, H. C. Identification of active-site residues in *Aspergillus ficum* extracellular pH 2.5 optimum acid-phosphatase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 192, n. 2, p. 754-759, Apr. 1993.

ULLAH, A. H. J.; GIBSON, D. M. Extracellular (EC 3.1.3.8) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135. **Preparative Biochemistry**, v. 17, n. 1, p. 63-91, 1987.

ULLAH, A. H.; GIBSON, D. M. Purification and characterization of acid-phosphatase from cotyledons soybean seeds. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 260, n. 2, p. 514-520, Feb. 1988.

ULLAH, A. H. J.; SETHUMADHAVAN, K. PhyA gene product of *Aspergillus ficum* and *Peniophora lycii* produces dissimilar phytases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 303, n. 2, p. 463-468, Apr. 2003.

- USHASREE, M. V.; VIDYA, J.; PANDEY, A. Gene cloning and soluble expression of *Aspergillus niger* phytase in *E. coli* cytosol via chaperone co-expression. **Biotechnology Letters**, v. 36, n. 1, p. 85-91, Jan. 2014.
- VAN STADEN, J.; DEN HANN, R.; VAN ZYL, W. H.; BOTHA, A.; VILJOEN- BLOOM, M. Phytase activity in *Cryptococcus laurentii* ABO 510. **Fems Yeast Research**, v. 7, n. 3, p. 442-448, May. 2007.
- VASCONCELOS, E. A. F.; MEDEIROS, M. G. F.; RAFFIN, F. N.; MOURA, T. F. A. L. Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil®200 nas características dos extratos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 243-249, nov. 2005.
- VATS, P.; BANERJEE, U. C. Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 1, p. 3-14, July 2004.
- VATS, P.; BANERJEE, U. C. Biochemical characterisation of extracellular phytase (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase) from a hyper-producing strain of *Aspergillus niger* van Teighem. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 141-147, Apr. 2005.
- VILLENA, G. K.; GUTIERREZ-CORREA, M. Production of cellulase by *Aspergillus niger* biofilms developed on polyester cloth. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 262-268, Sept. 2006.
- VILLENA, G.; MORENO, P.; CORREA, M. G. Cellulase production by fungal biofilms on polyester cloth. **Agro Food Industry Hi-Tech**, v. 12, n. 1, p. 32-35, Jan./Feb. 2001.
- VILLENA, G. K.; FUJIKAWA, T.; TSUYUMU, S.; GUTIÉRREZ-CORREA, M. Structural analysis of biofilms and pellets of *Aspergillus niger* by confocal laser scanning microscopy and cryo scanning electron microscopy. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1920-1926, Mar. 2010.
- VOGEL, H. J. Distribution of lysine pathways among fungi evolutionary implications. **American Naturalist**, v. 98, n. 903, p. 435-446, 1964.
- VOHRA, A.; SATYANARAYANA, T. Phytases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 29-60, 2003.
- WALPOLA, B. C.; SONG, J. S.; KEUN, M. J.; YOON, M. H. Evaluation of phosphate solubilizing potential of three *Burkholderia* species isolated from green house soils. **Korean Journal of Soil Science & Fertilizer**, v. 45, n. 4, p. 602-609, 2012.
- WANG, Q.; FU, S. J.; SUN, J. Y.; WENG, X. Characterization of a thermostable alkaline phytase from *Bacillus licheniformis* ZJ-6 in *Pichia pastoris*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 27, n. 5, p. 1247-1253, May 2011.

WANG, Y.; GAO X.; SU, Q.; WU, W.; AN, L. Expression of a heat stable phytase from *Aspergillus fumigatus* in tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. NC89). **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 44, n. 1, p. 26-30, Feb. 2007.

WANG, Y.; MENG, F.; ZHANG, Y. Expression, purification and characterization of recombinant protein tyrosine phosphatase from *Thermus thermophilus* HB27. **Acta Biochimica Et Biophysica Sinica**, v. 41, n. 8, p. 689-698, Aug. 2009.

WEBB, J. S.; VAN DER MEI, H. C.; NIXON, M.; EASTWOOD, I. M.; GREENHALGH, M.; READ, S.; ROBSON, G. D.; HANDLEY, P. S. Plasticizers increase adhesion of the deteriorogenic fungus *Aureobasidium pullulans* to polyvinyl chloride. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 3575-3581, Aug. 1999.

WISEMAN, A. **Handbook of enzyme biotechnology**. Chichester: John Wiley & Sons, 1975. 148 p.

WODZINSKI, R. J.; ULLAH, A. H. J. Phytase. **Advances in Applied Microbiology**, v. 42, p. 263-302, 1996.

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

XAVIER SALMON, D. N.; PIVA, L. C.; BINATI, R. L.; RODRIGUES, C.; VANDENBERGUE, L. P.; SOCCOL, C. R.; SPIER M. R. A bioprocess for the production of phytase from *Schizophyllum commune*: studies of its optimization, profile of fermentation parameters, characterization and stability. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 7, p. 1067-1079, Sept. 2012.

XIAO, C.; ZHANG, H.; FANG, Y.; CHI, R. Evaluation for rock phosphate solubilization in fermentation and soil plant system using a stress tolerant phosphate-solubilizing *Aspergillus niger* WHAK1. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, n. 1, p. 123-133, Jan. 2013.

YANG, X. J.; FINNEGAN, P. M. Regulation of phosphate starvation responses in higher plants. **Annals of Botany**, v. 105, n. 4, p. 513-526, Apr. 2010.

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, July 1999.

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, n. 1, p. 1-14, Jan. 2012.

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. 1/2, July 2009. doi: 10.1016/j.gene.2009.04.002

YOSHII, H.; OHASHI, T.; KUGIMOTO, Y.; FURUTA, T.; LINKO, P. Stability of alcohol dehydrogenase (ADH) during a suspended droplet drying and storage. **Drying Technology**, v. 23, n. 6, p. 1217-1227, 2005.

ZANELLA, I. **Suplementação enzimática em dietas a base de milho e soja processadas sobre a digestibilidade de nutrientes e desempenho de frangos de corte**. 1998. 179 f. Tese (Doutorado em Zootecnia Produção Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1998.

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, n. 11, p. 4125-4131, June 2010.

ZHANG, L. H.; DONG, L.; XU, Y.; ZHANG, J. X.; LIU, J.; WANG, H. Properties of *A. Ficum* AS3.324 phytase expressed in tobacco. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 213-216, Jan. 2005.

ZHU, X. L.; ZHANG, L. H.; AN, L.; GAO, X.; WANG, Y. Plant growth promoting activities of phosphate-solubilizing bacteria *Acinetobacter calcoaceticus* YC-5a and *Enterobacter agglomerans* KMC-7. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 2613-2618, Aug. 2014.

ANEXO

Phytase Production by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* Biofilm: Characterization of Enzymatic Activity After Spray Drying in Presence of Carbohydrates and Nonconventional Adjuvants

Vanessa Sayuri Sato¹, João Atílio Jorge², Wanderley Pereira Oliveira³, Claudia Regina Fernandes Souza³, and Luis Henrique Souza Guimarães^{1,2*}

¹Institute of Chemistry of Araraquara – UNESP, Rua Francisco Degni s/n, 14800-900 Araraquara, São Paulo, Brazil

²Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto – USP, Avenida Bandeirantes 3900, Monte Alegre, 14040-901 Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

³Faculty of Pharmaceutics Science of Ribeirão Preto – USP, Avenida Bandeirantes 3900, Monte Alegre, 14040-900 Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Received: August 28, 2013
Revised: October 24, 2013
Accepted: October 31, 2013

First published online
November 5, 2013

*Corresponding author
Phone: +55-16-36024682;
Fax: +55-36024886;
E-mail: lhguimaraes@ffclrp.usp.br

pISSN 1017-7825, eISSN 1738-8872

Copyright© 2014 by
The Korean Society for Microbiology
and Biotechnology

Microbial phytases are enzymes with biotechnological interest for the feed industry. In this article, the effect of spray-drying conditions on the stability and activity of extracellular phytase produced by *R. microsporus* var. *microsporus* biofilm is described. The phytase was spray-dried in the presence of starch, corn meal (>150 µm), soy bean meal (SB), corn meal (<150 µm) (CM), and maltodextrin as drying adjuvants. The residual enzyme activity after drying ranged from 10.7% to 60.4%, with SB and CM standing out as stabilizing agents. Water concentration and residual enzyme activity were determined in obtained powders as a function of the drying condition. When exposed to different pH values, the SB and CM products were stable, with residual activity above 50% in the pH range from 4.5 to 8.5 for 60 min. The use of CM as drying adjuvant promoted the best retention of enzymatic activity compared with SB. Spray drying of the *R. microsporus* var. *microsporus* phytase using different drying adjuvants showed interesting results, being quite feasible with regards their biotechnological applications, especially for poultry diets.

Keywords: *Rhizopus microsporus*, spray drying, phytase, enzyme stabilization

Introduction

Phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases; EC3.1.3.8 and EC3.1.3.26) catalyze the hydrolysis of phosphomonoester bonds of phytate (salts of myo-inositol 1,2,3,4,5,6-hexakis dihydrogen phosphate), thereby releasing lower forms of myo-inositol phosphates and inorganic phosphate. Phytases are widespread among bacteria, yeast, fungi, and plants, and among animals as well [11, 20]. Regardless of the source, several studies have confirmed the use of phytases in animal nutrition, environment protection, and human health [27, 39].

The demand for enzymes with desirable properties for application may be accomplished by screening different

microbial strains isolated from different environments, or may also be performed through modification using methods of protein engineering and molecular evolution [25]. Many bacteria and fungi have been reported as phytase producers under different fermentative process as, for example, the phytase produced by the fungus *Rhizopus oryzae* under solid-state fermentation [29] and by *Thermoascus aurantiacus* in submerged fermentation [22]. However, the possibility of using new ways of cultivation to maximize the production of enzymes, as biofilm fermentation, is attractive. The use of biofilms and their potential to release enzymes with biotechnological potential has been mentioned [10].

One of the main priorities in the marketing of enzymes is to maintain the molecule stability in aqueous solution, as

well as the development of formulations that are stable during packaging, transportation, and long-term storage [19]. Spray-drying is a technology that has been considered as a good alternative for this purpose. It is the most common method for the drying of liquid compositions. The commutation of a solution suspension or emulsion into a powder in a one-step process can be considered as the main advantage of this methodology [35]. The high drying efficiency and the reduced cost compared with the freeze-drying should be also considered [26]. Despite the high drying temperature, the cooling effect caused by the solvent evaporation leads the dried product to relatively low exposure temperature. Therefore, enzymes can be dried without appreciable loss of activity [18]. This method is widely used in dairy and pharmaceutical industries for the dehydration of various substances, such as milk, whey, antibiotics, and vitamins [19].

The addition of stabilizing agents is a common method used to protect the native protein when submitted to drying [2]. The carbohydrates, polymers, and polyols (*e.g.*, mannitol, sucrose, trehalose, lactose, arabic gum, cyclodextrins, and maltodextrin) are widely used. Some enzymes have been successfully spray-dried and characterized as, for example, the lipase of *Cercospora kikuchii* [5] and the β -fructofuranosidase from *Fusarium graminearum* [8]. However, to our knowledge, the properties of fungal spray-dried phytase have not been reported yet. According to this, the present paper describes the characterization of spray-dried extracellular phytase produced by *R. microsporus* var. *microsporus* biofilm in the presence of several carbohydrates and nonconventional drying adjuvants.

Materials and Methods

Microorganism and Culture Condition

The filamentous fungus *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* was isolated from Brazilian soil, identified by the Laboratory of Microbiology from the Federal University of Pernambuco, Brazil, and deposited in the Laboratory of Microbiology of the Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto from the University of São Paulo, Brazil. The microorganism was maintained on slants of PDA medium (Acumedia, Lansing, MI, USA) at 30°C for 7 days, and then stored at 4°C.

The *R. microsporus* var. *microsporus* biofilms were developed on polyethylene inert supports (2.0 × 2.0 cm) previously washed with detergent and distilled water, and then sterilized under UV radiation. The sterilized supports were immersed in an aqueous spore suspension (10⁶ spores/ml) at 30°C under agitation (50 rpm) for 2 h for spore adhesion to the support. The supports were then rinsed twice with distilled water for 30 min under agitation

(50 rpm) in order to remove the unadhered spores. The supports with adhered spores were transferred to 250 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml of Vogel medium [38] with different agro-industrial products (soya mince, rye flower, sugarcane bagasse, wheat bran, and orange peel) and sugars (fructose, galactose, glucose, maltose, and sucrose) as carbon sources, pH 6.0, and previously autoclaved at 121°C, 1.5 atm for 30 min. The cultures were maintained at 30°C under agitation (50 rpm) for 48 h. The media values obtained were compared using the Tukey test with the *p* value fixed at 0.05.

Determination of Phytase Activity and Protein Quantification

After cultivation, the biofilm was removed and the cell-free extracellular extract containing phytase was obtained, dialyzed overnight at 4°C against distilled water, and used for the enzyme activity assay. The phytase activity was assayed according to Gulati *et al.* [9] with modifications. The reaction mixture was 50 μ l of enzyme sample incubated with 50 μ l of 1% (w/v) phytic acid (dodecasodium salt; Sigma) in 0.2 M sodium acetate buffer, pH 4.5. After 30 min, the reaction was stopped by the addition of 100 μ l of 15% TCA (trichloroacetic acid) and 300 μ l of distilled water was added in each test tube. Then 0.9 μ l of the chromogenic reagent (0.76 M sulfuric acid, 10% ascorbic acid, and 2.5% ammonium molybdate; 3:1:0.5 (v/v/v)) was added and the tubes were incubated at 50°C for 20 min. The absorbance was taken at 820 nm. Controls without addition of enzyme were included to estimate the non-enzymatic hydrolysis of the substrate. One unit of enzyme activity was defined and expressed as the amount of enzyme that releases 1 μ mol of phytate per minute under the assay conditions. The spray-dried phytase activity was determined in the same conditions, but using the powder diluted in 0.5 M sodium acetate buffer at pH 4.0, taking into account the residual solids present in the soluble extract.

Protein content was quantified according to Bradford [1] using bovine serum albumin (BSA) as standard.

Scanning Electron Microscopy (SEM)

The *R. microsporus* var. *microsporus* biofilm on polyethylene as an inert support obtained from the cultivation using sugarcane bagasse as carbon source was dehydrated with increasing concentrations of ethanol in water (10–90%, by volume) and finally with absolute ethanol, sprayed with colloidal gold, and submitted to SEM analysis using a Zeiss equipment EVO50 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) with IXRF Systems 500 digital processing.

Drying and Operation Conditions

Drying was conducted in a bench-top spray dryer (model SD-05; Lab-Plant, Huddersfield, UK), with a concurrent flow regime. The drying chamber had a diameter of 215 mm and a height of 500 mm. The main components of the system were a feed system for the drying gas, consisting of a blower and an air filter; a temperature control system for the drying gas; and a product collection system (cyclone). The crude extract was placed into the

spray dryer through a feed system, consisting of a peristaltic pump, a two-fluid atomizer (inlet orifice diameter of 1.0 mm), and the air compressor. The feed flow rate of atomizing was 17.0 L/min at a pressure 1.5 kgf/cm². The flow rate of the drying air was maintained constant at 60 m³/h.

The drying operation started with the injection of drying air into the SD-05 spray dryer. The air was heated at 100°C, and then the crude extract was fed at a preset flow rate (4 g/min) together with the atomizing air at a pressure of 141 kPa and flow rate of 17.0 L/min. Different proportions (2, 5, and 10% (w/v)) of the adjuvants starch, corn meal (>150 µm), soybean, corn meal (<150 µm) and maltodextrin were added to the enzymatic extract before spray drying. Measurements of the outlet gas temperature (T_{gs}) were taken at regular intervals to detect the moment when the dryer attained a steady state (15 min). Once steady state was attained, samples of the dried product were collected and used for physical and chemical characterization.

Measurement of Powder Properties

The powder properties were characterized through the determination of phytase activity, powder moisture content, water activity, and particle size. The determination of the residual moisture content of the samples was performed in a Karl Fischer titrator (Titrimo Plus model 870; Metrohm). The water activity was measured using a water activity meter in Aqua Lab 4TEV (Decagon Devices, Inc., Pullman, WA, USA). For the determination of particle size distribution, dried sample was sprinkled on a glass slide and images were obtained with the aid of an optical microscope coupled with a digital camera (Olympus model BX60MIV). Photographs were analyzed using the Image Pro Plus 7.0 software, and the average diameter of particles (which refers to the average length of the diameter measured at intervals of two degrees and passing through the center of particles) was determined. The powder production yield or product recovery of the spray-drying was also evaluated as a measure of dryer performance. The product recovery was determined by mass balance, defined as the ratio between the total mass of the solids introduced into the dryer and the total mass collected by the cyclone. The powder on the internal wall of the cyclone was not considered, and assumed as powder losses.

Biochemical Characterization of the Powders

The powders containing phytase that had the best residual activity and product recovery were characterized. Reactions to determine the optimum pH and temperature of phytase activity after drying were conducted between 30°C and 80°C, and pH between 2.5 and 10.5, using 0.5 M citrate buffer (2.5–3.5), sodium acetate buffer (pH 3.5 to 6.0), Tris-HCl buffer (pH 6.0–8.5), and Ampol buffer (pH 8.5–10.5). The stability to pH and temperature was determined using the pH range from 2.5 to 10.5 for 30 to 60 min and temperature range between 30°C and 80°C for certain periods (5–180 min). For this goal, the powders obtained with soy bean and corn meal (<150 µm) were diluted in 0.5 M sodium

acetate buffer at pH 4.0 (10.15 g/100 ml of buffer) as described previously and maintained at different pH and temperature conditions. It was used the proportion of 1:1 (v/v) between the enzymatic sample and the incubation buffer. During the incubation, the tubes were mixed manually. The assayed samples were placed on ice to decrease the temperature as soon as possible and the phytase activity was determined as described previously. The enzymatic activity of the spray-dried extract measured after the completion of the drying (time 0) was used as a control.

Results and Discussion

Production of Phytase by *R. microsporus* var. *microsporus* Biofilm

The *R. microsporus* var. *microsporus* biofilm produced good levels of extracellular phytase using saccharides, considering the specific activity, especially with sucrose (121.7 U/mg of protein) and glucose (95.4 U/mg of protein) as carbon sources. In the absence of carbon source, however, the enzyme was also produced. These results indicate that the phytase production by this fungus is constitutive. On the other hand, the best production using agro-industrial products was obtained using sugarcane bagasse (44.8 U/mg of protein) and rye flour (16.4 U/mg of protein) as carbon source (Table 1). Despite the best production using saccharides, the biofilm mass obtained was lower than the biomass obtained in the presence of agro-industrial products

Table 1. Carbon sources used for phytase production by *R. microsporus* var. *microsporus* biofilms.

Carbon source	Extracellular phytase activity		Dried biomass
	U/ml	U/mg of protein	g
None	42.87 ± 0.47 ^a	114.75 ± 0.23 ^a	0.06
Crushed soy	23.38 ± 0.33 ^b	6.48 ± 0.20 ^b	1.13
Fructose	29.12 ± 0.14 ^c	43.13 ± 0.09 ^c	0.13
Galactose	30.92 ± 0.70 ^c	88.7 ± 0.43 ^d	0.34
Glucose	30.09 ± 0.33 ^c	95.37 ± 0.20 ^{a,d,g}	0.28
Maltose	28.9 ± 0.20 ^{c,d}	67.4 ± 0.13 ^e	0.47
Oat meal	27.71 ± 0.52 ^d	14.76 ± 0.32 ^f	1.53
Rye flour	30.21 ± 0.28 ^c	16.43 ± 0.17 ^f	1.62
Sucrose	32.91 ± 0.89 ^{c,e}	121.69 ± 0.55 ^g	0.51
Sugarcane bagasse	35.81 ± 0.11 ^e	44.8 ± 0.99 ^c	1.29
Wheat bran	26.67 ± 0.28 ^d	13.4 ± 0.17 ^f	2.81

Cultures were performed using Vogel medium, pH 6.0, at 30°C for 48 h under orbital agitation (50 rpm). The media values were compared using the Tukey test ($p < 0.05$) and the same lower case letters in the columns show that there is no statistically significant difference. The biomass was determined after biofilm drying at 40°C using a stove.

as carbon sources. In addition, the development of biofilm in the absence of carbon source was extremely reduced (0.06 g). In this situation, the specific activity was directly influenced by the biofilm biomass since a reduced growth also reduced protein secretion and, consequently, gave a higher specific activity. Considering this aspect as well as that the enzyme production using sugarcane bagasse was 2.7 times higher than that obtained for rye flour, the former was selected as the carbon source for phytase production. In addition, the specific activity obtained when saccharides were used as carbon sources showed higher values, due to the low levels of protein. Various authors have used sugarcane bagasse as carbon source for the production of enzymes [23, 30]. According to Pandey *et al.* [27], the energy required and the physical support for the fungus growth as well as the production of the desired metabolite are primarily provided by the carbon source. Thus, probably the sugarcane bagasse has additional nutrients that promote better development of the fungus and, consequently, an increase in the enzyme production. There are reports in the literature on the use of other types of waste as carbon source to produce enzymes, such as the

work of Spier *et al.* [34] that shows the production of phytase using citrus pulp. Wheat flour is well reported for the production of various enzymes with industrial application, such as cellulases, xylanases, and phytases from *Aspergillus japonicus*. Roopesh *et al.* [31] optimized production of phytase by *Mucor racemosus* in wheat bran. However, for the production of phytase by *R. microsporus* var. *microsporus*, this carbon source was less pronounced. Being an agro-industrial residue, sugarcane bagasse has low cost, providing more viable conditions for large-scale production. The maximum production of extracellular phytase by *R. microsporus* var. *microsporus* biofilms was obtained in 48 h. The maximum phytase activity from *Saccharomyces cerevisiae* CY was also obtained with 48 h of cultivation with 10% galactose as carbon source [13]. Other different periods for phytase production by microorganisms have been reported as, for example, 14 h for *E. coli* phytase [14] and 120 h for *Bacillus* sp. KHU-10 [4].

The enzyme production is also influenced by the way in which the fungus grows. Fig. 1 shows the morphology of the *R. microsporus* var. *microsporus* biofilm after 48 h of growth in medium containing sugarcane bagasse as carbon

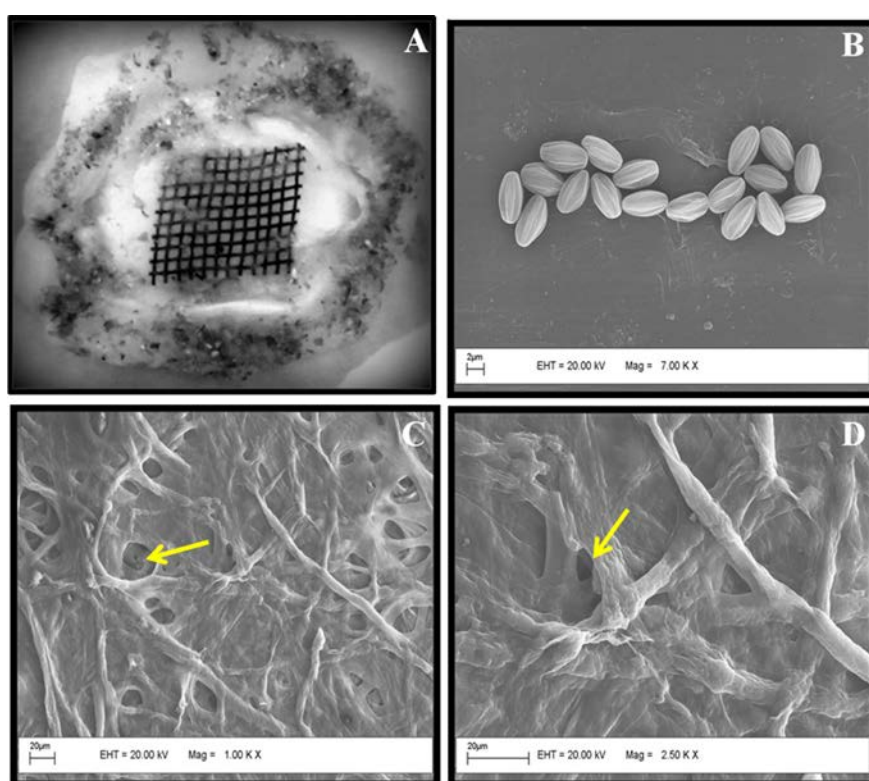


Fig. 1. Biofilm (A) and scanning electron micrograph of *R. microsporus* var. *microsporus* spores (B) and biofilm obtained with 48 h of growth (C and D).

Channels are indicated by arrows.

source. The development of the fungal biofilm depends on sequential steps where the spore adhesion in the inert support, using adhesive molecules, is the first one. Then, the germinative tube is provided and, consequently, the hyphae develop. According to the SEM micrograph (Fig. 1B), the spores from *R. microsporus* var. *microsporus* have an ellipsoid morphology with rugous surface that can facilitate its interaction with the inert support. The biofilm can be characterized by several intertwined hyphae, which form an ordered array, with the formation of various channels that allow efficient exchange of nutrients between the microbial cells and the environment (Figs. 1C and 1D). Morphological patterns similar to *R. microsporus* var. *microsporus* biofilms were observed in other studies with biofilms, as demonstrated for the biofilm of *A. niger* in polyester fabric [36, 37].

Phytase Activity of Spray-Dried Product

The maintenance of the enzyme structure and its properties, as well as the improvement in its stability, is an important challenge for biotechnological application of this type of molecule. To protect the enzyme during the drying process,

the extracellular crude extract containing phytase from *R. microsporus* var. *microsporus* was added with different protective adjuvants in different proportions. Some carbohydrates that are recognized as agents that protect the enzymatic activity at high temperatures were used as adjuvants, as well as some alternative adjuvants like corn bran and soybean meal poultry feed used in animal feed [32]. Table 2 presents the effects of the different adjuvants and their respective concentrations, as well as the outlet drying gas temperature (T_{gs}) and feed flow rate of enzyme composition (W_{real}) on product recovery (R_{EC}), drying efficiency (X), and phytase activity (R_{PA}).

During the drying process, the outlet air temperature was maintained between 68°C and 72°C. Similar results were observed in studies by other authors [5, 6, 8], using similar drying conditions. According to results obtained by Namaldi *et al.* [21], the loss of the enzyme activity becomes more pronounced when the inlet temperature of the drying air is increased. In spite of the drastic conditions of spray drying, the enzyme activities can be maintained if their native structure is preserved by the use of protective adjuvants. This makes the spray-drying a convenient method for

Table 2. Effects of type and concentration of drying adjuvants on process yield, phytase activity, residual phytase activity (R_{PA}), and outlet drying gas temperature (T_{gs}).

Experimental conditions		Responses				
Adjuvants	Concentration (%)	T_{gs} (°C)	W_{real} (g/min)	R_{EC} (%)	X (%)	R_{PA} (%)
Starch	10	68	4.3	63.1	41.2	44.8
	5	69	4.1	60.2	39.9	40.8
	2	68	4.1	53.6	41.2	10.7
Corn meal (>150 μ m)	10	69	4.4	20.6	38.9	40.5
	5	69	4.1	22.1	39.8	30.5
	2	69	4.0	24	36.1	25.7
Soybean meal	10	71	4.1	32.6	37.6	60.4
	5	69	4.1	30.6	37.7	59.2
	2	69	4.2	22.4	36.5	59.6
Corn meal (<150 μ m)	10	71	4.1	55.7	39.4	49.3
	5	71	4.2	57.5	38.1	59.5
	2	70	4.0	41.2	37	59.6
Maltodextrin	10	72	4.1	46.2	39.1	58
	5	72	3	5.6	37.8	57.9
	2	71	4	6.9	37.8	56.6
Aqueous solution						
phytase						100

T_{gs} : outlet drying gas temperature; W_{real} : feed flow rate of enzyme composition; R_{EC} : product recovery; X : drying efficiency; R_{PA} : residual phytase activity (residual phytase activity was determined by comparing the activities after being spray-dried and the enzyme in aqueous solutions before drying). The 100% corresponds to 36.8 U/ml.

enzyme drying. The α -amylase (Fungamyl 800L, Novozymes A/S) obtained from *Aspergillus oryzae* dissolved in a solution of maltodextrin and submitted to the spray-drying showed a variation in outlet and inlet air temperatures from 50°C to 107°C and 160°C to 220°C, respectively [33]. For serine alkaline proteases spray-dried, the inlet air temperature was from 70°C to 130°C, and the outlet air temperature ranged from 56°C to 90°C [21]. In the study of drying of probiotics for *Bifidobacterium lactis* BB12, the inlet and outlet temperatures were 80°C and 48°C, respectively [16].

The best product recovery, after the spray-drying, was found using starch (60–63.1%) and corn meal <150 μm (55.7–57.1%) as adjuvants (Table 2). On the other hand, low yields of the drying process (5.6% and 6.9%) were obtained using maltodextrin. This may be related to the physicochemical properties of the resulting mixture of enzymatic extract with maltodextrin. The low yield in some cases might be due to the inefficient powder collection system of the spray dryer, which leads to a carryover of fine particles along the exhaust air. In studies conducted by Costa-Silva *et al.* [5], the powder deposition in the chamber during the spray-drying was also cited as a possible factor responsible for reduced yields.

The highest residual phytase activity was found for the powders containing soybean at all concentrations (average 59.7%), as well as when used corn meal was (<150 μm) as adjuvant (59%) at 2% and 5% (w/v). The powder containing maltodextrin also presented good residual phytase activity, but the recovery was reduced, as previously presented. For α -amylase from *Aspergillus oryzae*, the residual activity obtained for the enzyme dried in presence of maltodextrin varied from 51.9% to 91.8% [33]. The extract containing *F. graminearum* β -fructofuranosidase was better when spray-dried with the modified starch (10% (w/v)) and trehalose (2% (w/v)), with 63.6% and 56.9% of recovery, respectively [8].

According to Stahl *et al.* [35], the reduction of the feed flow rate can reduce the particle size. If the same amount of liquid is sprayed into smaller particles, the total surface area of droplets is increased, resulting in an extensive contact with high temperature. It can lead to a reduction in the enzyme activity. In addition, other factors have been recognized as important for the reduction of the enzymatic activity during spray-drying. The proteins are presumed to be exposed to high shear forces during the atomization process, and contact with the air flow of high temperature, and thus suffer from heat stress resulting in irreversible structural changes and thermal denaturation, among others [41].

To reduce the degree of activity, loss of an enzyme during drying, adjuvants as, for example, the carbohydrates (as used for spray-drying of *R. microsporus* var. *microsporus* phytase) can be used. Two mechanisms may explain, at least in part, the role of carbohydrates in the protection of the enzyme. In the first case, the water is replaced by carbohydrates to preserve the native structure of the protein. In aqueous medium, water and protein establish hydrogen bonds, as can be also observed for carbohydrates, which form hydrogen bonds with proteins in the solid state. A second hypothesis is the formation of a crystalline matrix, which hinders the change of protein conformation, thus preserving its activity [19].

Physical Properties of the Spray-Dried Powders

The average particle diameters of spray-dried extract using corn meal (28.45 μm) were significantly higher than that observed for the powders obtained with maltodextrin (17.86 μm) and with starch (13.25 μm) (Table 3). The micro- and macroscopic aspects were clearly observed in powders

Table 3. Physical properties of the powders containing phytase in the presence of different adjuvants.

Powders	Responses		
	A_w	X_p (%)	dp (μm)
ST 2%	NA	10.7 $\pm$ 0.67	13.83 $\pm$ 8.33
ST 5%	NA	9.78 $\pm$ 0.75	13.54 $\pm$ 5.37
ST 10%	NA	7.62 $\pm$ 0.65	12.39 $\pm$ 5.05
CM1 2%	NA	10.24 $\pm$ 0.4	NA
CM1 5%	NA	8.90 $\pm$ 0.38	NA
CM1 10%	NA	7.72 $\pm$ 0.63	NA
SB 2%	NA	9.73 $\pm$ 0.3	NA
SB 5%	NA	8.85 $\pm$ 0.62	NA
SB 10%	0.2 $\pm$ 0.01	7.66 $\pm$ 0.36	NA
CM2 2%	NA	9.3 $\pm$ 0.14	23.13 $\pm$ 22.8
CM2 5%	NA	7.78 $\pm$ 0.46	32.87 $\pm$ 25.8
CM2 10%	0.24 $\pm$ 0.01	6.96 $\pm$ 0.69	29.37 $\pm$ 23.8
MT 2%	NA	10.6 $\pm$ 0.77	15.45 $\pm$ 17.05
MT 5%	NA	8.46 $\pm$ 0.22	18.24 $\pm$ 30.72
MT 10%	0.23 $\pm$ 0.01	6.54 $\pm$ 0.49	19.90 $\pm$ 37.31

ST: starch; CM1: corn meal (>150 μm); SB: soybean; CM2: corn meal (<150 μm); MT: maltodextrin; A_w : water activity; X_p : product moisture content; dp: particle diameter; NA: not available.

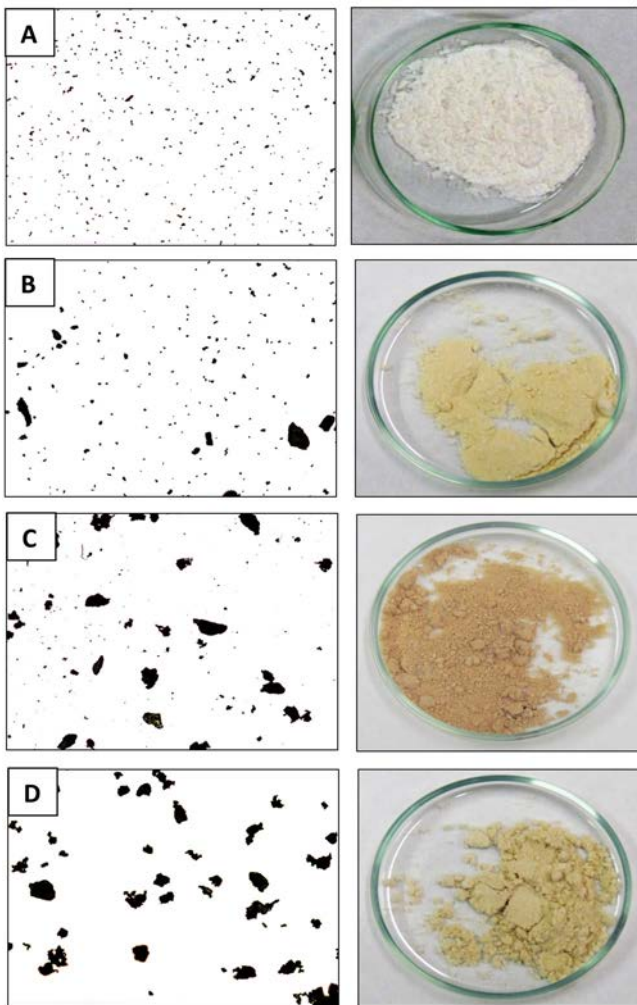


Fig. 2. Spray-dried phytase powder using different adjuvants: starch 2% (A), corn meal (<150 μm) 2% (B), soybean meal 2% (C), and corn meal 2% (>150 μm) (D).

Images were obtained in an optical microscope coupled with a camera (Olympus model BX60MIV). Magnification = 40x.

containing the enzyme (Fig. 2). The soybean and corn meal (>150 μm) are visually amorphous, when compared with the starch and corn meal (<150 μm). It was not possible to determine the average diameter of the corn meal (>150 μm) and soybean meal powders because of the particles aggregation. This may be due to a high moisture content, since water is a determinant factor for both the integrity of the solid matrix and the protein-adjuvant interaction [17]. It was mentioned that the dry powder containing trypsin using lactose, dextrin, and cyclodextrin as adjuvants was almost all amorphous, whereas the powder obtained with sucrose as adjuvant showed different degrees of crystallinity and that with mannitol was highly crystalline [19].

The water activity (A_w) and the moisture content of the product are important aspects that should be considered for the stability of some processed foods and for inhibition of the microbial growth. The dried extracts that had the best phytase activity and product recovery had minimum values of water activity, which is desired to guarantee product stability (Table 3). The growth of bacteria that influences the deterioration of the product ceases at A_w below 0.9. Most yeast and filamentous fungi will not grow at A_w below 0.85 and 0.70, respectively. These values are higher than those found in the spray-dried powder containing phytase described in this paper. The moisture content ranged from 6.54 to 10.5, depending on the concentration and type of adjuvant added to the feed composition.

Biochemical Characterization of Spray-Dried Products

The determination of the effects of temperature and pH on enzymatic activity is very important to define the process parameters for enzyme utilization, as well as its stability during the process. According to this, the optimum temperature and pH of extracellular phytase for the spray-dried powders using soybean and corn meal (<150 μm) as adjuvants were determined, as well as for the free enzyme. Two peaks of phytase activity, one at pH 4.5 and another at pH 8.5, for both soybean meal and corn meal (150 μm) spray-dried powders were obtained (Figs. 3A and 3C). The phytase activity under alkaline pH is an uncommon and interesting characteristic for fungal phytases, which showed activity at a range of pH 4.5 to 6.0 as demonstrated for free *R. microsporus* var. *microsporus* phytase with two peaks of activity at 4.5 and 6.5 (data not shown). However, alkaline phytases have been reported for bacteria such as *Bacillus* [9]. In addition, significant phytase activity (>70%) was also observed for the pH range from 5.0 to 8.0. It is possible that the *R. microsporus* var. *microsporus* produces two phytases: one is acidic and the other is a new alkaline enzyme. Another explanation would be the production of a bifunctional enzyme that is able to act in both conditions. Fungal alkaline phytase has not been documented until this moment. Production of two different enzymes has been reported as observed for the mesophilic fungus *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 that produced two different phytases designated as phyA and phyB, one with optimum pH of 5.5 and the another with optimum pH of 2.0, respectively [12]. As an example of a bifunctional enzyme, *Rhizopus oryzae* phytase produced under solid-state fermentation that acts at pH 1.5 and 5.5 can be cited [29].

The optimal temperature for phytase activity after drying

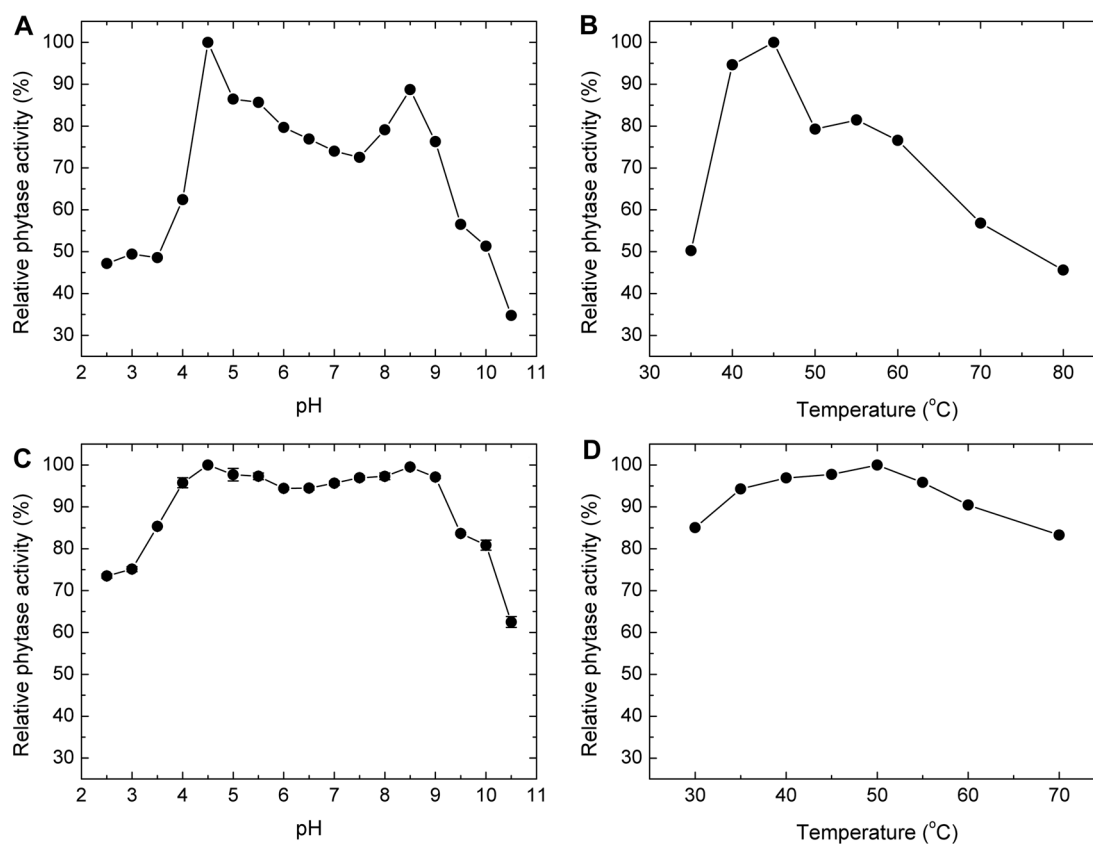


Fig. 3. Influence of pH (A and C) and temperature (B and D) on the activity of the spray-dried phytase from *R. microsporus* var. *microsporus* in the presence of soybean (A and B) and corn meal (<150 μ m) (C and D) as adjuvants.

was 45°C using soybean (Fig. 3B) and 50°C using corn meal (<150 μ m) (Fig. 3D) as adjuvants, both higher than that found for the free enzyme (40°C). Several studies have investigated the best temperature of reaction for microbial phytases, with optimal activity reported between 40°C and 60°C, as obtained for the enzymes from *Aspergillus fumigatus* (37°C) [28] and *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 (55°C) [12]. Then, the spray dryer technology can be used to also improve some enzymatic properties if compared with the free enzyme, because of the protective action of the adjuvants.

The soybean meal and corn meal powders containing phytase were exposed to different pH values for 30 and 60 min. The phytase activity in soybean powder was maintained higher than 60% for 60 min at a pH range from 4.5 to 8.5 (Fig. 4A). For the powder with corn meal (<150 μ m) as adjuvant, the phytase activity was maintained above 90% at pH value from 2.5 to 10.0 (Fig. 4C). There are no significant differences in the stability profile for 30 and 60 min considering both adjuvants. For the free enzyme,

the stability was reduced at extreme pH values with a half life (t_{50}) of 120 min at pH 2.0, 3.0, and 10.5 (data not shown), a profile similar to that found in the presence of soybean as adjuvant. The differences observed between the stabilities obtained in the presence of both soybean meal and corn meal can be explained by the interactions of these adjuvants with the enzyme molecule. The corn meal adjuvant was able to protect the enzyme structure better than soybean meal, especially at extreme pH. The reduced dimension of corn meal (<150 μ m) adjuvant allows the higher surface of contact to interact with the enzyme molecule if compared with each other. The phytase from *Schizophyllum commune* maintained 100% of its activity at pH 6.0 after 72 h [40]. According to Rani and Ghosh [29], the optimum temperature and pH for phytase activity from *Rhizopus oryzae* was 55°C, and 1.5 and 5.5, respectively. Despite the few studies on the stability of dried phytase as well as data on enzyme storage at room temperature or at higher temperatures, the results obtained here for spray-

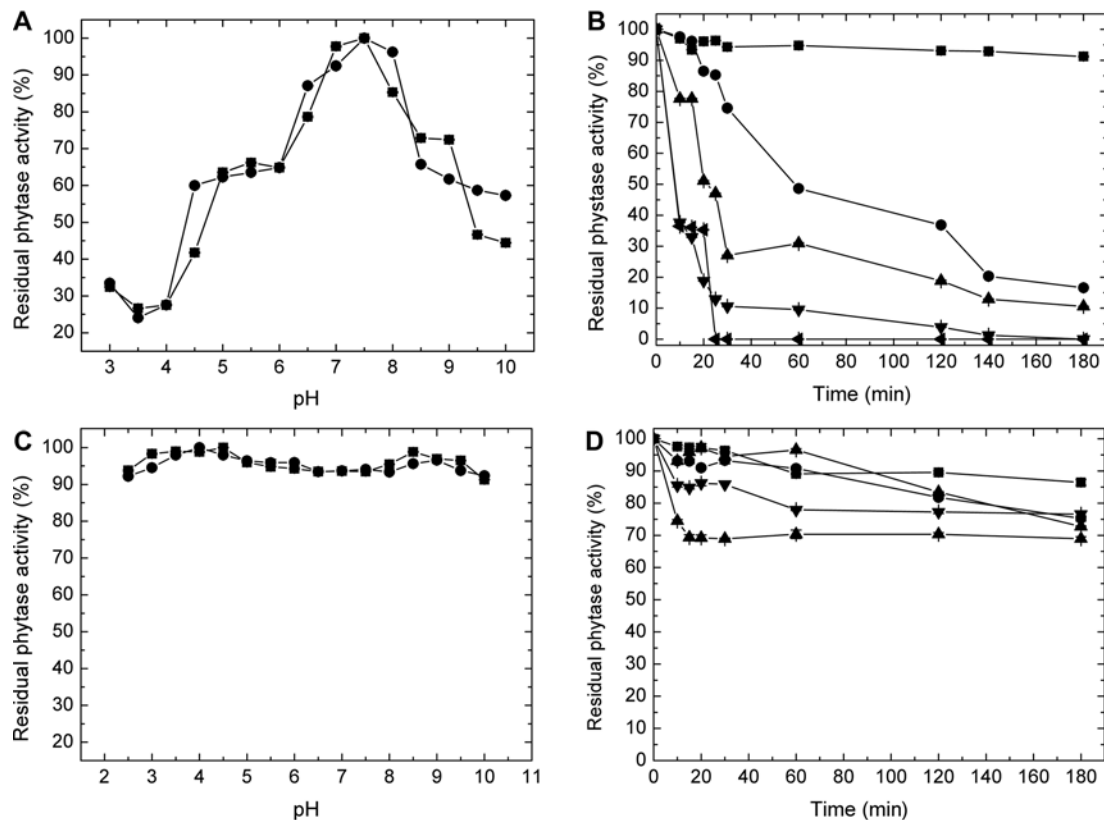


Fig. 4. pH stability (A and C) for 30 min (■) and 60 min (●), and thermal stability (B and D) at (■) 30°C, (●) 37°C, (▲) 40°C, (▼) 50°C, and (◄) 60°C, and at (■) 37°C, (●) 40°C, (▲) 50°C, (▼) 60°C, and (◄) 70°C for spray-dried phytase in the presence of soybean meal (A and B) and corn meal (<150 μ m) (C and D), respectively.

dried *R. microsporus* var. *microsporus* phytase are promising for future application. For correct action, these enzymes should be resistant both to the action of the stomach pH and the temperature of food processing, as well as capable to support the storage condition [24].

The phytase activity based on soybean meal as spray-drying adjuvant was fully stable at 30–37°C for 30 min. (Fig. 4B). On the other hand, the enzyme activity was reduced when the dried extract was maintained at 50°C and 60°C, with a half-life (t_{50}) of 8 min (Fig. 4B). The use of corn meal (<150 μ m) as adjuvant allowed good thermal stability, with 75% of phytase activity maintained for 180 min from 37°C to 60°C, and 70% of activity at 70°C (Fig. 4D). The *A. niger* ATCC 9142 phytase retained 22% residual activity after 3 min at 80°C [3]. The spray-dried phytase from *R. microsporus* var. *microsporus* was found to be more stable than the other reported phytases [7, 15]. When compared with the pH and temperature stability of the crude extract, the spray-dried enzyme in the presence

of corn meal (<150 μ m) had its relative activity improved in 5%. The interaction between the adjuvant corn meal and the protein provided greater protection than that observed for the use of soybean meal as adjuvant. The addition of some stabilizing agents would prevent the direct contact of the protein with high temperatures and or stabilize the conformational structure of the protein [5].

In conclusion, the production of *R. microsporus* var. *microsporus* phytase for use in a biofilm is an alternative and viable process for future applications. In addition, the enzyme production was dependent on the carbon source used. The extracellular enzyme obtained under this condition was successfully spray-dried and its stability properties were improved compared with the soluble enzyme, allowing the use of this enzyme for biotechnological applications, especially in diets for poultry. In addition, this is the first time that an alkaline activity has been mentioned for a fungal phytase, deserving future investigation and characterization of these interesting properties.

Acknowledgments

We thank Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support, and Maurício de Oliveira and M.Sc. Marcelo Luís Lombardi Martinez for the technical assistance.

References

- Bradford MM. 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microorganism quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Carpenter JF, Crowe JH. 1989. An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. *Biochemistry* **28**: 3916-3922.
- Casey A, Walsh G. 2003. Purification and characterization of extracellular phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142. *Bioresour. Technol.* **86**: 183-188.
- Choi YM, Suh HJ, Kim JM. 2001. Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus* sp. KHU-10. *J. Prot. Chem.* **20**: 287-292.
- Costa-Silva TA, Nogueira MA, Souza CRF, Oliveira WP, Said S. 2011. Lipase production by endophytic fungus *Cercospora kikuchii*: stability of enzymatic activity after spray drying in the presence of carbohydrates. *Drying Technol.* **29**: 1112-1119.
- Costa-Silva TA, Souza CRF, Oliveira WP, Said S. 2010. Partial purification and drying by spray dryer of extracellular lipases from the endophytic fungus *Cercospora kikuchii*. *J. Biotechnol.* **150**: S377.
- Escobin-Mopera L, Ohtani M, Sekiguchi S, Sone T, Abe A, Tanaka M, et al. 2012. Purification and characterization of phytase from *Klebsiella pneumoniae* 9-3B. *J. Biosci. Bioeng.* **113**: 562-567.
- Gonçalves HB, Jorge JA, Oliveira WP, Souza CRF, Guimarães LHS. 2013. Extracellular β -fructofuranosidase from *Fusarium graminearum*: stability of the spray-dried enzyme in the presence of different carbohydrates. *J. Microencapsul.* **30**: 624-631.
- Gulati HK, Chadha BS, Saini HS. 2007. Production and characterization of thermostable alkaline phytase from *Bacillus laevolacticus* isolated from rhizosphere soil. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 91-98.
- Gutiérrez-Correa M, Ludeña Y, Ramage G, Villena GK. 2012. Recent advances on filamentous fungal biofilms for industrial uses. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **167**: 1235-1253.
- Haefner S, Knietzsch A, Scholten E, Braun J, Lohscheidt M, Zelder O. 2005. Biotechnological production and applications of phytases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**: 588-597.
- Howson SJ, Davis RP. 1983. Production of phytate-hydrolyzing enzyme by some fungi. *Enzyme Microb. Technol.* **5**: 377-382.
- In M-J, Seo S-W, Oh N-S. 2008. Fermentative production and application of acid phytase by *Saccharomyces cerevisiae* CY strain. *Afr. J. Biotechnol.* **7**: 3115-3120.
- Kleist S, Miksch G, Hitzmann B, Arndt M, Friehs K, Flaschel E. 2003. Optimization of the extracellular production of a bacterial phytase with *Escherichia coli* by using different fed-batch fermentation strategies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**: 456-462.
- Lan GQ, Abdullah N, Jalaludin S, Ho YW. 2011. Purification and characterization of a phytase from *Mitsuokella jalaludinii*, a bovine rumen bacterium. *Afr. J. Biotechnol.* **10**: 12796-12806.
- Lian WC, Hsiao HC, Chou CC. 2002. Survival of bifidobacteria after spray-drying. *Int. J. Food Microbiol.* **74**: 79-86.
- Linders LJM, Meerdink G, VanTriet K. 1996. Influence of temperature and drying rate on the dehydration inactivation of *Lactobacillus plantarum*. *Food Bioprod. Bioprocess.* **74**: 110-114.
- Masters K. 1991. *Spray-Drying Handbook*. Longman, Harlow, England.
- Millqvist-Fureby A, Malmsten M, Bergenstahl B. 1999. Spray-drying of trypsin – surface characterisation and activity preservation. *Int. J. Pharmaceut.* **188**: 243-253.
- Mullaney EJ, Daly CB, Ullah AHJ. 2000. Advances in phytase research. *Adv. Appl. Microbiol.* **47**: 157-199.
- Namaldi A, Calik P, Uludag Y. 2006. Effects of spray drying temperature and additives on the stability of serine alkaline protease powders. *Drying Technol.* **24**: 1495-1500.
- Nampoothiri KM, Tomes GJ, Roopesh K, Szakacs G, Nagy V, Soccol CR, Pandey A. 2004. Thermostable phytase production by *Thermoascus aurantiacus* in submerged fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **118**: 205-214.
- Naqvi SHA, Dahot MU, Khan MY, Xu JH, Rafiq M. 2013. Usage of sugar cane bagasse as an energy source for the production of lipase by *Aspergillus fumigatus*. *Pakistan J. Bot.* **45**: 279-284.
- Nunes RC, Kronka RN, Prado CS, Mesquita AJ, Nunes VQ. 2001. Retirada dos suplementos micromineral e/ou vitamínica ração de suínos em fase de terminação: característica de carcaça e vida de prateleira da carne suína. *Ciência Animal Brasileira* **2**: 79-86.
- Olempska-Beer ZS, Merker RI, Ditto MD, DiNovi MJ. 2006. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms – a review. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **45**: 144-158.
- Oomah BD, Mazza G. 2001. Optimization of a spray drying process for flaxseed gum. *Int. J. Food Sci. Technol.* **36**: 135-143.
- Pandey A, Szakacs G, Soccol CR, Rodriguez-Leon JA, Soccol VT. 2001. Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresour. Technol.* **77**: 203-214.
- Pasamontes L, Haiker M, Wyss M, Tessier M, vanLoon A. 1997. Gene cloning, purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1696-1700.
- Rani R, Ghosh S. 2011. Production of phytase under solid-state

- fermentation using *Rhizopus oryzae*: novel strain improvement approach and studies on purification and characterization. *Biores. Technol.* **102**: 10641-10649.
30. Ribeiro DA, Cota J, Alvarez TM, Bruechli F, Bragato J, Pereira BM, et al. 2012. The *Penicillium echinulatum* secretome on sugar cane bagasse. *PLOS One* **7**: e50571.
 31. Roopesh K, Ramachandran S, Nampoothiri KM, Szakacs G, Pandey A. 2006. Comparison of phytase production on wheat bran and oilcakes in solid-state fermentation by *Mucor racemosus*. *Bioresour. Technol.* **97**: 506-511.
 32. Rostagno HS, Albino LFT, Donzele JL, Gomes PC, Oliveira RF, Lopes DC, et al. 2005. *Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos: Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais*. 2ª Ed. UFV/DZO.
 33. Samborska K, Witrowa-Rajchert D, Goncalves A. 2005. Spray-drying of alpha-amylase – the effect of process variables on the enzyme inactivation. *Drying Technol.* **23**: 941-953.
 34. Spier MR, Scheidt GN, Portella AC, Rodriguez-Leon JA, Woiciechowski AL, Greiner R, Soccol CR. 2011. Increase in phytase synthesis during citric pulp fermentation. *Chem. Eng. Comm.* **198**: 286-297.
 35. Stahl K, Claesson M, Lilliehorn P, Linden H, Backstrom K. 2002. The effect of process variables on the degradation and physical properties of spray dried insulin intended for inhalation. *Int. J. Pharm.* **233**: 227-237.
 36. Villena GK, Fujikawa T, Tsuyumu S, Gutierrez-Correa M. 2010. Structural analysis of biofilms and pellets of *Aspergillus niger* by confocal laser scanning microscopy and cryo scanning electron microscopy. *Bioresour. Technol.* **101**: 1920-1926.
 37. Villena GK, Gutierrez-Correa M. 2007. Morphological patterns of *Aspergillus niger* biofilms and pellets related to lignocellulolytic enzyme productivities. *Lett. Appl. Microbiol.* **45**: 231-237.
 38. Vogel HJ. 1964. Distribution of lysine pathways among fungi – evolutionary implications. *Am. Nat.* **98**: 435-446.
 39. Vohra A, Satyanarayana T. 2003. Phytases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* **23**: 29-60.
 40. Xavier Salmon DN, Piva LC, Binati RL, Rodrigues C, de Souza Vandenberghe LP, Soccol CR, Spier MR. 2012. A bioprocess for the production of phytase from *Schizophyllum commune*: studies of its optimization, profile of fermentation parameters, characterization and stability. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **35**: 1067-1079.
 41. Yoshii H, Ohashi T, Kugimoto Y, Furuta T, Linko P. 2005. Stability of alcohol dehydrogenase (ADH) during a suspended droplet drying and storage. *Drying Technol.* **23**: 1217-1227.