

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA**

PEDRO HENRIQUE DE OLIVEIRA ORNELA

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

**ARARAQUARA/SP
2017**

PEDRO HENRIQUE DE OLIVEIRA ORNELA

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

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

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães

**ARARAQUARA/SP
2017**

FICHA CATALOGRÁFICA

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

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

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

PEDRO HENRIQUE DE OLIVEIRA ORNELA

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

Araraquara, 03 de agosto de 2017.


BANCA EXAMINADORA



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



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



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

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Pedro Henrique de Oliveira Ornela

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

ENDEREÇO PROFISSIONAL

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

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

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

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

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

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

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

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

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

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

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

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

PROJETOS DE PESQUISA/ATUAÇÃO PROFISSIONAL

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

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

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

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

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos

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

Resumo publicados em Anais de congressos

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

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

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

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

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

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

Apresentação de Trabalhos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS, CONGRESSOS, EXPOSIÇÕES E FEIRAS

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

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

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

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

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

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

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

DEDICATÓRIA

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A CAPES e FAPESP, pelo suporte financeiro.

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

OneRepublic

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

Barry Allen – The Flash

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

LISTA DE TABELAS

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS

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

SUMÁRIO

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

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

1 INTRODUÇÃO

1.1 Reino Fungi

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

1.1.1 Fungos filamentosos

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

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

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

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

1.2 Enzimas

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

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

Tabela 1 - Classificação internacional de enzimas

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

Fonte: Nelson e Cox (2013).

1.2.1 Fontes de enzimas e potencialidade biotecnológica

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

1.2.2 Obtenção de enzimas através do processo de fermentação

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

1.2.3 No comércio e indústria

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

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

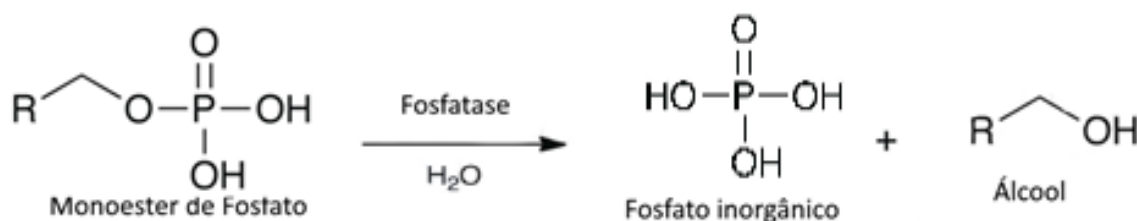
Entre os principais produtos que atualmente utiliza-se enzimas em alguns de seus processos industriais, pode-se citar: a produção de polpas (JIMÉNEZ et al., 1999), papel (NGUYEN, D. et al., 2008), tratamento do couro (KANDASAMY et al., 2012), detergentes (SAEKI et al., 2007), alimentos (CONTRERAS et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

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

1.3 Fosfatases

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

Figura 1 - Reação catalisada pela ação da fosfatase.



Fonte: Autor

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

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

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

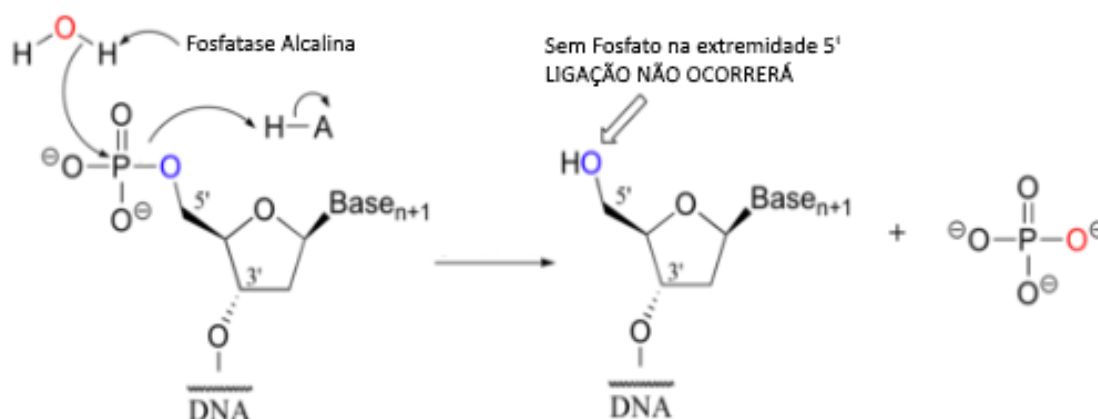
O fósforo é um macronutriente encontrado em todos os organismos, fazendo parte de diversas moléculas vitais, como o DNA, RNA, os fosfolipídios, a lectina, caseína, além de integrar membranas celulares, estruturas ósseas e moléculas de ATP (NELSON; COX, 2013). Este elemento também atua na regulação da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

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

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

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

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

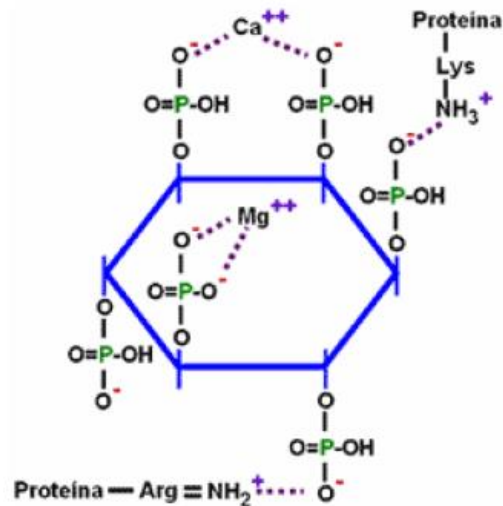


Fonte: Adaptado de Keogh et al. (2006).

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

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

Figura 4 - Estrutura do ácido fítico.



Fonte: FARUSI (2007).

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

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

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

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

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

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

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral desta pesquisa foi selecionar uma linhagem fúngica capaz de produzir fosfatase e fitase alcalinas, purificando-as e caracterizando-as bioquimicamente.

2.2 Objetivos Específicos

- *Screening* dos potenciais fungos filamentosos produtores de fosfatase e fitase alcalinas;
- Selecionar a espécie com maior produção fosfatásica alcalina;
- Padronizar as melhores condições de cultivo para produção de fosfatase alcalina em fermentação submersa;
- Purificar a fosfatase e fitase alcalinas obtidas;
- Caracterizar bioquimicamente ambas as enzimas.
- Determinar os parâmetros cinéticos da fosfatase e fitase alcalinas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Biologia Celular do Departamento de Biologia na Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP – USP). A Figura 5 descreve simplificada os procedimentos realizados no presente trabalho.

Figura 5 - Esquema simplificado dos experimentos realizados neste trabalho.

SELEÇÃO DAS LINHAGENS PRODUTORAS DE FOSFATASE E FITASE



3.1 Microrganismos utilizados e seleção das linhagens produtoras de fosfatases e fitases

A seleção (*screening*) das linhagens fúngicas com capacidade de produzir fosfatases e fitases foi realizada entre as linhagens *Aspergillus niveus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus phoenicis*, *Aspergillus caespitosus*, *Aspergillus versicolor*, *Trichoderma* sp. e *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*, além das espécies *Aspergillus niger* ANG18 e *Aspergillus fumigatus* CAS21 isolados de plantas da Caatinga, depositadas na micoteca do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, USP, de Ribeirão Preto/SP.

3.2 Manutenção dos microrganismos no laboratório

Os repiques das culturas fúngicas foram feitos a cada 30 dias em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar) previamente autoclavado a 121°C, 1,5 atm por 30 minutos, e posteriormente inclinados a temperatura ambiente para solidificação. As linhagens foram incubadas em estufa por um período de 6 a 8 dias a 30°C. Após esse período, foram armazenadas em refrigerador a 4°C até a utilização.

3.3 Preparo da suspensão de esporos

A partir das culturas armazenadas, a suspensão de esporos foi obtida através da adição de 10 mL de água destilada estéril em cada tubo, sendo realizada a raspagem da superfície do meio contendo o microrganismo com o auxílio de uma alça de platina, submetendo-o a agitação manual. A contagem de esporos por mL da suspensão foi realizada em câmara de Neubauer, padronizando-se o inóculo com a concentração de 10^6 esporos/mL de meio de cultivo.

3.4 Produção de fosfatases e fitases em fermentação submersa (FSbm)

A fermentação submersa foi inicialmente conduzida em 25 mL de meio Khanna (KHANNA et al., 1995), contidos em frascos Erlenmeyer de 125 mL, com pH ajustado para 6,0, adicionados de farinha de centeio (1-2% m/v) como fonte

adicional de carbono. Os meios foram previamente autoclavados a 121°C a 1,5 atm por 30 minutos e depois inoculados com suspensão de esporos (10^6 esporos/mL de meio), sendo posteriormente incubados a 30°C sob agitação orbital de 100 rpm, por 24-96 horas. Todos os experimentos foram feitos em duplicata biológica, ou seja, duplicata de experimentos utilizando repiques diferentes da mesma linhagem.

3.5 Obtenção das enzimas em FSbm

As culturas provindas da fermentação em meio Khanna foram filtradas a vácuo em funil Büchner, obtendo-se um filtrado livre de células e o micélio. O filtrado foi dialisado contra água destilada a 4°C por 24 horas, e utilizado para determinação da atividade enzimática extracelular. O micélio foi macerado em graal de porcelana em banho de gelo adicionando-se areia previamente tratada com ácido nítrico, seguida da adição de água, e centrifugada a 10000xg por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então utilizado para determinação da atividade enzimática intracelular.

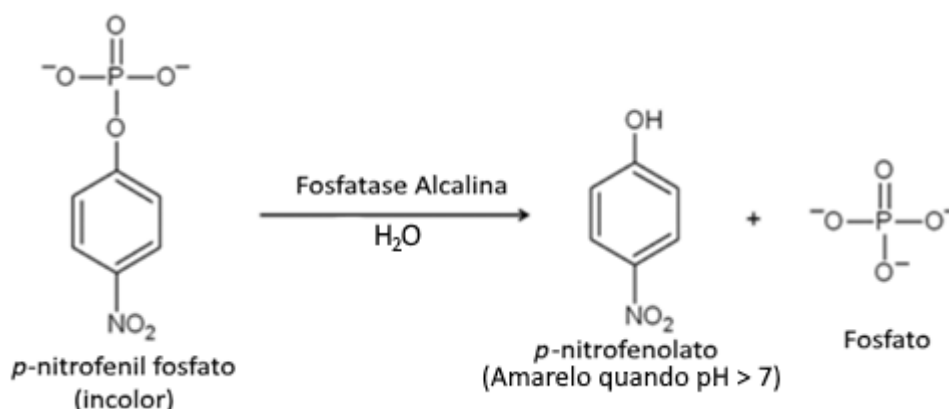
3.6 Determinação da atividade enzimática

3.6.1 Atividade *p*-nitrofenilfosfatásica

Foi determinada descontinuamente, utilizando-se como substrato o *p*-nitrofenil fosfato (Figura 6) a 2,5 mM em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 para a atividade fosfatásica ácida e tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 para a atividade fosfatásica alcalina. O meio reacional foi composto por 100 µL do substrato dissolvido em solução tampão e 100 µL de amostra enzimática. A mistura de reação foi mantida a 40°C por diferentes intervalos de tempo (10 e 20 minutos). A reação foi interrompida pela adição de 2,0 mL de solução saturada de tetraborato de sódio. As absorbâncias foram obtidas em $\lambda=405$ nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para hidrolisar um micromol de substrato por minuto nas condições de ensaio. A atividade específica foi expressa em U/mg de proteína. Nos experimentos foram incluídos controles com a enzima inativada, obtida com a adição prévia da solução tetraborato de sódio antes da adição da amostra enzimática no meio reacional, para identificar a hidrólise não

enzimática do substrato e todos os ensaios foram realizados em triplicata para o cálculo do erro padrão.

Figura 6 - Ação da fosfatase alcalina sobre o *p*-nitrofenil fosfato



Fonte: Autor baseado em Stanford et al. (2014).

3.6.2 Atividade fitásica

A atividade fitásica foi determinada mediante adaptação da metodologia descrita por Gulati et al. (2007) com modificações, sendo o meio reacional composto por 50 μL de amostra enzimática incubada com 50 μL da solução de ácido fítico (dodecasódico hidratado, $\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_{12}\text{O}_4\text{P}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ Sigma[®]) a 1% (m/v) dissolvido em tampão de acetato de sódio 200 mM, pH 5,5 para atividade ácida e tampão Tris-HCl 200 mM, pH 8,0 para a atividade alcalina. Após 30 minutos de reação na temperatura de 55°C, foram adicionados 100 μL de ácido tricloroacético (TCA) 15% para interromper a reação e 300 μL de água destilada em cada tubo de ensaio. Posteriormente, foram adicionados 900 μL do reagente cromogênico, composto por ácido sulfúrico 0,76 M, ácido ascórbico 10% e molibdato de amônio 2,5% (3:1:0,5 v/v/v) e, posteriormente, incubados a 50°C por 20 minutos. Após os tubos esfriarem, foi feita a leitura em espectrofotômetro a $\lambda=820$ nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi determinada e expressa como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de fosfato por minuto nas condições de ensaio. A atividade específica foi expressa em U/mg de proteína. Nos experimentos foram incluídos controles com a enzima inativada para identificar a hidrólise não enzimática do substrato e todos os ensaios foram realizados em triplicata para o cálculo do erro padrão.

3.7 Quantificação de proteína

A quantificação de proteínas foi realizada como descrito por Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (20-200 µg) como padrão e foi expressa como mg de proteína por mL de amostra. Todos os ensaios foram realizados em triplicata para o cálculo do erro padrão.

3.8 Influência de diferentes fontes adicionais de carbono na produção enzimática

Foram utilizados, a fim de melhorar a produção fosfatásica, carboidratos, como amido, avicel, dextrose, lactose, maltose, pectina, rafinose, sacarose, trealose, triptose, xilana e xilose, resíduos agroindustriais (bagaço de cana-de-açúcar, casca de mandioca e farelo de trigo), entre outras fontes (soja moída, chá preto, farinha de centeio), todos acrescentados na proporção de 1% (m/v) no meio de cultivo, além de um ensaio sem fonte adicional de carbono.

Posteriormente, a produção enzimática nas melhores fontes adicionais de carbonos foi analisada em função do tempo de cultivo, variando de 24 a 96 horas. Uma vez determinado o período para a maior produção enzimática para cada fonte adicional testada, o efeito da concentração (0,5% a 4% (m/v)) destas no meio foi analisada. No caso do bagaço de cana-de-açúcar utilizado, doado por um microempreendedor na cidade de Ribeirão Preto/SP, o mesmo foi inicialmente lavado com água destilada diversas vezes até que todo o açúcar redutor fosse retirado, este foi quantificado a cada lavagem pelo método de DNS (MILLER, 1959). Posteriormente, foi seco em estufa de circulação de ar por 24 horas, moído em moinho de facas no Instituto de Química da UNESP/Araraquara com peneira de 30 mesh, e depois levado ao laboratório de Microbiologia da USP-Ribeirão Preto/SP para realização dos experimentos.

Depois, foi analisada a influência de uma segunda fonte adicional de carbono, dextrose, no meio de cultivo, sendo adicionada em diferentes concentrações variando de 0,05 a 5 mM, onde o controle foi realizado sem a adição da segunda fonte de carbono.

3.9 Influência de diferentes meios de cultivo na produção fosfatásica em FSbm

Com o objetivo de melhorar a produção de fosfatase alcalina extracelular por *R. microsporus* var. *microsporus*, foram testados cinco diferentes meios de cultivo, os quais estão descritos a seguir:

Meio Khanna (KHANNA et al., 1995)

- Solução de sais de Khanna [20x].....5,0mL
 - NH_4NO_32,0g
 - KH_2PO_41,3g
 - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0,362g
 - KCl0,098g
 - $\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
- Extrato de levedura.....0,1g
- Água destilada q.s.p.....100mL

Meio Czapek (WISEMAN, 1975)

- NaNO_30,3g
- KH_2PO_40,1g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$5g
- KCl0,05g
- $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$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
 - $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$0,24g

- KH_2PO_40,3g
- $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$1,0g
- Água destilada q.s.p.....100mL
- Peptona.....0,02g
- Extrato de levedura.....0,45g
- Água destilada q.s.p.....100mL

Meio NBrip (NAUTIYAL, 1999)

- $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$1,0g
- KCl.....0,2g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$0,25g
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$1,0g
- Água destilada q.s.p.....1,0L

Meio Mineral (COSTA et al., 2008)

- CaCl_20,1g
- NH_4Cl0,3g
- KH_2PO_40,2g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$0,1g
- Água destilada q.s.p.....100mL

Meio Vogel (VOGEL, 1964)

- Solução de sais de Vogel [50X].....2,0mL
 - Citrato de sódio pentahidratado.....1,5g
 - KH_2PO_42,5g
 - NH_4NO_31,0g
 - $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$0,1g
 - $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$0,05g
 - Água destilada q.s.p.....100mL
- Solução de biotina.....20 μL
 - Biotina.....0,05g
 - Etanol 50%.....100mL

- Solução de traços de elementos.....0,5mL
 - Ácido cítrico. H₂O.....5g
 - ZnSO₄.7 H₂O.....5g
 - Fe₂(NH₄)₂ .(SO₄)₂.6 H₂O.....1g
 - CuSO₄.5 H₂O.....0,25g
 - H₃BO₃.....0,05g
 - MnSO₄.H₂O.....0,05g
 - Na₂MoO₄.2 H₂O.....0,05g
 - Clorofórmio.....1mL
- Água destilada q.s.p.....100mL

3.10 Influência da adição de fosfato de potássio monobásico na produção enzimática

Com o propósito de avaliar o efeito da adição de KH₂PO₃ na produção enzimática, o composto foi retirado da formulação do meio Khanna. Posteriormente, foram adicionadas, separadamente aos frascos Erlenmeyer, diferentes concentrações de fosfato de potássio (0,05 a 5 mM) no meio de cultura. Como controle, foi adotado o meio de cultivo ausente desse composto.

3.11 Planejamento experimental

Para otimização das condições de cultivo do fungo filamentosso *R. microsporus* var. *microsporus* em FSbm para produção da fosfatase alcalina, foi realizado um planejamento experimental utilizando um delineamento composto central rotacional (DCCR), considerando três fatores ($k = 3$; temperatura, pH e tempo de cultivo), com duplicata no ponto central por bloco ($n_r = 6$), em três níveis ($n=3$) adicionados de pontos axiais. Nas condições descritas anteriormente, o DCCR foi preparado em duplicata (2 blocos) utilizando o software STATISTICA[®] versão 12.5 da empresa StatSoft, Inc., como apresentado na Tabela 2:

Tabela 2 - Planejamento Composto Central Rotacional (DCCR) para 3 fatores, 3 níveis e duplicata no ponto central por bloco.

Nº de Replicatas	Temperatura (°C)	pH	Tempo de Cultivo (h)
2	25 (-1)	4 (-1)	72 (-1)
2	25 (-1)	4 (-1)	120 (+1)
2	25 (-1)	8 (+1)	72 (-1)
2	25 (-1)	8 (+1)	120 (+1)
2	35 (+1)	4 (-1)	72 (-1)
2	35 (+1)	4 (-1)	120 (+1)
2	35 (+1)	8 (+1)	72 (-1)
2	35 (+1)	8 (+1)	120 (+1)
2	30 (0)	6 (0)	96 (0)
2	21,18 (- α)	6 (0)	96 (0)
2	38,81 (+ α)	6 (0)	96 (0)
2	30 (0)	2,47 (- α)	96 (0)
2	30 (0)	9,52 (+ α)	96 (0)
2	30 (0)	6 (0)	53,66 (+ α)
2	30 (0)	6 (0)	138,33 (+ α)
2	30 (0)	6 (0)	96 (0)

$\alpha = 1,6329$.

A equação do modelo matemático proposto com o planejamento experimental foi formulada de acordo com a equação 1:

Equação 1: Modelo matemático para o resultado do delineamento composto central rotacional.

$$\gamma_i = \beta_0 + \beta_1 a + \beta_2 b + \beta_3 c + \beta_{11} a^2 + \beta_{22} b^2 + \beta_{33} c^2 + \beta_{12} ab + \beta_{13} ac + \beta_{23} bc + \varepsilon_i$$

Onde a, b, e c são as variáveis referentes aos fatores; o β_0 (ponto de interseção), os β_1 , β_2 , β_3 (referentes aos efeitos lineares), os β_{11} , β_{22} , β_{33} (referentes aos efeitos quadráticos) e os β_{12} , β_{13} e β_{23} (referentes aos efeitos de interação dupla) são coeficientes de regressão obtidos pelo método de mínimos quadrados; e ε é o erro experimental correspondente a γ (atividade específica).

3.12 Purificação da fosfatase e fitase alcalina em FSbm

O filtrado extracelular foi submetido ao processo de purificação em coluna cromatográfica de troca iônica DEAE-Celulose (2 x 12 cm), previamente equilibrada em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,5. A enzima foi eluída mediante a aplicação de um gradiente linear de NaCl (0 a 500 mM) no mesmo tampão, com vazão ajustada para 0,9 mL/min. As frações coletadas (3 mL/fração) foram monitoradas a 280 nm em espectrofotômetro e submetidas à avaliação da atividade fosfatásica alcalina como descrito anteriormente (item 3.6.1). As frações que apresentaram atividade fosfatásica foram reunidas em um único *pool* e dialisadas *overnight* por 24 h contra água destilada a 4°C. Posteriormente, foram liofilizadas, ressuspensas em solução tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,5 adicionado de 500 mM de NaCl e, então, aplicada em coluna cromatográfica de exclusão molecular Sepharose CL-6B (1 x 70 cm) previamente equilibrada e eluída com o mesmo tampão. A vazão foi ajustada para 0,3 mL/min e as frações coletadas (1 mL/fração) que apresentaram atividade fosfatásica foram reunidas em um único *pool*, assim como as que apresentaram atividade fitásica, como já descrito no item 3.6.2, que foram reunidas em outro *pool*. As amostras foram dialisadas contra água (4°C) por 24 horas. Posteriormente, as amostras obtidas das colunas cromatográficas DEAE-Celulose e Sepharose CL-6B foram dialisadas e aplicadas em eletroforese em condições desnaturantes, como descrito a seguir.

3.13 Eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

As amostras purificadas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida, montado entre placas de vidro, em condições desnaturantes (SDS-PAGE 12%) (LAEMMLI, 1970), utilizando-se a fonte de alimentação PowerPac™ BIO-RAD® ajustada para 100 V e 40 mA. Após a corrida eletroforética, o gel foi removido das placas de vidro e as bandas proteicas coradas com Coomassie Blue Silver G-250 (CANDIANO et al., 2004). Como marcador de massa molecular, foi utilizado o *Precision Plus Protein "Kaleidoscope" Standards* (BIO-RAD®) com massa molecular variando de 10 a 250 kDa.

3.14 Determinação da massa molecular

As massas moleculares nativas da fosfatase e fitase foram determinadas utilizando amostras proteicas dialisadas contra água (4°C) por 24 horas, liofilizadas e ressuspensas em 2 mL de tampão Tris-HCl 10 mM pH 7,5 adicionado de 500 mM de NaCl, sendo, posteriormente, aplicadas em coluna cromatográfica de exclusão molecular Sepharose CL-6B (1 x 70 cm), nas condições já citadas no item 3.9. Como marcador de massa molar foram utilizados β -amilase (200 kDa), álcool desidrogenase (150 kDa) e albumina de soro bovino (66 kDa). O volume livre da coluna (V_0) foi de 53 mL, determinado com Blue Dextran 2000.

3.15 Caracterização Bioquímica

3.15.1 Determinação da temperatura ótima de reação e termoestabilidade para a atividade fosfatásica e fitásica

O ensaio de determinação da temperatura ótima de atividade para as fosfatases foi realizado em diferentes temperaturas (30°C a 60°C) e para a determinação da temperatura ótima de atividade fitásica, a reação enzimática foi conduzida em temperaturas variando de 30°C a 70°C. A estabilidade térmica da fosfatase foi realizada a 40°C, 45°C, 50°C e 60°C, e da fitase a 50°C, 60°C, 65°C, 70°C e 80°C. Em diferentes intervalos de tempo (0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 150, 210, 280 minutos), foram retiradas alíquotas da enzima incubada, mantidas em banho de gelo e, depois, ensaiadas para atividade enzimática como já descrito (item 3.6.1 e 3.6.2).

3.15.2 Determinação do pH ótimo de reação e estabilidade ao pH para a atividade fosfatásica e fitásica

Para a determinação do pH ótimo de atividade fosfatásica foram utilizadas as seguintes soluções: tampão ácido cítrico 100 mM (pH 3,0 a 4,0), tampão acetato de sódio 100 mM (pH 4,5 a 6,5) e tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,5 a 9,0). Para a atividade fitásica, a influência do pH reacional foi avaliada utilizando-se solução tampão ácido cítrico 100 mM (pH 2,5 a 7,0), solução tampão Tris-HCl 100 mM (7,5 e

8,0) e solução ácido bórico 100 mM (pH 8,5 a 10,0). A estabilidade da fosfatase e fitase quanto ao pH foi verificada incubando-se essas enzimas em valores de pH variando de 3 a 10, armazenadas em câmara fria (4°C). As amostras enzimáticas foram adicionadas na proporção de 1:1 (v/v) e após diferentes períodos de tempo (0, 0,5, 1, 3, 6, 12 e 24 horas), foram retiradas alíquotas (100 µL) e a atividade enzimática residual foi determinada como já descrito no item 3.6.1 e 3.6.2.

3.15.3 Efeito de diferentes compostos na atividade fosfatásica e fitásica alcalina

O efeito de compostos químicos sobre a atividade fosfatásica e fitásica (item 3.6.1 e 3.6.2, respectivamente) foi determinado adicionando-se diferentes composto na mistura reacional, como: sais (AgNO₃, BaCl₂, CaCl₂, CoCl₂, CuCl₂, CuSO₄, FeCl₃, Fe₂(SO₄)₃, HgCl₂, KCl, KH₂PO₄, KI, MgCl₂, MgSO₄, MnCl₂, MnSO₄, NaBr, NaCl, NaF, NaNO₃, NH₄Cl, NH₄F, NH₄NO₃, Zn(NO₃)₂ e ZnSO₄), β-mercaptoetanol, ureia, glicose, SDS e EDTA na concentração final de 1 mM e 5 mM; 0,01% e 0,02% (v/v) para os detergentes Triton X-100 e Tween-20, e 1% e 2% (v/v) para os solventes orgânicos metanol, acetona, acetonitrila, etanol, isopropanol e n-butanol.

3.15.4 Hidrólise de diferentes substratos

Para analisar a hidrólise de diferentes substratos frente à fosfatase alcalina purificada, foram utilizados os substratos β-Glicerofosfato, ATP, ácido Fítico, D-frutose-6-fosfato, D-glicose-1-fosfato, D-glicose-6-fosfato, *p*-nitrofenilfosfato. Para quantificar a atividade enzimática da fosfatase alcalina, foi utilizado o método descrito por Heinonen e Lahti (1981), onde o meio reacional foi composto por 225 µL de água ultrapura, 200 µL de tampão Tris-HCl (100 mM) pH 8,5, 25 µL de amostra enzimática e 50 µL do substrato na concentração final de 2,7 mM. Após 15 minutos em banho-maria a 45°C, a reação foi interrompida com a adição de 500 µL de TCA 20%. Posteriormente, 500 µL do ensaio anterior foi utilizado para determinar a atividade enzimática com o acréscimo do reagente cromogênico, preparado no momento da reação, composto por 3,09 mL de Molibdato de amônio, 34,7 mL de ácido sulfúrico concentrado e água destilada até completar o volume de 250 mL. Os ensaios foram agitados em agitador tipo Vortex, e adicionado de 1000 µL de

Acetona, agitado novamente e depois adicionado 500 μ L de ácido cítrico (0,4 M). Uma unidade de atividade enzimática (U) foi determinada e expressa como a quantidade de enzima necessária para liberar um μ mol de fosfato por minuto nas condições de ensaio. Nos experimentos foram incluídos controles com a enzima inativada para identificar a hidrólise não enzimática do substrato e todos os ensaios foram realizados em triplicata para o cálculo do erro padrão.

3.15.5 Determinação das constantes cinéticas

A constante de Michaelis-Menten (K_m), velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$), constante de renovação (k_{cat}) e a razão k_{cat}/K_m foram determinados para a fosfatase e fitase purificada, utilizando seus respectivos substratos, o *p*-NPP (em concentrações finais de 0,1 a 2,5 mM) e fitato (em concentrações finais de 0,1 a 4,5 mM final). Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram determinados com auxílio do software SigrafW[®] (LEONE et al., 2005). A atividade fosfatásica e fitásica foi determinada como descrito no item 3.7.1. e 3.7.2., respectivamente.

3.15.6 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Bioestat versão 5.3, 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

4.1 Seleção da linhagem produtora de fosfatases e fitases

Como pode-se observar na Tabela 3, o microrganismo *Aspergillus flavus* destacou-se como melhor produtor de fosfatase ácida intracelular (23 U/mg de proteína), sendo de 4 a 6,5 vezes superior aos demais e 7,5 vezes maior que a forma extracelular. Além disso, para forma extracelular, as produções enzimáticas por *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus fumigatus* e *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* foram estatisticamente semelhantes entre si e superiores aos valores observados para as demais linhagens, sendo cerca de 2,7 vezes maior que a obtida com *Aspergillus flavus*.

Os fungos do gênero *Aspergillus* são amplamente estudados devido à produção de diversas enzimas, incluindo-se as espécies *A. carbonarius* (GARGOVA; SARIYSKA, 2003), *A. phoenicis* (NASCIMENTO, 2011) e *A. flavus* (GAIND; SINGH, 2015), que já foram pesquisados quanto a sua capacidade de produção de fosfatase ácida e fitase. Já o fungo *R. microsporus* var. *microsporus*, apesar da existência de trabalhos citando a presença de fosfatases dentro da célula (SATO, 2015), não foi caracterizado especificamente em relação a sua produção de fosfatases ácidas e alcalinas extracelular.

Com relação à produção fosfatásica alcalina, o fungo *A. flavus* foi o melhor produtor da forma intracelular (8,28 U/mg de prot.), valor este 2,1 vezes maior se comparado ao fungo com menor produção (*A. carbonarius*). Por outro lado, a baixa produção da forma extracelular mostra que, possivelmente, esta linhagem mantém a maior parte de suas fosfatases no interior da célula ou essas enzimas presentes no meio intracelular podem ser enzimas, armazenadas no interior de vesículas, com destino extracelular em via de secreção. Com relação à enzima extracelular alcalina, os fungos *A. fumigatus* e *R. microsporus* var. *microsporus* como melhores produtores (4,86 U/mg de prot. e 5,18 U/mg de prot., respectivamente), sendo a produção 2,4 e 2,6 vezes maior que a observada para o fungo *A. flavus*.

Tabela 3 - Atividade específica da fosfatase ácida e alcalina em FSbm por diferentes linhagens de fungos filamentosos.

Fungos	Fosfatase Ácida (U/mg de prot.)		Fosfatase Alcalina (U/mg de prot.)	
	Intracelular	Extracelular	Intracelular	Extracelular
<i>A. carbonarius</i>	5,39 ^A ±1,23	8,31 ^A ±0,35	4,00 ^A ±0,24	4,16 ^E ±0,08
<i>A. flavus</i>	23,00 ^B ±1,01	3,02 ^B ±0,09	8,28 ^B ±0,33	2,00 ^C ±0,06
<i>A. fumigatus</i>	3,98 ^A ±0,13	8,20 ^A ±1,39	7,96 ^B ±0,61	4,86 ^B ±0,11
<i>A. phoenicis</i>	4,09 ^A ±0,63	6,16 ^C ±0,02	6,36 ^C ±0,06	3,91 ^D ±0,00
<i>A. terreus</i>	3,47 ^A ±0,11	5,53 ^D ±0,21	4,43 ^A ±0,34	3,48 ^A ±0,26
<i>R. microsporus</i> <i>var. microsporus</i>	4,52 ^A ±0,76	7,48 ^A ±1,11	6,24 ^C ±1,06	5,18 ^B ±0,71

FSbm em meio Khanna suplementado com 1% de farinha de centeio, por 72 horas sob agitação orbital de 100 rpm, pH 6,0, a 30°C. Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na coluna diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

De acordo com a tabela anteriormente apresentada, o fungo *A. flavus* possui potencial para produção de enzimas intracelulares, ácidas e alcalinas, pois, segundo Khan e colaboradores (2010), a maior parte das enzimas produzida por este microrganismo encontra-se dentro de vacúolos no interior da célula, e também associada na parte interna da membrana plasmática. A utilização de enzimas intracelulares ainda é inviável em escala industrial, devido ao processo adicional necessário para retirada desta proteína, no caso, a ruptura das células. Quanto às enzimas extracelulares alcalinas, dois fungos se destacaram, *A. fumigatus* e *R. microsporus var. microsporus*. Considerando a existência de diversos trabalhos quanto à capacidade de produção de fosfatases e fitases pelo gênero *Aspergillus*, optou-se por trabalhar com o fungo *R. microsporus var. microsporus*, o qual já foi indicado como bom produtor de fosfatases e fitases ácidas (SATO et al., 2015). De acordo com o trabalho publicado por Guimarães e colaboradores (2006) e Howsom e Davis (1983), os fungos *R. microsporus var. oligosporus*, *R. oryzae*, *R. oligosporus* e *R. stolonifer* são bons produtores de fosfatases, demonstrando que o gênero *Rhizopus* tem grande potencial a ser estudado quanto a estas enzimas.

Considerando a melhor produção de fosfatase alcalina (5,18 U/mL), bem como indícios da presença de uma atividade fitásica alcalina (SATO, 2015), o microrganismo *R. microsporus var. microsporus* foi escolhido para dar continuidade ao estudo, em comparação com outras linhagens fúngicas disponíveis no laboratório

de Microbiologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, USP, de Ribeirão Preto/SP.

Na Tabela 4, nota-se que a produção extracelular de fitase pela maioria dos microrganismos testados, com exceção do *A. caespitosus* e *A. niveus*, foi superior a intracelular, o que é interessante uma vez que o processo mecânico de lise celular torna-se desnecessário. Considerando a forma intracelular, o fungo *A. niveus* foi o maior produtor (7,71 U/mg de prot.), sendo seguido por *A. fumigatus* (6,37 U/mg de prot.). Pode-se observar também que *A. fumigatus* e *A. terreus* foram os maiores produtores da forma extracelular (20,6 U/mg de prot. e 19,4 U/mg de prot., respectivamente), sendo seguida por *R. microsporus* var. *microsporus* e *A. niger*.

Tabela 4 - Produção de fitase alcalina em FSbm por diferentes linhagens de fungos filamentosos.

Fungos	Atividade Específica (U/mg de prot.)		
	Intracelular	Extracelular	Σ Total (Intra+Extra)
<i>A. caespitosus</i>	2,69 ^{CE} ±2,13	0,88 ^D ±0,88	3,58 ^{DE} ±3,02
<i>A. flavus</i>	0 ^D ±0,0	3,17 ^C ±1,48	3,17 ^{DE} ±1,48
<i>A. fumigatus</i>	6,37 ^B ±0,31	20,68 ^A ±1,01	27,05 ^A ±1,32
<i>A. niger</i>	0 ^D ±0,0	10,15 ^B ±3,33	10,15 ^C ±3,33
<i>A. niveus</i>	7,71 ^A ±0,88	0 ^D ±0,0	7,71 ^C ±0,88
<i>A. phoenicis</i>	0 ^D ±0,0	3,34 ^C ±0,58	3,34 ^E ±0,58
<i>A. terreus</i>	0 ^D ±0,0	19,41 ^{AB} ±5,57	19,41 ^{AB} ±5,57
<i>A. versicolor</i>	1,52 ^C ±0,43	4,75 ^C ±0,99	6,27 ^{CD} ±1,42
<i>R. microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	2,26 ^C ±0,00	13,99 ^B ±0,0	16,25 ^B ±0,0
<i>Trichoderma</i> sp.	0,78 ^{DE} ±0,78	3,68 ^C ±0,68	4,47 ^{DE} ±1,46

FSbm utilizando meio Khanna suplementado com farelo de centeio 2% (m/v) por 72 horas, pH 6,0 a 30°C sob agitação orbital (100 rpm). Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na coluna diferem pelo teste de Tukey (p<0,05).

As linhagens de *Aspergillus* são amplamente estudadas quanto à sua capacidade de produzir inúmeras enzimas, incluindo a fitase (SELLE; RAVINDRAN, 2008), porém o fungo *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* ainda foi pouco caracterizado quanto a produção de fitase alcalina secretada para o meio extracelular e, por este motivo, foi selecionada esta linhagem. Existem poucos relatos na literatura com referência à produção de fitase alcalina por fungos filamentosos como, por exemplo, as observadas para *A. fumigatus*, *A. flavus* (GAIND; SINGH, 2015) e *R. microsporus* var. *microsporus* (SATO et al., 2015). Entretanto, nenhum estudo aprofundado no que diz respeito à caracterização destas enzimas foi realizado. A produ-

ção de fitase alcalina tem sido relatada também entre bactérias como no caso de *Pseudomonas* sp. (SELVAMOHAN et al., 2012).

4.2 Efeitos de diferentes fontes adicionais de carbono na produção de fosfatase alcalina em FSbm

De forma geral, os microrganismos quebram moléculas de carbono com alta massa molecular em pequenas moléculas através de processos metabólicos, convertendo-as em aminoácidos, nucleotídeos, vitaminas, carboidratos, ácidos graxos, para posteriormente transformá-las em proteínas, coenzimas, ácidos nucleicos, peptidoglicanos, polissacarídeos e lipídios (SÁNCHEZ; DEMAIN, 2002). Selecionado o fungo *R. microsporus* var. *microsporus* como melhor produtor de fosfatase alcalina extracelular, analisou-se a produção enzimática na presença de diferentes fontes de carbono adicionadas ao meio de cultivo.

Desta forma, na Tabela 5 podemos observar que a farinha de centeio favoreceu a maior produção fosfatásica intracelular (13,81 U/mL) sendo 21 vezes maior que o meio sem fonte adicional de carbono, e alta atividade específica em relação às demais fontes (51,63 U/mg de prot.), sendo seguida pela produção obtida com a adição de soja moída (10,25 U/mL). Considerando a anato-fisiologia do microrganismo e o método de obtenção da enzima intracelular, quando as células fúngicas foram maceradas, obteve-se não somente as enzimas que atuam no interior da célula, mas também aquelas que estavam no citosol sendo direcionadas para sair da célula e, possivelmente, com a extensão do tempo de cultivo, estas enzimas poderiam ser secretadas para o meio externo sendo quantificadas no filtrado extracelular, e não como amostra intracelular (WISEMAN, 1975).

As atividades específicas identificadas para os meios com adição de lactose e sem adição de fonte de carbono provêm do baixo crescimento do microrganismo, não sendo possível a quantificação de proteínas, devido a baixa absorvância (0,004 e 0,001, respectivamente) obtida.

Tabela 5 - Influência das fontes adicionais de carbono utilizadas na produção de fosfatase alcalina intra e extracelular em FSbm por *R. microsporus* var. *microsporus*.

Fonte adicional de Carbono (1% (m/v))	Intracelular		Extracelular	
	Atividade Fosfatásica (U/mL)	Atividade Específica (U/mg prot.)	Atividade Fosfatásica (U/mL)	Atividade Específica (U/mg prot.)
Amido (Maisena)	0,22±0	3,13±0,00	0,13±0,06	0,15±0,07
Avicel	2,43±0,03	2,90±0,03	2,65±0,03	6,98±0,08
Bagaço de Cana	1,72±0,06	14,82±0,55	5,63±0,32	9,04±0,51
Casca de Mandioca	2,84±0,09	13,27±0,45	0,70±0,03	0,80±0,03
Chá Preto	1,95±0,57	14,78±4,37	2,13±0,25	3,26±0,39
Dextrose	1,40±0,32	5,96±1,36	6,59±0,19	11,01±0,32
Farelo de Trigo	8,31±0,51	24,01±1,48	0,68±0,06	0,68±0,06
Farinha de Centeio	13,81±0,51	51,63±1,92	4,56±0,86	3,25±0,61
Lactose	1,20±0,03	ND*	1,65±0,09	3,65±0,00
Maltose	1,06±0,03	14,13±0,42	2,27±0,06	2,98±0,08
Pectina	4,36±0,06	26,15±0,38	0,25±0,03	0,62±0,08
Rafinose	0,77±0,06	8,76±0,72	2,95±0,25	6,01±0,52
Sacarose	3,00±0,06	6,43±0,13	2,72±0,19	7,53±0,53
Soja Moída	10,25±0,03	19,49±0,06	0,90±0,32	0,43±0,15
Trealose	0,18±0,06	1,60±0,56	0,43±0,03	0,68±0,05
Triptose	0,84±0,96	8,61±0,98	7,97±0,16	6,43±0,12
Xilana	0,52±0,03	5,03±0,31	0,00±0,00	0,00±0,00
Xilose	1,09±0,12	6,30±0,74	0,59±0,06	1,45±0,15
Sem fonte adicional	0,65±0,03	ND*	1,56±0,16	3,80±0,00

Cultivo em FSbm no meio Khanna, por 72 horas sob agitação orbital de 100 rpm, pH 6,0, a 30°C.

*ND = Não determinado. Os valores de proteínas totais não puderam ser determinados.

Com relação à forma extracelular, pode-se observar que os maiores níveis de produção enzimática foram obtidos com a adição do açúcar triptose (7,97 U/mL), sendo cinco vezes maior se comparado ao meio sem fonte adicional de carbono, seguido por dextrose (6,59 U/mL), bagaço de cana de açúcar (5,63 U/mL) e farinha de centeio (4,56 U/mL). A atividade específica obtida com bagaço de cana de açúcar (9,04 U/mg de prot.), foi menor que a observada com a adição de dextrose (11,01 U/mg de prot.), que foi 2,9 vezes superior ao meio sem adição de carbono. Foi superior também ao obtido com a adição de avicel (6,98 U/mg de prot.), sacarose (7,53 U/mg de prot.) e demais fontes de carbono.

Na presença de amido, casca de mandioca, farelo de trigo, pectina, soja moída, trealose e xilose, a produção enzimática foi extremamente reduzida. Em meio

adicionado com xilana, a produção fosfatásica extracelular foi inexistente, diferindo do observado por Guimarães e colaboradores (2003) para o fungo *Aspergillus caespitosus* que apresentou maior produção extracelular com esta fonte de carbono (5,4 U/mL).

Um ponto importante a se analisar antes da escolha da fonte adicional de carbono é a disponibilidade desta para o pesquisador e seu custo no mercado, pois a busca por fontes de carbono com reduzido valor comercial e alta disponibilidade onde o microrganismo possa crescer e produzir os metabólitos desejados, torna a pesquisa mais aplicável no âmbito científico e industrial (CARVALHO et al., 2006). O bagaço de cana de açúcar é um substrato em alta disponibilidade devido à produção alcooleira e açucareira, o qual é gerado em toneladas e descartado no meio ambiente sem nenhum tipo de tratamento, causando impacto ambiental (CARDONA et al., 2010).

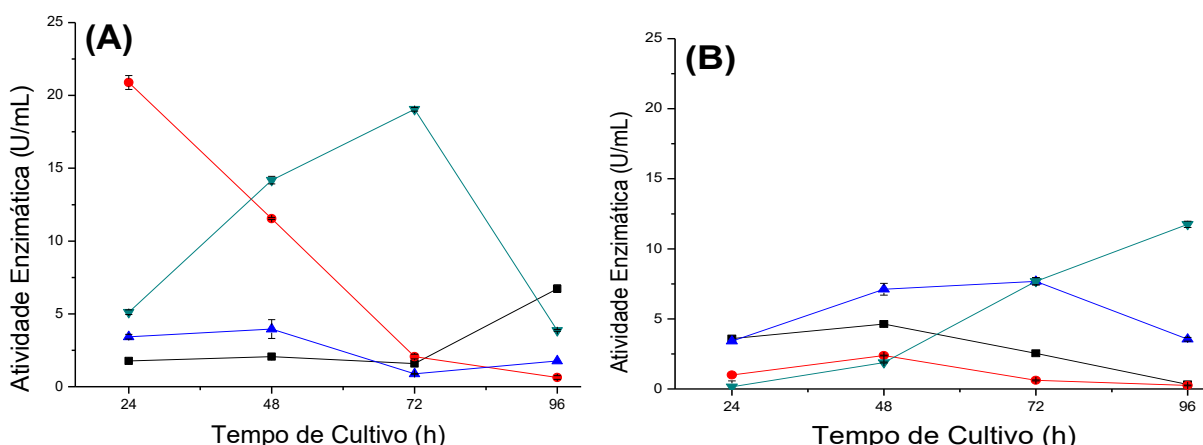
Considerando a produção fosfatásica alcalina extracelular (U/mg de proteína), a influência do tempo de cultivo na produção enzimática utilizando dextrose e sacarose, as quais proporcionaram alta atividade, bem como o agro resíduo bagaço de cana-de-açúcar, que alavancou a produção enzimática, foi analisada. Considerando que o uso da farinha de centeio, proporcionou a maior produção da forma intracelular por *R. microsporus var. microsporus* (51,63 U/mg de prot.), esta fonte adicional também foi considerada para as próximas análises.

4.3 Produção de fosfatases em cultivos com diferentes fontes adicionais de carbono em função do tempo

Analisando a Figura 7A, a maior produção enzimática intracelular, utilizando farinha de centeio, foi obtida em 72 horas (19,0 U/mL), representando um valor 9,5 vezes maior que o obtido com o uso das demais fontes de carbono neste mesmo período. Por outro lado, com a adição de dextrose a maior produção enzimática (22,8 U/mL) foi obtida em 24 horas de cultivo. A dextrose é uma fonte de carbono prontamente assimilável em relação às outras fontes de carbono testadas e de menor complexidade em relação as outras fontes de carbono testadas. O acréscimo de bagaço de cana de açúcar e sacarose promoveram baixas produções enzimáticas intracelulares ao longo do tempo. A sacarose e dextrose não proporcionaram uma produção satisfatória ao longo do tempo de cultivo,

possivelmente devido à glicose, sendo também o produto de hidrólise da sacarose, atuar como repressor catabólico, o que causa transformações irreversíveis na formação das proteínas, tornando-as inativas (MAZÓN, 2014). Por mais que o bagaço de cana de açúcar utilizado tenha sido previamente tratado com diversas lavagens até que todo o açúcar redutor fosse removido, a presença de açúcares retidos entre as fibras celulolíticas (MARABEZI, 2009) pode ter inibido a produção de fosfatases, como citado anteriormente.

Figura 7 - Produção de fosfatase alcalina intracelular (A) e extracelular (B) por *R. microsporus* var. *microsporus* em função da adição de 1% (m/v) de sacarose (■), dextrose (●), bagaço de cana-de-açúcar (▲) e farinha de centeio (▼). Cultivos realizados em meio Khanna em agitador orbital a 100 rpm, pH 6 e 30°C.



Fonte: Autor

Como o objetivo principal era a obtenção de uma fonte do carbono adicional que favorecesse a produção da fosfatase secretada para o meio, analisou-se o filtrado extracelular (Figura 7B). Para o uso do bagaço de cana de açúcar e da farinha de centeio, a produção enzimática extracelular foi estatisticamente similar considerando o período de 72 horas. Observou-se que, diferentemente dos meios com as outras fontes adicionais, o meio adicionado farinha de centeio poderia proporcionar uma maior produção enzimática se o tempo de cultivo fosse estendido. Desta forma, prolongado o tempo de cultivo, a máxima produção foi obtida no período 96 horas ($11,7 \pm 0,27$ U/mL).

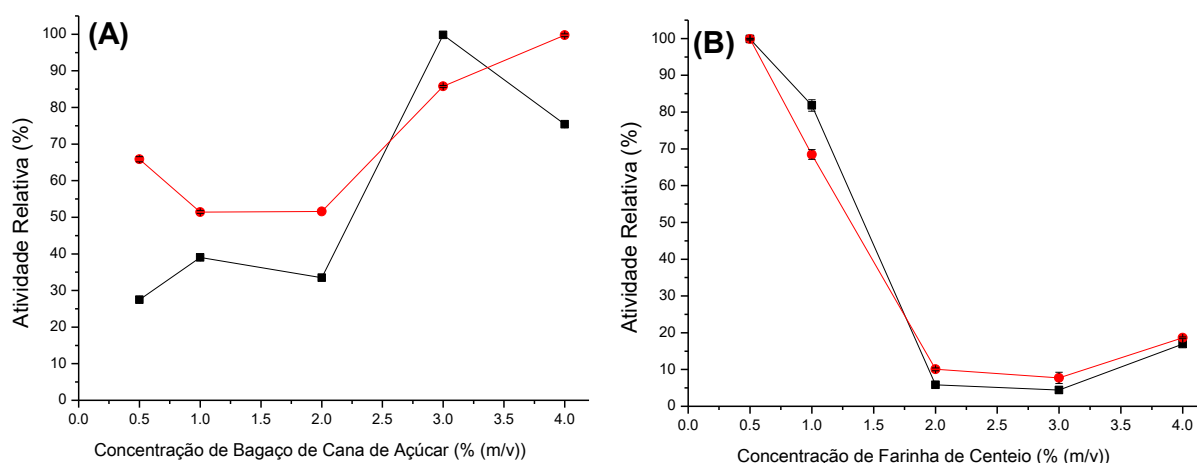
Existem estudos demonstrando a eficácia da utilização de bagaço de cana de açúcar como fonte de carbono para produção de enzimas de origem fúngica (GUIMARÃES et al., 2009; RIBEIRO et al., 2012), e de fontes de carbono

provenientes de grãos como farelo de trigo (RUSTIGUEL et al., 2015). A farinha de centeio, que apresenta composição química semelhante ao trigo, é rica em sódio, cálcio, potássio e fósforo (LEÓN; ROSELL, 2007). A presença de fósforo, que também faz parte do bagaço de cana de açúcar, mostrou que, em certa quantidade, favorece a produção de fosfatases pelo fungo *R. microsporus* (SATO et al., 2015). Assim, para continuidade do estudo, foram selecionados cultivos de 72 e 96 horas contendo bagaço de cana de açúcar e farinha de centeio, respectivamente, para a produção de fosfatase alcalina extracelular.

4.4 Influência da concentração da fonte de carbono adicional na produção enzimática

De acordo com a Figura 8A, a maior produção enzimática alcalina extracelular foi obtida com a utilização de 3% (m/v) de bagaço de cana de açúcar no meio, concentração superior à usada por outros autores, como Guimarães e colaboradores (2004) que utilizaram 1% (m/v) desta fonte para produção de fosfatases ácida por *Aspergillus caespitosus*. No caso da farinha de centeio (Figura 8B), a concentração ótima para maior produção enzimática alcalina extracelular foi de 0,5% (m/v), atingindo 14,3 U/mL, superando a máxima proporcionada pelo bagaço de cana de açúcar (10,9 U/mL).

Figura 8 - Efeito da concentração de bagaço de cana-de açúcar (A) e de farinha de centeio (B) adicionados ao meio de cultivo na produção fosfatásica alcalina extracelular por *R. microsporus* var. *microsporus* cultivado em meio Khanna em agitador orbital a 100 rpm, pH 6,0 e 30°C por 72 (A) e 96 (B) horas. Erro padrão variando entre 0,22 e 1,56. Símbolos: (■) Atividade fosfatásica alcalina (●) Atividade específica. Em (A), 100% corresponde a 10,9 U/mL e 3,98 U/mg de prot.; Em (B), 100% corresponde a 14,3 U/mL e 3,34 U/mg de prot.



Fonte: Autor

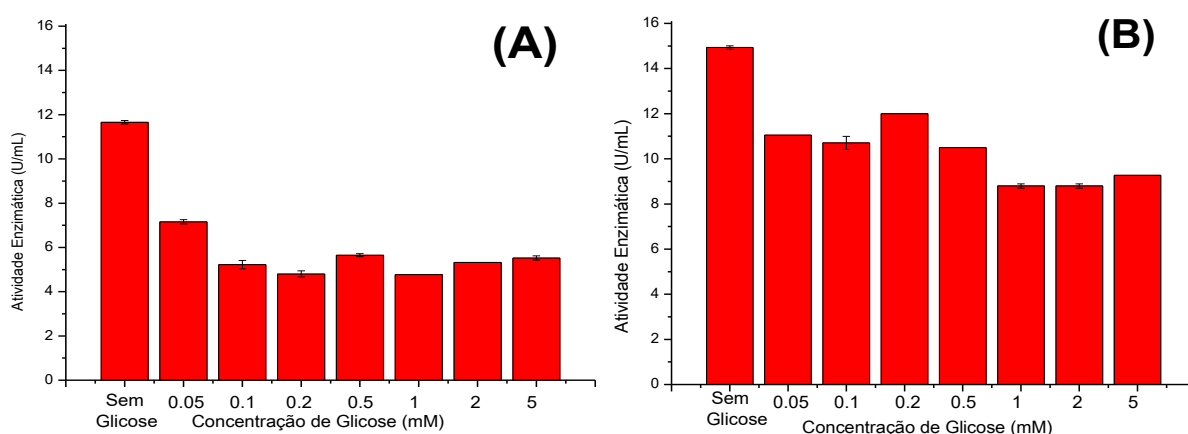
De acordo com os perfis dos gráficos analisados anteriormente (Figura 8) para as diferentes concentrações de bagaço de cana de açúcar e de farinha de centeio empregadas, e considerando a composição em fosfato para ambas as fontes, é possível especular sobre as causas da variação na produção de fosfatases. No caso do bagaço de cana de açúcar, o qual apresenta baixa concentração de fosfato em sua composição (CARVALHO et al, 2006), a produção da fosfatase é pouco incentivada, necessitando de uma concentração maior de bagaço para suprir essa necessidade nutricional. Por outro lado, logo após aumentar além da quantidade ótima necessária, leva a redução da produção fosfatásica. Fato semelhante ocorre com a farinha de centeio que, de acordo com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (NEPA-UNICAMP, 2011), possui alta concentração de fósforo (3,4g/kg de farinha de centeio), sendo o composto que apresenta-se em maior concentração. Desta forma, a utilização da farinha de centeio em baixa concentração disponibiliza uma quantidade de fósforo acrescentado ao meio de cultivo suficiente para que tenha alta produção de fosfatases. Porém, quando a concentração de centeio é aumentada, tem-se a brusca redução da produção enzimática como observado na Figura 8B.

Bernard et al. (2002) demonstraram a redução na atividade *p*-nitrofenilfosfatásica produzida por *Aspergillus fumigatus* com a adição de 1 mM ou mais de fósforo inorgânico no meio de cultivo. O estudo realizado com o fungo *Humicola lutea* 120-5 também demonstrou que, aumentando a concentração de fosfato de potássio no meio de cultivo, a biossíntese de fosfatase e protease ácidas é reduzida (ALEKSIEVA; MICHEVA-VITEVA, 2000). Para continuidade do estudo, foram adotadas as concentrações de 3% (m/v) para o bagaço de cana-de-açúcar e 0,5% (m/v) para a farinha de centeio.

4.5 Influência da adição de glicose como segunda fonte adicional de carbono

Selecionada as concentrações do bagaço de cana de açúcar e farinha de centeio, adicionaram-se diferentes concentrações de glicose a fim de observar se a produção de fosfatase alcalina extracelular seria maior na presença de uma segunda fonte de carbono de mais fácil acesso, como os açúcares.

Figura 9 - Influência da adição de diferentes concentrações de glicose como segunda fonte adicional de carbono para produção de fosfatase alcalina extracelular por *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* em meio Khanna, adicionado de 3% de bagaço de cana por 72 horas (A) e 0,5% de farinha de centeio por 96 horas (B), em agitador orbital a 100 rpm, pH 6,0 e 30°C.



Fonte: Autor

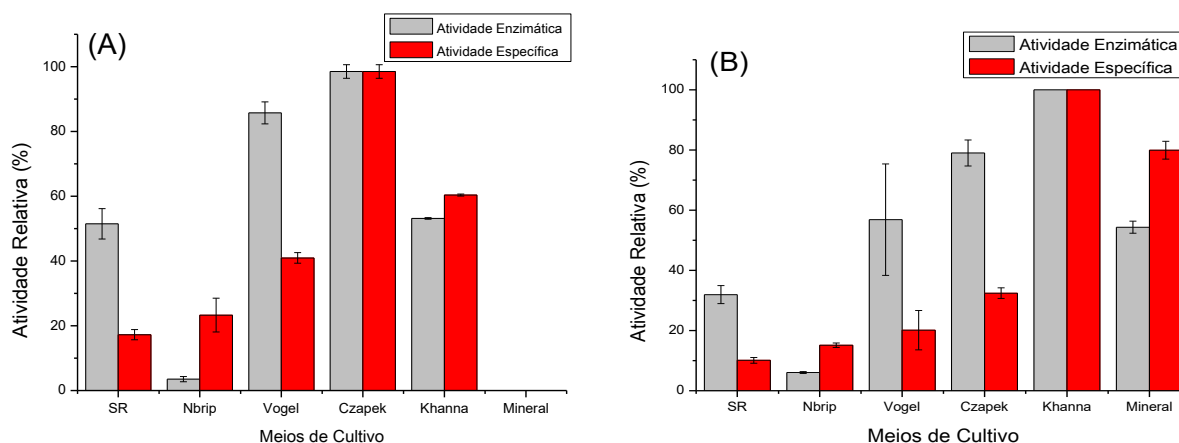
A produção de fosfatase alcalina foi reduzida para os meios contendo bagaço de cana-de-açúcar e farinha de centeio acrescentados de glicose (Figura 9A e B, respectivamente). Este comportamento deve-se, possivelmente, a repressão

catabólica sofrida pelo fungo, pois a glicose atua como inibidor dos genes que participam na produção de diversas enzimas (MAZÓN, 2014). Porém, em alguns microrganismos, como o *S. cerevisiae*, a presença de glicose é fundamental para o monitoramento do fósforo inorgânico presente no meio, sugerindo que esse açúcar compõe um sistema de *feedback* do fungo, regulando a secreção de fosfatase para o meio extracelular (GIOTS; DONATON; THEVELEIN, 2003).

4.6 Produção de fosfatase alcalina em diferentes meios de cultura

Utilizando as duas fontes adicionais de carbono selecionadas anteriormente, a influência da composição do meio de cultura na produção enzimática foi analisada. Pode-se observar na Figura 10A que o meio Czapek favoreceu a maior produção enzimática (12,1 U/mL) quando utilizado bagaço de cana de açúcar, seguido pelo meio Vogel (10,5 U/mL). Considerando a atividade específica, a maior produção também foi encontrada no meio Czapek (8,15 U/mg de prot.). Já no caso da farinha de centeio (Figura 9B), a melhor produção foi obtida em meio Khanna (13,8 U/mL), que já estava sendo utilizado anteriormente, sendo 16,5 vezes maior que o obtido com o meio de menor produção (NBRIP), seguido pelo meio Czapek (10,91 U/mL).

Figura 10 - Influência do meio de cultura adicionado de 3% (m/v) de bagaço de cana-de-açúcar (A) e de 0,5% (m/v) de farinha de centeio (B) na produção de fosfatase alcalina extracelular por *R. microsporus var. microsporus* em FSbm sob agitação orbital a 100 rpm, pH 6,0 e 30°C por 72 horas e 96 horas, respectivamente. Em (A), 100% corresponde a 12,1 U/mL e 8,15 U/mg de prot.; Em (B), 100% corresponde a 13,8 U/mL e 4,1 U/mg de prot.).



Fonte: Autor

Analisando a composição dos meios de cultura Khanna e Czapek observa-se a presença de fosfato de potássio monobásico, o que pode ter favorecido à produção de fosfatase. De certa forma, este resultado é reforçado com o observado para o meio NBRIP, que não apresenta esse componente em sua formulação, obtendo-se a menor produção com ambas as fontes de carbono adicionais testadas. Já foi descrito que a concentração de enzimas ou metabólitos produzidos pode depender da presença de um composto específico, o qual age como indutor, sendo capaz de “ativar” a produção de metabólitos quando necessário (SÁNCHEZ; DEMAIN, 2002).

A adição de farinha de centeio, que contém alta concentração de fósforo em sua composição, em meio Khanna pode ter contribuído para a máxima produção enzimática (Figura 10B), uma vez que este meio possui baixa concentração de fosfato. Considerando o uso de bagaço de cana de açúcar, o qual possui baixa concentração de fósforo em sua composição, nos diferentes meios de cultura, o meio Czapek, com a segunda maior concentração de fosfato de potássio testado, favoreceu a maior produção enzimática de fosfatases (Figura 10A). Alguns estudos mostram que a presença de fosfato no meio, até em forma de rocha mineral, é importante para o microrganismo obter fósforo (YADAV; TARAFDAR, 2003).

O meio Mineral, que apresenta maior concentração de fosfato de potássio monobásico em sua composição, favoreceu a produção fosfatásica quando adicionado de farinha de centeio. Por outro lado, quando adicionado de bagaço de cana de açúcar, que possui açúcar residual entre suas fibras de celulose, a produção foi reduzida, demonstrando que a presença de glicose no meio de cultura pode ter reduzido a produção da fosfatase, semelhante ao estudo da fosfatase ácida produzida por *Humicola lutea* 120-5 (ALEKSIEVA; MICHEVA-VITEVA, 2000). Estes resultados reforçam a importância não somente da composição do meio de cultura empregado, mas também a importância da composição da fonte de carbono empregada na produção enzimática por *R. microsporus* var. *microsporus*.

Sato e colaboradores (2015) cultivaram o fungo *R. microsporus* var. *microsporus* em biofilme utilizando o meio Khanna com adição de diferentes concentrações de fosfato de potássio monobásico (0-5 mM), e identificaram um aumento na produção fitásica com o acréscimo de até 0,5 mM de KH_2PO_4 , e quando essa concentração foi aumentada, notou-se uma redução na produção de fitase.

Observando a concentração de fósforo disponível nos meios, é possível especular uma ligação entre a utilização deste composto, a mobilização de reservas endógenas e produção de fosfatases. Os resultados obtidos sugerem que a síntese de fosfatase é regulada por meio da concentração de fosfato no meio, sendo sintetizada em condições limitantes de fósforo. A produção de fosfatase regulada pela concentração de KH_2PO_4 já foi descrita por Yeung et al. (2009) para a bactéria gram-negativa *Burkholderia cenocepacia* e para o fungo *Neurospora crassa* (NAHAS et al., 1982). Gras (2008) demonstrou que o fungo *Neurospora crassa* possui um gene (*mak-2*) que atua na via de sinalização para a captação de fosfato e no monitoramento do fósforo inorgânico (Pi) extracelular, e está diretamente ligado às MAP quinases, enzimas que atuam na sinalização intracelular. As MAP quinases são essenciais para a ativação ou repressão de genes que possibilitam uma resposta adaptativa específica ao meio, como a produção de enzimas extracelulares para obtenção de nutrientes (GRAS, 2008).

Por este motivo, o estudo da regulação da síntese da fosfatase por microrganismos deve ser feito com a linhagem pura em condições determinadas pelo pesquisador, pois os mecanismos de regulação da síntese são complexos e variam de um microrganismo para outro (ALBRECHT et al., 2010).

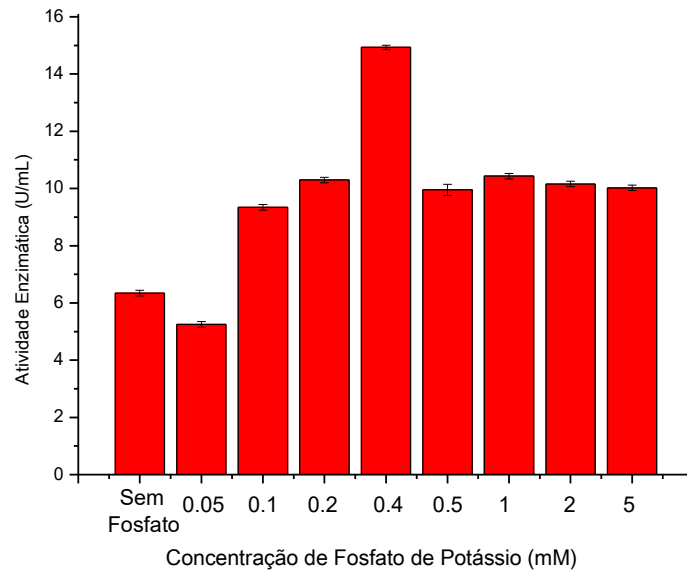
A farinha de centeio, por mais que não seja um resíduo, pode ser utilizada em baixa concentração como, por exemplo, 0,5% (m/v) no meio de cultivo, para obtenção da máxima produção enzimática. Com isso, foi escolhida esta concentração para dar continuidade aos estudos.

4.7 Influência da concentração de fosfato de potássio no meio de cultivo

Observando a Figura 11, pode-se inferir que quando adicionado 0,4 mM de fosfato de potássio ao meio, a produção enzimática foi maior. Na formulação do meio Khanna (KHANNA et al., 1995), o fosfato de potássio faz parte da solução de sais, sendo adicionado na concentração de 0,1 mM. Quando acrescido em concentrações iguais ou superiores a 0,5 mM, a produção enzimática mantém-se em torno de 15 U/mL, comportamento já descrito por Aleksieva e Micheva-Viteva (2000), demonstrando que, a partir de uma determinada concentração, o microrganismo não produz mais fosfatases, evitando assim o excesso de metabólitos no meio. Com

isso, a concentração de 0,4 mM de fosfato de potássio foi utilizada para posteriores análises.

Figura 11 - Influência da concentração de fosfato de potássio no meio de cultivo para produção de fosfatase alcalina por *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* a 30°C, pH 6 por 96 horas em agitação orbital de 100 rpm.

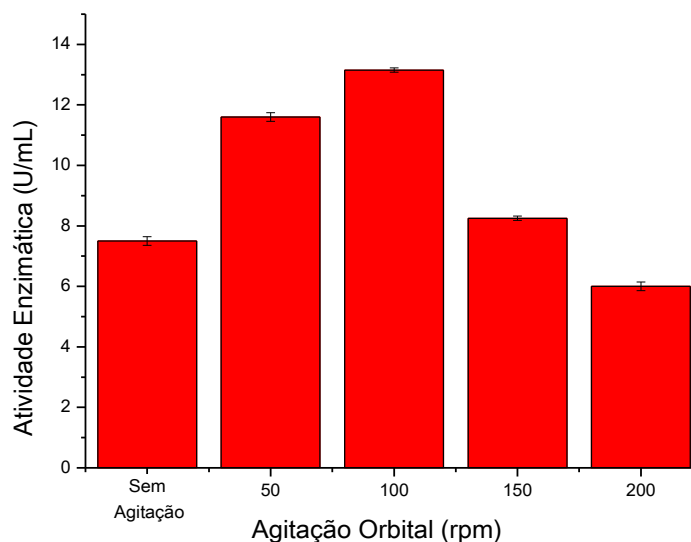


Fonte: Autor

4.8 Influência da agitação na produção de fosfatase

A influência da intensidade da agitação orbital do cultivo sobre a produção enzimática foi analisada como pode ser observado na Figura 12. A maior produção enzimática (12,9 U/mL) por *R. microsporus* var. *microsporus* foi obtida empregando-se agitação de 100 rpm.

Figura 12 - Influência da condição de agitação orbital para produção de fosfatase extracelular alcalina por *R. microsporus* var. *microsporus* em FSbm em meio Khanna adicionado de 0,5% de farinha de centeio a 30°C por 96 horas. 100% corresponde a 12,9 U/mL.



Fonte: Autor

Nos cultivos em fermentação submersa, os quais são compostos por mais de 90% de água livre, é necessário mecanismo de aeração e agitação para que os componentes deste meio, células microbianas e oxigênio estejam dispersos uniformemente (SHRADDHA et al., 2011). Ustok, Tari e Gogus (2007) afirmaram que os objetivos principais das condições de agitação é o aumento da transferência de calor e massa no meio e manutenção das células em suspensão, além da dispersão das bolhas de ar, e conseqüentemente, fornecendo o suprimento de oxigênio necessário para os microrganismos. Do ponto de vista bioquímico, o oxigênio é o receptor final de elétrons, sendo, ao final da cadeia respiratória, reduzido à água, permitindo a reoxidação das coenzimas participantes das reações de desidrogenação ao longo do ciclo de Krebs e da glicólise, além de permitir a estocagem de energia através das moléculas de ADP, que são convertidas em ATP (NELSON; COX, 2013).

Guimarães e colaboradores (2004), utilizando o fungo *A. caespitosus*, obtiveram fosfatases alcalinas em fermentação submersa também agitada orbitalmente a 100 rpm. Desta forma, foi selecionada a agitação orbital de 100 rpm para posteriores estudos.

4.9 Otimização das condições de cultivo utilizando o Planejamento Experimental

De maneira geral, analisando os resultados obtidos, é possível observar que em temperaturas mais altas (35°C) ocorre uma redução da produção enzimática em relação à 25°C e 30°C (Tabela 6). Também é possível observar redução da produção enzimática quando usado pH 4,0 comparado ao pH 8,0. As maiores produções enzimáticas foram obtidas nas análises 5 e 7, sendo que temperaturas moderadas (aproximadamente 27,5°C) influenciam positivamente a produção fosfatásica alcalina. Fungos do gênero *Rhizopus* são descritos como mesófilos, ou seja, desenvolvem-se melhor em temperaturas entre 15 e 40°C (BENNETT, 1998), o que justifica tal resultado. A combinação que proporcionou a maior produção enzimática foi pH 8,0, temperatura 25°C e tempo de cultivo de 120 horas (análise 7).

Tabela 6 - Matriz do delineamento composto central rotacional para pH, tempo e temperatura de cultivo.

Nº da análise	pH	Tempo de Cultivo (h)	Temperatura (°C)	Atividade Específica (U/mg de prot.)	
				Bloco 1	Bloco 2
1	4	72	25	8,80	5,02
2	4	72	35	0,62	3,24
3	4	120	25	2,77	1,27
4	4	120	35	2,91	1,91
5	8	72	25	8,54	6,88
6	8	72	35	7,03	4,11
7	8	120	25	13,34	15,59
8	8	120	35	1,99	4,13
9	6	96	30	3,13	4,90
10	2,47	96	30	2,29	2,50
11	9,52	96	30	3,66	3,24
12	6	53,66	30	2,87	2,26
13	6	138,33	30	3,80	6,72
14	6	96	21,18	9,28	7,65
15	6	96	38,81	8,78	6,89
16	6	96	30	3,86	2,60

$\alpha=1,6329$

4.9.1 Confiabilidade do modelo matemático do planejamento

O valor previsto pode não condizer inteiramente aos valores obtidos nos ensaios, devido ao erro experimental, obtendo-se um $R^2=0,7976$, ou seja, obteve uma confiabilidade de 79,76%, sendo uma correlação baixa, onde normalmente, no âmbito científico, é aceito um R^2 acima de 0,90, o que confirma a correlação do planejamento e equação retirada do modelo (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Outros trabalhos acadêmicos utilizaram o planejamento para otimizar outros parâmetros, como a produção de etanol celulósico com $R^2= 0,89$ (SANTOS et al., 2014), para otimização na produção de α -amilase com $R^2= 0,96$ (ANUPAMA; SOMALANKA, 2016), otimização na produção de tanases com $R^2=0,99$ (KUMAR et al., 2016), e otimização no método de extração e hidrólise da quercetina em alface e kaempferol em rúcula com $R^2=0,74$ e $0,75$, respectivamente (HUBER et al., 2007).

Os testes estatísticos, p -valor e intervalos de confiança não podem ser interpretados de forma absoluta nas ciências biológicas, sendo que os resultados não estatisticamente significativos podem representar dados biologicamente significados (GREENLAND et al., 2016). Isso pode ser analisado quando comparado, por exemplo, as variações de temperatura e pH do ambiente ao longo da linha evolutiva dos microrganismos, sendo fator determinante para o metabolismo ótimo e sucesso adaptativo deles (BENNETT, 1998; JAMES et al., 2006; BLACKWELL, 2011).

4.9.2 Otimização do pH, temperatura e tempo de cultivo para a produção enzimática

Os dados apresentados a seguir (Tabela 7) estimam que os fatores que mais influenciaram a produção enzimática foram o pH no modelo linear, e a temperatura no modelo linear e quadrático, onde seus coeficientes demonstram a significância da alteração desses fatores sobre a atividade específica da fosfatase alcalina produzida por *R. microsporus* var. *microsporus*.

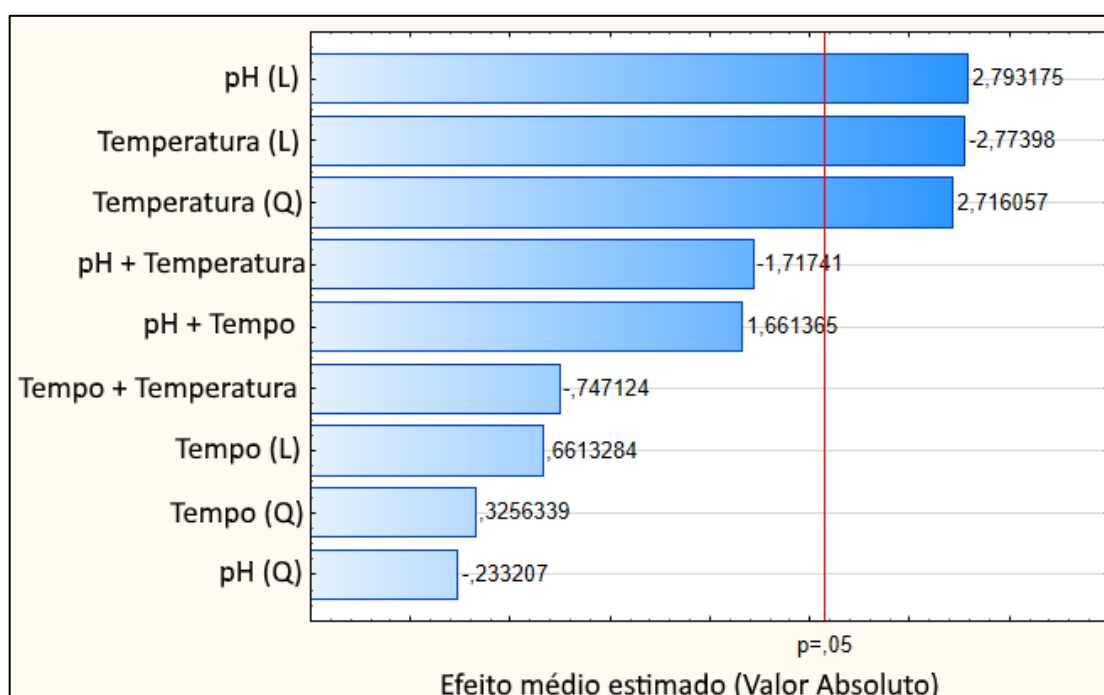
Segundo o gráfico de pareto (Figura 13), é possível observar que o pH no modelo linear apresenta coeficiente de 2,79, representando que o aumento do pH nos experimentos age positivamente na produção enzimática, diferentemente da

temperatura no modelo linear, que apresentou o coeficiente de -2,77, demonstrando que o aumento da temperatura tem efeito negativo na produção enzimática.

Tabela 7 - Efeitos para os fatores e os erros padrões correspondentes a atividade específica da fosfatase alcalina produzida por *R. microsporus* var. *microsporus*. Modelo linear e quadrático representados por (L) e (Q), respectivamente. Em vermelho, os valores estatisticamente significativos.

	Coeficiente de Regressão	Erro Padrão	p
Média	3,660	1,300	0,010
Efeitos Principais			
pH (L)	2,727	0,976	0,011
pH (Q)	-0,266	1,140	0,818
Tempo (L)	0,646	0,976	0,515
Tempo (Q)	0,371	1,140	0,748
Temperatura (L)	-2,708	0,976	0,011
Temperatura (Q)	3,095	1,140	0,013
Interações			
pH + Tempo	2,163	1,302	0,111
pH + Temperatura	-2,236	1,302	0,100
Tempo + Temperatura	-0,973	1,302	0,463

Figura 13 - Gráfico de Pareto para o efeito médio estimado das variáveis independentes sobre a atividade específica da fosfatase alcalina produzida por *R. microsporus* var. *microsporus*.



Fonte: Autor

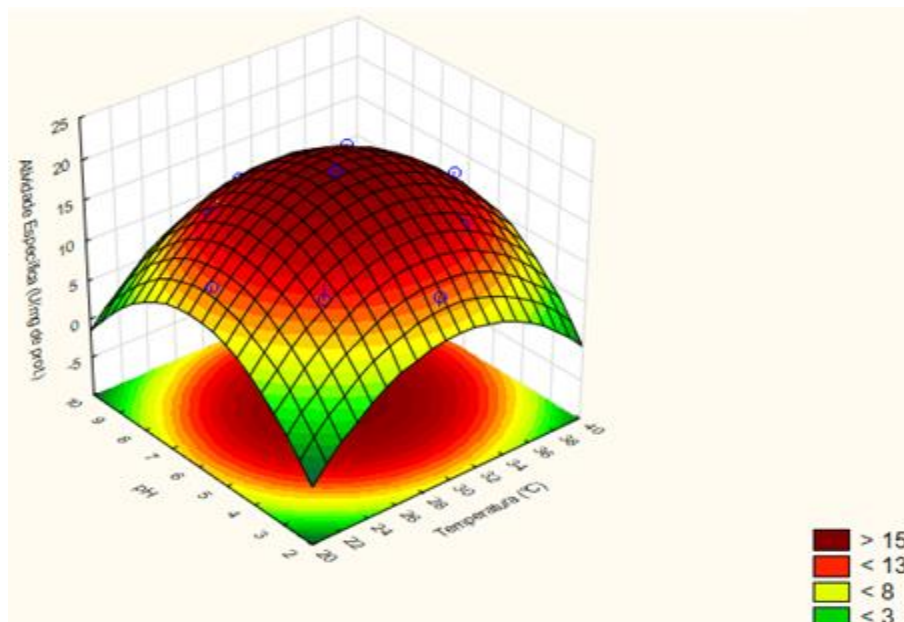
Com base no modelo matemático de 2ª ordem do DCCR, representados na equação 2, os parâmetros não estatisticamente significantes para atividade específica da fosfatase alcalina foram retirados, obtendo assim a equação ajustada do modelo matemático:

Equação 2: Representação matemática ajustada do modelo criado com o planejamento composto central rotacional.

$$\begin{aligned} & \text{Atividade Específica } (\gamma) \\ & = -149,68 + 9,48 * \mathbf{pH} + 6,41 * \mathbf{Temperatura} - 0,098 * \mathbf{Temperatura}^2 \end{aligned}$$

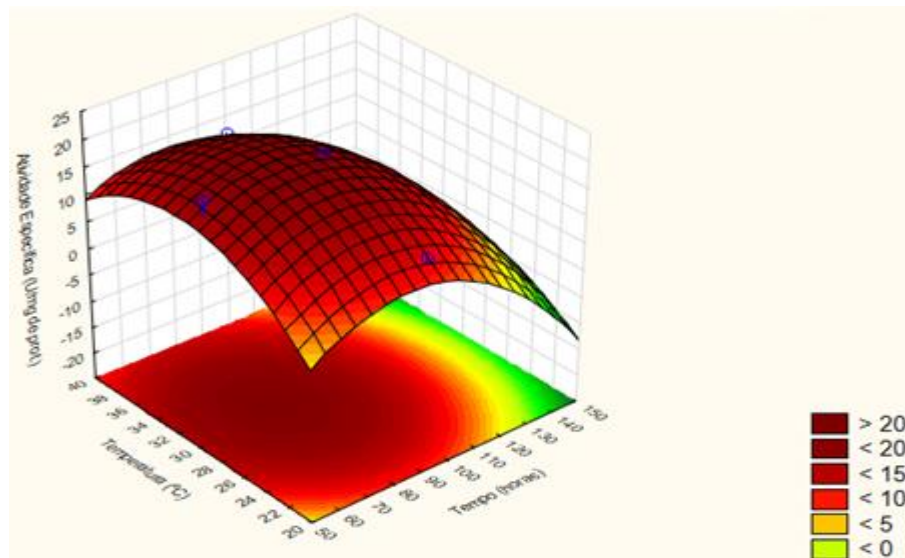
Observados os dados anteriormente, o modelo quadrático foi utilizado para gerar as superfícies de resposta, comparando duas variáveis correlacionadas, sendo pH e temperatura (Figura 14), temperatura e tempo (Figura 15), e tempo e pH (Figura 16).

Figura 14 - Superfície de Resposta para o efeito do pH e da temperatura sobre a atividade específica (U/mg de prot.) da fosfatase alcalina extracelular produzida por *R. microsporus* var. *microsporus* mantendo o tempo de cultivo no ponto central (96 horas).



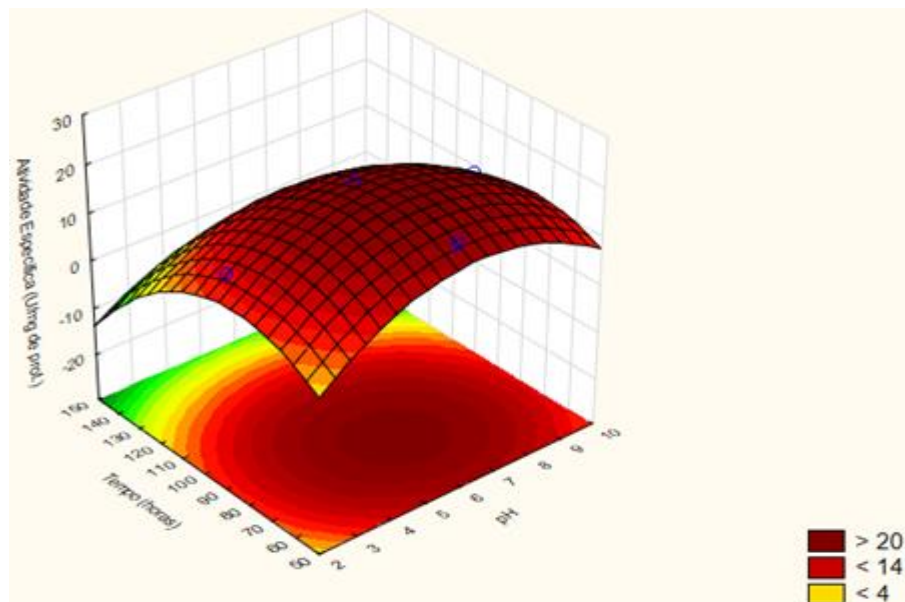
Fonte: Autor

Figura 15 - Superfície de Resposta para o efeito da temperatura e do tempo sobre a atividade específica (U/mg de prot.) da fosfatase alcalina extracelular produzida por *R. microsporus* var. *microsporus* mantendo o pH no ponto central (pH 6,0).



Fonte: Autor

Figura 16 - Superfície de Resposta para o efeito do tempo e pH sobre a atividade específica (U/mg de prot.) da fosfatase alcalina extracelular produzida por *R. microsporus* var. *microsporus* mantendo a temperatura no ponto central (30°C).



Fonte: Autor

Posteriormente, foi calculado, com auxílio do *software*, os valores críticos de pH inicial, tempo e temperatura de cultivo (Tabela 8) para máxima produção de fosfatase alcalina extracelular.

Tabela 8 - Valores mínimos e máximos testados, e valores críticos de pH, tempo de cultivo e temperatura para máxima produção de fosfatase alcalina por *R. microsporus* var. *microsporus* em FSbm

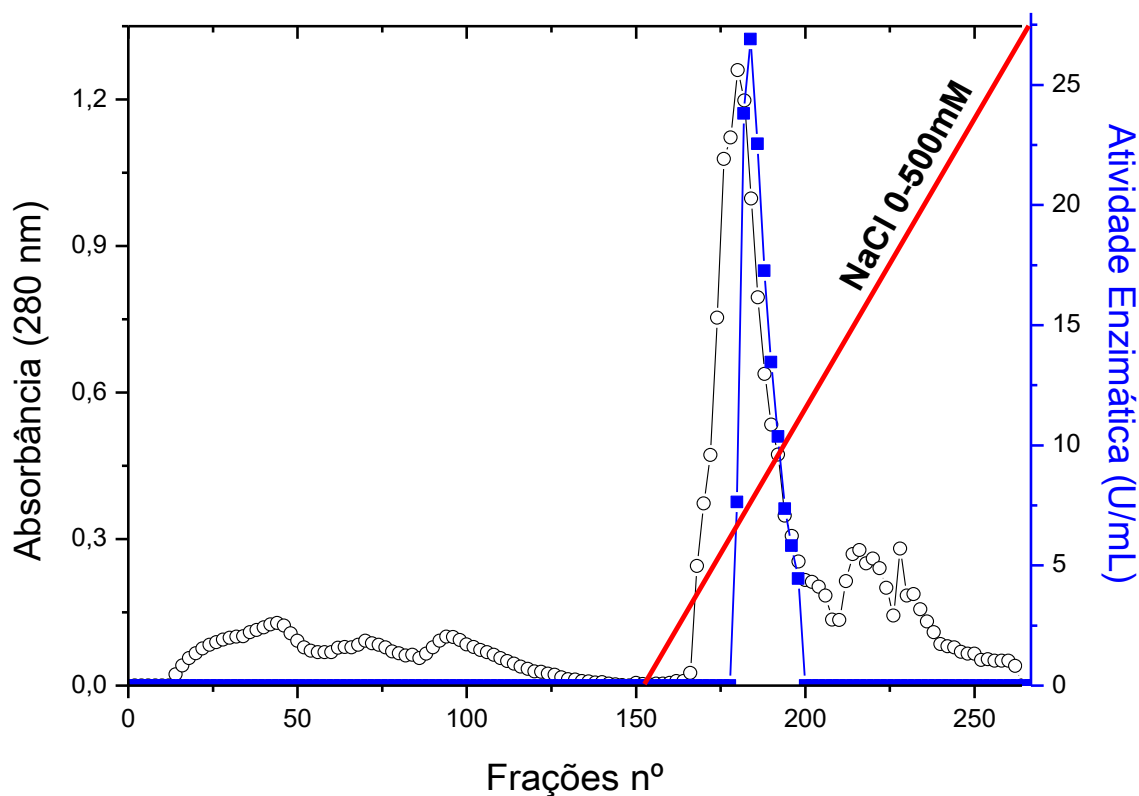
	Valores Mínimos	Valores Críticos	Valores Máximos
pH	2,47	6,31	9,52
Tempo (h)	53,66	75,58	128,33
Temperatura (°C)	21,18	31,79	38,81

Realizando o cultivo nas condições citadas nos valores críticos (pH 6,3, 76 horas e 31,8°C), a fosfatase produzida por *R. microsporus* var. *microsporus* atingiu $21,68 \pm 0,58$ U/mL de atividade enzimática, sendo cerca de 1,67 vezes maior do que os valores de atividade da fosfatase obtidas antes da realização da otimização. Esse valor supera os valores obtidos para a fosfatase produzida por *A. caespitosus* (4,49 U/mL) em meio SR com pH 6 a 40°C por 72 horas (GUIMARÃES et al., 2003) e *A. flavus* em meio *Mustard cake* com pH 6 a 30°C por 96 horas (12,00 U/mL) (GAIND; SINGH, 2015). Com base no exposto, foi selecionado 76 horas de tempo de cultivo, pH inicial 6,3 e 32°C de temperatura de incubação para os posteriores análises.

4.10 Purificação do filtrado extracelular em coluna cromatográfica DEAE-Celulose

Na Figura 17, pode-se observar o perfil cromatográfico em coluna de troca iônica DEAE-Celulose para a fosfatase alcalina extracelular, sendo observado um único pico de atividade enzimática eluído com 141 mM de NaCl, demonstrando que a fosfatase alcalina interagiu com a resina. Este método inicial utilizado para purificação da fosfatase alcalina assemelha-se ao método utilizado para purificar a fosfatase ácida de *Aspergillus caespitosus* por Guimarães e colaboradores (2004), o qual foi seguido pela purificação na coluna Concanavalina A-Sepharose. Outro método de purificação citado na literatura é a precipitação da fosfatase de *E. coli* por sulfato de amônio com saturação de 25 a 80% e, posteriormente, por cromatografia em CM-Sepharose CL-6B, DEAE-Sepharose CL-6B, fenil-Sepharose CL-4B e MonoS HR 5/5 (GREINER et al., 1993). Lim et al. (2000) separaram as isoformas de fosfatases de *Escherichia coli* através da técnica de *chromatofocusing* que separa as proteínas de acordo com seus pontos isoelétricos.

Figura 17 - Perfil cromatográfico em DEAE-Celulose para a fosfatase alcalina extracelular produzida por *R. microsporus* var. *microsporus* em FSbm no meio Khanna com adição de 0,5% (m/v) de farinha de centeio a 100 rpm em agitador orbital, pH 6,3, 31,8° C por 76 horas. Símbolos: (■) Atividade fosfatásica alcalina; (○) Absorbância 280 nm.

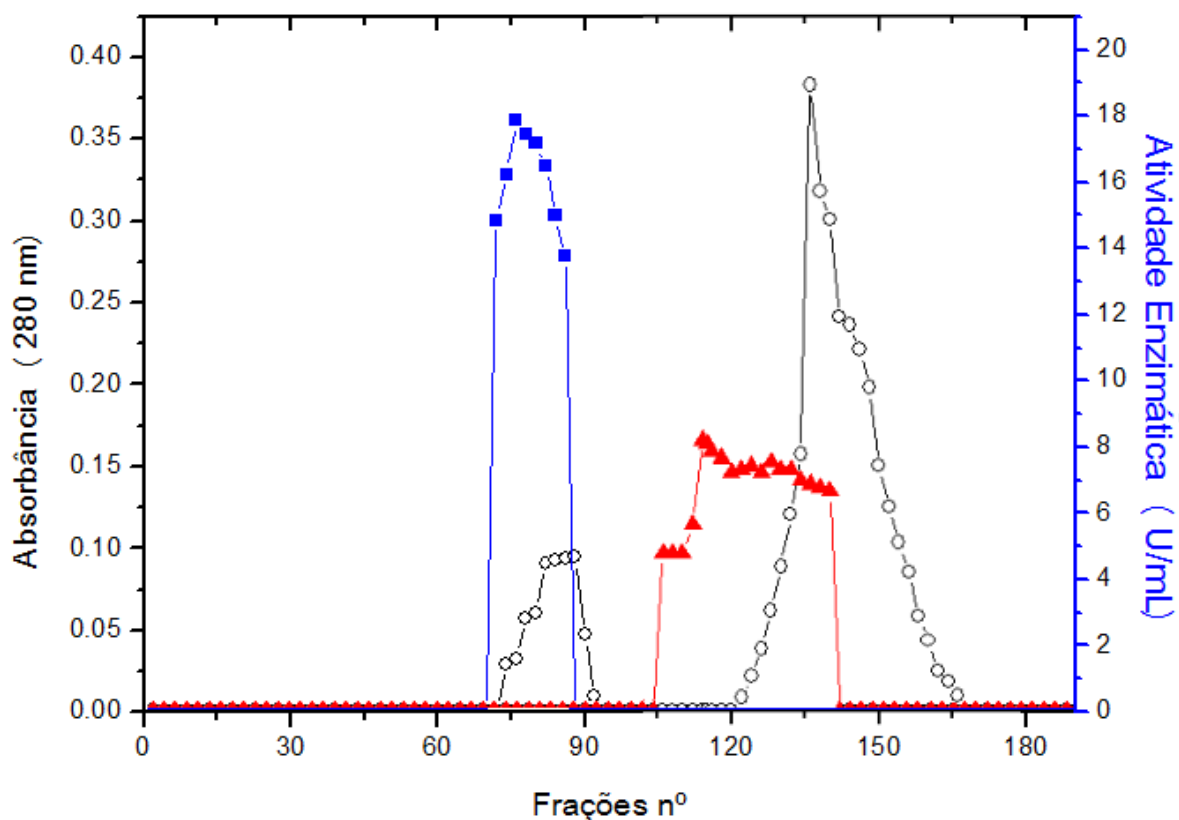


Fonte: Autor

Considerando que o fungo *R. microsporus* var. *microsporus* foi capaz de produzir fitase alcalina, como apresentado anteriormente e verificado por Sato et al. (2015), a atividade fitásica alcalina da fração purificada foi analisada, obtendo-se um valor de 4,54 U/mL.

Posteriormente, a fração com atividade fosfatásica e fitásica reunida da DEAE-Celulose foi submetida à coluna cromatográfica de exclusão molecular. Na figura 18, apresenta-se o perfil cromatográfico em coluna de exclusão molecular Sepharose CL-6B para a fosfatase e fitase alcalinas extracelulares produzidas por *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*. São observados dois picos de atividade enzimática, sendo que o primeiro corresponde a atividade fosfatásica alcalina, e o segundo a atividade fitásica alcalina.

Figura 18 - Perfil cromatográfico em Sepharose CL-6B (1 x 70 cm) para a fosfatase e fitase alcalina produzida por *R. microsporus* var. *microsporus* em FSbm no meio Khanna com adição de 0,5% (m/v) de farinha de centeio a 100 rpm em agitador orbital, pH 6,3, 31,8° C por 76 horas. Símbolos: (■) Atividade fosfatásica alcalina; (▲) Atividade fitásica alcalina; (○) Absorbância 280 nm



Fonte: Autor

Mediante estes procedimentos de purificação, a fosfatase foi purificada 9,9 vezes com 13,0% de recuperação (Tabela 9), divergindo da purificação da fosfatase ácida de *A. caespitosus* em ConA-Sepharose, que foi purificada 33,4 vezes com recuperação de 14,7% (GUIMARÃES et al., 2004).

Tabela 9 - Purificação da fosfatase alcalina extracelular produzida por *R. microsporus* var. *microsporus* em FSbm no meio Khanna com adição de 0,5% (m/v) de farinha de centeio a 100 rpm em agitador orbital, pH 6,3, 31,8°C por 76 horas.

Passo de Purificação	Volume (mL)	Atividade (U Totais)	Proteína Total (mg)	Atividade específica (U/mg de prot.)	Recuperação (%)	Fator de Purificação (vezes)
Extrato Bruto	90	1980	191,6	10,33	100,0%	1
DEAE-Celulose	25	1160,8	25,74	45,09	58,6%	4,3
Sepharose CL-6B	16	257,6	2,51	102,6	13,0%	9,9

Com relação a fitase alcalina, obteve-se purificação de 86,36 vezes com recuperação de 167,6% (Tabela 10). Este resultado de recuperação indica que, possivelmente, a atividade da fosfatase atrapalha na quantificação da atividade fitásica, pois o produto formado pela ação catalítica da fitase sofre, posteriormente, hidrólise pela fosfatase. Segundo Gulati, Chadha e Saini (2007), o complexo “azul de molibdênio” formado na reação de quantificação da atividade fitásica ocorre com a ligação do ortofosfato liberado com o molibdato de amônio adicionado ao meio reacional, porém quando o ortofosfato é hidrolisado pela fosfatase, a formação do complexo é reduzida fazendo com que a atividade fitásica observada na fração retirada da DEAE-Celulose e no extrato bruto seja subestimada. Quando a fosfatase é separada da fitase, a atividade fitásica é melhor quantificada, proporcionando resultados maiores que os obtidos anterior a purificação.

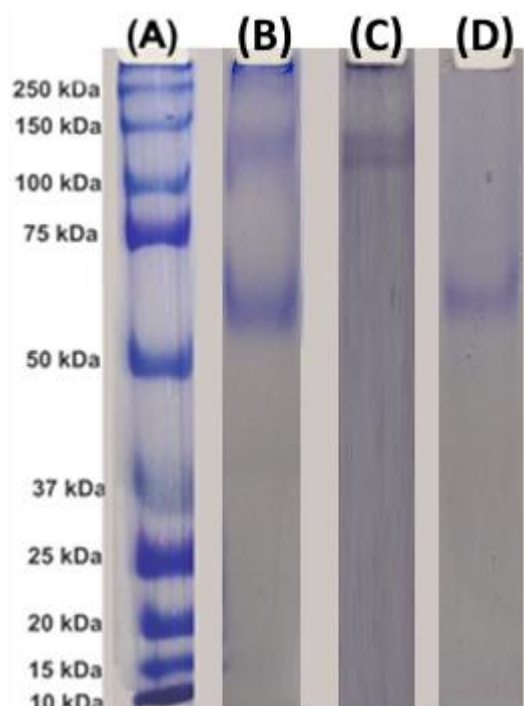
Tabela 10 - Purificação da fitase alcalina produzida por *R. microsporus* var. *microsporus* em FSbm no meio Khanna com adição de 0,5% (m/v) de farinha de centeio a 100 rpm em agitador orbital, pH 6,3, 31,8°C por 76 horas.

Passo de Purificação	Volume (mL)	Atividade (U Totais)	Proteína Total (mg)	Atividade específica (U/mg de prot.)	Recuperação (%)	Fator de Purificação (vezes)
Extrato Bruto	90	147,6	191,6	0,77	100,0%	1
DEAE-Celulose	25	113,5	25,74	4,41	76,7%	5,7
Sepharose CL-6B	38	247,38	3,72	66,50	167,60	86,3

Esse método de purificação difere do utilizado por Sato e colaboradores (2014), que utilizaram as colunas cromatográficas DEAE-Celulose, seguida por CM-Celulose, obtendo 4,7% de recuperação e purificação de 4,1 vezes.

Na Figura 19 observa-se o perfil eletroforético em condições desnaturantes (SDS-PAGE 12%) para o *pool* reunido das frações obtidas em DEAE-Celulose e das frações reunidas da Sepharose CL-6B que apresentaram atividade fosfatásica e fitásica alcalina. Para o *pool* obtido da DEAE-Celulose duas bandas proteicas com massas moleculares aparentes de $128,4 \pm 0,71$ kDa e $60,4 \pm 2,30$ kDa foram obtidas (Figura 19, canaleta B). Já para as frações obtidas em Sepharose CL-6B observa-se uma única banda proteica com $127,5 \pm 0,92$ kDa (Figura 19, canaleta C) correspondente a fração com atividade fosfatásica e outra com $62,9 \pm 0,78$ kDa (Figura 19, canaleta D) para a fração com atividade fitásica.

Figura 19 - Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12% para a fosfatase e fitase alcalinas extracelulares produzidas por *R. microsporus* var. *microsporus* purificadas em DEAE-Celulose (B) e em Sepharose CL-6B (C e D) coradas por Coomassie Brilliant Blue R-250. Em (A), marcador de massa molecular BIO-RAD® (A); Em (B), proteínas em DEAE-Celulose onde foram aplicados 103 µg; Em (C), banda proteica da fosfatase em Sepharose CL-6B onde foram aplicados 156 µg; Em (D), banda proteica da fitase em Sepharose CL-6B onde foram aplicados 98 µg.



Fonte: Autor

4.11 Determinação da massa molecular da fosfatase e fitase alcalinas

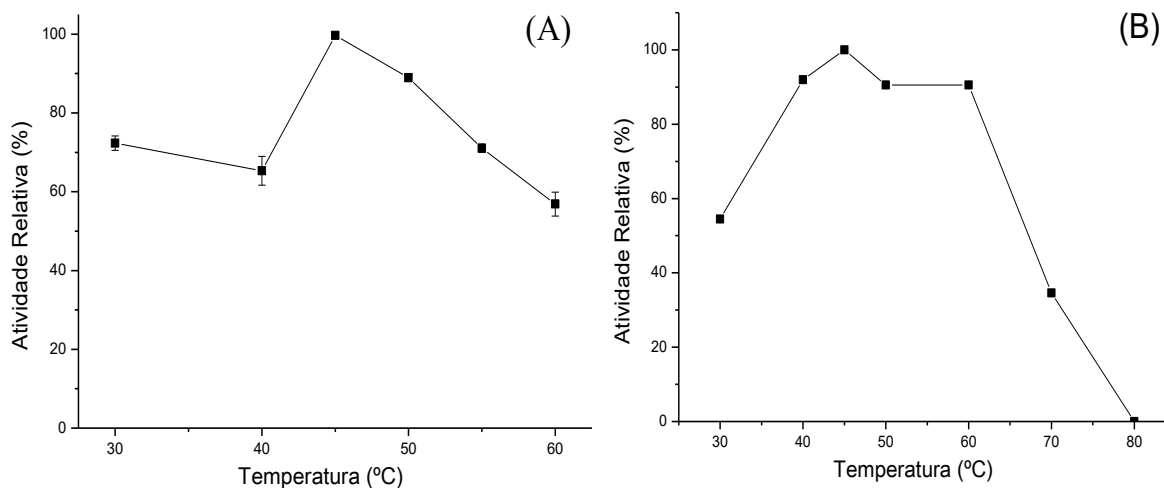
A massa molecular nativa da fosfatase e fitase alcalinas produzidas por *R. microsporus* var. *microsporus* foi de $122,7 \pm 1,81$ e $55,5 \pm 0,82$ kDa, respectivamente, determinadas por coluna cromatográfica Sepharose CL-6B. A proximidade destes valores aos encontrados em SDS-PAGE 12% indicam que ambas enzimas são monômeros.

A fosfatase alcalina produzida por *S. thermophilum* teve massa molecular estimada em 132 kDa (GUIMARAES et al., 2001), e a produzida por *R. oligosporus* em 125 kDa (CASEY; WALSH, 2004). Já a fosfatase de *Humicola grisea* var. *thermoidea* teve massa molecular estimada em 126 kDa (BARACCHINI BUAINAIN et al., 1998). Tais resultado corroboram com a massa molecular encontrada para enzima produzida por *R. microsporus* var. *microsporus*. Já a fitase, é citada como tendo massa molecular variando de 45 a 65 kDa quando produzidas por *A. fumigatus* (PASAMONTES et al., 1997), *Bacillus laevolacticus* (GULATI; CHADHA; SAINI, 2007), *R. oligosporus* (AZEKE; GREINER; JANY, 2011) e *A. oryzae* (SHRADDHA et al., 2011), assemelhando-se a massa molecular encontrada para a fitase de *R. microsporus* var. *microsporus*.

4.12 Influência da temperatura e do pH sobre a atividade fosfatásica

A fosfatase alcalina produzida por *R. microsporus* var. *microsporus* apresentou temperatura ótima de atividade de 45°C (Figura 20), tanto quando contida no extrato como na forma purificada. Os resultados obtidos para a temperatura assemelham-se aos descritos para a cianobactéria *Nostoc flagelliforme*, também com atividade fosfatásica ótima em 45°C (LI, P. et al., 2013), assim como para o fungo *A. fumigatus*, que produziu enzima com temperatura ótima de atividade entre 40°C e 45°C (BERNARD et al., 2002). A fosfatase produzida pelo fungo *Penicillium citrinum* apresentou temperatura ótima de reação de 60°C (GAWAS-SAKHALKAR et al., 2012).

Figura 20 - Temperatura ótima aparente para a atividade fosfatásica extracelular presente no extrato bruto (A) e purificada (B) do fungo *R. microsporus* var. *microsporus*. Em (A), 100% corresponde a 14,34 U/mL; Em (B), 100% corresponde a 14,38 U/mL.

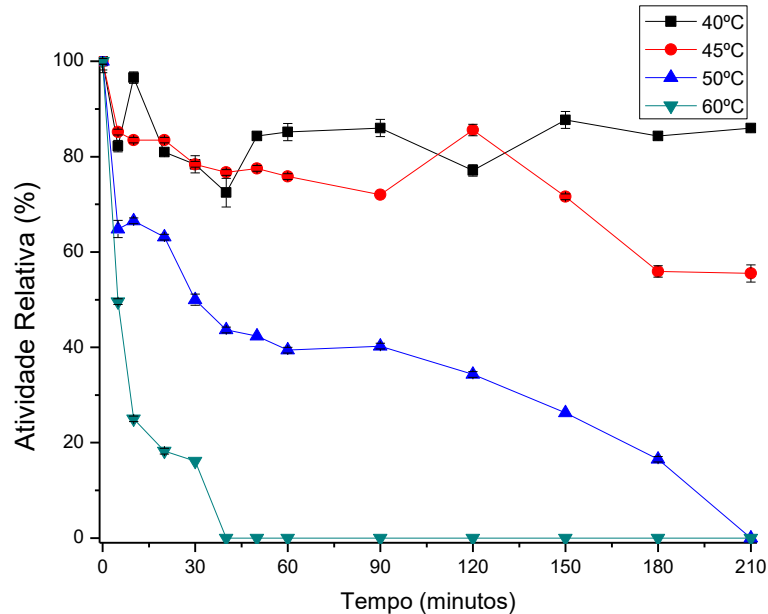


Fonte: Autor

A estabilidade enzimática frente a diferentes condições como a temperatura, presença de íons metálicos ou cofatores, presença de surfactantes, tampões e respectivos pH, estresse oxidativo, presença de solventes, entre outros (FISCHLECHNER et al., 2014; FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2017), é uma das características mais importantes quando almeja-se a aplicação industrial (FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2017).

Neste contexto, de acordo com a Figura 21, a fosfatase alcalina purificada foi capaz de manter sua atividade acima em torno de 80% durante 210 minutos a 40°C. Considerando a incubação a 45°C, a atividade foi reduzida para 55% no mesmo período. Em temperaturas mais elevadas, a atividade enzimática foi reduzida, atingindo tempo de meia vida (T_{50}) de 40 minutos na temperatura de 50°C e de 5 minutos a 60°C. Após 40 minutos a 60°C, a atividade enzimática foi totalmente inibida.

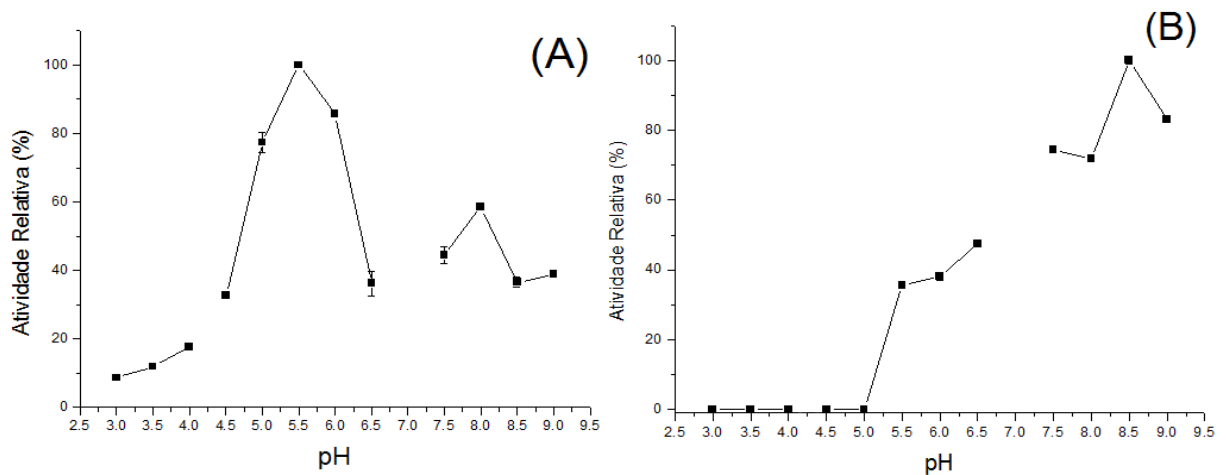
Figura 21 - Estabilidade térmica da fosfatase alcalina purificada a 40°C (▼), 45°C (▲), 50°C (●) e 60°C (■) por diferentes períodos. 100% corresponde a 16,09 U/mL.



Fonte: Autor

Com relação ao pH de atuação, na Figura 22A é possível observar dois picos de atividade fosfatásica quando considerado o extrato bruto, sendo um em pH 5,5 e outro em pH 8,0, indicando, possivelmente que o fungo produz isoformas de fosfatases como também descrito por Sato et al. (2016). Porém, quando considerada a fração purificada, a maior atividade da fosfatase alcalina foi obtida em pH 8,5 (Figura 22B).

Figura 22 - Determinação do pH ótimo aparente para a atividade fosfatásica extracelular presente no extrato bruto (A) e purificada (B) do *R. microsporius* var. *microsporius*. Em (A), 100% corresponde a 22,06 U/mL; Em (B), 100% corresponde a 14,38 U/mL

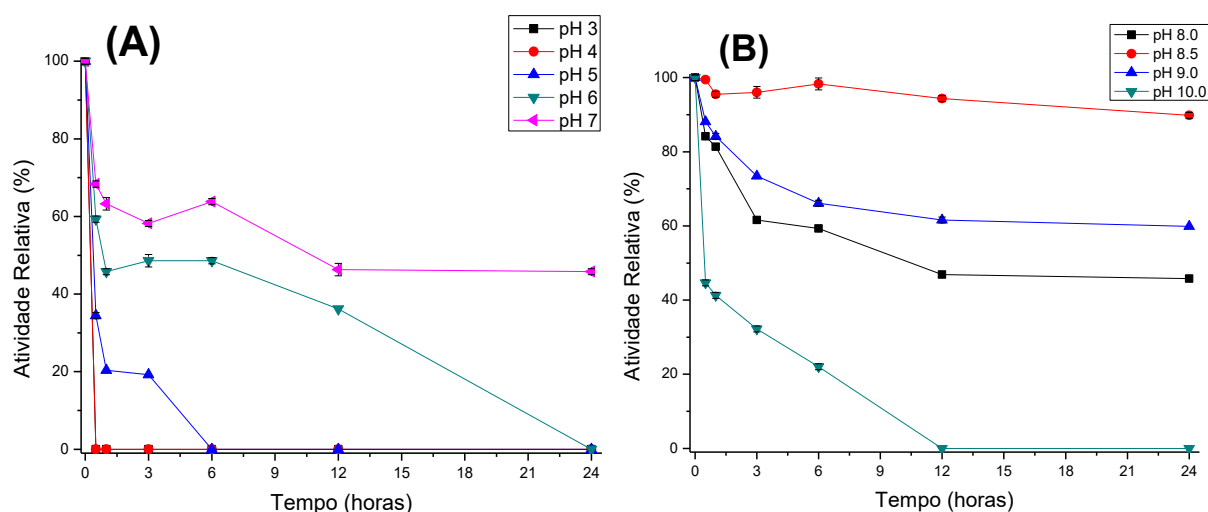


Fonte: Autor

Para a cianobactéria *Nostoc flagelliforme*, a atividade fosfatásica ótima foi no pH 11,0 (LI, P. et al., 2013), e Guimarães et al. (2001) identificou o pH 10,0 e 9,5 para a fosfatase conidial e micelial, respectivamente, produzidas por *Scytalidium thermophilum*. Já para os fungos *A. fumigatus* e *Penicillium citrinum*, a atividade da fosfatase permaneceu estritamente ácida, sendo observado o pH ótimo de 5,5 e 4,8, respectivamente (BERNARD et al., 2002; GAWAS-SAKHALKAR et al., 2012).

Na Figura 23, é possível observar que a atividade enzimática da fosfatase purificada foi mantida próxima a 100% quando mantida em pH 8,5 por todo o período analisado. A medida que o valor do pH de incubação foi aumentado, a atividade enzimática sofreu redução obtendo-se um T_{50} de 4 horas quando mantida em pH 10,0. Nos valores de pH iguais a 3,0, 4,0 e 5,0, a atividade enzimática foi drasticamente reduzida, com T_{50} de aproximadamente 12 horas no pH 6 e 24 horas em pH 7,0. A enzima histidina fosfatase ácida produzida pela bactéria *Yersinia kristensenii* pode permanecer com até 83,2% de sua atividade em pH 2,0 por 1 hora (NIU et al., 2016). Já as fosfatases alcalinas atuam e são estáveis em grandes faixas de pH alcalinos (COLEMAN, 1992; OH et al., 2004).

Figura 23 - Estabilidade ao pH da fosfatase alcalina extracelular purificada produzida por *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* por diferentes períodos. 100% corresponde a 12,06 U/mL. Em (A) está representado a estabilidade aos pH ácidos e o neutro; Em (B) está representado a estabilidade aos pH alcalinos.

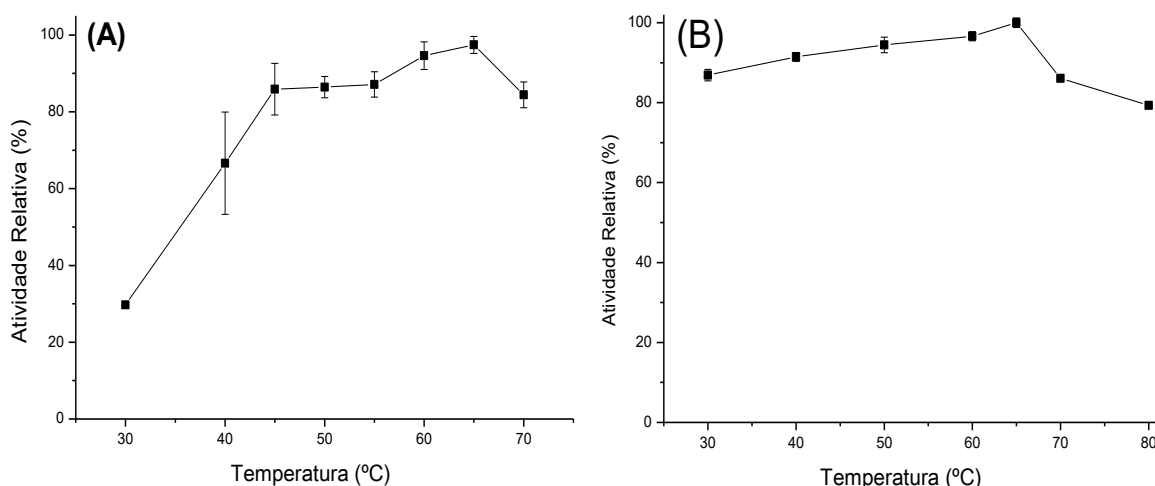


Fonte: Autor

4.13 Influência da temperatura e do pH sobre a atividade fitásica

Tanto para a atividade fitásica presente no extrato bruto quanto para enzima purificada (Figura 24), foi obtida a temperatura ótima de reação de 65°C. Fitases provindas de *A. niger* NRRL 3135 (HOWSON e DAVIS, 1983) e *A. fumigatus* (PASAMONTES et al., 1997) apresentaram atividade ótima em 55°C e 37°C, respectivamente, valores inferiores ao obtido para a atividade fitásica alcalina de *R. microsporus* var. *microsporus*.

Figura 24 - Temperatura ótima aparente para a atividade fitásica extracelular presente no extrato bruto produzida por *R. microsporus* var. *microsporus* cultivado em meio Khanna com adição de 0,5% de farinha de centeio, a 31,8°C em agitador orbital a 100 rpm e pH 6,3 por 76 horas (A), e para a fitase purificada (B). Em (A), 100% corresponde a 1,29 U/mL; Em (B), 100% corresponde a 8,82 U/mL

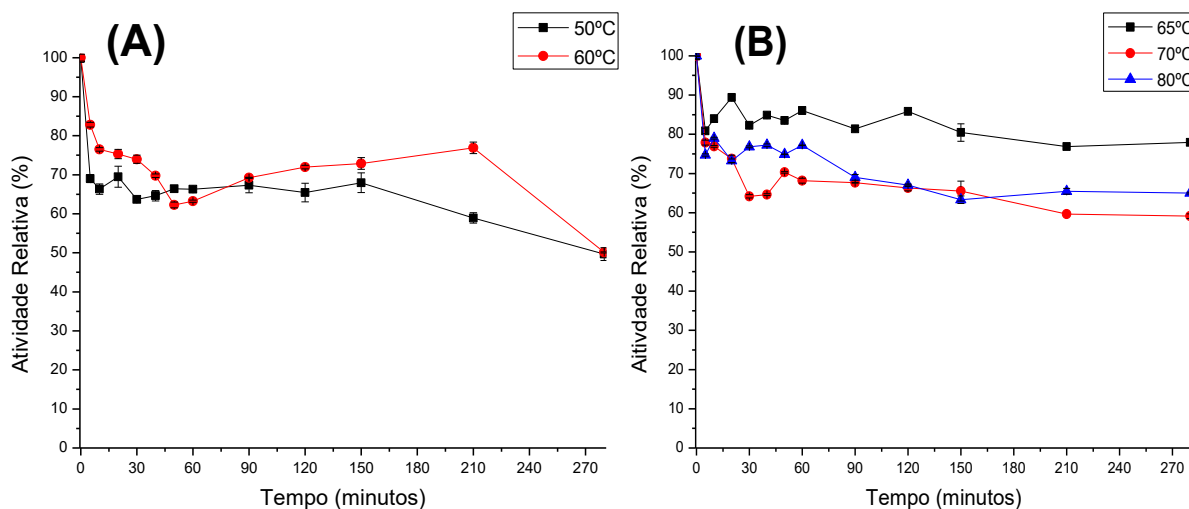


Fonte: Autor

Com relação a estabilidade térmica, é possível observar que nas temperaturas de 50, 60 e 70°C, a atividade fitásica manteve-se acima de 70% ao longo do tempo. Já em sua temperatura ótima de reação (65°C), 95% da atividade enzimática foi mantida (Figura 25). Outro resultado importante é que, na temperatura de 80°C, a enzima manteve cerca de 75% de sua atividade a partir de 15 minutos de incubação (Figura 25B) e, pensando na aplicação da fitase em ração, segundo Wiss et al. (1999), as indústrias de ração animal buscam fitases termoestáveis, pois a peletização da ração ocorre entre 80°C a 85°C durante alguns segundos. Estas enzimas também devem atuar nas condições do organismo que irá se alimentar da ração suplementada com estas enzimas (JUNIOR et al., 2015), mostrando a

importância desta enzima ser capaz de suportar altas temperaturas por um determinado tempo sem ser inativada.

Figura 25 - Estabilidade térmica da fitase alcalina purificada a 50°C e 60°C (A), e a 65°C, 70°C e 80°C (B) por diferentes períodos. 100% corresponde a 8,35 U/mL.

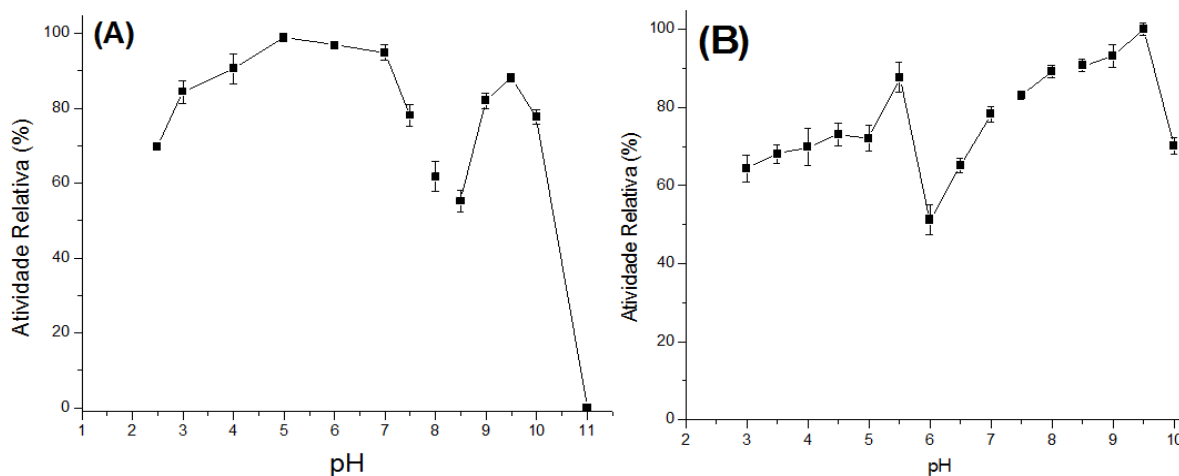


Fonte: Autor

A fitase produzida por *Aspergillus fumigatus* perdeu apenas 10% de sua atividade em temperaturas acima de 100°C por 20 minutos (PASAMONTES et al., 1997). Por outro lado, a produzida por *A. niger* teve sua atividade reduzida em até 30% em temperaturas acima de 55°C (WYSS et al., 1998). Casey e Walsh (2004) demonstraram que a fitase produzida por *A. niger* foi estável por 3 minutos a temperatura de 80°C.

De acordo os dados apresentados na Figura 26, são observados claramente dois picos de atividade enzimática como descrito por Sato et al. (2014), um em pH 5,5 e outro em pH 9,5. Contudo, o valor de pH observado como ótimo para atividade alcalina diferiu do observado anteriormente por Sato et al. (2014), que obtiveram atividade máxima no pH 8,5 para *R. microsporus* var. *microsporus*. A fitase produzida pela bactéria *Bacillus laevolacticus* apresentou maior atividade fitásica no pH 7,0, mantendo cerca de 90% de sua atividade em pH 8,0, (GULATI et al., 2007). A maioria das fitases microbianas mostram atividade ótima em pH ácido (entre 4,5 e 5,5), incluindo-se as de origem fúngica (RAO et al., 2009).

Figura 26 - Determinação do pH ótimo aparente para a atividade fitásica extracelular presente no extrato bruto (A) e purificada (B) produzida por *R. microsporus* var. *microsporus*. Em (A), 100% corresponde a 1,71 U/mL; Em (B), 100% corresponde a 9,24 U/mL.

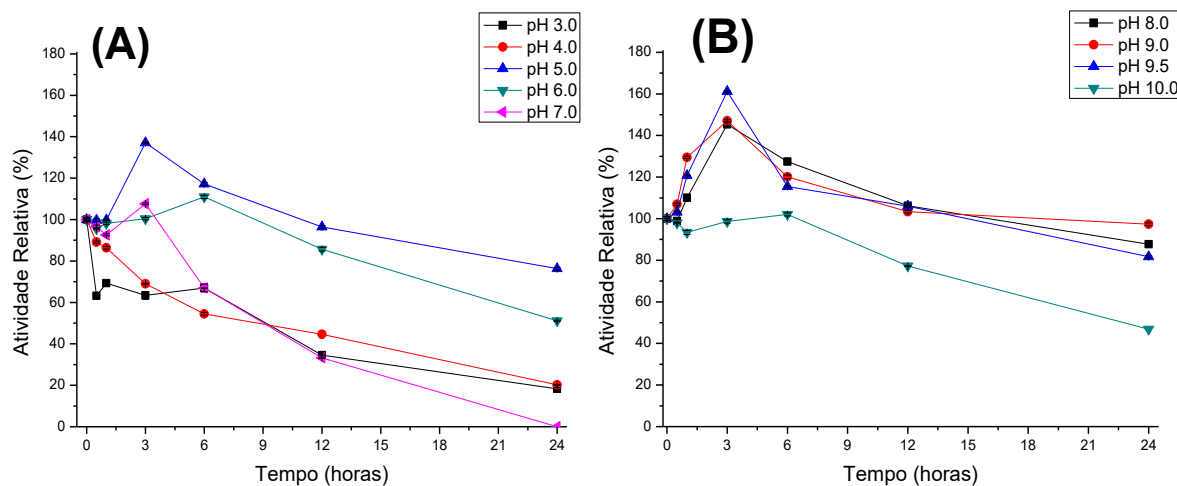


Fonte: Autor

Na Figura 27A pode-se observar que a fitase produzida por *R. microsporus* var. *microsporus* manteve sua atividade catalítica em pH ácidos acima de 60% por 6 horas. Em pH neutro, após 24 horas, a enzima foi inibida totalmente, porém nos pH alcalinos (Figura 27B), a atividade manteve-se acima de 80%, com exceção do pH 10, após 24 horas. Outra característica importante a se notar, é que, após um período de 1 a 2 horas, a enzima teve sua atividade aumentada em até 160% nos pH 8,0, 9,0 e 9,5, e, após 3 horas de exposição, teve sua atividade reduzida.

De modo geral, como citado em outros trabalhos, a fitase apresenta estabilidade em ampla faixa de pH, como a produzida por *A. niger*, que manteve sua atividade acima de 70% por 12 horas em pH variando de 3,5 a 9,0 (SONI; MAGDUM; KHIRE, 2010). A fitase produzida por *Monascus* sp. permaneceu com sua atividade acima de 80% com valores de pH variando de 5,5 a 7,0 por 12 horas (ALVES et al., 2016). Já a produzida por *R. oligosporus* perdeu 5% de sua atividade no pH 3,0, 20% em pH acima de 6,0; porém manteve 100% da sua atividade em pH 4,5 durante 10 dias (AZEKE; GREINER; JANY, 2011). Para uma futura aplicação, a enzima estudada torna-se interessante, uma vez que mantém sua atividade catalítica em uma maior faixa de pH, incluindo o alcalino.

Figura 27 - Estabilidade ao pH da fitase produzida por *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* purificada por diferentes períodos. 100% corresponde a 7,85 U/mL. Em (A) está representado a estabilidade aos pH ácidos e ao neutro; Em (B) está representada a estabilidade aos pH alcalinos.



Fonte: Autor

4.14 Efeito de diferentes sais e compostos na atividade fosfatásica alcalina

De maneira geral (Tabela 11), a atividade enzimática da fosfatase alcalina não foi significativamente alterada pela maioria dos diferentes sais usados na concentração de 1 mM. Contudo, o uso de alguns sais sulfatados e fluoretados, assim como o íon Cu^{+2} e Ag^{+2} reduziram a atividade da fosfatase. Além desses, o KH_2PO_4 foi o segundo maior redutor da atividade enzimática, ficando atrás apenas do NaF. A regulação da atividade da fosfatase por fontes de fósforo já foi estudada, onde o fosfato inorgânico é capaz de reprimir e/ou inibir esta enzima (SÁNCHEZ; DEMAIN, 2002). Alguns compostos, na concentração de 1 mM, que não haviam afetado significativamente a atividade fosfatásica, quando presentes na concentração de 5 mM proporcionaram a redução da atividade como, por exemplo o Fe_2SO_4 . Importante destacar que, na presença de ureia, β -mercaptoetanol e SDS, não houve redução acima de 40% da atividade catalítica, mesmo quando usados na concentração de 5 mM (Tabela 11).

Tabela 11 - Efeito de diferentes compostos na atividade fosfatásica extracelular alcalina de *R. microsporus* var. *microsporus*. 100% corresponde a 18,41 U/mL.

Compostos	Atividade relativa (%)	
	1 mM	5 mM
Controle*	100	100
AgNO ₃	61,85 ± 0,52	39,25 ± 0,00
BaCl ₂	99,25 ± 3,14	99,62 ± 0,52
CaCl ₂	84,81 ± 0,00	82,59 ± 0,52
CoCl ₂	88,51 ± 0,52	77,77 ± 0,00
CuCl ₂	63,70 ± 0,52	60,18 ± 1,04
CuSO ₄	63,70 ± 1,04	35,55 ± 0,00
EDTA	95,66 ± 1,57	80,02 ± 1,04
Fe ₂ SO ₄	96,66 ± 0,52	50,07 ± 0,52
FeCl ₃	112,22 ± 1,57	61,85 ± 0,52
Glicose	92,44 ± 0,52	90,02 ± 0,52
HgCl ₂	86,29 ± 0,52	75,55 ± 1,04
KCl	87,03 ± 0,52	89,25 ± 0,52
KH ₂ PO ₄	46,29 ± 0,52	21,85 ± 0,52
KI	87,40 ± 0,52	78,88 ± 0,52
MgCl ₂	86,66 ± 1,04	96,29 ± 0,00
MgSO ₄	60,04 ± 1,04	57,03 ± 1,04
MnCl ₂	77,40 ± 0,52	58,14 ± 0,52
MnSO ₄	87,03 ± 0,52	58,14 ± 0,52
NaBr	89,25 ± 0,52	83,33 ± 0,52
NaCl	89,62 ± 1,04	90,37 ± 1,04
NaF	21,48 ± 0,00	10,74 ± 0,52
NaNO ₃	84,07 ± 1,57	82,96 ± 2,09
NH ₄ Cl	88,51 ± 1,57	81,11 ± 0,52
NH ₄ F	44,81 ± 0,52	18,88 ± 0,52
NH ₄ NO ₃	91,48 ± 0,52	92,22 ± 0,52
SDS	86,00 ± 1,57	82,44 ± 0,52
Ureia	82,44 ± 1,04	64,88 ± 1,57
Zn(NO ₃) ₂	85,92 ± 0,00	84,81 ± 0,52
ZnSO ₄	88,51 ± 0,52	85,55 ± 0,52
β-mercaptoetanol	91,22 ± 1,57	90,02 ± 0,52

*Controle = Sem adição de compostos

Diferentes trabalhos apontam os íons Mg⁺² e Mn⁺² como ativadores de atividade fosfatásica (BUAINAIN et al., 1998; OH et al., 2004), diferentemente do observado para a fosfatase estudada. Por outro lado, os íons Zn⁺², Co⁺², Hg⁺², além dos compostos EDTA e β-mercaptoetanol, são citados como inibidores da atividade da fosfatase (BUAINAIN et al., 1998), novamente, contrapondo os resultados encontrados, os quais demonstram que a atividade catalítica manteve-se acima de

80% mesmo na concentração de 5 mM para esses compostos. O β -mercaptoetanol atua perturbando as pontes dissulfeto da enzima, o que pode causar a diminuição da atividade catalítica da enzima, porém a atividade residual permaneceu acima de 90%, indicando que tais interações não são essenciais para a atividade catalítica da fosfatase. O composto quelante EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) é capaz de formar complexos estáveis com vários íons metálicos e na maioria das enzimas afeta a atividade catalítica negativamente, porém não houve significativa redução na atividade enzimática, demonstrando que esta enzima não depende de um íon metálico divalente específico para sua atuação.

Na Tabela 12, observa-se a enzima foi capaz de suportar concentrações de 1% de diversos solventes mantendo sua atividade acima de 80%, porém quando dobrou a concentração, com exceção do Isopropanol, a atividade foi reduzida para cerca de 40%. Quanto aos surfactantes Triton X-100 e Tween 20, a enzima manteve sua atividade acima de 80% em ambas as concentrações. Chhokar et al. (2010) descreveram que solventes orgânicos podem aumentar a solubilidade de substratos não polares, aumentar a estabilidade térmica das enzimas, diminuir as reações secundárias dependentes da água ou eliminar a contaminação microbiana.

Tabela 12 - Efeito de diferentes solventes e surfactantes na atividade fosfatásica extracelular alcalina de *R. microsporus* var. *microsporus*. 100% corresponde a 18,41 U/mL.

Compostos	Atividade relativa (%)	
	1 % (v/v)	2% (v/v)
Controle*	100	100
Acetona	87,64 \pm 0,57	46,08 \pm 0,57
Acetonitrila	70,89 \pm 1,70	48,44 \pm 0,57
Etanol	82,04 \pm 1,70	45,26 \pm 0,57
Isopropanol	86,82 \pm 0,57	72,04 \pm 1,13
Metanol	86,44 \pm 1,13	43,69 \pm 0,57
n-Butanol	81,23 \pm 0,57	40,45 \pm 0,57
	0,01% (v/v)	0,02% (v/v)
Triton X-100	90,02 \pm 0,57	81,26 \pm 0,57
Tween 20	90,88 \pm 0,57	82,24 \pm 0,57

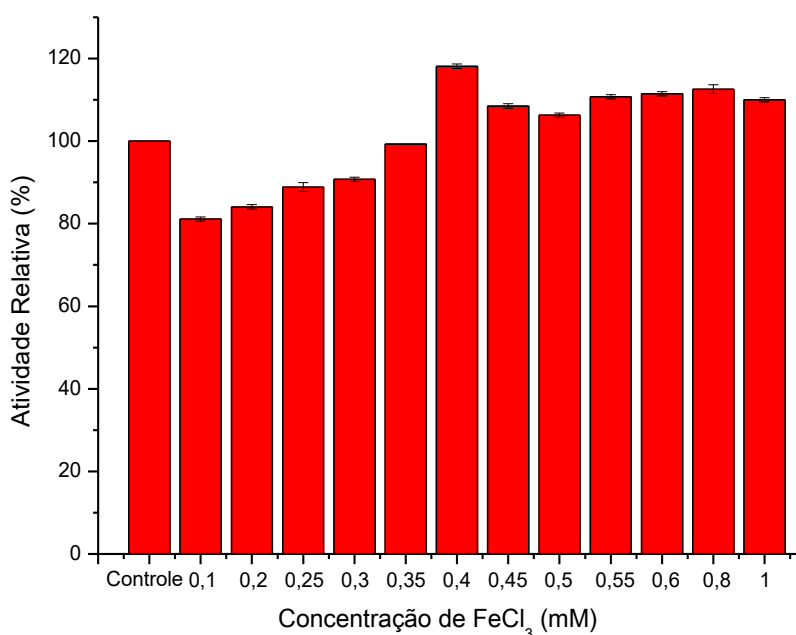
*Controle = Sem adição de compostos

O cloreto de ferro promoveu o aumento da atividade da enzima na concentração de 1 mM, tendo, posteriormente, reduzido a atividade da enzima quando usado na concentração de 5 mM. Com isso, variou-se a concentração deste

sal no meio reacional com o propósito de encontrar a concentração ideal para estimular a atividade catalítica da fosfatase.

Analisando a Figura 28, pode-se observar que, quando adicionado 0,4 mM de cloreto de ferro ao meio racional, a atividade foi 1,2 vezes maior que o meio sem adição deste composto. Em concentrações mais baixas (0,1 a 0,35 mM) de FeCl_3 , houve redução da atividade catalítica da enzima, possivelmente devido a disputa entre as moléculas de fosfatase alcalina pela ligação com o íon metálico, levando a uma hidrólise menos acentuada do substrato (JUMA; TABATABAI, 1977). Porém, quando a concentração de FeCl_3 é aumentada, existem íons suficientes para suprir a demanda das moléculas enzimáticas, possibilitando uma hidrólise do substrato de modo mais eficiente. Considerando a maior atividade enzimática obtida a partir do uso de 0,4 mM de FeCl_3 , esta concentração foi usada na determinação dos parâmetros cinéticos da fosfatase.

Figura 28 - Influência da concentração de cloreto de ferro (FeCl_3) na atividade fosfatásica alcalina produzida por *R. microsporus* var. *microsporus*. 100% corresponde a 18,41 U/mL.



Fonte: Autor

4.15 Efeito de diferentes sais e compostas na atividade fitásica alcalina

Analisando a Tabela 13, observa-se que na presença da maioria dos sais a atividade enzimática foi mantida acima de 70%. Porém, nenhum composto ativou a enzima. Os compostos SDS, β -mercaptoetanol, ureia, EDTA e o íons Zn^{+2} reduziram a atividade enzimática. De acordo com Kar, Banerjee e Bhattacharyya (2003) a ureia, em concentrações mais elevadas, provoca alteração conformacional na estrutura terciária das enzimas, promovendo a desnaturação. O SDS recobre a proteína, deixando-a com uma carga negativa, dificultando a interação com outras moléculas. O enxofre impede a formação de pontes de dissulfeto na proteína (MULLANEY; ULLAH, 2003).

Um resultado também importante a se observar, é o meio reacional adicionado de fosfato de potássio, demonstrando que esse composto, que pode ser o produto da ação fitásica sobre seu substrato específico, age como inibidor da atividade enzimática. Neste caso, houve redução de 98% na presença de 1mM de KH_2PO_4 e inibição total quando acrescentado 5 mM. O $HgCl_2$ reduziu a atividade em 55% e 85% na concentração de 1 e 5 mM, respectivamente.

Tabela 13 - Efeito de diferentes compostos na atividade fitásica extracelular alcalina de *R. microsporus* var. *microsporus*. 100% corresponde a 8,15 U/mL.

Compostos	Atividade relativa (%)	
	1 mM	5mM
Controle*	100	100
AgNO ₃	94,58 ± 1,68	93,29 ± 1,08
BaCl ₂	97,68 ± 3,38	96,44 ± 1,68
CaCl ₂	98,89 ± 1,68	94,54 ± 1,08
CoCl ₂	97,36 ± 1,08	47,25 ± 1,08
CuCl ₂	87,15 ± 3,38	74,16 ± 3,38
CuSO ₄	89,54 ± 1,68	83,11 ± 3,38
EDTA	37,71 ± 1,08	33,67 ± 1,68
FeCl ₃	89,89 ± 1,08	89,81 ± 1,68
Glicose	75,64 ± 1,68	74,21 ± 3,38
FeSO ₄	99,18 ± 0,45	98,85 ± 1,08
HgCl ₂	45,24 ± 1,08	14,77 ± 1,08
KCl	61,24 ± 3,38	48,67 ± 1,68
KH ₂ PO ₄	2,15 ± 1,08	0,00
KI	79,85 ± 0,45	75,63 ± 1,08
MgCl ₂	92,74 ± 1,68	98,45 ± 1,08
MgSO ₄	95,65 ± 1,68	96,41 ± 2,76
MnCl ₂	89,63 ± 0,45	89,57 ± 1,08
MnSO ₄	89,95 ± 1,08	87,68 ± 1,68
NaBr	97,65 ± 1,68	96,12 ± 1,68
NaCl	99,58 ± 0,45	98,96 ± 1,08
NaF	97,41 ± 2,03	94,48 ± 1,08
NaNO ₃	68,54 ± 3,38	61,28 ± 2,76
NH ₄ Cl	87,61 ± 1,68	83,64 ± 1,08
NH ₄ F	78,65 ± 1,68	78,25 ± 1,08
NH ₄ NO ₃	74,1 ± 1,68	67,23 ± 1,68
SDS	41,41 ± 1,68	33,67 ± 2,03
Ureia	48,68 ± 1,08	37,94 ± 2,03
Zn(NO ₃) ₂	68,54 ± 1,08	48,99 ± 1,08
ZnSO ₄	61,75 ± 1,08	9,48 ± 1,08
β-mercaptoetanol	37,04 ± 1,68	35,02 ± 1,08

*Controle = Sem adição de compostos

Segundo a literatura, a fitase produzida por *Saccharomyces castellii* foi inibida pelos íons Ca⁺², Mg⁺², Mn⁺², Fe⁺², Zn⁺² e Cu⁺² na concentração de 5 mM (SHRADDHA et al., 2011). A fitase produzida por *Selenomonas ruminantium* também foi fortemente inibida pelos íons Zn⁺², Cu⁺², Fe⁺², Fe⁺³ e Hg⁺² (YANKE; SELINGER; CHENG, 1999), contrapondo os resultados encontrados para a fitase

alcalina de *R. microsporus* var. *microsporus* (Tabela 13), que teve sua atividade reduzida em até 15% pelos mesmos íons.

Semelhante aos resultados observados, a fitase produzida por *Bacillus* sp. foi inibida por EDTA (KIM et al., 1998), assim como a produzida por *Bacillus subtilis* (SHRADDHA et al., 2011). Isso ocorre devido ao EDTA retirar o metal nessas proteínas, mudando suas conformações, podendo ter suas atividades catalíticas restauradas quando incubadas na presença de íons metálicos bivalentes (KEROVUO et al., 1998).

Quanto aos solventes (Tabela 14), a fitase teve sua atividade reduzida pelo metanol, mantendo-se acima de 75% em outros solventes, e quando dobrada a concentração, a acetona, acetonitrila e o metanol reduziram em mais de 60% da atividade fitásica. Quanto aos surfactantes, Triton X-100 e Tween 20, a enzima teve sua atividade fortemente reduzida em ambos, sendo inibida totalmente na concentração de 0,02% de Triton X-100. Os surfactantes proporcionaram queda na atividade enzimática possivelmente pela influencia desses nas ligações hidrofóbicas da fitase (SILVA et al., 2011).

Tabela 14 - Efeito de diferentes solventes e surfactantes na atividade fitásica extracelular alcalina de *R. microsporus* var. *microsporus*. 100% corresponde a 8,15 U/mL.

Compostos	Atividade relativa (%)	
	1 % (v/v)	2% (v/v)
Controle*	100	100
Acetona	75,76 ± 0,48	47,14 ± 0,24
Acetonitrila	85,19 ± 0,71	67,68 ± 0,71
Etanol	84,51 ± 0,71	90,24 ± 3,33
Isopropanol	95,96 ± 0,95	88,89 ± 1,19
Metanol	51,52 ± 0,71	26,26 ± 0,24
n-Butanol	87,21 ± 1,19	84,51 ± 3,10
	0,01%(v/v)	0,02%(v/v)
Triton X-100	3,37 ± 0,24	0,00
Tween 20	24,58 ± 0,95	22,56 ± 0,24

*Controle = Sem adição de compostos

4.16 Hidrólise de diferentes substratos pela fosfatase alcalina

Diferentes substratos foram submetidos à ação catalítica da fosfatase alcalina purificada a fim de observar a hidrólise destes compostos pela enzima. Pelos valores encontrados na Tabela 15, verifica-se que o *p*-nitrofenilfosfato é o substrato que a fosfatase alcalina melhor hidrolisou, seguido pelo ATP. Os substratos D-glicose-6-fosfato, D-frutose-6-fosfato e β -glicerofosfato foram menos hidrolisados (32-37% se comparados ao *p*-NFF), diferindo do observado para a enzima intracelular produzida por *Bacillus* sp., que atuou eficientemente sobre D-glicose-6-fosfato, D-frutose-6-fosfato (MORNET, 2001; OH et al., 2004). Adicionalmente, é possível perceber também que a D-glicose-1-fosfato foi mais hidrolisada pela fosfatase alcalina do que a D-glicose-6-fosfato e a D-frutose-6-fosfato, indicando uma preferência pela remoção de fosfatos ligados na posição 1.

Tabela 15 - Hidrólise de diferentes substratos pela fosfatase alcalina purificada produzida por *R. microsporus* var. *microsporus*. 100% corresponde a 6,12 U/mL.

Substratos (2,7 mM final)	Atividade Relativa (%)
β -Glicerofosfato	32,8 \pm 0,42
ATP	91,4 \pm 0,71
Ácido Fítico	11,5 \pm 1,33
D-Frutose-6-fosfato	35,4 \pm 1,08
D-Glicose-1-fosfato	67,9 \pm 0,81
D-Glicose-6-fosfato	36,8 \pm 0,45
<i>p</i> -nitrofenil fosfato	100

Resultados encontrados foram semelhantes para a fosfatase ácida de *A. caespitosus* (GUIMARÃES et al., 2004). A fosfatase alcalina pouco hidrolisa o ácido fítico, diferentemente da fosfatase ácida, que é utilizada em rações, substituindo a fitase e disponibilizando mais fósforo para a nutrição de animais (REZÁCOVÁ et al., 2008). A fosfatase alcalina produzida por *R. microsporus* var. *microsporus* atuou em moléculas biológicas como, principalmente, o ATP, presente nos seres vivos como forma armazenamento de energia (NELSON; COX, 2013), sendo a hidrólise deste substrato quase tão efetiva quanto do *p*-nitrofenilfosfato.

4.17 Parâmetros Cinéticos

4.17.1 Fosfatase alcalina

Com auxílio do programa SigrafW[®], determinaram-se os parâmetros cinéticos da fosfatase purificada, na ausência e na presença de FeCl₃ (0,4 mM) no meio reacional.

Tabela 16 - Parâmetros cinéticos para a fosfatase alcalina extracelular produzida por *R. microsporus* var. *microsporus* frente ao substrato p-NFF na ausência e na presença de FeCl₃.

FeCl ₃	K_m (mM)	$V_{máx}$ (U/mg de prot.)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ /mM)
ausente	0,449	3,948	8,077	17,990
0,4 mM	0,382	5,124	10,483	27,444

Como apresentado na Tabela 16, o maior valor de K_m foi observado na ausência de cloreto de ferro (0,449 mM) e o $V_{máx}$ foi maior na presença deste sal (5,124 U/mg de prot.), o que evidencia que na presença de FeCl₃, a enzima atua mais eficientemente sobre o substrato, apresentando maior afinidade. Tais afirmações também são confirmadas pelo k_{cat} , que é maior na presença do cloreto de ferro. Uma melhor conformação da enzima e dos seus sítios ativos proporcionado pela adição do cloreto de ferro pode aumentar a afinidade da enzima com o substrato (HOLLANDER, 1971; COLEMAN, 1992; HOFMEYR; CORNISH-BOWDEN, 1997). Os valores encontrados da relação k_{cat}/K_m mostra a diferença na eficiência catalítica com a adição ou não de cloreto de ferro, onde a enzima apresenta um valor 1,52 vezes maior na presença do Fe⁺². A fosfatase alcalina produzida por *Thermus* sp. NTU-237 apresentou K_m de 0,081 mM, k_{cat} de 6,08 s⁻¹ e $V_{máx}$ de 6,76 U/mg de proteína (NGUYEN, H. C. et al., 2017).

Os parâmetros cinéticos encontrados neste estudo reforçam que a fosfatase atua em condições específicas, dependendo do meio reacional e do tipo de substrato utilizado, assim como os íons presentes, podendo modificar sua atividade (GONÇALVES et al., 2002; SIMÃO et al., 2007).

4.17.2 Fitase alcalina

Observou-se que a fitase produzida por *R. microsporus var. microsporus* foi capaz de hidrolisar o substrato fitato de sódio com K_m de 0,413 e $V_{m\acute{a}x}$ de 2,458 U/mg de proteína. Na literatura, são citados valores de K_m variando de 0,027 a 813 mM (CASEY; WALSH, 2004). O valor de K_m obtido para a fitase produzida por *Bacillus subtilis* 168 foi 2,19 mM (CHEN et al., 2015) enquanto que para a fitase extracelular de *R. oligosporus* CT11K2 foi de 0,15 mM (SUTARDI; BUCKLE, 1988). Foi determinado para a fitase ácida produzida por *R. microsporus var. microsporus* o $K_m = 0,72$ mM (SATO et al., 2015), demonstrando que a fitase alcalina produzida por este fungo tem maior afinidade pelo substrato. As fitases apresentam ampla especificidade de substratos, geralmente, com maior afinidade pelo ácido fítico, porém as características moleculares desta enzima podem mudar de acordo com o organismo que a produz (VATS; BANERJEE, 2004)

Os valores de k_{cat} e k_{cat}/K_m ($2,27\text{ s}^{-1}$ e $5,50\text{ s}^{-1}/\text{mM}$, respectivamente) são inferiores aos encontrados na literatura para as fitases ácidas (CASEY; WALSH, 2004; CHEN et al., 2015; RANJAN; SATYANARAYANA, 2016). Porém este é o primeiro estudo com relação aos parâmetros cinéticos de uma fitase alcalina de origem fúngica.

5 CONCLUSÕES

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

NIU, C.; LUO, H.; SHI, P.; HUANG, H.; WANG, Y.; YANG, P.; YAO, B. N - glycosylation improves the pepsin resistance of HAP phytases by enhancing their stability at acidic pH and reducing the pepsin accessibility to cleavage sites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 4, p. 1004-1014, 2016.

NOROUZIAN, D.; AKBARZADEH, A.; SCHARER, J. M.; YOUNG, M. M. Fungal glucoamylases. **Biotechnology Advance**, v. 24, n. 1, p. 80-85, 2006.

OH, B. C.; CHOI, W. C.; PARK, S.; KIM, Y. O.; OH, T. K. Biochemical properties and substrate specificities of alkaline and histidine acid phytases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n. 4, p. 362-372, 2004.

OKAMURA-MATSUI, T.; TOMODA, T.; FUKUDA, S.; OHSUGI, M. Discovery of alcohol dehydrogenase from mushrooms and application to alcoholic beverages. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 23, n. 2/6, p. 133-144, 2003.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios: Revista Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, p. 97-109, 2012.

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

PARK, I.; LEE, J.; CHO, J. Degradation of phytate pentamagnesium salt by *Bacillus* sp. T4 phytase as a potential eco-friendly feed additive. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 25, n. 10, p. 1466-1472, 2012.

PASAMONTES, L.; HAIKER, M.; WYSS, M.; TESSIER, M.; VAN LOON, A. P. Gene cloning, purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 5, p. 1696-1700, 1997.

RANJAN, B.; SATYANARAYANA, T. Recombinant HAP phytase of the thermophilic mold *Sporotrichum thermophile*: expression of the codon-optimized phytase gene in *Pichia pastoris* and applications. **Molecular Biotechnology**, v. 58, n. 2, p. 137-147, 2016.

RAVINDRAN, V.; SELLE, P. H.; RAVINDRAN, G.; MOREL, P. C. H.; KIES, A. K.; BRYDEN, W. L. Microbial phytase improves performance, apparent metabolizable energy, and ileal amino acid digestibility of broilers fed a lysine-deficient diet. **Poultry Science**, v. 80, n. 3, p. 338-344, 2001.

REZÁCOVÁ, P.; BOREK, D.; MOY, S. F.; JOACHIMIÁK, A.; OTWINOWSKI, Z. Crystal structure and putative function of small toprim domain-containing protein from *Bacillus stearothermophilus*. **Proteins**, v. 70, n. 2, p. 311-319, 2008.

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

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

SATO, V. S. **Produção de fitase por *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*: purificação, caracterização bioquímica e aplicação**. 2015. 122 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015

SATO, V. S.; JORGE, J. A.; GUIMARÃES, L. H. S. Characterization of a thermotolerant produced by *Rhizopus microsporus* var. *microsporus* biofilm on an inert support using sugarcane bagasse as carbon source. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.179, n. 4, p. 610-624, 2016.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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