



NATÁLIE MARTINS ALVES

**PRODUÇÃO DE FITASE POR FUNGO
ENDOFÍTICO**

**LAVRAS-MG
2014**

NATÁLIE MARTINS ALVES

PRODUÇÃO DE FITASE POR FUNGO ENDOFÍTICO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Patrícia Gomes Cardoso

**LAVRAS-MG
2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e Serviços
da Biblioteca Universitária da UFLA**

Alves, Natálie Martins.

Produção de fitase por fungo endofítico / Natálie Martins Alves.
– Lavras: UFLA, 2014.

59 p.: il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Patrícia Gomes Cardoso.

Bibliografia.

1. Bioprospecção. 2. *Muscodor* sp. 3. Purificação da Enzima. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 547.758

NATÁLIE MARTINS ALVES

PRODUÇÃO DE FITASE POR FUNGO ENDOFÍTICO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, área de concentração Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 21 de fevereiro de 2014.

Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

UFLA

Dr. Luis Henrique Souza Guimarães

FFCLRP/USP

Dra. Patrícia Gomes Cardoso

Orientadora

**LAVRAS – MG
2014**

*Aos meus pais pelo amor e doação sem medidas e por fazer de mim o que sou
hoje*

DEDICO e OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora pela força, fé e vitória conquistadas.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial ao Departamento de Biologia – Setor de Microbiologia Agrícola, pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

À Professora Dra. Patrícia Gomes Cardoso, pelo incentivo, orientação segura, ensinamentos, amizade, confiança e oportunidade de realização deste trabalho.

Aos Professores Drs. Roberta Hilsdorf Piccoli, Luís Henrique Souza Guimarães e José Guilherme Lembi Ferreira Alves pelas sugestões, colaboração e participação na banca examinadora.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP, em especial ao Dr. Luis Henrique Souza Guimarães, Vanessa Sato, Larissa, Thaís, Cynthia, Zé, Maurício, Paulo. Gostaria de agradecer imensamente a supervisão, oportunidade, apoio e ajuda.

Às meninas da República Tcheca em Ribeirão Preto (Glauce, Van e Mayra), muito obrigada por abrir as portas para mim com tanto carinho e obrigada sempre pela amizade conquistada.

Aos professores do Departamento de Biologia – Setor de Microbiologia Agrícola, pelos ensinamentos adquiridos durante o curso.

Aos colegas do Departamento de Biologia – Setor de Microbiologia Agrícola, em especial à minha turma de Mestrado, pela amizade e companheirismo.

Aos amigos que fiz durante toda essa trajetória, Aline, Carol (Bu), Sirlei, Ju, Kaly, a todos os amigos do Laboratório BIOGEN, em especial Dany, Pati, Nati, Mônica e Mateus pela amizade, carinho, ajuda, convivência e boas risadas.

Às minhas queridas e grandes amigas, Dri, Luaninha, Aracelli, Natalinha, Aninha, Danizinha, Luany, Ariane, Carol (Rocha, Naves e Teixeira), Milena, Tayana, Camila, Erika, Mari, Lívia, Dani, Cris, Marilídia e a todos os amigos que não citei, mas que têm a mesma importância, pela amizade, cumplicidade, companheirismo, apoio e torcida.

Às minhas amigas e companheiras de casa, Tchuca, Tó e Pauly e às meninas da República Dedo di Moça pela amizade e convivência de sempre.

A todos os meus familiares, em especial, Paizinho, Mãezinha e Pri pela compreensão, amor, dedicação, doação e carinho em todos os momentos de minha vida, e que me ensinaram a amar o próximo, valorizar cada momento da vida e as grandes amizades conquistadas.

E a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a elaboração e realização deste trabalho/sonho.

Muito obrigada!

“... se quiser alguma coisa na vida, vá até lá e pegue...”

Christopher McCandless

RESUMO

Na maioria das matérias-primas de origem vegetal utilizadas na alimentação animal, parte do fósforo mineral está armazenada na forma de ácido fítico ou fitato. O fitato é a principal forma de estocagem de fósforo dos vegetais, porém não é prontamente assimilado na alimentação em baixas concentrações da enzima fitase. Além de tornar o fósforo indisponível, o fitato liga-se a cátions bivalentes, como o cálcio, cobre, magnésio, ferro, manganês e zinco impedindo a absorção desses nutrientes no intestino do animal. A enzima promove hidrólise da molécula do fitato liberando fósforo, aumentando, assim, sua biodisponibilidade para alimentação animal. Fitase está distribuída nos tecidos animais e vegetais, além de ser sintetizada por algumas espécies de fungos e bactérias. A adição desta enzima na dieta de animais é essencial para promover uma maior absorção de fósforo e também contribuir para a diminuição nos níveis de fósforo excretado pelos animais, diminuindo, assim, a poluição provocada pelo excesso de fósforo no meio ambiente. Este trabalho teve como objetivo selecionar dentre 100 fungos isolados de cavernas brasileiras pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium* e 13 fungos endofíticos isolados da parte aérea do café, uma espécie que se destaque na produção da enzima fitase, avaliar fatores que podem influenciar na produção desta enzima e caracterizá-la parcialmente. Para a seleção, os fungos foram cultivados em meio contendo ácido fítico como única fonte de fósforo. Após sete dias a 25°C em meio contendo ácido fítico como única fonte de fósforo, foi avaliado o crescimento e produção da enzima pela presença de halo de degradação (IE) do ácido fítico ao redor das colônias. Quarenta e sete fungos produziram fitase e os fungos *Penicillium minioluteum* (CF279) e *Muscodor* sp. (UBSX) apresentaram maiores halos de degradação, 2,41 e 4,46, respectivamente. A otimização das condições de cultivo de *Muscodor* sp. foram: pH 5,0, agitação de 125 rpm e temperatura de 30°C. A produção máxima de fitase deu-se no período de 144h (26,51 U/mg). Esses resultados permitiram um rendimento de 7,5% na produtividade da enzima (purificação parcial). Este é o primeiro trabalho que relata a produção da enzima fitase por um fungo endofítico, *Muscodor* sp.

Palavras-chave: Bioprospecção. Fitase. Fungo endofítico. Purificação da enzima.

ABSTRACT

In most of the raw materials of plant origin used in animal feed, part of the mineral phosphorus is stored as phytic acid or phytate. Phytate is the main storage form of phosphorus in vegetables but is not readily assimilated into food at low concentrations of the enzyme phytase. Besides making the phosphorous unavailable phytate binds divalent cations such as calcium, copper, magnesium, iron, manganese and zinc preventing the absorption of these nutrients in the gut of the animal. The enzyme promotes the hydrolysis of the phytate phosphorus releasing molecule, thereby increasing its bioavailability in feed. Phytase is distributed in plant and animal tissues, and is synthesized by some species of bacteria and fungi. The addition of this enzyme in the diet of animals is essential to promote greater uptake of phosphorus and also contribute to a decrease in the levels of phosphorus excreted by animals, thus reducing the pollution caused by excess phosphorus in the environment. This work aimed to select a fungus that stands out in the production of phytase among 100 isolates from Brazilian caves belonging to the genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Cladosporium* and 13 endophytic fungi of the aerial part of the coffee plant and to assess factors that may influence the production of this enzyme and partially characterize it. For selection, the fungi were cultured in medium containing phytic acid as a sole source of phosphorus. After seven days at 25°C in medium containing phytic acid as a sole source of phosphorus we evaluated the growth and enzyme production by the presence of the phytic acid halo degradation (Enzymatic Index - EI) surrounding the colonies. 47 produced phytase and fungus *Penicillium minioluteum* (CF279) and *Muscodor* sp. (UBSX) showed higher degradation halos, 2.41 and 4.46, respectively. The optimization of growth conditions *Muscodor* sp. were: pH 5.0, agitation 125 rpm and 30°C. And the maximum production of phytase occurred in the period of 144h (26.51 U/mg). These results allowed a yield of 7.5 % in productivity of the enzyme (partial purification). This is the first study that reports the production of phytase by an endophytic fungus, *Muscodor* sp.

Keywords: Bioprospecting. Phytase. Endophytic fungus. Purification of the enzyme.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1	Ácido Fítico.....	13
2.2	Enzima: Fitase (EC 3.1.3.8 e EC 3.1.3.26)	16
2.3	Produção de fitase por microrganismos	19
2.4	Aplicações da fitase	22
2.5	Características físico-químicas das fitases.....	26
	REFERÊNCIAS	28
	SEGUNDA PARTE – ARTIGO.....	35
	ARTIGO 1 Production and partial purification of phytase by endophytic fungus	36
1	INTRODUCTION.....	37
2	MATERIALS AND METHODS.....	39
3	RESULTS AND DISCUSSION	43
4	CONCLUSIONS	55
	REFERENCES.....	56

1 INTRODUÇÃO

Fitases (myo-inositol hexaphosphate phosphohydrolase; EC 3.1.3.8 e EC 3.1.3.26) são enzimas pertencentes à classe das fosfatases que hidrolisam ácido fítico a fosfatos de mio-inositol e fosfatos inorgânicos, através de uma série de intermediários de mio-inositol fosfato, eliminando, assim, características antinutricionais do ácido fítico. Podem ser produzidas por microrganismos, plantas e alguns animais. As fitases têm aplicações potenciais em indústrias de alimentos e ração e também reduzem os efeitos antinutricionais do ácido fítico. Nos últimos anos, as fitases têm atraído considerável atenção dos cientistas e empreendedores nas áreas de nutrição, proteção do meio ambiente e biotecnologia. A venda anual de fitase nos EUA é estimada em US\$ 150 milhões que é um terço de todo o mercado de enzima.

O ácido fítico ou fitato (myo-inositol hexakisphosphate) é a principal fonte de fósforo na alimentação dos animais, porém não é prontamente assimilado por estes. Além de tornar o fósforo indisponível, o fitato liga-se aos cátions bivalentes (Ca^+ , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} e Zn^{2+}), impedindo a absorção desses nutrientes no intestino dos animais.

Apesar de estudos terem sido realizados visando à produção e caracterização das fitases de alguns microrganismos, informações a respeito da sua regulação, capacidade catalítica, especificidade, otimização da sua produção e purificação ainda precisam ser esclarecidas a fim de reduzir custos e viabilizar o uso desta enzima em escala industrial. Fitases podem ser produzidas por muitas espécies de bactérias, fungos e leveduras ou, ainda, por plantas e alguns animais e é capaz de eliminar as propriedades antinutricionais do fitato. Estas são produzidas em escala comercial utilizando-se um número limitado de organismos. Muitos experimentos já foram conduzidos durante os últimos anos para demonstrar os efeitos da fitase microbiana na utilização de fósforo por

frangos. Com isso, a utilização de fungos filamentosos na produção de fitases aplicadas em diversos processos biotecnológicos vem crescendo cada vez mais.

Assim, o trabalho proposto teve como objetivo selecionar um fungo que se destacasse na produção de fitase, avaliar fatores que influenciam na produção desta enzima e caracterizá-la parcialmente. Sendo o isolado melhor produtor, pertencente à classe dos fungos endofíticos, o trabalho é considerado pioneiro no relato de produção de fitase por esses fungos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Ácido Fítico

O ácido fítico (myo-inositol hexakisphosphate), também chamado de fitato (Figura 1), é um composto orgânico de ocorrência natural que pode ser encontrado em muitos grãos de cereais, sementes oleaginosas, legumes e plantas, possuindo 60-90% de fósforo total desses vegetais, sendo, assim, sua maior fonte de armazenamento (Tabela 1) (ZUO et al., 2010). O fitato pode ser classificado também como mio-inositol 1, 2, 3, 4, 5, 6-di-hidrogenofosfato de hexaquis (IUPAC-IUB). Este é constituído por seis grupamentos fosfato ligados a uma molécula de seis átomos de carbonos, cuja massa molecular é de 660 kDa (SEBASTIAN; TOUCHBURN; CHAVES, 1998).

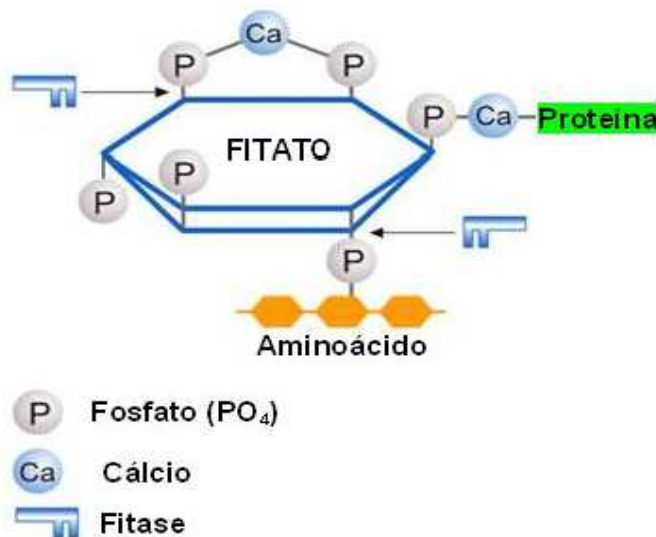


Figura 1 Estrutura do ácido fítico. Representação do complexo formado com proteína, aminoácido e cálcio.

Tabela 1 Porcentagem de ácido fítico presente em sementes, grãos, legumes e frutas

Sementes / Grãos / Legumes / Frutas	% ácido fítico (p/p)
Gergelim	4,71
Abóbora	4,08
Canola	2,50
Tomate	1,66
Soja	1,55
Feijão	1,41
Cevada	1,02
Trigo	1,02
Avelã	1,02

Devido à presença dos grupamentos fosfato, o fitato apresenta a capacidade de se complexar com proteínas e cátions bivalentes. A interação entre ácido fítico, minerais e proteínas parece ser a causa primária dos efeitos antinutricionais da dieta rica em fitato. O ácido fítico possui a capacidade de se ligar a proteínas, tanto em pH ácido quanto alcalino e neutro, promovendo o decréscimo da solubilidade destas e eventualmente a redução de sua utilização (CHERYAN, 1980). Ocorre acúmulo do fitato em sementes e grãos durante o amadurecimento, juntamente com substâncias de armazenamento tais como amido e lipídeos. Em alguns cereais e leguminosas o ácido fítico se acumula nas partículas de aleurona e cristais de formato globoso, respectivamente (REDDY; SATHE; SALUNKHE, 1982; TYAGI; TYAGI; VERMA, 1998). Essa forma de fósforo não é assimilada por animais monogástricos, devido à baixa concentração ou ausência da enzima fitase no trato gastrointestinal. Por passar intacto pelo aparelho digestivo desses animais há a necessidade de suplementação de fósforo na ração. O alto conteúdo de ácido fítico nas fezes causa eutrofização do ambiente, devido à alta liberação de fósforo orgânico no solo ou água seguida pela degradação por microrganismos que ali estão presentes (GARGOVA; ROSHKOVA; VANCHEVA, 1997).

O farelo de trigo é um dos compostos vegetais mais ricos em ácido fítico e foi o substrato utilizado no presente trabalho.

O trigo é uma gramínea de inverno do gênero *Triticum* sp. e o principal cereal produzido no mundo. Seu beneficiamento gera valiosos subprodutos como o farelo de trigo. Aproximadamente seis milhões de toneladas de trigo são produzidas anualmente no Brasil (ABITRIGO, 2014). Em 2010, a produção mundial de trigo foi de 676 milhões de toneladas e o consumo de 642 milhões de toneladas de trigo (ABIMA, 2014).

Na obtenção da farinha de trigo, aproximadamente 28% do grão não é aproveitado, originando o subproduto farelo de trigo. Este farelo é basicamente composto pelo tegumento que envolve o grão, representa a parte externa do trigo correspondente ao pericarpo ou camada de aleurona, possuindo, ainda, resíduos do endosperma farináceo (Figura 2). Esse subproduto é composto por farelo fino, farelo grosso, remoído claro e remoído escuro, sendo facilmente separados nas diferentes etapas de processamento do grão. No entanto, ao término do beneficiamento todos os compostos farão parte da composição do farelo de trigo (Tabela 2) (SALMON, 2011).

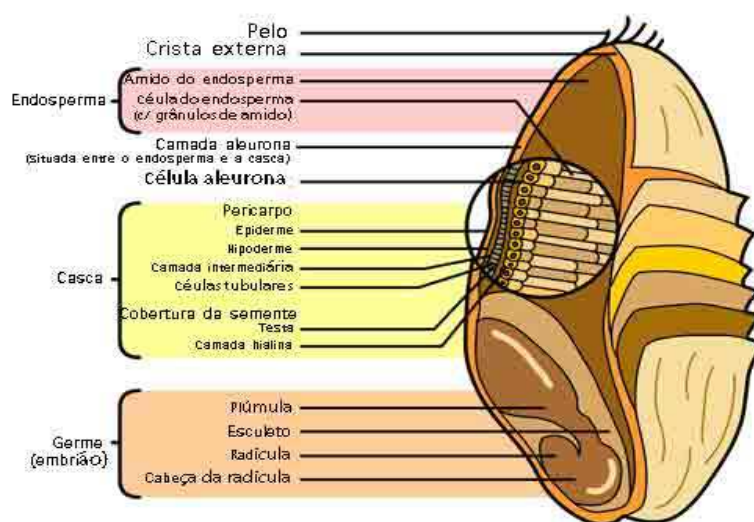


Figura 2 Esquemática do grão de trigo

Tabela 2 Composição do farelo de trigo

Composição do farelo de trigo (Unidade valor por 100 g)	
Calorias	216,00
Proteínas (g)	15,55
Lipídeos Totais (g)	4,25
Carboidratos (g)	64,51
Fibras Totais (g)	42,80
Cálcio (mg)	73,00
Ferro (mg)	10,57
Magnésio (mg)	611,00
Fósforo (mg)	1013,00
Potássio (mg)	1182,00
Sódio (mg)	2,00
Zinco (mg)	7,27
Cobre (mg)	1,00
Manganês (mg)	11,50
Selênio (mg)	77,60
Vitamina C (mg)	0,00
Tiamina (mg)	0,52
Riboflavina (mg)	0,58
Niacina (mg)	13,58
Vitamina B6 (mg)	1,30
Folato Totais (mcg)	79,00
Vitamina B12 (mcg)	0,00
Vitamina A (IU)	9,00
Retinol (mcg)	0,00
Vitamina E (mg)	1,49
Vitamina K (mg)	1,90
Ácidos graxos, totais saturados (g)	0,63
Ácidos graxos, totais mono-insaturados (g)	0,64
Ácidos graxos, totais poli-insaturados (g)	2,21
Colesterol (mg)	0,00

Fonte: Nutrient Database for Standart USDA (2008)

2.2 Enzima: Fitase (EC 3.1.3.8 e EC 3.1.3.26)

Fitases pertencem à classe das fosfatases e são enzimas que hidrolisam ácido fítico a fosfatos de mio-inositol e fosfatos inorgânicos, através de uma série de intermediários de mio-inositol fosfato, eliminando, assim, as características antinutricionais destes (Figura 3) (KAUR; KUNZE; SATYNARAYANA, 2007). Podem ser produzidas por microrganismos, plantas

e alguns animais. Bactérias, leveduras e fungos filamentosos têm sido relatados como produtores de fitases extra e intracelulares, bem como na forma ligada à célula (FU et al., 2008; RAO et al., 2009).

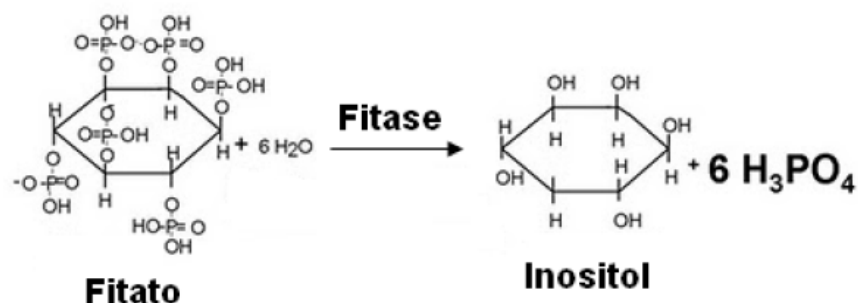


Figura 3 Reação de hidrólise do fitato pela fitase.

Fonte: Enviropig™, 2011 modificado

Existem dois tipos de fitases classificadas pela Comissão de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB), com a Comissão IUPAC-IUBMB e pela Nomenclatura Bioquímica (JCBN). Seria a 3-fitase (EC 3.1.3.8) que hidrolisa primeiro a ligação do éster na posição 3 do mio-inositol hexakisphosphate e é principalmente relatada em microrganismos e a 6-fitase (EC 3.1.3.26), que primeiro hidrolisa a ligação éster na posição 6 do mio-inositol hexakisphosphate e é relatada principalmente em plantas. Esta também tem sido encontrada em alguns fungos basidiomicetos (LASSEN et al., 2001). Fitases também têm sido classificadas como HAP (histidina fosfatase ácida), BPP (β-hélice fitase), CP (fosfatase cisteína) e PAP (fosfatase ácida púrpura) com base nas suas propriedades catalíticas (MULLANEY; ULLAH, 2003).

A recuperação de enzimas de origem microbiana, vegetal ou animal é uma etapa complexa do processo, pois técnicas de purificação dependem das características moleculares de cada enzima. Durante o processo deve-se

preocupar com a estabilidade da enzima, a eficiência da purificação, rendimento, grau de pureza. Porém, existem enzimas industriais cuja aplicação não requer elevado grau de pureza, de modo que operações cromatográficas não são necessárias, onde a simples concentração do meio é suficiente para a comercialização do produto (MARSHAK et al., 1996).

Fitases têm sido purificadas utilizando métodos como cromatografias de troca iônica seguidas por cromatofocalização (SPIER et al., 2011). Também, a partir de precipitação com sulfato de amônio, cromatografia por exclusão molecular e cromatografia por filtração em gel (GREINER; SILVA; COURI, 2009). A diálise é uma técnica amplamente empregada durante os processos de separação e purificação, pois permite a troca de tampões na amostra, a dessalinização do meio contendo a amostra, sendo o procedimento utilizado entre etapas cromatográficas. Consiste em um processo que separa moléculas de acordo com o seu tamanho molecular, através do uso de membranas contendo poros de dimensões inferiores aos tamanhos das macromoléculas de interesse. Esses poros permitem que moléculas pequenas, tais como sais e solvente, difundam através da membrana, mas impedem a passagem de moléculas maiores. O material mais comumente usado em diálise é a celulose (SALMON, 2011).

Extração líquido-líquido ou sistemas bifásicos são definidos genericamente como sistemas de duas fases líquidas imiscíveis em que o solvente principal é a água (ZASLAVSKY, 1995). Em geral, apresentam grande quantidade de água em ambas as fases, fazendo com que sejam meios muito pouco agressivos a moléculas como enzimas, por exemplo. Podem ser formados por dois polímeros hidrófilos ou um determinado polímero com determinados sais. Acima da concentração crítica destes componentes ocorre espontaneamente a separação das fases, predominando um ou outro componente de cada uma das fases resultantes (TUBIO ; NERLI; PICÓ, 2004). Os sistemas bifásicos aquosos

possuem um grande potencial para a purificação de proteínas, pois possuem uma separação seletiva, baixa tensão superficial, e um processo de baixo custo, altos rendimentos e minimização da desnaturação de proteínas (CASCON; ANDREWS; ASENJO, 1991).

2.3 Produção de fitase por microrganismos

Fitases produzidas por microrganismos são as principais, apresentando alto rendimento e sendo empregadas principalmente na indústria de rações animais (KIM, 2006). A produção por leveduras já foi descrita em *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *Torulopsis candida*, *Debaryomyces castellii*, *Kluyveromyces fragilis* e *Schwanniomyces castellii*, sendo que *Schwanniomyces castellii* demonstrou alta produção de fitase extracelular (DVORÁKOVÁ; VOLFOVÁ; KOPECKÝ, 1998). Também podem ser produzidas por muitas espécies de bactérias e fungos e são capazes de eliminar as propriedades antinutricionais do fitato (COUSINS, 1999).

Estudos com fitases produzidas por fungos iniciaram em 1962, mas somente a partir de 1991 é que a fitase de *Aspergillus niger* foi comercialmente produzida (SELLE; RAVINDRAN, 2008). A partir daí, outros fungos foram relatados como produtores desta enzima. A maioria produziu fitase extracelular (KEROVUO, 2000).

A produção de fitases fúngicas se mostra mais vantajosa pela facilidade de extração da enzima do ponto de vista industrial, já que os fungos sintetizam enzimas extracelulares que são lançadas em um substrato externo e, portanto, elimina-se a etapa de rompimento celular de enzimas intracelulares (SALMON, 2011). Os fungos podem ser cultivados utilizando diferentes métodos de cultivo, como a fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (LIU et al., 1998). O cultivo de *Aspergillus niger* em meio líquido ou sólido, adicionado de

farelo de trigo mostrou que esse microrganismo produz fitase nas duas condições (PAPAGIANNI; NOKES; FILER,1999). Em escala industrial utilizam-se microrganismos para a produção das fitases a partir de diferentes processos fermentativos. Dois tipos básicos de fermentação são utilizados para a produção de enzimas, a fermentação submersa (FS) (Figura 4) e a fermentação em estado sólido (FES). A FS é a técnica utilizada nos países ocidentais para a produção de enzimas, devido à facilidade de crescimento dos microrganismos em condições controladas de pH e temperatura, além de tornar fácil a recuperação das enzimas extracelulares. Esse processo utiliza um meio fermentativo líquido, onde as fontes de nutrientes utilizadas são solúveis e o desenvolvimento do microrganismo se dá em presença de água livre. O conteúdo de água nesse processo é superior a 95%. Como vantagens da FS podem ser consideradas a relativa facilidade de cultivo em grande escala, já que garante a homogeneidade do meio, e a facilidade no controle dos parâmetros do processo, principalmente se monitorados por sensores adequados. No entanto, uma desvantagem dessa técnica é a maior probabilidade de contaminação, devido à grande quantidade de água utilizada (ORLANDELLI et al., 2012).

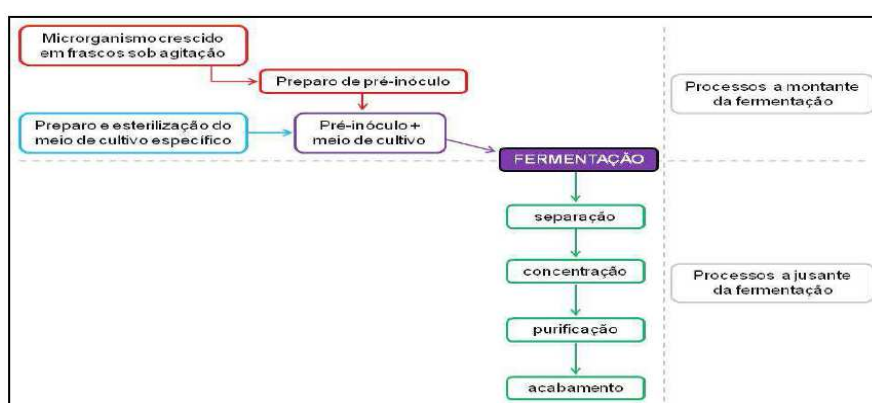


Figura 4 Fluxograma simplificado da produção de enzimas microbianas em escala industrial, utilizando o processo de fermentação submersa
Fonte: Adaptado de Sant'Anna Junior

Fungos produtores de enzimas podem ser isolados de diversos locais, incluindo cavernas (De MELO et al., 2013). As características peculiares das cavernas favorecem o desenvolvimento de muitos microrganismos. Poucos estudos sobre a microbiota cavernícola têm sido descritos e microrganismos importantes podem ser isolados nesse ambiente. Isso destaca a importância e a possibilidade de identificação de espécies de interesse biotecnológico isoladas nesses locais.

Outra fonte produtora de enzimas são os fungos endofíticos. Os microrganismos endofíticos são considerados novas fontes promissoras de diversos compostos como antibióticos, antioxidantes, antitumorais e enzimas (STROBEL; DAYSI, 2003). O termo endofítico foi primeiramente introduzido por De Bary (1866) e era aplicado a qualquer microrganismo presente dentro do tecido das plantas. Hoje, o conceito mais comumente usado para fungos endofíticos provém de Petrini (1991) onde “fungos endofíticos são microrganismos que habitam o tecido vegetal durante alguma fase do seu ciclo de vida, podendo colonizar o tecido interno da planta sem causar doença ao hospedeiro”. Na maioria dos casos estudados, interações entre endofítico e plantas têm se mostrado muito benéficas e podem estar relacionadas à sanidade vegetal, já que atuam no controle do crescimento de microrganismos patogênicos, inibem a herbivoria por insetos, além de outras ações que em conjunto aumentam a capacidade adaptativa da planta (VARMA; SUDHA; FRANKEN, 1999; PEIXOTO NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2002).

Os fungos endofíticos têm sido isolados de diferentes espécies vegetais, desde árvores (ARNOLD; LUTZONI, 2007), palmáceas (FROHLICH; KYDE; PETRINI, 2000), gramíneas (MULLER; KRAUSS, 2005) e líquens (LI et al., 2007). A diversidade de espécies isoladas de um mesmo hospedeiro varia significativamente e essa variação pode ocorrer devido aos diferentes métodos de isolamento utilizados em cada estudo (HYDE; SOYTONG, 2008). Os fungos

endofíticos habitam folhas, pecíolos, estruturas reprodutivas, galhos, cascas e também raízes de plantas (FAETH; FAGAN, 2002). A maioria desses fungos pertence ao Filo *Ascomycota* e seus anamorfos, sendo que em apenas alguns trabalhos foi demonstrada a presença de representantes no Filo *Basidiomycota* (HYDE; SOYTONG, 2008).

Em geral, eles adentram as plantas por aberturas naturais como estômatos e hidatódios ou feridas causadas por insetos, por estruturas de fungos patogênicos, como os apressórios ou mecânicas. Alguns são transmitidos via sementes. Em plantas com propagação vegetativa, eles passam de uma para a outra através das estruturas utilizadas nessa propagação (AZEVEDO, 1998). Após a penetração eles se disseminam de maneira sistêmica para diversas partes da planta, habitando de forma ativa o apoplasto, vasos condutores e, em alguns casos ocorre colonização intracelular (HALLMANN et al., 1997).

2.4 Aplicações da fitase

As enzimas exógenas são utilizadas na alimentação animal visando à remoção ou hidrólise de fatores antinutricionais, aumento da digestibilidade dos nutrientes existentes e suplementação de enzimas endógenas em animais jovens (CLASEEN, 1996). Foi avaliado o efeito do uso de enzimas exógenas na alimentação de frangos de corte, visando melhorar o desempenho dos animais. Os resultados mostraram aumento no ganho de peso e desempenho dos animais avaliados (CLASSEN; CAMPBELL; ROSSNAGEL, 1985; LYONS, 1996). A utilização de enzimas exógenas na alimentação de animais monogástricos e o emprego de fitases em rações têm melhorado a digestão e absorção destas pelos animais (ABIOYE; AKINREMI, 2010; BRANDÃO; COSTA; BRANDÃO, 2007). Esta enzima também tem sido utilizada em produtos para consumo humano (AFINAH; YAZID; ANIS SHOBIRIN, 2010; ROSELL; SANTOS;

PENELLA, 2009). Uma importante fonte de fósforo são os ingredientes de origem vegetal, porém a maior parte encontra-se combinado com o inositol, formando a molécula do ácido fítico ou hexafosfato de inositol que formam uma ampla variedade de sais insolúveis, diminuindo, assim, a solubilidade e a digestibilidade dos nutrientes.

Dentre os minerais exigidos pelas aves, o fósforo e o cálcio são considerados os mais importantes, por serem necessários não apenas para ótima taxa de crescimento, mas também para a mineralização óssea. O fósforo participa nos processos metabólicos e na absorção de nutrientes, além de ser o mineral que mais onera o custo das rações. Entretanto, a alimentação de frangos de corte baseia-se em alimentos de origem vegetal, nos quais aproximadamente 66% do P (fósforo) estão na forma de fitato (hexafosfato de inositol) (ROSTAGNO et al., 2000).

Fitases são úteis na alimentação humana e animal, na preparação de intermediários de mio-inositol fosfato, no combate à poluição de fósforo e na promoção do crescimento da planta (IDRISS et al, 2002; GREINER; KONIETZNY, 2006 ; RAO et al, 2009). Os suplementos alimentares para animais são derivados de fontes vegetais, tais como cereais, legumes, soja, etc. O ácido fítico é bem conhecido por se complexar com diferentes cátions, bem como com as proteínas (WISE, 1983). Fitase adicionada à dieta, melhora a biodisponibilidade de cobre e zinco em suínos (ADEOLA et al., 1995) e aves (YI; KORNEGAY; DENBOW, 1996). Fitase microbiana também melhora a absorção aparente de magnésio, cobre, zinco e ferro em suínos (SELLE; RAVINDRAN, 2007). Adição de fitase aumenta a concentração de sais minerais como magnésio, fósforo, cálcio, manganês e zinco no plasma, osso e em todo o corpo do animal (VIELMA et al., 2004).

A deficiência de fósforo no solo é um dos principais entraves para a produção agrícola mundial. Grande proporção de fósforo no solo existe na forma

orgânica, da qual o ácido fítico é a forma predominante. Alguns trabalhos relatam o papel de fitase na promoção do crescimento das plantas e na redução da poluição causada pelo excesso de fósforo. Fungos produtores de fitase e fosfatase foram utilizados como inoculantes de sementes, para ajudar na nutrição de plantas em solos contendo alto teor de fósforo na forma de ácido fítico (YADAV; TARAFDAR, 2003). A eficiência de hidrólise do fósforo de diferentes compostos orgânicos por diferentes fungos indicaram que esses podem beneficiar a nutrição de plantas. *Arabidopsis* transgênica que expressa a fitase extracelular de *Medicago truncatula* apresentou melhor utilização do fósforo orgânico e crescimento da planta. Usando o fitato como única fonte de fósforo o peso seco das *Arabidopsis* transgênicas foi de 3,1 a 4,0 vezes maior do que o das plantas controle e conteúdo de fósforo de 4,1 a 5,5 vezes maior, sugerindo o grande potencial de expressão heteróloga do gene da fitase para melhorar a absorção de fósforo pela planta (XIAO; HARRISON; WANG, 2005).

Foram preparados inositol 1,2,3,4,5-pentakisphosphate, inositol 2,3,4,5-tetrakisphosphate, inositol 2,4,5-trifosfato de inositol e 2,5 bifosfato usando fitase imobilizada de *Escherichia coli* (GREINER; KONIETZNY, 1996). Derivados de fosfato de inositol podem ser usados como estabilizadores de enzimas, substratos de enzimas para a investigação metabólica, como inibidores potenciais de enzimas e de drogas e como blocos de construção quiral (SIREN, 1986).

Uma fitase termorresistente foi descrita para hidrolisar o ácido fítico durante o processamento de papel. Esse processo não gera subprodutos cancerígenos e tóxicos. Portanto, a utilização de fitases no processamento de papel poderia ser usada no desenvolvimento de tecnologias mais limpas (LIU et al., 1998).

A adição de fitase de *A. niger* em farinhas contendo farelo de trigo aumenta a absorção de ferro em seres humanos (SANDBERG; HULTHEN; TURK, 1996). A suplementação de fitase de *Sporotrichum thermophile* melhorou a qualidade do pão e reduziu a concentração de fitato (SINGH; SATYANARAYANA, 2012).

Os ruminantes sustentam a microbiota que enzimaticamente libera fósforo inorgânico a partir de ácido fítico, no entanto, monogástricos como os seres humanos, galinhas e porcos produzem pouca ou nenhuma fitase no intestino. Assim, o fósforo do ácido fítico não está disponível e o ácido fítico é excretado nas fezes (MULLANEY; DALY; ULLAH, 2000). O ácido fítico presente no esterco desses animais é enzimaticamente clivado por microrganismos do solo e da água. O fósforo, assim liberado, é transportado para os corpos d'água causando eutrofização. Isso resulta em depleção de oxigênio devido ao crescimento excessivo de algas. O pré-tratamento de alimentos para animais com fitases aumenta a disponibilidade de fósforo inorgânico, melhorando, assim, o estado nutricional dos alimentos e também contribui para diminuir a poluição causada pelo excesso de fósforo no solo e na água (NAHM, 2002). A excreção de fósforo pode ser reduzida em 30%, via substituição de fosfato na alimentação com fitase e pelo teor de fósforo digestível igualmente calculado. A adição de fitase na alimentação de leitões resultou em um aumento significativo na taxa de crescimento e melhor conversão alimentar comparado à alimentação convencional. A suplementação de fitase em dietas de milho e farelo de soja melhorou a digestibilidade do fósforo e diminuiu a excreção de fósforo (HILL; SUTTON; ROCHERT, 2009).

2.5 Características físico-químicas das fitases

Parâmetros como temperatura, pH, consumo de oxigênio, formação de dióxido de carbono, microrganismo escolhido, natureza do substrato e disponibilidade de nutrientes devem ser controlados e considerados durante todo o processo de fermentação. Foi estudada a produção de fitase de *Sporotrichum thermophile* em fermentação submersa e foram otimizados os parâmetros que afetam o processo. Com o auxílio de ferramentas estatísticas, este estudo teve a finalidade de aumentar a síntese da enzima, o seu rendimento e diminuir custos do processo. O resultado foi de 3,73 vezes o aumento na produção de fitase, utilizando meio com 3% de farelo de trigo ao invés de fitato de sódio como substrato (SINGH; SATYANARAYANA, 2009).

Fitases com temperaturas ótimas mais altas são desejáveis na indústria de alimentos para animais, porque a peletização da ração envolve um passo de 80 a 85°C durante alguns segundos (WISS et al., 1999). Fitases de *Aspergillus fumigatus* (PASAMONTES et al., 1997) e *Aspergillus niger* NRRL 3135 (HOWSON; DAVIS, 1983) exibiram uma atividade ótima a 37°C e a 55°C, respectivamente. Algumas fitases microbianas mostram atividade ótima em pH ácido (SINGH; SATYANARAYANA, 2009;. RAO et al, 2009). Fitases de origem fúngica exibem atividade ótima na faixa de pH 4,5 a 5,5 (GREAVES; ANDERSON; AND WEBLEY, 1967). A massa molecular dessa enzima varia de 40 a 700 kDa. A maioria das fitases caracterizadas são proteínas monoméricas (SINGH; KAUR; SATYANARAYANA, 2006). A fitase de *Aspergillus fumigatus* apresentou massa molecular de 60 kDa (PASAMONTES et al., 1997). Já a fitase de *Aspergillus niger* foi homopentamérica, com 353 kDa (monômeros com 66 kDa) (VATS; BANERJEE, 2004).

Foi isolado *Aspergillus* sp., de amostras de raízes de leguminosas e a atividade de fitase foi observada até o quarto dia de cultivo. A temperatura ótima

de crescimento foi de 30°C e de produção 35°C. O pH ótimo encontrado foi próximo ao neutro (KIM et al., 1999).

Sete isolados de fungos filamentosos, pertencentes aos gêneros, *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Trichoderma* foram testados para avaliar a expressão induzível de fitase, por meio de otimização preferencial em fermentação em estado sólido - FES. Diferentes isolados mostraram preferência ao substrato sólido de farelo de trigo, lentilha, aveia, milho e bagaço de cana para a produção máxima de fitase. Entre os fungos testados foi observada a produção máxima de fitase em *A. flavus* (80 U/g de substrato sólido) usando o farelo de trigo como substrato sólido, a pH 6, depois de 7 dias do período de fermentação a 30°C. Foi estabelecido que substratos sólidos com conteúdos alto de fitato e baixo de fosfato inorgânico (Pi) são substratos de escolha para a produção de fitase por FES (GULL et al., 2013).

REFERÊNCIAS

- ABIMA. **Produção e consumo de trigo**. Disponível em:
http://www.abima.com.br/est_mtrigo.asp. Acessado em 19/01/2014.
- ABIOYE, S.; IGE, D.; AKINREMI, O.; NYACHOTI, M.; DON FLATEN. Characterizing fecal and manure phosphorus from pigs fed phytase supplemented diets. **Journal of Agricultural Science**, v.2, p.3-12, 2010.
- ABITRIGO. **Associação brasileira a indústria do trigo**. Disponível em:
<http://www.abitrigo.com.br/trigo.asp> . Acessado em 19/01/2014.
- ADEOLA, O.; LAWRENCE, B.V.; SUTTON, A.L.; CLINE, T.R. Phytase-induced changes in mineral utilization in zinc-supplemented diets for pigs. **J. Anim. Sci.**, v.73, p. 3384-3391, 1995.
- AFINAH, S.; YAZID, A.M.; ANIS SHOBIRIN, M.H.; SHUHAIMI, M. . Phytase: application in food industry. **International Food Research Journal**, v.17, p.13-21, 2010.
- ARNOLD, A.E., LUTZONI, F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are TROPICAL LEAVES BIODIVERSITY HOTSPOTS? **Ecology**, v. 88, n. 3, p. 541-549, 2007.
- AZEVEDO, J.L. Microrganismos endofíticos. In: **Ecologia microbiana**. Editora Embrapa, CNPMA, Jaguariuna, p.117-137, 1998.
- BRANDÃO, P.A.; COSTA, F.G.P.; BRANDÃO, J.S.; SILVA, J. H. V. Efeito da adição de fitase em rações de frangos de corte durante as fases de crescimento e final. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, n.2, p.492-498, 2007.
- CASCONE, O.; ANDREWS, B. A.; ASENJO, J.A. Partitioning and purification of thaumatin in aqueous two-phase systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 13, p. 629-635, 1991.
- CHERYAN, M. Phytic acid interactions in food systems. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.13, n.4, p.297-335, 1980.
- CLASSEN, H. L.; CAMPBELL, G. L.; ROSSNAGEL, B. G. Studies on the hull barley in chick diets: deleterious effects and methods of avallution. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 65, n. 3, p. 725-733, 1985.

CLASSEN, H.L. Cereal grain starch and exogenous enzymes in poultry diets. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v.62, p.21-27, 1996.

COUSINS, B. Enzimas na nutrição de aves. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL ACAV EMBRAPA SOBRE NUTRIÇÃO DE AVES, 1999, Concórdia. **Anais...** Concórdia: [s.n.], p. 118-132, 1999.

DE BARY, A. Morphologie und Physiologie Pilze, Flechten, und myxomyceten. **Hofmeister's Handbook of Physiological Botany**. Leipzig , v.. 2, 1866, 316p.

DE MELO, A.G., et al. Screening and identification of tannase-producing fungi isolated from Brazilian caves. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 6, p. 483-487, 5 February, 2013.

DVORÁKOVÁ, J.; VOLFOVÁ, O.; KOPECKÝ, J. Characterization of phytase produced by *Aspergillus niger*. **Folia Microbiol.**, v.42, p.349-352, 1998.

FAETH, S.H., FAGAN, W.F. Fungal endophytes: Common host plant symbionts but uncommon mutualists. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, n 2, p. 360-368, 2002.

FROHLICH, J., HYDE, K.D., PETRINI, O. Endophytic fungi associated with palms. **Mycological Research** 104, p.1202-1212, 2000.

FU, S.; SUN, J.; QIAN, L.; LI, Z. *Bacillus* phytases: present scenario and future perspectives. **Appl. Biochem. Biotechnol**, v. 151, n. 1, p. 1-8, 2008.

GARGOVA, S.; ROSHKOVA, Z.; VANCHEVA, G. Screening of fungi for phytase production. **Biotechnology Techniques**, v.11, n. 4, p.221-224, 1997.

GREAVES, M.P.; ANDERSON, G. AND WEBLEY, D.M. The hydrolysis of inositol phosphates by *Aerobacter aerogenes*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 132, p. 412-418, 1967.

GREINER, R.; KONIETZNY, U. Construction of a bioreactor to produce special breakdown products of phytate. **J. Biotechnol.**, v. 48, p.153-159, 1996.

GREINER, R.; KONIETZNY, U. Phytase for food application. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 44, p. 125-140, 2006.

GREINER, R.; SILVA, L. G.; COURI, S. Purification and characterisation of an extracellular phytase from *Aspergillus niger* 11T53A9. **Braz. J. Microbiol.**, v. 40, p. 795-807, 2009.

GULL, I., et al. Optimization of phytase production in solid state fermentation by different fungi. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 46, p. 5207-5212, 2013.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J. W. Bacterial endophytes in agriculture crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 895-914, 1997.

HILL, B.E.; SUTTON, A.L.; RICHERT, B.T. Effects of low-phytic acid corn, low-phytic acid soybean meal, and phytase on nutrient digestibility and excretion in growing pigs. **J. Anim. Sci.**, v.87, p. 1518-1527, 2009.

HOWSON, S.J.; DAVIS, R.P. Production of phytate hydrolyzing enzymes by some fungi. **Enz. Microb. Technol.**, v. 5, p. 377-382, 1983.

HYDE, K.D, SOYTONG, K. The fungal endophyte dilemma. **Fungal Diversity** v. 33, p.163-173, 2008.

IDRISS, E.E.; MAKAREWICZ, O.; FAROUK, A.; ROSNER, K.; GREINER, R.; BOCHOW, H.; RICHTER, T.; BORRISS, R. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. **Microbiology**, v.148 (Pt 7), p. 2097-2109, 2002.

KAUR, P.; KUNZE, G.; SATYANARAYANA, T. Yeast phytases: Present scenario and future perspectives. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 27, p. 93-10, 2007.

KEROVUO, J.A. Novel Phytase from *Bacillus*. Characterization and Production of the Enzyme. **Academic Dissertation**, p. 1-66, 2000.

KIM, D. et al. Enzymatic evaluation of *Bacillus amyloliquefaciens* phytase as a feed additive. **Biotechnology Letters**, v.21, p. 925-927, 1999.

KIM, T.; MULLANEY, E.J.; PORRES, J.M.; RONEKER, K.R.; CROWE, S.; RICE, S.; KO, T.; ULLAH, A.H.J.; DALY, C.B.; WELCH, R.; LEI, X.G. Shifting the pH Profile of *Aspergillus niger* PhyA Phytase To Match the Stomach pH Enhances Its Effectiveness as an Animal Feed Additive. **Applied and Environmental Microbiology**, V. 72, n. 6, p. 4397-4403, 2006.

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

LI, W.C., ZHOU, J., GUO, S.Y., GUO, L.D. Endophytic fungi associated with lichens in *Baihua mountain* of Beijing, China. **Fungal Diversity**, v. 25, p. 69-80, 2007.

LIU, B. et al. The induction and characterization of phytase and beyond. **Enzyme Microb. Technol.**, v.22, p.415-424, 1998.

LYONS, T. P. Goal 1996: a truly global science-based company that responds rapidly to emerging issues. In: NORTH AMERICA UNIVERSITY TOUR, 1996, Nicholasville. **Anais...** Nicholasville: Alltech, p. 1-32, 1996.

MARSHAK, D. R.; KADONAGA, J. T.; BURGESS, R. R.; KNUTH, M. W.; BRENNAN, W. A.; LIN, S. **Strategies for protein purification and characterization** – a laboratory course manual. United States of America. Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 1979-2101, 1996.

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

MULLANEY, E.J.; ULLAH, A.H. The term phytase comprises several different classes of enzymes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 312, p. 179-184, 2003.

MULLER, C.B., KRAUSS, J. Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, n. 4, p. 450-456, 2005.

NAHM, K.H. Efficient feed nutrient utilization to reduce pollutants in poultry and swine manure. **Crit. Rev. Env. Sci. Technol.**, v. 32, p. 1-16, 2002.

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

PAPAGIANNI, M.; NOKES, S.E.; FILER, K. Production of phytase by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v.35, p.397-402, 1999.

PASAMONTES, L. et al. 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.

PEIXOTO NETO, P.A.S.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W.L. Micro-organismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 29, p. 62-76, 2002.

PETRINI, O. Fungal endophytes of tree leaves. **Microbial ecology of leaves**. Springer Verlag, New York, p. 179-197, 1991.

RAO, D.E.; RAO, K.V.; REDDY, T.P.; REDDY, V.D. Molecular characterization, physicochemical properties, known and potential applications of phytases: An overview. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v. 29, n. 2, p. 182-198, 2009.

REDDY, N.R.; SATHE, S.K.; SALUNKHE, D.K. Phytases in legumes and cereals. **Adv. Food Res.**, v. 82, p. 1-92, 1982.

ROSELL, C.M. Wholemeal wheat bread: a comparison of different breadmaking processes and fungal phytase addition. **Journal of Cereal Science**, v. 50, n. 2, p. 272-277, 2009.

ROSTAGNO, H. S. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos**: composição de alimentos e exigências nutricionais. Viçosa: UFV, 2000. 141 p.

SALMON, D.N.X.. Desenvolvimento de um bioprocesso para a produção, caracterização e recuperação da fitase de *Schizophyllum commune* obtida por fermentação em estado sólido. **Dissertação**. Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Área de Concentração em Agroindústria e Biocombustíveis, Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná. P. 1-122, 2011.

SANDBERG, A.S.; HULTHEN, L.R.; TURK, M. Dietary *Aspergillus niger* phytase increases iron absorption in humans. **J. Nutr.**, v. 126, p.476-480, 1996.

SANT'ANNA JUNIOR, G. L. Produção de enzimas microbianas. In: ORLANDELLI, R. C. et al. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios: Rev. Saúde e Biol.**, v.7, n.3, p.97-109, set./dez. 2012.

SEBASTIAN, S.; TOUCHBURN, S.P.; CHAVEZ, E.R. Implications of phytic acid and supplemental microbial phytase in poultry nutrition : a review. **World's Poultry Sci. Journal**, v.54, p.27-47, 1998.

SELLE, P.H.; RAVINDRAN, R. Microbial phytase in piggery nutrition. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v. 135, p. 1-41, 2007.

SELLE, P.H.; RAVINDRAN, V. Phytate-degrading enzymes in pig nutrition. **Livestock Science**, v.133, p. 9-122, 2008.

SINGH, B.; KAUR, P.; SATYANARAYANA, T. Fungal phytases for improving the nutritional status of foods and combating environmental phosphorus pollution. In AK CHAUHAN, and A VERMA (eds.) **Microbes: Health and Environment**. IK International Publishers, New Delhi, p. 289-326, 2006.

SINGH, B.; SATYANARAYANA, T. Improved phytase production by a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* in submerged fermentation due to statistical optimization. **Bioresource Technology**, v. 99, p.824-830, 2009.

SINGH B, SATYANARAYANA T. Production of phytate-hydrolyzing enzymes by thermophilic moulds. **Afr. J. Biotechnol**, v. 11, p. 12314-12324, 2012.

SIREN, M. **New myo-inositol triphosphoric acid isomer**. Pat SW 052950, 1986.

SPIER, M.R.; SCHEIDT, G.N; PORTELLA, A.C; RODRÍGUEZ-LEÓN, J.A.; WOICIECHOWSKI, A.L.; GREINER, R.; SOCCOL, C.R. Increase in Phytase Synthesis During Citric Pulp Fermentation. **Chemical Engineering Communications**, v. 198, p. 286 – 297, 2011.

STROBEL, G.A.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 67, p. 491-502, 2003.

TUBIO, G.; NERLI, B.; PICÓ, G. Relationship between the protein surface hydrophobicity and partitioning behavior in aqueous two -phase systems of polyethyleneglycol-dextran. **Journal of Chromatography B**, v. 799, p. 293-301, 2004.

TYAGI, P.K.; TYAGI, P.K.; VERMA, S.V.S. Phytate phosphorus content of some common poultry feed stuffs. **Indian J. Poult. Sci.**, v. 33, p. 86-88, 1998.

VARMA, A.; SUDHA, S.; FRANKEN, P. *Piriformospora indica*: a cultivable plant growth promoting root endophyte with similarities to arbuscular mycorrhizal fungi. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 65, p. 2741-2744, 1999.

VATS, P.; BANERJEE, U.C. Production studies and catalytic properties of phytases (*myo*-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): An overview. **Enz. Microb. Technol.**, v. 35, p. 3-14, 2004.

VIELMA, J.; RUOHONEN, K.; GABAUDAN, J.; VOGEL, K. Top-spraying soybean meal-based diets with phytase improves protein and mineral digestibilities but not lysine utilization in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (walbaum). **Aquacult. Res.**, v. 35, p. 955-964, 2004.

WISS, M. et al. Biophysical characterization of fungal phytases: molecular size, glycosylation patten, and engineering of proteolytic resistance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 2, p.359-366, 1999.

WISE, A. Dietry factors determining the biological activities of phytase. **Nutr. Abstr. Rev.**, v. 53, p. 791-806, 1983.

XIAO, K.; HARRISON, M.J.; WANG, Z.Y. Transgenic expression of a novel *M. truncatula* phytase gene results in improved acquisition of organic phosphorus by *Arabidopsis*. **Planta**, v. 222, n. 1, p. 27-36, 2005.

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 Biol. Biochem.**, v. 35, n. 6, p. 745-751, 2003.

YI, Z.; KORNEGAY, E.T.; DENBOW, D.M. Effect of microbial phytase on nitrogen and amino acid digestibility and nitrogen retention of turkey poult fed corn-soybean meal diets. **Poult. Sci.**, v. 75, p. 979-990, 1996.

ZASLAVSKY, B. Y. **Aqueous Two-Phase Partitioning**. New York: Marcel Dekker, 656 p. 1995.

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

SEGUNDA PARTE – ARTIGO

ARTIGO 1 Production and partial purification of phytase by endophytic fungus

Artigo redigido conforme as normas da revista científica (versão preliminar)

1 INTRODUCTION

The phytic acid or phytate (myo - inositol hexakisphosphate) is the major source of phosphorus in animal feed, but it is not readily assimilated by them. Besides making the phosphorous unavailable phytate binds to divalent cations (Ca^+ , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} and Zn^{2+}), preventing the absorption of these nutrients in the gut of animals.

In animal feed industries, the feed is usually supplemented with inorganic phosphate in order to meet the phosphorous need for proper growth and development of animals. However, antinutritional effects of phytate remains unaffected (SANDBERG; ANDLID, 2002). Excretion of indigestible phytate having large amount of phosphorous in manure leads to redistribution of phosphorous in soil (TURNER; LEYTEM, 2004). It may leach in waterways and execute eutrophication that generates water quality issues. Hence, elevated phosphorous levels in water and soil also creates several environmental problems. To avoid the phytate related issues, there is need to introduce the methods for degradation of phytate. The physical and chemical methods are expensive and reduce the nutritional value of feed as well. Therefore, enzymatic degradation of phytate appears to be of great interest (SINGH; KAUR; SATYANARAYANA, 2006).

Phytases (myo-inositol hexaphosphate phosphohydrolase; EC 3.1.3.8 and EC 3.1.3.26) are enzymes belonging to the class of phosphatases that hydrolyze phytic acid to myo-inositol phosphates and inorganic phosphate through a series of myo-inositol phosphate intermediates, eliminating anti-nutritional characteristics of phytic acid. Phytases have potential applications in the food and feed industries, and they also lessen the antinutritional effects of phytic acid. In recent years, phytases have attracted considerable attention from scientists and entrepreneurs in the areas of nutrition, environmental protection

and biotechnology. The annual sales of phytase in the U.S.A. is estimated at \$150 million which is one third of the entire enzyme market (SINGH; KAUR; SATYANARAYANA, 2006).

Phytase can be produced by many species of bacteria, fungi and yeast. Although studies have been conducted aimed at the production and characterization of phytase from some microorganisms, information about its regulation, catalytic capacity, specificity, optimization of production and purification, still need to be clarified in order to reduce costs and facilitate the use of this enzyme on an industrial scale. It is produced on a commercial scale by a limited number of organisms. Many experiments have been conducted to demonstrate the effects of microbial phytase in broiler chickens by using phosphorus (LELIS et al., 2012).

Thus, the proposed work aimed to select a fungus that excels in the production of phytase, assess factors that may influence the production of this enzyme and to partially characterize it. Being the best producer isolated, belonging to the class of endophytic fungi, the work is considered a pioneer in the reporting of phytase production by these fungi.

2 MATERIALS AND METHODS

The experiments were conducted in the Filamentous Fungi Genetics and Bioprospecting Laboratory - BIOGEN from Federal University of Lavras - UFLA, Lavras, Minas Gerais and the Microbiology Laboratory from Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto - FFCLRP/USP.

2.1 Microorganisms evaluated and selection of phytase producing fungi

One hundred filamentous fungi isolated from the Brazilian Caatinga caves and 13 endophytic fungi isolated from coffee plant shoots belonging to the Culture Collection of the BIOGEN, were evaluated for their ability to produce the enzyme phytase. The cultures were maintained in MilliQ water at 4°C. The isolates were reactivated on potato dextrose agar (PDA) and incubated at 25°C for 7 days.

The selection of fungal phytase producers was carried out in medium containing (g/L) phytic acid ($C_6H_{18}O_{24}P_6$): 5; $NaNO_3$: 3; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0.5; KCl: 0.5; $FeSO_4$: 0.12; $CaCl_2$: 0.66; $ZnSO_4$: 0.17; agar: 30 (SILVA et al., 2010). The fungi that showed a clear zone (halo) around the colony, and possessed an Enzyme Index (EI) greater than 2, were selected to evaluate the specific enzyme activity. $EI = \text{halo diameter} / \text{colony diameter}$.

2.2 Molecular identification

The molecular identification of the selected fungus was carried out using sequences of the ITS region. The fungus was grown on PDA and mycelium was scraped with a sterile toothpick. The extraction of total DNA was performed according to the "Mobio UltraClean Microbial® kit". Amplification reactions

were performed in a volume of 30 μ L containing 15 μ L of Quiagen kit, 12 μ L H₂O, 1 μ L primer F, 1 μ L primer R and 1 μ L DNA.

Primers ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') and ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC 5') and amplification conditions were: 95°C 2min, 95°C 1min, 50°C 1 min, 72°C 1 min and 72°C 7 min, programmed for 35 cycles. The amplifications were performed in a thermocycler "MULTIGENE, Labnet International Inc. The sequences were analyzed with the aid of SeqAssem program and alignment with other sequences available in the database "GenBank" was made by the MEGA program.

2.3 Phytase assay

The phytase activity was determined according to Gulati, Chadha e Saini (2007). The phosphorus released was measured spectrophotometrically. One unit of phytase activity is defined as "amount of phytase required to release one mole of inorganic phosphorus per time unit under test conditions".

2.4 Determination of total protein

The total protein concentration was determined by the Bradford method (BRADFORD, 1976) using whey protein bovine serum albumin (BSA) as a standard. The unit was defined as the amount of protein in mg/mL of sample. Total protein (mg total) was calculated by multiplying the protein in mg/mL for the sample volume.

2.5 Influence of some physical factors on phytase production under submerged fermentation (SF)

The substrates used for the production of phytase under submerged fermentation (SF) were (5%) wheat bran, soybean, sugarcane bagasse, oat, corn starch, and rye flour.

The physical parameters included agitation (100, 125 and 150 rpm), initial pH (4, 5, 6 and 7) and temperature (25, 30 and 35°C), fungal growth incubation time (24, 48, 72, 96, 120, 144 and 168 hours) and fungus dry weight. The fermentation medium was prepared in 250 ml Erlenmeyer flasks by adding (g/L) of wheat bran: 5, yeast extract: 3; NaNO₃: 3; MgSO₄·7H₂O: 0.5; KCl: 0.5; FeSO₄: 0.12; CaCl₂: 0.66, ZnSO₄: 0.17, pH 5.5 (SILVA et al., 2010). After this process, three disks of approximately eight millimeters of the selected fungus mycelium was inoculated in the fermentation medium, which was initially incubated at 25°C for 7 days at 125 rpm. Phytase activity was evaluated assay of enzyme.

2.6 Chromatographic column DEAE-cellulose ion exchange

The supernatant of the crude extract obtained from the extracellular SF was applied to column chromatography ion exchange DEAE-cellulose (1 x 12cm) previously equilibrated in 10 mM sodium acetate buffer, pH 5.0 and a flow rate adjusted to 1 mL/min. The enzyme was eluted by applying a linear NaCl gradient (0-1M) in the same buffer. Fractions (3 mL/tube) were collected that showed activity in "pools", dialyzed against distilled water overnight at 4°C.

2.7 Stability to temperature and pH

The thermostability was determined by incubating partially purified phytase at temperatures of 40°C, 50°C and 60°C. After time intervals of 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45 and 60 minutes, aliquots were removed and the enzyme maintained in an ice bath for determining phytase activity.

The pH stability of phytase was observed by incubating the partially purified enzyme in 100mM citrate buffer (pH 3, 4, 5 and 6) and 100mM Tris-HCl (pH 7, 8, 9 and 10). The enzyme and buffer were added at 1:1 (v/v) and after incubation for 1 hour aliquots were removed and the relative enzyme activity was determined.

2.8 Effect of different compounds on phytase activity

The effect of different salts NaCl, AlCl₃, CuCl₂, CuSO₄·5H₂O, FeCl₃, HgCl₂, KCl, MgSO₄·7H₂O, Zn(NO₃)₂·7H₂O, CaCl₂, Urea and EDTA on the partially purified phytase activity was investigated. The compounds were used at final concentrations of 1mM in the reaction medium for phytase activity determination.

All experiments were performed in triplicate, using white as control. It took into account the standard deviation for the construction of graphs.

3 RESULTS AND DISCUSSION

Isolates that had an index value (Table 1) greater than 2 were CF279 (EI = 2.41) and UBSX (EI = 4.46). These were identified as *Penicillium minioluteum* and *Muscodor* sp. (Xylariaceae, Ascomycetes), respectively. The enzymatic index of the enzyme produced by the endophyte *Muscodor* sp. had the highest value so this isolate was chosen for the tests to evaluate factors that may influence the production of phytase and characterization tests of the enzyme produced. Isolate UBSX is a sterile (not producing spores) endophytic fungus possessing some interesting hyphal characteristics including coiling, ropyness, and right angle branching. The mycelia of the fungus on most media are whitish and suppressed (Fig. 1). All attempts to obtain initiate spore formation have failed. These include placement on various media. The sequences were entered into “GenBank” as KJ425599.

Table 1 Higher enzyme levels produced by endophytic (UBSX, Z26 and HZM64) and by fungi isolated from caves (CF279, CF302 and HE189A)

Isolate	Index Value (EI)
UBSX	4,41
Z26	4,35
HZM64	3,7
CF279	2,41
CF302	2,2
HE189A	2,09

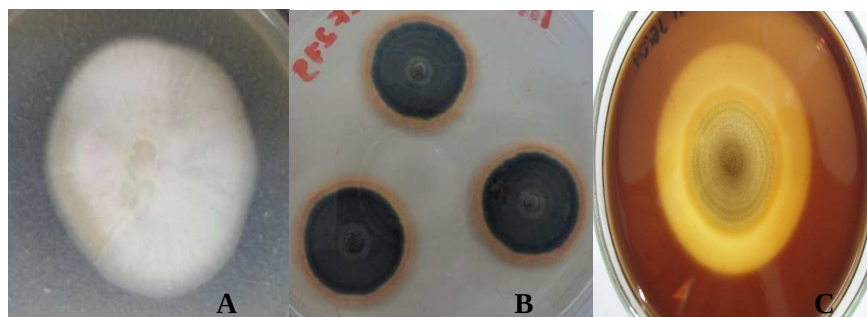


Figure 1 Mycelium of isolates UBSX (A) and CF279 (B) grown on PDA, and clear zone (halo) produced from isolate CF279 (C).

The *Muscodor* genus has been reported as a good producer of several other metabolites of interest. A fungus of the genus *Muscodor* that produces extremely bioactive volatile organic compounds (VOCs) was found. This endophyte, *Muscodor albus* produces a mixture of volatile organic compounds which are lethal to a variety of human and plant pathogens such as fungi and bacteria. And also, is effective against nematodes and certain insects (STROBEL, 2006). The effect of water activity (A_w) on the production of volatile organic compounds produced by *M. albus* CZ - 620, the inhibitory effects of volatile organic compounds on the growth of three pathogens of potato tubers (*Fusarium sambucinum*, *Helminthosporium solani*, and *Pectobacterium atrosepticum*) and the development of diseases caused by the three pathogens (dry rot, silver scurf and bacterial soft rot, respectively) were investigated. Results showed that water activity influences the production of VOCs and the VOCs tested inhibited the growth of pathogens and diseases caused by them in potato tubers (CORCUFF et al., 2011). *Muscodor crispans* (B - 23), an endophyte residing within the tissues of the stem of *Ananas ananassoides*, a wild pineapple of the Bolivian Amazon Basin, was described as a new species of *Muscodor* and produces a number of esters, alcohols and acids of low molecular weight an whose volatiles have antibiotic properties, making this a potentially

useful organism in many situations. Despite its 100% genetic similarity to regions of rDNA of *M. albus*, this organism is considered distinct because of the number and type of its unusual phenotypic characteristics (MITCHELL et al., 2008).

All solid substrates resulted in phytase production by *Muscodor* sp. but in a minor amount compared to wheat bran (0.19 U) (Table 2). The specific activity for the wheat bran substrate was 2.34 U/mg. Wheat bran is a byproduct of wheat grain and its composition is rich in calories, proteins, vitamins, minerals, and other important elements for the development of microorganism and enzyme production of interest, making a great substrate for production phytase. This substrate produced more protein (0.19U), and thinking of the enzyme of interest (phytase), that facilitates its purification. The microorganism *Mucor racemosus* NRRL 1994 produced phytase using wheat bran as substrate/support (ROOPESH et al., 2006).

Table 2 Substrates and optimum substrate for phytase production by *Muscodor* sp.

Substrate	Total Phytase (U)
Rye Flour	0.08
Wheat Bran	0.19
Sugarcane bagasse	0.05
Soybean	0.07
Oat	0.04
Corn Starch	0.03

The enzyme activity was tested in the pH range from 4 to 7 using sodium phytate as substrate. The peak of phytase activity produced by *Muscodor* sp. was pH 5.0 (Fig. 2). Similar results were obtained for phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142 which showed optimum pH of 5.0 (CASEY; WALSH, 2003) and *A. niger* FS3 which showed an optimum pH at 5.5 (SPIER et al., 2010). The pH value around 5.0 - 6.0 is characteristic for most phytases

from fungi and bacteria (VOHRA; SATYANARAYANA, 2003). *Schizophyllum commune* phytase showed significant activity at pH 5.0, which may facilitate the degradation of phytate already in the salivary glands (pH 5.0 - 7.0) (CASEY; WALSH, 2004; SALMON, 2011).

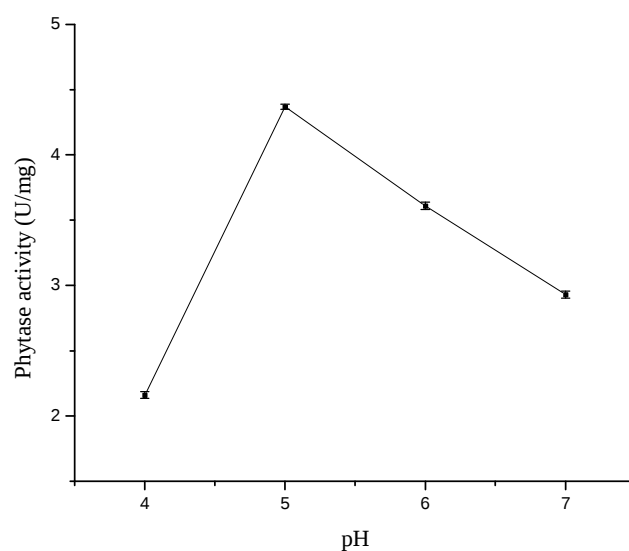


Figure 2 Effect of pH of the culture medium for the production of phytase by *Muscodor* sp.

Agitation also exerted influence on the production of phytase, with an observed increase in the specific activity of the enzyme. The agitation of 125 rpm allowed increased phytase activity when *Muscodor* sp. was inoculated into the culture medium using wheat bran as substrate and at pH 5.0 (Fig. 3).

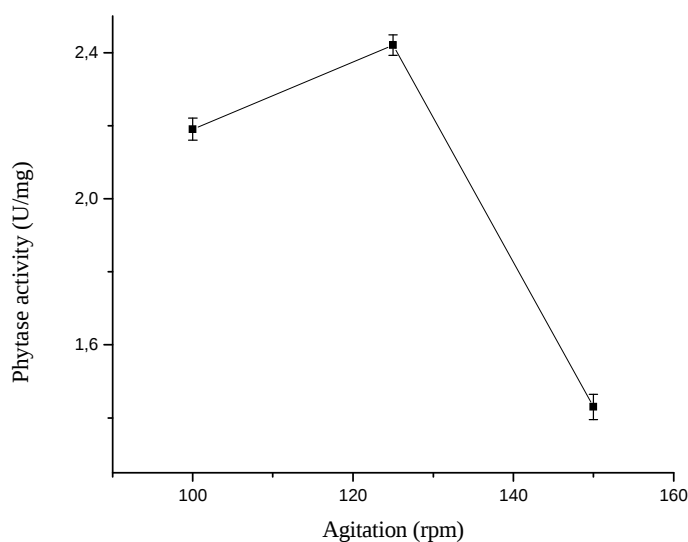


Figure 3 Effect of agitation on the production of phytase by *Muscodor* sp.

Enzymes have an optimum temperature at which they have a constant activity for a specified period of time. The optimum temperature of phytase *Muscodor* sp. was 30°C, which showed a maximum specific activity of 1.23 U/mg, compared to phytase activity at 25°C (0.63 U/mg) and 35°C (0.98 U/mg) (Fig. 4).

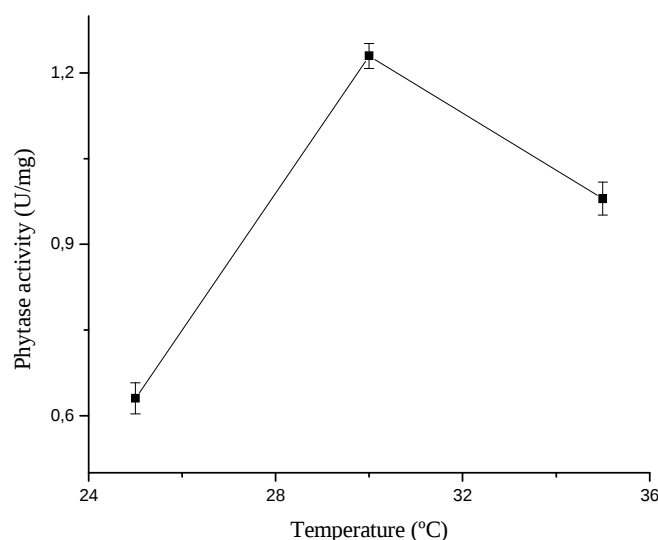


Figure 4 Effect of temperature on production of phytase by *Muscodor* sp.

The study of the phytase production kinetics was performed on a laboratory scale in Erlenmeyer flasks. Submerged fermentations were carried out according to the parameters evaluated: temperature of 30°C, pH 5.0, rotation of 125 rpm. The flasks were incubated for 168 hours, and every 24 hours of fermentation samples were withdrawn. The production of phytase was measured by determining enzyme activity and determination of biomass (dry weight). Figure 5 (A e B) show the results of the study of the kinetics of production of phytase by *Muscodor* sp. The maximum phytase activity (26.51 U/mg) was achieved in 144 hours of fermentation. Monitoring biomass growth should continue for 168 hours following definition of the stationary phase and decline.

The phase lag or phase adjustment takes around 12 hours and from this moment the biomass starts to increase, thus characterizing the log phase or early logarithmic growth phase, which continues during the fermentation process

(SALMON, 2011). Studied the kinetics of production of phytase by *Aspergillus niger* FFS3 in solid state fermentation using citrus pulp with substrate/support, which reached 96 U/mg of phytase in 96 hours of fermentation and 25 U/mg of phytase was produced by *Aspergillus ficuum* using wheat bran as substrate/support within 96 hours of fermentation (SPIER et al., 2009).

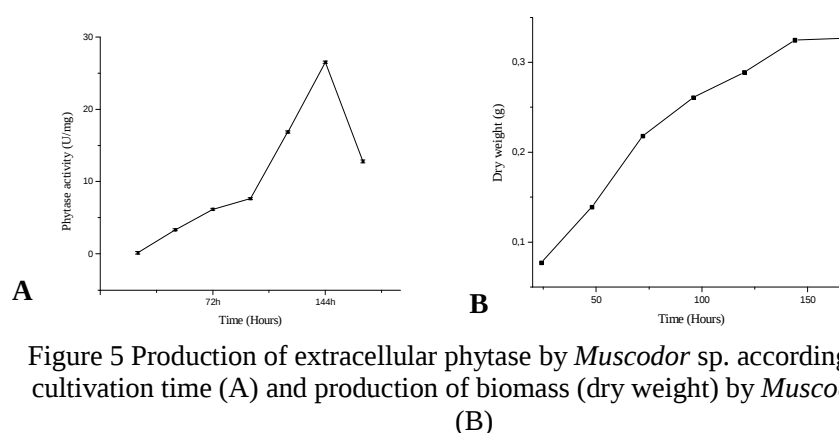


Figure 5 Production of extracellular phytase by *Muscodor* sp. according to the cultivation time (A) and production of biomass (dry weight) by *Muscodor* sp. (B)

With the standardization of the parameters evaluated optimum substrate: wheat bran, optimal pH: 5.0, optimal agitation: 125 rpm, and optimal temperature: 30°C, the specific enzyme activity of endophytic *Muscodor* sp., increased 11.32 times from 2.34 U/mg to 26.51 U/mg (Table 3).

Table 3 Standardization of parameters evaluated for phytase production by *Muscodor* sp.

	No standardization of the parameters evaluated	With the standardization of the parameters evaluated
Optimum substrate	Wheat bran	Wheat bran
Optimal pH	x	5.0
Optimal agitation (rpm)	x	125
Optimal temperature (°C)	x	30
Specific enzyme activity (U/mg)	2.34	26.51

The crude enzymatic extract produced by *Muscodor* sp. in SF was subjected to ion exchange chromatography on DEAE-cellulose. The elution profile showed two protein peaks with phytase activity of 4.52 U/mg (Buffer) and 5.19 U/mg (NaCl). The results of phytase activity and OD 280 nm are shown in Figure 6. Practically all the early process phytase (100 mL extract) is present in the next step, after the DEAE, but in a smaller volume (56 mL). The purification factor increased (1.31), however a small increase, thus, little protein was removed and separated from the enzyme of interest (phytase). This shows that there was a slight separation from other proteins, or the use of DEAE not allow a high efficiency of purification. On the other hand, other compounds that could be present in the crude extract and disrupt the enzymatic activity, even minimally, may have been removed, and therefore, the total activity increased slightly, allowing a slightly higher recovery (about to 7%). The ideal would be to repeat the purification process seeking other alternatives (Table 4).

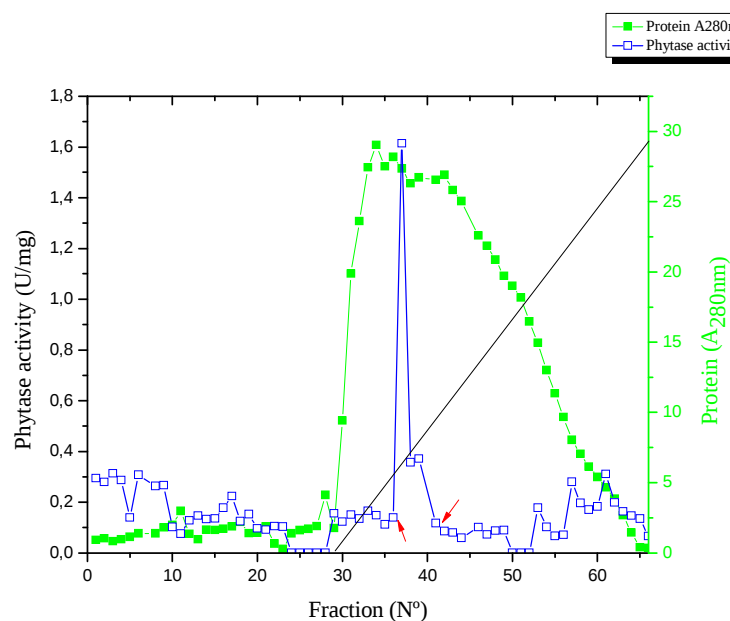


Figure 6 Elution profile of phytase *Muscodor* sp. DEAE-Cellulose column

Table 4 Partial purification of phytase produced by *Muscodor* sp.

Steps	Volume (mL)	Total Phytase (U)	Total Protein (mg)	Specific Activity (U/mg)	Yield (%)	Purification
Gross Extract	100	11.10	2.8	3.96	100	1
DEAE Cellulose	56	11.93	2.3	5.19	107.5	1.31

For the temperature stability and salts the partially purified extract in a DEAE-cellulose column was used. This extract had a phytase activity value of 5.19 U/mg.

The stability of phytase *Muscodor* sp. contained in the partially purified extract was evaluated after storage for 1 hour at 25°C at different pH values 3, 4, 5, 6 (citrate buffer) and 7, 8, 9 and 10 (Tris-HCl) (Fig. 7A). For the pH stability, partially purified extract was also used, but with an activity amount of 7.36 U/mg (100% relative activity). At pH 5.0, we observed maximum enzyme

stability. This is due to the fact that this is the optimum pH for growth of the fungus for phytase production. The difference between the curves can be explained by the fact of having used different buffers for the two pH ranges citrate (3, 4, 5 and 6) and Tris-HCl (7, 8, 9 and 10). The citrate curve, is more likely to be correct by showing stability, however small, at acidic pH (4, 5 and 6 - optimal pH of phytase activity). At pH 5.0 (100%) a certain of stability was observed, and as the pH increases, the stability decreases. However, in the Tris-HCl curve, we also observed that the enzyme remained stable at higher pH. This difference can also be explained by analytical errors in the activity methodology. An alternative could be to quantify the pH at the time of the enzymatic reaction in the fungal growth medium for enzyme production, not only before. Phytase I of *Monascus* was also stable at pH 5.5-6.5 and phytase II had a better stability at pH 6.0 to 7.0 (TADASHI et al. 2001), and phytase II of *Aspergillus niger* was stable pH 3.5 to 9.0 and at room temperature over a 12 hour period of incubation (SONI; MAGDUM; KHIRE, 2010).

Phytase stability at 40°C was observed, keeping its relative activity of 135.7% and 23.11% for a period of 1 hour, after aliquot collection at times of 2, 5, 10, 15, 20, 30, 45 and 60 minutes. This stability was followed at 50°C, but with only 14.88% retention, and at 60°C, the thermal stability decreases gradually (Fig. 7B).

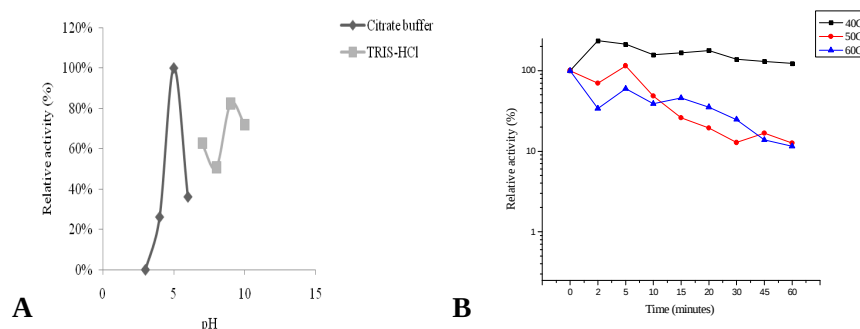


Figure 7 pH stability (A) and temperature stability (B) of phytase produced by *Muscodor* sp.

The majority of microbial phytases studied have shown similar optimum temperatures within a temperature range of 45-55°C (BOYCE; WALSH, 2007). Thermal inactivation was reported for phytase of *Aspergillus fumigatus* at 70°C (WOODZINSKI; ULLAH 1996). Most fungal phytases characterized to date have optimum temperature in the range of 30-60°C (CASEY; WALSH, 2004).

Table 4 Effect of different compounds on *Muscodor* sp. phytase activity

Addition (1mM)	Phytase activity (U/mg)	Relative activity (%)
Without addition of compound	5,19	100
NaCl 1mM	0.61	11.75
AlCl 1mM	2.59	49.9
CuCl 1mM	2.22	42.77
CuSO4.5H2O 1mM	2.08	40.07
FeCl ₃ 1mM	4.47	86.12
HgCl ₂ 1mM	1.40	26.97
EDTA	0	0
KCl	0	0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0	0
Zn(NO ₃).7H ₂ O	0	0
CaCl ₂	0	0
Urea	0	0

The influence of the presence of different compounds on the phytase activity of partially purified phytase is shown in Table 4. The enzyme activity

and the relative activity was calculated considering the enzymatic activity of the partially purified extract (5.19 U/mg), which is equivalent to 100% of relative activity. The phytase produced by *Muscodor* sp. was totally inhibited by EDTA, K^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} and urea and relatively inhibited by Na^+ , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Al , Fe^{2+} , whereas, the inhibition was lower by $FeCl_3$ (86.12%).

Phytase produced by *Aspergillus niger* was also inhibited by Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} , Sn^{2+} , Cd^{2+} , and strongly inhibited by the Fe^{2+} (DVORAKOVA; VOLFIVÁ; KOPECKY, 1997). The activity of phytase from *Candida krusei* WZ-001 was completely inhibited by Zn^{2+} and strongly inhibited by Mg^{2+} . Increasing the concentration of Fe^{2+} (5 mM) resulted in recovery of phytase activity. When increasing the concentration of sodium in the partially purified extract of the enzyme, there is a greater activity loss, so this is considered a major phytase enzyme inhibitor. In this work, in which the components completely inhibited the enzyme, NaCl was the first to inhibit the enzyme (11.75%) almost completely. Ullah, Sethumadhavan e Mullaney (2008) reported that 500 mM NaCl had an inhibitory effect on the activity of phytase from *Aspergillus niger*.

4 CONCLUSIONS

The endophytic *Muscodor* sp., was selected as a good producer of phytase. According to the parameters evaluated, the highest phytase production by endophytic *Muscodor* sp., in SF, occurred when it was inoculated in medium containing wheat bran as substrate, pH 5.0, agitation 125 rpm and 30°C. During the growth curve of the endophytic *Muscodor* sp., the highest phytase production occurred after 144 hours of fermentation with a yield of 26.51 U/mg. The enzyme had less inhibition when FeCl₃ was added, compared to other salts added. The peak enzyme activity was higher using NaCl as eluent, with a recuperation of 7.5%. Phytase of *Muscodor* sp. had a higher stability at 40°C and pH 5.0. The work conducted herein is the first work that reports the production of phytase by an endophytic fungus.

4.1 Acknowledgements

The author sincerely thanks the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), FAPEMIG and CNPq and appreciates the financial support that made the development of this work possible. The author would also like to thank Professor Luis Henrique Souza Guimarães and all staff of the Microbiology Laboratory of the University of São Paulo (USP/RP, Brazil) for their cooperation and support given during the experiments in his laboratory.

REFERENCES

- BOGAR B.; SZAKACS G.; LINDEN, J.C.; PANDEY, A.; TENDERDY, R. P. Optimization of phytase production by solid substrate fermentation. **J Ind Microbiol Biotechnol.** v.30, p.183-189, 2003.
- BOYCE, A.; WALSH, G. Purification and characterisation of an acid phosphatase with phytase activity from *Mucor hiemalis* Wehmer. **J. Biotechnol.**, v. 132, p. 82–87, 2007.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CASEY, A.; WALSH, G. Purification and characterization of extracellular phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142. **Bioresour. Technol.**, v. 86, p. 183-188, 2003.
- CASEY, A.; WALSH, G. Identification and characterization of a phytase of potential commercial interest. **J. Biotechnol.**, v.110, p. 313–322, 2004.
- CORCUFF, R.; MERCIER, J.; TWEDDELL, R.; ARUL, J. Effect of water activity on the production of volatile organic compounds by *Muscodor albus* and their effect on three pathogens in stored potato. **Fungal Biology**, v. 115, p. 220-227, 2011.
- COUSINS, B. Enzimas na nutrição de aves. In: Simpósio internacional ACAV EMBRAPA sobre nutrição de aves, 1999, Concórdia. **Anais...** Concórdia: [s.n.], p. 118-132, 1999.
- DIGUTA, C.F.; VINCENT, B.; GUILLOUX-BENATIER, M.; ALEXANDRE, H.; ROUSSEAUX, S PCR ITS-RFLP: A useful method for identifying filamentous fungi isolates on grapes. **Food Microbiol.** 2011 Sep; v. 28, n. 6, p.1145-54. doi: 10.1016/j.fm.2011.03.006. Epub 2011 Mar 21.
- DVORÁKOVÀ, O. VOLFOVÀ, J. KOPECKY. Characterization of phytase produced by *Aspergillus niger*. **Folia Microbiol.**, v. 42, p. 349-52, 1997.
- GONZALEZ, M.C.; ANAYA, A., GLENN; A.E., MACIAS-RUBALCAVA; M.L.;HERNANDEZ-BAUTISTA, B.E.; HANLIN, R.T. *Muscodor yucatanensis*, a new endophytic ascomycete from Mexican chakah, *Bursera simaruba*. **Mycotaxon**, v. 110, n. 1, p. 363-372, 2009.

GREEN,W., BOOTH,L., GEARY,B., MATHUR,E., RICHARDSON,T.H. AND VARGAS,P.N.: "**A record of *Muscodor strobilii*, a novel bioactive endophyte from Malaysia**" FJ664551, [Online] 3 March 2009 (2009-03-03),

XP002592097 *Muscodor* sp. WG-2009a internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence.

Retrieved from the Internet:

URL:http://lifesciencedb.jp/ddbj/ff_list.cgi?max_num=all&project_id=726826&type=plain>

GULATI HK, CHADHA BS, SAINI HS. Production of feed enzymes (phytase and plant cell wall hydrolyzing enzymes) by *Mucor indicus* MTCC 6333: Purification and characterization of phytase. **Folia Microbiol**, v. 52, p. 491-497, 2007.

HARLAND BF, HARLAND J. Fermentative reduction of phytic acid in rye, wheat and whole wheat bread. **Cereal Chem**, v. 57, p. 226-229, 1980.

KLICH, M. A. Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. **Mycologia**, v. 94, p. 21-27, 2002.

LELIS, G;R. et al. Diet supplementation with phytase on performance of broiler chickens. **R. Bras. Zootec.**, v.41, n.4, p.929-933, 2012.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, p. 265-275, Nov. 1951.

MITCHELL, A.M., STROBEL, G.A., HESS, W.M., VARGAS, P.N.; EZRA, D. *Muscodor crispans*, a novel endophyte from *Ananas ananassoides* in the Bolivian Amazon. **Fungal Diversity**, v. 31, p. 37-43, 2008.

PITT, J.I. Toxigenic fungi and micotoxinas. **Br. Med. Bull**, v. 56, p. 184-192, 2000.

PITT, J.I. AND HOCKING, A.D. **Fungi and Food Spoilage** Vol. II, ed. Pitt, J.I. and Hocking, A.D. London: Blackie Academic and Professional; p. 347-391, 1997.

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

SALMON, D.N.X. Desenvolvimento de um bioprocesso para a produção, caracterização e recuperação da fitase de *Schizophyllum commune* obtida por fermentação em estado sólido. **Dissertação**. Programa de Pós-Graduação em Processos Biotecnológicos, Área de Concentração em Agroindústria e Biocombustíveis, Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná. P. 1-122, 2011.

SANDBERG, A.S., ANDLID, T. Phylogenetic and microbial phytases in human nutrition. **Int. J. Food Sci. Technol.**, v. 37, p. 823-833, 2002.

SILVA, L.T.; MOREIRA, K.A.; PORTO, T.S.; PORTO, A.L.F. Produção de fitase a partir de resíduos agroindustriais em fermentação no estado sólido utilizando fungos do gênero *Aspergillus*. **Jepex 2010** – Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2010.

SINGH, B.; KAUR, P.; SATYANARAYANA, T. Fungal phytases for improving the nutritional status of foods and combating environmental phosphorus pollution. In AK CHAUHAN, and A VERMA (eds.) **Microbes: Health and Environment**. IK International Publishers, New Delhi, p. 289-326, 2006.

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

SPIER, M. R.; LETTI, L. A.; WOICIECHOWSKI, A. L.; SOCCOL, C. R. A Simplified Model for *A. Niger* FS3 Growth during Phytase Formation in Solid State Fermentation. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v.52, p.151-158, 2009.

SPIER, M.R.; FENDRICH, R.; ALMEIDA, P.; NOSEDA, M.; GREINER, R.; KONIETZNY, U.; WOICIECHOWSKI, A.; SOCCOL, V.; SOCCOL, C. R. Phytase produced on citric byproducts: purification and characterization. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 27, p. 267-274, 2010.

STROBEL, G. *Muscodor albus* and its biological promise. **J Ind Microbiol Biotechnol** , p. 514-522, 2006.

TADASHI, N.; SATOSHI, K.; TADANORI, Y.; HIDEHARU, A.; YOKO, K.; SEIJI, S.; KEIICHI, Y. **Phytase having a low michaelis constant for phytic acid from *Monascus***. United States Patent 6261592 (2001), disponível em: <www.freepatentsonline.com/6261592.html>. Acessado em 2014.

TURNER, B.L., LEYTEM, A.B. Phosphorus compounds in sequential extracts of animal manures: chemical speciation and a novel fractionation procedure. **Environ. Sci. Tech**, v. 38, p. 6101-6108, 2004.

ULLAH, A. H. J.; SETHUMADHAVAN, K.; MULLANEY, E. J. Unfolding and Refolding of *Aspergillus niger* PhyB Phytase: Role of Disulfide Bridges. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 8179–8183, 2008.

VOHRA, A.; SATYANARAYANA, T. Phytases: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. **Crit. Rev. Biotechnol**, v. 23, p. 29-60, 2003.

WOODZINSKI, R. J.; ULLAH, A. H. J. Biochemical characterization of cloned *Aspergillus fumigatus* phytase (phyA). **Adv. Appl. Microbiol**, v. 42, p. 263–302, 1996.