

**Universidade Federal de São Carlos**  
**Programa de Pós-graduação em Biotecnologia**

**Produção de Fitase por Fungos Endofíticos dos Manguezais do Estado de São Paulo**

**Lucas de Abreu Silveira**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia

**São Carlos – SP**  
**Junho 2017**

**Universidade Federal de São Carlos**  
**Programa de Pós-graduação em Biotecnologia**

**Produção de Fitase por Fungos Endofíticos dos Manguezais do Estado de São Paulo**

**Lucas de Abreu Silveira**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia

**Orientadores:** Profa. Dra. Cristiane Sanchez Farinas  
Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava

**São Carlos – SP**  
**Junho 2017**



---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Lucas de Abreu Silveira, realizada em 27/06/2017:

---

Profa. Dra. Cristiane Sanchez Farinas  
EMBRAPA

---

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa  
UFSCar

---

Profa. Dra. Mayerlenis Jiménez Rojas  
UFSCar

***Dedico este trabalho aos meus pais por todo amor, preocupação, dedicação e incentivo em todos os momentos da minha vida;***

***Aos meus irmãos, Erick e Letícia;***

***Obrigado pelo apoio e confiança.***

***À todos vocês dedico!***

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, que esta sempre no comando;

A Profa. Dra. Cristiane Sanchez Farinas pela orientação, aprendizado, paciência e oportunidade;

Ao Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava pela orientação, confiança, aprendizado, paciência, oportunidades e conselhos;

À Universidade Federal de São Carlos – UFSCar;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – PPGBiotec;

À Comissão de Aperfeiçoamento Pessoal do Nível Superior – CAPES;

Aos colegas de laboratório;

Aos amigos pela compreensão e paciência nos dias difíceis;

Ao meu irmão pelo grande suporte, conselhos e paciência;

À todos que contribuíram para esta conquista.

*“Pra trás nem pra pegar impulso!”*

*Clóvis de Barros Filho.*

## Índice

Listas de Ilustrações .....	8
Listas de Tabelas.....	9
<b>RESUMO .....</b>	<b>10</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>15</b>
1.1 Enzimas de Importância Industrial .....	15
1.2 Fitase .....	15
1.3 Micro-organismos Produtores de Fitase .....	19
1.4 Fermentação em Estado Sólido (FES).....	21
1.4.1 Temperatura.....	21
1.4.2 pH .....	22
1.4.3 Umidade.....	22
1.4.4 Substrato .....	23
1.5 Produção de Fitase por FES.....	23
1.6 Micro-organismos Endofíticos .....	25
1.7 Fungos Endofíticos de Manguezais .....	26
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
2.2 Objetivo geral .....	27
2.3 Objetivos específicos.....	27
<b>3 Materiais e Métodos.....</b>	<b>27</b>
3.1 Seleção para Fitase.....	27
3.2 Preparo do inóculo para a fermentação.....	28
3.3 Produção de Fitase em FES .....	28
3.4 Diálise do extrato bruto .....	29
3.5 Atividade Fitásica.....	29
3.6 Determinação da atividade da fitase usando as velocidades iniciais de liberação de fosfato .....	32
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>33</b>
4.1 Seleção em placa.....	33
4.2 Produção e Atividade Fitásica .....	37
4.3 Análise da produção de fitase com farelo de trigo como substrato .....	40

4.4	Efeito do indutor na atividade de fitase .....	42
4.5	Efeito da diálise na atividade de fitase .....	44
5	CONCLUSÕES.....	47
6	Perspectiva para Trabalhos Futuros.....	48
	REFERÊNCIAS .....	49

## Lista de Ilustrações

<b>Figura 1.</b> Reação de hidrólise do fitato pela enzima fitase.....	<b>16</b>
<b>Figura 2.</b> Estrutura do ácido fítico.....	<b>17</b>
<b>Figura 3.</b> Ilustração do complexo formado pela molécula de fitato com proteínas e cátions .....	<b>17</b>
<b>Figura 4.</b> Placas com o meio diferencial PSM ilustrando os halos de hidrólise. A – Colônia de <i>A.niger</i> C em meio PSM sem Triton X100. B - Colônia de <i>A. niger</i> C em meio PSM com Triton X100.....	<b>34</b>
<b>Figura 5.</b> Exemplos de colônias de fungos endofíticos em meio PSM. A e B – colônias que não cresceram em meio PSM. C e D colônias que cresceram em PSM, porém não houve formação de halo de hidrólise. E e F – colônias que cresceram em meio PSM e formaram halo de hidrólise.....	<b>35</b>
<b>Figura 6.</b> Reação de hidrólise do fitato de sódio pela fitase pelo tempo, com extrato do cultivo em FES por 72 h com a linhagem <i>A. awamori</i> 9(4).....	<b>38</b>
<b>Figura 7.</b> Atividade fitásica das linhagens fúngicas endofíticas: <i>A. awamori</i> 108(4), <i>A. awamori</i> 9(4), <i>A. niger</i> 56(3) e <i>A. awamori</i> 82(4) após 72 h de cultivo em FES com farelo de soja como substrato.....	<b>40</b>
<b>Figura 8.</b> Atividade de fitase pelo fungo endofítico <i>Aspergillus awamori</i> 9(4) com 72 h de cultivo FES.....	<b>41</b>
<b>Figura 9.</b> Atividade de fitase para a linhagem <i>A. awamori</i> 9(4) com 72 h de cultivo FES e adição de 1mM de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	<b>43</b>
<b>Figura 10.</b> Atividade de fitase para a linhagem <i>A. awamori</i> 9(4) com 72 h de cultivo FES sem indutor e com farelo de soja e farelo de trigo como substrato. A: atividade com extrato bruto, B: atividade com dialise do extrato.....	<b>44</b>
<b>Figura 11.</b> Atividade de fitase para a linhagem <i>A. awamori</i> 9(4) com 72 h de cultivo FES com indutor e com farelo de soja e farelo de trigo como substrato. A: atividade com extrato bruto, B: atividade com dialise do extrato.....	<b>45</b>

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Informações da literatura sobre a relação de micro-organismos produtores de fitase, modo de cultivo e substrato utilizado.....	<b>20</b>
<b>Tabela 2.</b> Exemplos na literatura ilustrando a diversidade de condições de cultivo para a produção de fitase por fungos filamentosos.....	<b>24</b>
<b>Tabela 3.</b> Diâmetro da colônia do fungo, diâmetro do halo de hidrólise e índice enzimático dos fungos filamentosos inoculados em meio diferencial PSM, mantidos à 30°C por 72 h.....	<b>36</b>
<b>Tabela 4.</b> Atividades calculadas com as diferentes metodologias testadas .....	<b>39</b>

## RESUMO

Uma fonte de grande potencial biotecnológico para a produção de enzimas são os microrganismos endofíticos. Estes microrganismos são capazes de produzir grande variedade de enzimas, dentre elas a fitase, que é responsável pela hidrólise do fitato. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de fungos endofíticos dos manguezais do estado de São Paulo para a produção de fitase. Inicialmente foi realizada uma seleção qualitativa de 33 isolados com meio diferencial PSM (*Phytase Screening Medium*), e uma segunda seleção quantitativa, em que os fungos pré-selecionados foram submetidos à fermentação em estado sólido (FES) para produção de fitase. Dentre os isolados avaliados, selecionou-se o fungo *Aspergillus awamori* 9(4), tendo este apresentado atividade de fitase de 43,98 U/100g quando submetido a cultivo FES por 72 h com farelo de soja como substrato. A fim de melhorar a produção de fitase, avaliou-se o uso de farelo de trigo como substrato, atingindo assim atividade de 82,77 U/100g, sob as mesmas condições de cultivo. Avaliou-se também o uso de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  como indutor na produção de fitase e o uso de diálise para a remoção de íons interferentes do extrato bruto na atividade de fitase. Para os experimentos realizados sem o indutor, a diálise do extrato resultou em atividades de 85,42 U/100g com farelo de soja e 55,44 U/100g com farelo de trigo. Já para os experimentos de cultivo com o indutor e em seguida dialisados resultaram em atividades de 132,35 U/100g com farelo de soja e 115,52 U/100g com farelo de trigo, indicando que o efeito do indutor é positivo na produção de fitases e que a diálise é importante para a atividade enzimática. Esses resultados indicam que o fungo endofítico do manguezal do Estado de São Paulo é promissor para a produção da enzima fitase, sendo inédito o uso de micro-organismos endofíticos para a produção desta enzima.

**Palavras-chave:** *bioprospecção, endófitos, fermentação em estado sólido, fitase.*

## ABSTRACT

*A source of great biotechnological potential for the production of enzymes are endophytic microorganisms. These microorganisms are capable of producing a wide variety of enzymes, among them phytase, which is responsible for phytate hydrolysis. The objective of this work was to evaluate the potential of endophytic fungi of the mangroves of the state of São Paulo for phytase production. Initially, a qualitative selection of 33 isolates with PSM (Phytase Screening Medium) and a second quantitative selection was carried out, in which the preselected fungi were submitted to solid state fermentation (SSF) for phytase production. Among the isolates evaluated, the fungus *Aspergillus awamori* 9(4) was selected, which presented phytase activity of 43.98 U/100g when submitted to SSF culture for 72 h with soybean meal as substrate. In order to improve phytase production, the use of wheat bran as substrate was evaluated, reaching an activity of 82.77 U/100g, under the same conditions of cultivation. The use of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  as an inducer in phytase production and the use of dialysis for the removal of interfering ions from the crude extract in phytase activity were also evaluated. For the experiments performed without the inducer, the dialysis of the extract resulted in activities of 85.42 U/100g with soybean meal and 55.44 U/100g with wheat bran. For the experiments of cultivation with the inducer and then dialysed resulted in activities of 132.35 U/100g with soybean meal and 115.52 U/100g with wheat bran, indicating that the effect of the inducer is positive in the production of Phytase and that dialysis is important for enzyme activity. These results indicate that the endophytic fungus of the mangrove of the State of São Paulo is promising for the production of phytase enzyme, being unpublished the use of endophytic micro-organisms for the production of this enzyme.*

**Key words:** *Bioprospecting, endophytes, phytase, solid state fermentation.*

## INTRODUÇÃO

Vários produtos de interesse econômico, como ácidos orgânicos, ésteres, biocombustíveis, antibióticos, vitaminas, aromas, proteínas e enzimas, podem ser obtidos a partir de processos que utilizam micro-organismos. A grande motivação para o uso de enzimas deve-se principalmente à redução do consumo energético do processo, pois enzimas atuam em condições brandas de temperatura e pressão, e à redução dos custos na etapa de purificação do produto final, pois, devido à alta seletividade e especificidade das enzimas, a formação de subprodutos indesejáveis é reduzida (VESCOVI, 2012; NELSON e COX, 2014). Fungos filamentosos são as principais fontes de enzimas industriais devido à sua excelente capacidade de produção de proteínas extracelulares (CORREA et al., 2014).

Uma fonte de grande potencial biotecnológico são os micro-organismos endofíticos, sendo os mesmos definidos por bactérias ou fungos que colonizam o interior de tecidos de plantas, sem apresentar efeito fitopatogênico no hospedeiro (OWEN e HUNDLEY, 2004), ocorrendo assim uma associação simbiótica. Vários autores têm estudado o potencial biotecnológico de fungos endofíticos, desde o controle de pragas (PAZ et al., 2007; MENDES et al., 2007), produção de substâncias antitumorais (STIERLE et al., 1993), a produção de enzimas como amilases, lipases e proteases (CORREA et al., 2014; AZEVEDO, 2014; LACAVA e AZEVEDO, 2014).

Sebastianes et al. (2013) relatam a diversidade de fungos endofíticos do manguezal do estado de São Paulo, nas cidades de Bertioga e Cananéia, sendo as espécies de mangue *Rhizophora mangle*, *Avicennia nitida*, *Laguncularia racemosa* em que foram isolados os fungos. Os manguezais cobrem aproximadamente 60 a 70% da costa tropical e subtropical do mundo. O termo manguezal se refere tanto às plantas como à comunidade associada, sendo esta última composta por bactérias, fungos, microalgas, pássaros e mamíferos (SEBASTIANES, 2010; SEBASTIANES et al. 2013). O Mangue é adaptado ao ambiente de alta salinidade, inundações das marés, ventos, altas temperaturas e solo anaeróbico, assim como os micro-organismos associados, proporcionando novas áreas de exploração do potencial biotecnológico (GOPAL e CHAUNHAN, 2006). A produção de hidrolases, como por exemplo

celulases, xilanases, lipases, lacases e fosfatases, por fungos endofíticos representa um tema bastante explorado por pesquisadores (PETRINI et al., 1992; CADWELL et al., 2000; SUNITHA, V. H. et al., 2013; SIDHU et al., 2014; KHAN et al., 2016).

Dentre as hidrolases provenientes de fungos endofíticos, não foram encontrados relatos na literatura sobre a enzima fitase, destacando a importância deste estudo. As fitases (mio-inositol hexaquisfosfato fosfatases, E.C. 3.1.3.8) catalisam a hidrólise de ácido fítico e seus sais, que geralmente produzem inositol, mio-inositol monofosfato e fosfato inorgânico (MULLANEY et al., 2000). Dentre as aplicações das fitases destaca-se o uso em ração animal e na alimentação humana, realçando o potencial de aplicação na indústria destas enzimas.

As fitases são produzidas por diversos micro-organismos, como bactérias, leveduras e fungos filamentosos, destacando-se os fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Thermomyces* e *Trichoderma*, (GARGOVA et al., 1997; VATS e BANERJEE, 2004; GREINER e KONIETZNY, 2006; SATO et al., 2014), as leveduras do gênero *Candida*, *Pichia*, *Geotrichum*, *Saccharomyces* e *Zigosaccharomyces* (OLSTORPE et al., 2009, YINGGUO et al., 2009) e as bactérias do gênero *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* e *Streptomyces* (GREINER e KONIETZNY, 2006; GHORBANI-NASRABADI et al., 2012; YU e CHEN, 2013). Com a evolução da biologia molecular, os genes de algumas fitases fúngicas têm sido clonados e expressos em micro-organismos como *Escherichia coli*, *Pichia pastoris* e *Aspergillus niger* (SUNITHA, K. et al., 1999; RODRIGUEZ et al., 2000). Dentre estes micro-organismos produtores, os fungos se destacam como fontes de fitase, pois esses geralmente produzem enzimas extracelulares, o que facilita a recuperação da enzima a partir do meio de fermentação e produção em massa. Os fungos filamentosos de maior interesse industrial incluem espécies de *Aspergillus* sp., como *A. awamori*, *A. niger*, *A. oryzae* e *A. nidulans* (VAN DER HOMBERGH et al., 1997).

O ácido fítico ou fitato é a maior forma de estoque de fósforo na maioria das plantas, grãos de cereais e sementes oleaginosas (PANDEY et al., 2001), apresentando seis grupamentos fosfato em sua cadeia carbônica. Nos alimentos, sob condições normais, encontra-se carregado negativamente,

apresentando a habilidade de formar quelatos com cátions, como cálcio, magnésio, ferro e zinco (GAIND e SINGH, 2015) e pode formar complexos com outras proteínas e enzimas, como a amilase, influenciando negativamente na digestão de nutrientes (THOMPSON e YOON, 1984). Portanto, pode ser considerado como um fator antinutricional, uma vez que animais monogástricos, como por exemplo suínos, aves e peixes, não são capazes de degradá-lo, interferindo na absorção de nutrientes. Assim, as fitases destacam-se na aplicação na produção de ração animal, uma vez que hidrolisando o fitato não haverá a formação de quelatos com cátions e complexos com outras proteínas e enzimas.

A produção de fitase pode ser feita por diferentes processos de cultivo microbiano. A fermentação submersa (FSm) é o processo de cultivo que ocorre em um meio nutritivo líquido, diferentemente da fermentação em estado sólido (FES). A fermentação em estado sólido (FES) é, por definição, um processo de cultivo que ocorre sobre uma matriz sólida possuindo umidade suficiente para o crescimento do micro-organismo e para manter seu metabolismo, sendo a matriz uma fonte de nutrientes ou simplesmente um suporte impregnado com os nutrientes, tornando-se economicamente atrativa a utilização de resíduos agroindustriais (SINGHANIA et al., 2009).

Devido à grande diversidade de micro-organismos produtores de enzimas e à deficiência de estudos de micro-organismos endofíticos produtores de fitases, este trabalho torna-se importante para a exploração do grande potencial de produção de enzimas por fungos endofíticos do manguezal do Estado de São Paulo.

## **1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1 Enzimas de Importância Industrial**

O homem faz uso de enzimas desde o início da civilização. Importantes atividades humanas em comunidades primitivas, como a produção de certos tipos de alimentos e bebidas e o curtimento de peles para a produção de couro para vestuário envolveu a utilização de atividades enzimáticas, mesmo que levadas a cabo de maneira inconsciente (POLAINA e MACCABE 2007). Embora as enzimas tenham sido exploradas desde os tempo remotos, a sua demanda aumentou tremendamente nos últimos anos (PANESAR et al. 2016). A maior parte do custo de produção de enzimas microbianas industriais se deve ao processo de cultivo e ao meio de cultivo a ser utilizado. Assim, para minimizar os custos de produção e atender à demanda e aos desafios em escala industrial, uma grande variedade de micro-organismos e de substratos agroindustriais baratos tem sido testadas a fim de garantir uma produção econômica de importantes enzimas industriais (HOELKER et al. 2004, FLORENCIO et al. 2015, SILVEIRA, E. A. et al. 2016). Dentre as enzimas estudadas, destacam-se lipases, endoglucanases, xilanases, lacases, amilases e fitases (GREINER e FAROUK, 2007; SINGH e MUKHOPADHYAY, 2012; PIROTA et al., 2013; PIROTA et al., 2016).

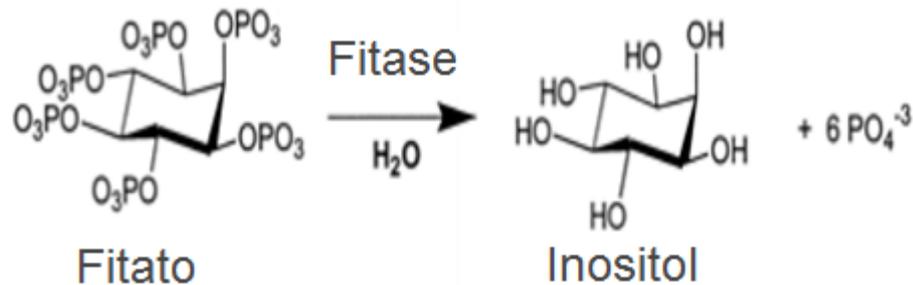
A enzima fitase tem sua importância industrial devido à aplicação em ração animal e na alimentação humana, hidrolisando o fitato e aumentando a biodisponibilidade de fosfato. Assim, torna-se relevante o estudo da produção desta enzima.

### **1.2 Fitase**

A enzima fitase tem seu primeiro estudo em 1907 pelos autores Suzuki e colaboradores, no qual descreveram a extração desta enzima do arroz, e a primeira fitase produzida comercialmente em 1994 (MULLANEY, 2000). A fitase catalisa a liberação do fosfato do fitato (mio-inositol hexaquisfosfato) formando sequencialmente, mio-inositol pentaquis-, tetraquis-, tris-, bis-, e mono-fosfatos, assim como fosfato inorgânico (Vats e Banerjee, 2004). Na

Figura 1 tem-se a reação de hidrólise do fitato gerando como produtos o inositol e 6 moléculas de fosfatos.

Figura 1. Reação de hidrólise do fitato pela enzima fitase.

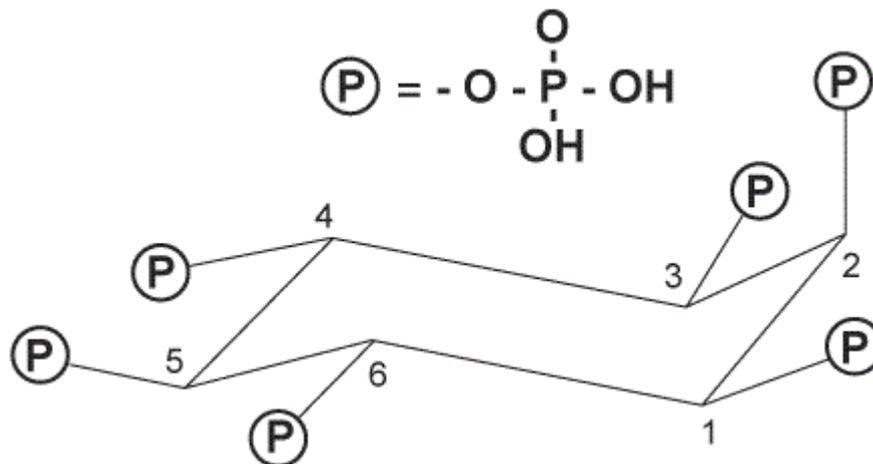


Fonte. Adaptado de MITTAL et al., 2011.

Caracterizações bioquímicas estimam que fitases tem peso molecular entre 35 e 700 kDa dependendo do micro-organismo (KUMAR et al., 2015). Zuo et al. (2010) relatam fitase de *Aspergillus ficuum* expressa em *Lactobacillus casei* apresenta peso molecular de 39,2 kDa. Ullah e Cummins (1987) determinaram a massa molecular da fitase de *Aspergillus ficuum* por análise de filtração em gel, obtendo uma massa molecular de 130 kDa.

Fitato ou ácido fítico é constituído por 6 grupamentos fosfatos ligados a molécula de seis átomos de carbonos (Figura 2) e apresenta várias funções fisiológicas importantes para as plantas durante o seu ciclo de vida, incluindo o armazenamento de fósforo e cátions que fornecem a matéria-prima para a formação das paredes celulares, após a germinação da semente (SATO, 2014).

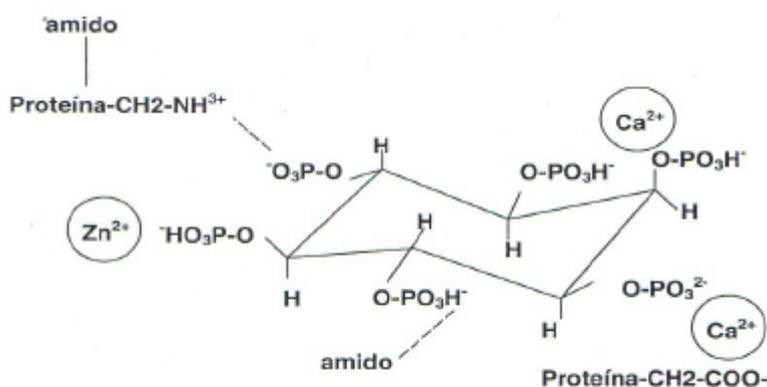
Figura 2. Estrutura do ácido fítico.



Fonte. FARIA et al., 2006.

Nos alimentos, sob condições naturais, o ácido fítico encontra-se carregado negativamente, o que lhe confere alto potencial para complexar com moléculas carregadas positivamente, como cátions ( $Zn^{+2}$ ,  $Fe^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Mg^{+2}$  e  $Ca^{+2}$ ) e proteínas, influenciando negativamente na digestão de nutrientes, sendo assim um fator antinutricional (Figura 3) (RAVINDRAN et al., 1999; COWIESON et al., 2006).

Figura 3. Ilustração do complexo formado pela molécula de fitato com proteínas e cátions



Fonte. MACHADO et al., 2014.

As fitases podem ser classificadas de acordo com seu pH ótimo. As fitases ácidas são as enzimas degradantes de fitatos com um pH ótimo em torno de 5,0 e as fitases alcalinas são enzimas degradantes de fitatos com um pH ótimo em torno de 8,0 (KONIETZNY e GREINER, 2002). E, segundo a

União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), em consulta com a IUPAC-IUB, Comissão Mista em Nomenclatura Bioquímica (JCBN), as fitases podem ser classificadas de acordo com a forma que iniciam a desfosforilação do ácido fítico em diferentes posições no anel de inositol. Listam-se três classes:

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

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

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

O fitato é fator antinutricional para animais monogástricos, como por exemplo suínos, aves e peixes, que não são capazes de degradá-lo, e interfere na absorção de nutrientes. Estudo com aves revelam que a utilização de fitase nas rações aumentam o ganho de peso e melhoram a conversão alimentar nas fases pré-inicial, de 1 a 7 dias de idade (PERNEY et al., 1993; BROZ et al., 1994; LEDOUX et al., 1998; ZHANG, Z. B. et al., 1998; NAMKUNG e LEESON, 1999, TEJEDOR et al., 2001), e na fase inicial, de 8 a 21 dias. Sendo a conversão alimentar o índice que mede a taxa de consumo de ração em um dado período de tempo pelo ganho de peso neste mesmo período de tempo.

Outro ponto importante a se considerar é a suplementação de fosforo (P) em ração para peixes pode ser um problema para o meio ambiente, visto que concentrações excessivas de P são a causa mais comum de eutrofização de rios, lagos e reservatórios (CORRELL, 1999). Autores mostram que a suplementação com fitase converte o quelato P-fitato tornando o P disponível para o peixe, e reduzindo a utilização de P como suplemento na ração, e assim, evitando o excesso deste nutriente nas águas (CAIN e GARLING, 1995; RODEHUTSCORD e PFEFFER, 1995).

### 1.3 Micro-organismos Produtores de Fitase

Fitase pode ser obtida de plantas, animais e micro-organismos, sendo que a produção de fitase por estes últimos é mais promissora, devido sua rápida reprodução e alta produtividade. Vários autores relatam a produção de fitase por diversos micro-organismos. Na Tabela 1, têm-se exemplos de micro-organismos produtores de fitase, o substrato utilizado na produção e o modo de cultivo. Nota-se que, para a produção de fitase utilizando bactérias e fungos leveduriformes, o modo de cultivo é preferencialmente a fermentação submersa (FSm) e como substrato fontes de carbono simples, como glicose e maltose. Já para fungos filamentosos, o modo de cultivo mais utilizado é a fermentação em estado sólido (FES), sendo que este tipo de cultivo reproduz o habitat natural de fungos e como substratos são utilizados resíduos agroindustriais como farelo de trigo e farelo de arroz. Dentre os fungos filamentosos produtores de fitase, destaca-se os fungos do gênero *Aspergillus* sp. Shieh e Ware (1968) estudaram atividade de fitase em mais de 2000 micro-organismos isolados, sendo que atividade extracelular de fitase foi observada em apenas 30, sempre em fungos filamentosos, sendo 28 pertencentes ao gênero *Aspergillus* sp.

Tabela 1. Informações da literatura sobre a relação de micro-organismos produtores de fitase, modo de cultivo e substrato utilizado.

<b>Micro-organismo</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Substrato</b>	<b>Referência</b>
<b>Bacteria</b>			
<i>Bacillus</i> sp.	FSm	Maltose	Choi et al. (1999)
<i>Enterobacter</i> sp.	FSm	Meio complexo a base de glicose	Yoon et al. (1996)
<i>Escherichia coli</i>	FSm	Meio complexo a base de glicose	Sunitha, K. et al. (1999)
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	FSm	Glicose	Sreeramulu et al. (1996)
<b>Fungo leveduriforme</b>			
<i>Arxula adenivorans</i>	FSm	Meio complexo a base de glicose/galactose	Sano et al. (1999)
<i>Hansenula polymorpha</i>	FSm	Glicose	Mayer et al. (1999)
<i>Schwanniomyces castellii</i>	FSm	Farelo de trigo, farinha de algodão	Segueilha et al. (1993)
<b>Fungo</b>			
<i>A. ficuum</i>	FES	Farelo de Canola	Ebune et al. (1995)
<i>A. niger</i>	Fsm/FES	Farelo de Trigo	Papagianni et al. (1999)
<i>A. niger</i>	FES	Farelo de Trigo	Gupta et al. (2014)
<i>A. niger</i>	FES	Farelo de arroz	Lima et al. (2014)
<i>A. oryzae</i>	FES	Farelo de arroz	Lima et al. (2014)
<i>Rhizomucor pusillus</i>	FES	Farelo de Trigo	Chadha et al. (2004)
<i>Aspergillus</i> sp. L117	FSm	Amido	Lee et al. (2005)
<i>Aspergillus</i> sp. 307	FSm	Amido	Gargova et al. (1997)
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>microsporus</i>	FSm	Farinha de centeio (meio Khanna)	Sato (2014)
<i>Penicillium purpurogenum</i>	FES	Espiga de milho:farelo de milho (1:1)	Awad et al. (2014)
<i>Hypocrea lixii</i> SURT01	FES	Cevada	Thyagarajan et al. (2014)
<i>Hypocrea lixii</i> SURT01	FSm	Amido	Thyagarajan et al. (2014)

Adaptado de Pandey et al. (2001)

Fsm. Fermentação Submersa

FES. Fermentação em Estado Sólido

## **1.4 Fermentação em Estado Sólido (FES)**

A fermentação em estado sólido (FES) é definida como um cultivo que envolve uma matriz sólida e é realizado em ausência ou quase ausência de água não absorvida pela matriz. A matriz sólida pode ser a fonte de nutrientes ou simplesmente impregnada pelos nutrientes adequados que permitem o desenvolvimento dos micro-organismos. A FES reproduz o habitat natural do fungo filamentosos, apresentando vantagem na produção de enzimas, e assim, aumentando a produtividade em comparação com a fermentação submersa. Além disso, as enzimas produzidas por FES são menos suscetíveis a problemas de inibição por substrato e são mais estáveis em relação às mudanças de temperatura ou pH (ACUNA-ARGUELLES et al., 1995; SAQIB et al., 2010). No entanto, apesar destas vantagens, a aplicação de FES nos processos industriais foi atrasada devido às dificuldades envolvidas no monitoramento e controle dos vários parâmetros do processo. Enquanto em FSm o meio pode ser considerado homogêneo, em FES, a existência de gradientes de umidade e temperatura pode afetar negativamente a produção de metabólitos. Por esta razão, a maioria dos processos de produção de enzimas industriais em grande escala utilizam atualmente FSm (SINGHANIA et al., 2010).

Além de utilizar os resíduos agrícolas de baixo custo, a FES aumenta a viabilidade econômica do processo e, também, resolve o problema de sua eliminação, que de outra forma causaria poluição (SINGHANIA et al., 2009). A eficiência de produção de enzima por FES é dependente tanto do micro-organismo utilizado como de fatores como temperatura, pH, umidade e substrato.

### **1.4.1 Temperatura**

O crescimento do micro-organismo se dá com a liberação de calor no meio. Com o aumento excessivo da temperatura as proteínas podem ser desnaturadas, perdendo sua função. O cultivo em FES ocorre na ausência ou quase ausência de água não absorvida pela matriz. Assim, é difícil de dissipar o calor produzido durante o processo, podendo causar problemas na produção

de enzima. Por outro lado, em baixas temperaturas, os micro-organismos não se desenvolvem, mantendo o metabolismo baixo, acarretando em baixa produção de enzimas e produtos secundários.

A caracterização de cada micro-organismo em particular, em termos da influência da temperatura na cinética de crescimento e formação do produto, é essencial para o desenvolvimento de bioprocessos em FES (FARINAS et al., 2014).

#### **1.4.2 pH**

A atividade enzimática é fortemente influenciada pelo pH, uma vez que os sítios ativos de enzimas são constituído de grupos iônicos carregados. A mudança de pH pode alterar a conformação da enzima, afetando sua função e, conseqüentemente, sua atividade. Dito isto, o pH do meio de cultivo é essencial para o desenvolvimento do micro-organismo e, conseqüentemente, para a produção de enzimas.

Como tentativa de amenizar o efeito de uma variação brusca do pH, utilizam-se substratos com boa capacidade tamponante ou a adição de soluções-tampão durante a etapa de umidificação do substrato (DEL BIANCHI et al., 2001).

#### **1.4.3 Umidade**

A umidade do meio de cultivo é um dos principais fatores que influencia na FES. O substrato com a umidade adequada deverá apresentar condições para que haja transferência de nutrientes e oxigênio para o fungo. Portanto, um alto teor de umidade diminui as trocas gasosas, enquanto um baixo teor de umidade prejudica o crescimento do micro-organismo em questão (RAGHAVARAO et al., 2003; OLIVEIRA JR, 2014).

#### **1.4.4 Substrato**

Uma das grandes vantagens de se fazer um cultivo em FES é a possibilidade de usar como substrato os resíduos agroindustriais, que são geralmente produzidos em grande quantidade pelas indústrias, favorecendo o meio ambiente, e não apresentam grande valor de mercado, como por exemplo o farelo de trigo, farelo de soja, bagaço de cana-de-açúcar etc. (RAIMBAULT, 1998; FLORENCIO et al., 2015).

Essa matriz sólida pode ser ou a fonte de nutrientes ou simplesmente um suporte impregnado pelos nutrientes apropriados que permitem o desenvolvimento dos micro-organismos (SINGHANIA et al., 2009).

#### **1.5 Produção de Fitase por FES**

A fermentação em estado sólido tem sido empregada na produção de fitase por vários autores e, com isso, várias metodologias de produção e análise são utilizadas. A Tabela 2 apresenta alguns exemplos de produção de fitase por cultivo em fermentação em estado sólido da literatura, ilustrando a diversidade de substratos utilizados, a temperatura de cultivo, pH, umidade inicial do substrato, tempo de cultivo e a atividade de fitase sob essas condições.

Tabela 2. Exemplos na literatura ilustrando a diversidade de condições de cultivo para a produção de fitase por fungos filamentosos.

Fungo	Substrato	Temperatura (°C)	pH	Umidade inicial	Tempo (h)	Atividade (U/g)	Referência
<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de Trigo	30	4,5	66%	120	112,1	Gupta et al. 2014
<i>A. niger</i>	Farelo de arroz	30	*	75%	36	41,1	Lima et al. 2014
<i>A. oryzae</i>	Farelo de arroz	30	*	75%	96	36,9	Lima et al. 2014
<i>Rhizomucor pusillus</i>	Farelo de Trigo	50	6,0	66%	48	7,05	Chadha et al., 2004
<i>Penicillium purpurogenum</i> GE1	Farelo de milho:corn cob (1:1)	27	8,0	66%	120	444	Awad et al., 2014
<i>A. niger</i> CFR335	Farelo de trigo:Farelo de arroz:Torta de amendoim (2:1:1)	30	7,0	60%	120	76	Gunashree e Venkateswaran (2015)
<i>A. ficuum</i> SGA01	Farelo de trigo:Farelo de arroz:Torta de amendoim (2:1:1)	30	7,0	60%	120	51	Gunashree e Venkateswaran (2015)
<i>A. flavus</i>	Torta de mostarda	30	6,0	58%	96	90,7	Gaind e Singh (2015)

\*não informado pelo autor.

Gunashree e Venkateswaran (2015) utilizaram como substrato mistura de farelo de trigo, farelo de arroz e torta de amendoim (2:1:1) conseguindo atividades de fitase de 76 U/g para *A. niger* CFR335 e 51 U/g para *A. ficuum* SGA01, com 120 horas de cultivo em frascos a 30 °C e 60% de umidade inicial do substrato, solução para umidificar contendo: 1% m/v de sacarose, 0,5% m/v de extrato de levedura, 0,005% m/v dos sais NaCl, MgCl<sub>2</sub>, MnSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub> e CaCl<sub>2</sub>, 0,010% m/v do sal FeSO<sub>4</sub> e como indutor 0,015% m/v de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e pH 7,0.

Gaind e Singh (2015) utilizaram torta de mostarda como substrato, conseguindo atividades de aproximadamente 90 U/g, para *A. flavus*, com 96 horas de cultivo em frascos a 30°C e 58% de umidade inicial do substrato, solução para umidificar contendo: 0,5% de NO<sub>3</sub>NH<sub>4</sub>, 0,1% de MgSO<sub>4</sub> e 0,1% de NaCl e pH 6,0.

Chadha et al. (2004) relatam atividade fitásica de 705 U/100g para *Rhizomucor pusillus* com farelo de trigo de substrato, 5 g de substrato e 10 mL de meio para umidificar, contendo 0,1% de asparigina, 0,3% de infusão de milho, 0,05% de KCl, 0,05% de MgSO<sub>4</sub>, 0,001% de FeSO<sub>4</sub>, 0,001% de MnSO<sub>4</sub> pH 6,0 a 50°C e 48 horas de cultivo.

Gunashree e Venkateswaran (2015) quantificaram o fosfato liberado no meio para a atividade de fitase utilizando a mistura de acetona, 5 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 10mM molibdato de amônio (2:1:1 v/v/v), em seguida adicionando 1M ácido cítrico e realizando a leitura em espectrofotômetro a 355 nm. Gaiind e Singh (2015), utilizaram a solução de reagente heptamolibdato de amônio/vanadato de amônio para a quantificação de fosfatos, realizando a leitura a 415 nm. Já Chadha et al. (2004), quantificaram o fosfato utilizando a solução de 0,76 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2,5% ácido ascórbico e 0,06% molibdato de amônio, e após 20 min à 50°C a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 820 nm.

## **1.6 Micro-organismos Endofíticos**

Segundo Mendes e Azevedo (2007), define-se como micro-organismo endofítico todo aquele que pode ou não crescer em meio de cultura, ou seja, cultivável ou não, e que habita o interior de tecidos e órgãos vegetais sem causar prejuízos ao seu hospedeiro. Tais micro-organismos podem ser divididos em dois tipos: Tipo I, os que não produzem estruturas externas à planta; e Tipo 2, os que produzem estruturas externas à planta.

Estima-se que somente 1% das espécies de bactérias e menos de 7% das espécies de fungos sejam conhecidas no mundo (HAWKSWORTH, 1991; GUNATILAKA, 2006), o que sugere que exista um grande potencial de pesquisa para esses grupos de micro-organismos. Dentre as pesquisas realizadas sobre micro-organismos endofíticos, tem-se o uso para controle biológico (LACAVA e AZEVEDO, 2013; FENG TIAN et al., 2014; PARK et al., 2015; XIANG et al., 2016; PALAZZINI et al., 2016;), produção de moléculas bioativas, como antibióticos (SEBASTIANES 2012a, 2012b; TRAPP et al., 2015; REZGUI et al., 2016;) e antitumorais (GARYALI et al, 2014; NICOLETTI e FIORENTINO, 2015), produção de hidrocarbonetos (SHAW et al., 2015) e produção de enzimas (PETRINI et al., 1992; CADWELL et al., 2000; SUNITHA,

V. H. et al., 2013; SIDHU et al., 2014; KHAN et al., 2016;). Dentre as enzimas estudadas, tem-se as amilases, lipases, lacases, fosfatases e endoglucanases.

Segundo Correa et al. (2014), fungos filamentosos são as principais fontes de enzimas industriais devido à sua excelente capacidade de produção de proteínas extracelulares. Sendo assim, fungos endofíticos tornam-se interessante fonte de pesquisa e produção de biomoléculas.

### **1.7 Fungos Endofíticos de Manguezais**

Os manguezais são um bioma costeiro tropical que está localizado na zona de transição entre a terra e o mar, onde a vegetação é dominada por um grupo particular de espécies de plantas (ZHOU et al., 2006). Embora o ecossistema de mangue seja rico em diversidade microbiana, menos de 5% das espécies presentes foram descritas; em muitos casos, nem seu papel ecológico nem seu potencial biotecnológico são conhecidos (THATOI et al., 2013).

Bioprospecção de produtos de interesse com fungos endofíticos de mangues tem sido realizada no mundo. Na China pesquisadores produziram alcaloides, derivados de altenusin, inibidores da fosfatase MptpB de *Mycobacterium tuberculosis* de fungos endofíticos de mangue (LI et al., 2013; LIU, Y. et al., 2016; LIU, Z. et al., 2016; CUI et al., 2017). Sebastianes et al. (2012b) relatam a produção de ácido 3-hidroxi-propinóico, um agente antibacteriano, proveniente de uma linhagem fúngica endofítica do gênero *Diaporthe phaseolorum*; isolada de manguezal do estado de São Paulo.

O mangue apresenta uma grande biodiversidade de espécies, tanto vegetal e animal como de micro-organismos. Sebastianes et al. (2013) relatam a biodiversidade de fungos endofíticos do mangue do estado de São Paulo. Segundo Gopal e Chaunhan (2006), os micro-organismos associados ao mangue são adaptados ao ambiente de alta salinidade, inundações das marés, ventos, altas temperaturas e solo anaeróbico, o que proporciona grandes áreas de exploração do potencial biotecnológico.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.2 Objetivo geral**

O objetivo deste trabalho foi estudar a produção de fitase a partir de linhagens endofíticas de fungos isolados de manguezais dos municípios de Bertioiga e Cananéia no estado de São Paulo; utilizando o cultivo por fermentação em estado sólido (FES).

### **2.3 Objetivos específicos**

Para alcançar o objetivo geral; os objetivos específicos foram:

- Realizar a bioprospecção de fungos endofíticos para produção de fitase utilizando a metodologia de seleção em placas;
- Validar os resultados da seleção em placa por meio do cultivo por fermentação em estado sólido (FES) utilizando farelo de soja como substrato;
- Avaliar o efeito do substrato na produção de fitase por FES utilizando farelo de trigo;
- Avaliar o efeito do indutor  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  na produção de fitase por FES;
- Avaliar o efeito da diálise na atividade de fitase.

## **3 Materiais e Métodos**

### **3.1 Seleção para Fitase**

Um total de 33 linhagens de fungos endofíticos isolados de manguezais (SEBASTIANES, 2010; SEBASTIANES 2013) e depositados na coleção de culturas microbianas do Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas – LaMiB, Departamento de Morfologia e Patologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFSCar, foram submetidos a seleção em placas para se observar a formação de halo incolor de hidrólise, indicando assim a hidrólise do fitato pelas colônias fúngicas produtores de fitase. As linhagens foram inoculadas em meio

PSM (“Phytate Screening Medium”), segundo Howson e Davis (1983) modificado, a 30°C, por 72 horas. Após este período, mediu-se o diâmetro da colônia e o diâmetro do halo de hidrólise. O PSM modificado é constituído de: Fitato de Sódio (5 g/L), Sacarose (10 g/L), Triptona (3 g/L), extrato de levedura (2 g/L), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2 g/L), KCl (0,5 g/L), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (1 g/L), MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (0,01 g/L), FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,018 g/L), CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (7 g/L), Triton X100 (1 ml/L) e agar (15 g/L). O fungo *A. niger* C foi submetido ao mesmo teste em PSM como controle, para formação de halo de hidrólise.

Os fungos produtores de halo de hidrólise foram submetidos a uma segunda seleção/confirmação para produção de fitase por fermentação em estado sólido, conforme descrito no item 3.3.

### 3.2 Preparo do inóculo para a fermentação

As linhagens foram inoculadas em placas de Petri contendo *Potato Dextrose Agar* (PDA) e colocadas em estufa à 30°C por 4 dias. Após 4 dias, foi realizada a coleta de esporos realizando a raspagem com tampão acetado de sódio 0,2M pH5,5. Esta solução de esporos passou por contagem para determinação do volume correto a ser adicionado para a fermentação contendo 10<sup>7</sup> esporos por grama de substrato. A contagem foi realizada por meio da câmara de Neubauer em microscópio óptico, e o cálculo do volume foi realizado seguindo a equação:

$$V_i = \frac{10^7 \text{ (esporos por grama de substrato)} \times \text{Massa substrato (em gramas)}}{25 \times 10^4 \times \text{diluição} \times \text{média contagem}}$$

### 3.3 Produção de Fitase em FES

A segunda etapa de seleção das linhagens fúngicas foi realizada com a produção da enzima fitase por fermentação em estado sólido (FES); segundo Gaiind e Singh (2015) com modificações. Brevemente, 10 g de farelo de soja foram pesados em frascos Erlenmeyer de 250 mL e umedecidos a 60%, com 6 mL de solução 1% (m/v) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5% (m/v) MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,1% (m/v) NaCl

e 1mM de indutor, neste caso o indutor utilizado foi  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Esse meio foi inoculado com  $10^7$  esporos do fungo por grama de substrato e mantidos a  $30^\circ\text{C}$  por 72 horas. Após o cultivo, a extração da fitase do meio foi feita pela adição de tampão 0,2 M acetato de sódio pH 5,5, na proporção de 5 mL para cada grama de substrato e colocado em shaker com agitação de 200 rpm por 1 h. O material foi centrifugado a 10000 rpm por 15 min sob temperatura de  $4^\circ\text{C}$  e o sobrenadante foi armazenado a  $-18^\circ\text{C}$  para futuras análises.

### **3.4 Diálise do extrato bruto**

Os extratos foram dialisados com a utilização de tubos Vivaspin 20 mL, geralmente utilizado para concentração de amostras. O tamanho do poro da membrana dos tubos utilizados foi de 10 kDa.

Foi colocado no tubo o volume de 15 mL de extrato bruto e centrifugado por 10 min em uma rotação de 3000 rpm a  $4^\circ\text{C}$ . Com isto, moléculas com tamanho menor que o poro da membrana foram descartadas. Em seguida, o volume da solução concentrada resultante foi ajustado para o volume inicial de 15 mL com tampão acetado de sódio 0,2M pH 5,5. Assim, a concentração inicial de enzimas do extrato bruto é igual à concentração do extrato dialisado, sendo pequenas moléculas de interferentes e contaminantes eliminadas.

### **3.5 Atividade Fitásica**

Foram avaliadas cinco metodologias para a análise de atividade de fitase, para então selecionar a metodologia que apresentasse maior atividade de fitase para ser utilizada no trabalho. As metodologias testadas foram: Murphy e Riley (1962); Gulati et al. (2007), Rocky-Salimi et al. (2016), Greiner et al. (2013) e Harland e Harland (1980), descritas a seguir.

#### **3.5.1 Metodologia de Murphy e Riley (1962)**

Este método analisa a quantidade de fosfato liberado em solução. Assim, fez-se a reação com 250  $\mu\text{L}$  de solução de fitato de sódio 1% m/v (Sigma) em tampão 0,2 M acetato de sódio pH 5,5, adicionado de 250  $\mu\text{L}$  de extrato

enzimático por 30 min a 50 °C. A reação foi parada com adição de 500 µL de solução de ácido tricloroacético 15% m/v. Para reação colorimétrica adicionou-se 0,04 mL de ácido cítrico 2,2% m/v, 0,4 mL de ácido ascórbico 7% m/v e 0,4 mL de reagente misto (25mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mol/L, 5,5 mL de molibdato de amônio 9,5 % m/v e 0,6 mL de tartarato de antimônio 3,24% m/v), agitou-se e deixou por 15 min a 50 °C. Para cálculo de atividade enzimática uma curva de calibração foi construída com padrões de fosfatos com o sal KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Mediu-se a absorbância a 880nm. A atividade foi expressa como quantidade de µmol de fosfato liberado no meio por minuto sob as condições do ensaio (U/g de substrato).

### **3.5.2 Metodologia de Gulati et al. (2007)**

Reação realizada com 50 µL de fitato de sódio 1 % m/v (Sigma) em tampão 0,2 M acetato de sódio pH 5,5, adicionado de 50 µL de extrato enzimático por 30 min a 50°C. A reação foi parada com adição de 100 µL de solução de ácido tricloroacético 15% m/v. Para reação colorimétrica adicionou-se 900 µL de solução 0,76 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10% m/v ácido ascórbico e 2,5 % m/v de molibdato de amônio na proporção 3:1:0,5. Essa solução foi então incubada por 20 min a 50 °C. Para cálculo de atividade enzimática uma curva de calibração foi construída com padrões de fosfatos com o sal KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Mediu-se a absorbância a 820nm. A atividade foi expressa como quantidade de µmol de fosfato liberado no meio por minuto sob as condições do ensaio (U/g de substrato).

### **3.5.3 Metodologia de Rocky-Salimi et al. (2016)**

Reação realizada com a mistura de 400 µL de solução de fitato de sódio (Sigma) 0,1% m/v em tampão Tris-HCl pH 7,0 e 100 µL de extrato enzimático por 30 min a 37°C. Quantificação de fosfato liberado pelo método de Heinonen e Lahti (1981) modificado, sendo adicionado 2 mL de uma solução formada pela mistura de acetona, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5 M e molibdato de amônio 10mM (2:1:1 v/v) agitou-se e adicionou em seguida 140 µL de ácido cítrico 1M, agitando novamente. Mediu-se a absorbância a 355 nm. Para cálculo de atividade enzimática uma curva de calibração foi construída com padrões de fosfatos

com o sal  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , com concentrações de fosfato de 5, 20, 50, 100, 200, 350 e 700 nmol. A atividade foi expressa como quantidade de  $\mu\text{mol}$  de fosfato liberado no meio por minuto sob as condições do ensaio (U/g de substrato).

#### **3.5.4 Metodologia de Greiner et al. (2013)**

Atividade de fitase foi feita em ensaios de hidrólise de fitato, conforme Greiner et al. (2013), em que a atividade foi determinada a 37 °C em 350  $\mu\text{L}$  de tampão 0,2 M acetato de sódio pH 5,5 contendo 0,165% m/v de fitato de sódio (Sigma). A reação enzimática teve início com a adição de 10  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático, mantida por 30 min para análises. A quantificação de fosfato liberado foi realizada pelo método de Heinonen e Lahti (1981) modificado, sendo adicionado 1,5 mL de solução de acetona,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2,5M e molibdato de amônio 10mM (2:1:1 v/v) agitou-se e em seguida adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de ácido cítrico 1M, agitando novamente. Mediu-se a absorbância a 355 nm. Para cálculo de atividade enzimática uma curva de calibração foi construída com padrões de fosfatos com o sal  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , com concentrações de fosfato de 5, 20, 50, 100, 200, 350 e 700 nmol A atividade foi expressa como quantidade de  $\mu\text{mol}$  de fosfato liberado no meio por minuto sob as condições do ensaio (U/g de substrato).

#### **3.5.5 Metodologia de Harland e Harland (1980)**

Atividade enzimática da fitase foi realizada em ensaios de hidrólise do substrato fitato, sendo determinada em 3,5 mL de tampão 0,2 M acetato de sódio pH 5,5 contendo 0,165% m/v de fitato de sódio (sigma), reação realizada a 37°C. A reação enzimática teve início com a adição de 500  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático diluído 5 vezes, mantida por 30 min para análises. A quantificação de fosfato liberado foi realizada pelo método de Harland e Harland (1980) modificado. A reação enzimática foi parada com a adição de 200  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético 10% m/v, e adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  e 500  $\mu\text{L}$  do reagente de Taussky-Schoor, mediu-se absorbância em 660 nm imediatamente após agitação. O reagente de Taussky-Schoor foi preparado diluindo 1 g de molibdato de amônio em 10 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5 M, em seguida diluiu-se com água destilada até volume de 70 mL. Adicionou-se a esta solução 5 g de sulfato

ferroso heptahidratado e completou-se o volume para 100 mL com água destilada. Para cálculo de atividade enzimática uma curva de calibração foi construída com padrões de fosfatos com o sal  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , com concentrações de fosfato de 100, 200, 300, 500 e 1000  $\mu\text{mol/L}$ . A atividade foi expressa como quantidade de  $\mu\text{mol}$  de fosfato liberado no meio por minuto sob as condições do ensaio (U/g de substrato).

### **3.6 Determinação da atividade da fitase usando as velocidades iniciais de liberação de fosfato**

As diferentes metodologias de atividade foram realizadas medindo as velocidades iniciais de liberação de fosfato a partir da hidrólise do fitato de sódio nas condições descritas anteriormente. Alíquotas foram tiradas do meio reacional em diferentes tempos 0, 10, 20, 30, 40 e 50 min. A quantificação da atividade foi realizada considerando a inclinação relativa a faixa linear de formação do produto com o tempo, usando a equação:

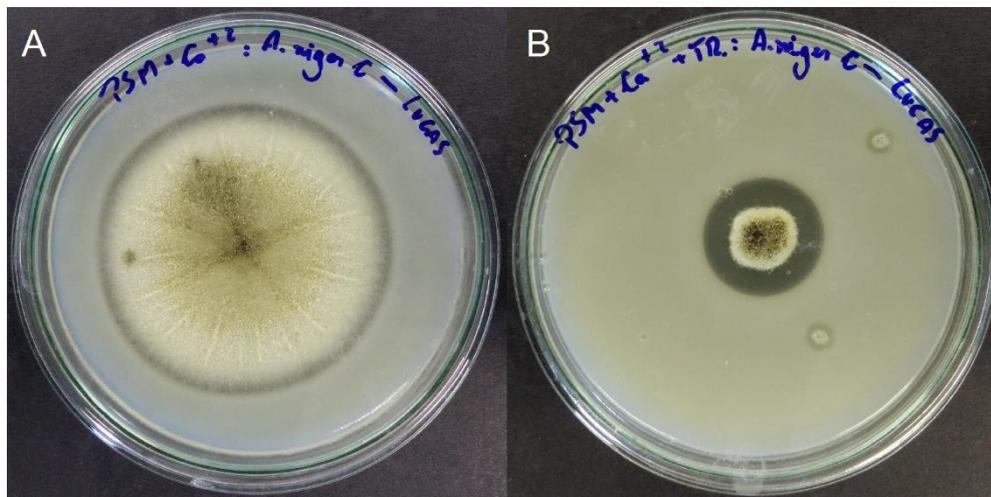
$$\text{Atividade}(U/g) = \frac{\text{coeficiente linear } (\mu\text{mol}/L \times \text{min}) \times \text{vol reator}(L) \times \text{Diluição}}{\text{vol de extrato enzimático}(mL)} \times \frac{50 \text{ mL (sol extração)}}{10 \text{ g (substrato)}}$$

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Seleção em placa

A seleção em placa foi realizada em triplicata as 33 linhagens endofíticas utilizando o meio de cultura diferencial PSM, constituído de Fitato de Sódio (5 g/L), Sacarose (10 g/L), Triptona (3 g/L), extrato de levedura (2 g/L),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (2 g/L), KCl (0,5 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1 g/L),  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0,01 g/L),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,018 g/L),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (7 g/L), Triton X100 (1 ml/L) e agar (15 g/L). Dentre as linhagens testadas temos os gêneros: *Aspergillus* sp., *Hypocrea* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Phomopsis* sp., *Diaporthe* sp. e *Diaporthales* sp.. A princípio observou-se que algumas colônias tiveram crescimento rápido, porém com formação de halo de hidrólise pequeno ou quase inexistente. Como solução optou-se por adicionar o surfactante Triton X100 ao meio diferencial PSM, causando a inibição da expansão da colônia do fungo filamentoso, sem impedir a liberação das enzimas, como observado por Fang et al. (2010). O surfactante em concentrações baixas pode desestabilizar a membrana plasmática do fungo a ponto de inibir o seu crescimento rápido, ademais, pode facilitar a secreção de enzimas pelo micro-organismo. A Figura 4 ilustra o crescimento do fungo *A. niger* com Triton X100 (B) e sem Triton X100 (A).

Figura 4. Placas com o meio diferencial PSM ilustrando os halos de hidrólise. A – Colônia de *A.niger* C em meio PSM sem Triton X100. B - Colônia de *A. niger* C em meio PSM com Triton X100.



A Figura 5 ilustra exemplos de colônias que não cresceram (A e B); colônias que cresceram, porém não formaram halo de hidrólise (C e D) e colônias que cresceram e formaram halo de hidrólise (E e F), quando submetidas ao meio diferencial PSM. A relação do tamanho da colônia e do tamanho do halo das linhagens de fungos utilizadas quando submetidas ao meio diferencial PSM está apresentada na Tabela 3.

Figura 5. Exemplos de colônias de fungos endofíticos em meio PSM. A e B – colônias que não cresceram em meio PSM. C e D colônias que cresceram em PSM, porém não houve formação de halo de hidrólise. E e F – colônias que cresceram em meio PSM e formaram halo de hidrólise.

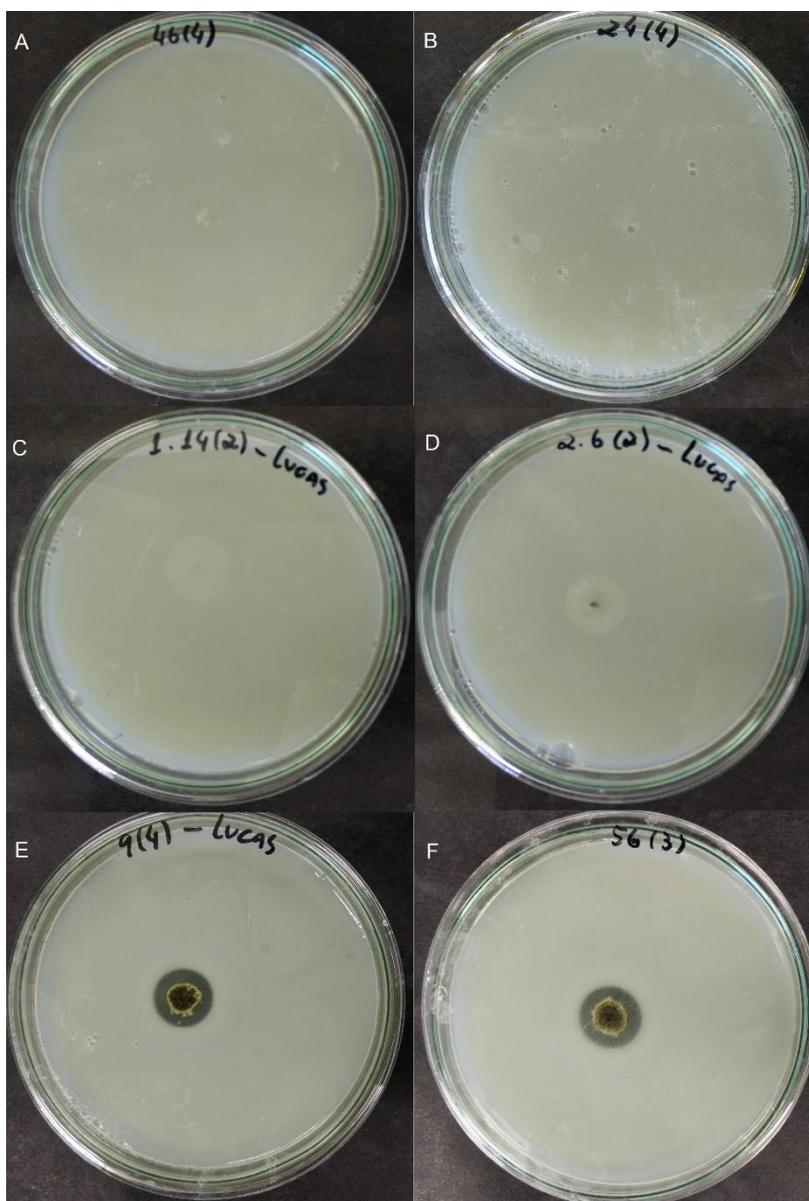


Tabela 3. Diâmetro da colônia do fungo, diâmetro do halo de hidrólise e índice enzimático dos fungos filamentosos inoculados em meio diferencial PSM, mantidos à 30°C por 72 h.

<b>Fungo</b>	<b>Diâmetro da Colônia (cm)</b>	<b>Diâmetro do Halo (cm)</b>	<b>Índice Enzimático*</b>
<i>Aspergillus niger</i> 56(3)	0,93 ± 0,06	1,63 ± 0,06	1,75 ± 0,06
<i>Aspergillus awamori</i> 82(4)	0,90 ± 0,06	1,60 ± 0,06	1,78 ± 0,06
<i>Aspergillus awamori</i> 108(4)	0,97 ± 0,06	1,77 ± 0,06	1,83 ± 0,06
<i>Aspergillus awamori</i> 9(4)	0,90 ± 0,06	1,57 ± 0,06	1,74 ± 0,06
<i>Hypocrea koningii</i> 44(4)	0,83 ± 0,06	0	0
<i>Hypocrea lixii</i> 1.16(2)	1,63 ± 0,06	0	0
<i>Hypocrea lixii</i> 1.14(2)	1,67 ± 0,06	0	0
<i>Hypocrea lixii</i> 12.6(2)	1,83 ± 0,06	0	0
<i>Hypocrea lixii</i> 68(4)	1,87 ± 0,06	0	0
<i>Hypocrea lixii</i> 2.6(2)	1,60 ± 0,06	0	0
<i>Hypocrea lixii</i> 47(4)	1,83 ± 0,06	0	0
<i>Hypocrea virens</i> 89(3)	1,23 ± 0,06	0	0
<i>Diaporthe</i> sp 5.1(1)	0,23 ± 0,06	0	0
<i>Penicillium</i> sp 3.12(2)	1,07 ± 0,12	0	0
<i>Penicillium</i> sp 60(4)	0,47 ± 0,06	0	0
<i>Diaporthe</i> sp 57(4)	0,00	0	0
<i>Diaporthales</i> sp 2.7(2)	1,40 ± 0,10	0	0
<i>Hypocrea koningii</i> 36.3(1)	1,03 ± 0,15	0	0
<i>Penicillium minioluteum</i> 24(4)	0,00	0	0
<i>Hypocrea koningii</i> 15.15(2)	0,00	0	0
<i>Phomopsis</i> sp26.1(1)	0,13 ± 0,06	0	0
<i>Diaporthe</i> sp 44(3)	0,00	0	0
<i>Hypocrea koningii</i> 46(4)	0,33 ± 0,06	0	0
<i>Fusarium</i> sp 16.1(1)	1,60 ± 0,10	0	0
<i>Fusarium</i> sp 63.1(1)	0,90 ± 0,10	0	0
<i>Fusarium</i> sp21.5(1)	1,33 ± 0,06	0	0
<i>Fusarium</i> sp 21.1(1)	1,33 ± 0,06	0	0
<i>Fusarium</i> sp 65.3(1)	1,10 ± 0,17	0	0
<i>Hypocrea koningii</i> 15.1(2)	0,37 ± 0,06	0	0
<i>Fusarium chlamydosporum</i> 75(3)	1,30 ± 0	0	0
<i>Fusarium lateritium</i> 68.1(1)	0,20 ± 0	0	0
<i>Fusarium camptoceras</i> 90(3)	0,83 ± 0,06	0	0

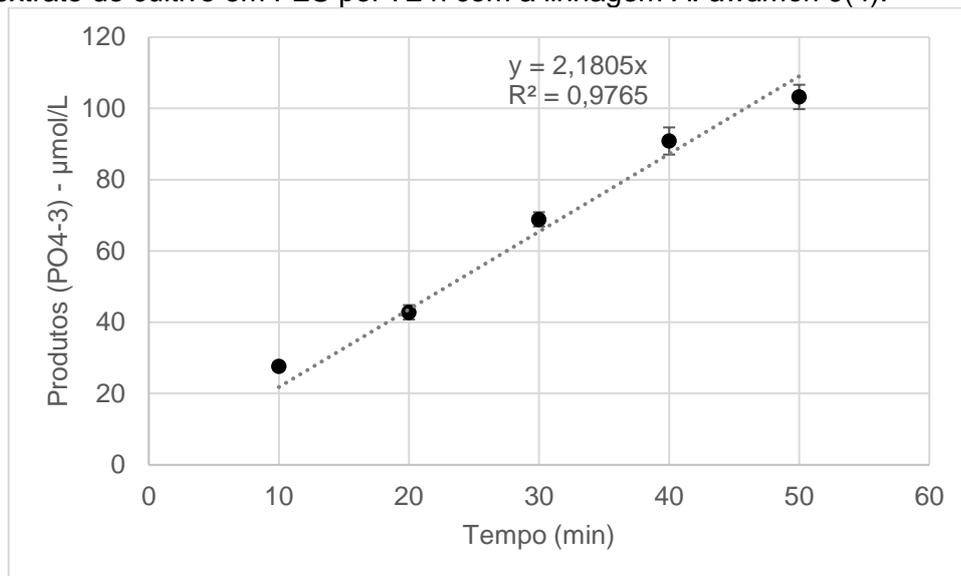
\*índice enzimático refere-se à relação entre o diâmetro do halo de hidrólise e o diâmetro da colônia do fungo

Dentre as 33 linhagens de fungos endofíticos avaliadas no teste em placas com meio de cultura diferencial PSM, 4 apresentaram halo de hidrólise, sendo os 4 fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* sp. Vários autores relatam a produção de fitase por fungos do gênero *Aspergillus* sp. (GARGOVA et al., 1997; LEE et al., 2005; UCHIDA et al., 2006; ZHANG, W. et al., 2007; COBAN e DEMIRCI, 2014). Todavia, há autores que relatam a produção de fitase por fungos do gênero *Rhizomucor* sp. (Chadha et al, 2004), *Penicillium* sp. (Awad et al., 2014) *Hypocrea* sp. (Thyagarajan et al., 2014), o que não foi observado neste trabalho. Para fins comparativos, o fungo *A. niger* C utilizado como controle, isolado da manteiga, da coleção de micro-organismos da EMBRAPA Agroindústria de Alimentos (Rio de Janeiro – RJ), foi submetido à crescimento em meio diferencial PSM, obtendo índice enzimático de 1,91 para fitase, validando a eficiência das linhagens de fungos endofíticos. Assim, as 4 linhagens de fungos endofíticos *Aspergillus* sp. apresentaram índice enzimático considerável para fitase e foram submetidos à FES e posterior análise de atividade fitásica.

#### **4.2 Produção e Atividade Fitásica**

Uma vez realizada a primeira etapa da seleção, torna-se necessária a confirmação de que a enzima produzida pelo fungo seja de fato uma fitase. A fermentação em estado sólido para a segunda seleção de fungo produtor de fitase foi realizada com farelo de soja como substrato por 72 h, e analisou-se a fitase produzida quanto ao tempo de reação seguindo as metodologias citadas. Todas as metodologias testadas apresentaram o mesmo padrão de reação, portanto, será apenas apresentado o gráfico referente à metodologia de Harland e Harland (1980), apresentado na figura 6 abaixo.

Figura 6. Reação de hidrólise do fitato de sódio pela fitase pelo tempo, com extrato do cultivo em FES por 72 h com a linhagem *A. awamori* 9(4).



Como podemos ver na Figura 6, ao decorrer do tempo de reação da enzima fitase temos que a reação enzimática foi linear durante os 50 minutos. Para fins de cálculo de atividade enzimática, deve-se manter o tempo de reação na faixa linear de geração de produtos. A curva da reação enzimática pelo tempo apresenta  $R^2$  igual à 97,65%, portanto, a reação apresenta liberação de fosfato linear entre o período de tempo utilizado para as análises. Foi levantada uma cinética de geração de produtos para cada cálculo de atividade realizado. Visto que para todas as metodologias testadas a reação enzimática manteve o mesmo padrão e linearidade no mesmo período de tempo, optou-se por realizar as atividades no tempo de 30 min de reação enzimática.

Dentre as metodologias de análise de atividade de fitase testadas somente a metodologia apresentada por Harland e Harland (1980) apresentou atividades acima de 40,0 U para 100g de substrato (Tabela 4), portanto, todas as atividades de fitase seguintes foram realizadas conforme esta metodologia.

Tabela 4. Atividades calculadas com as diferentes metodologias testadas.

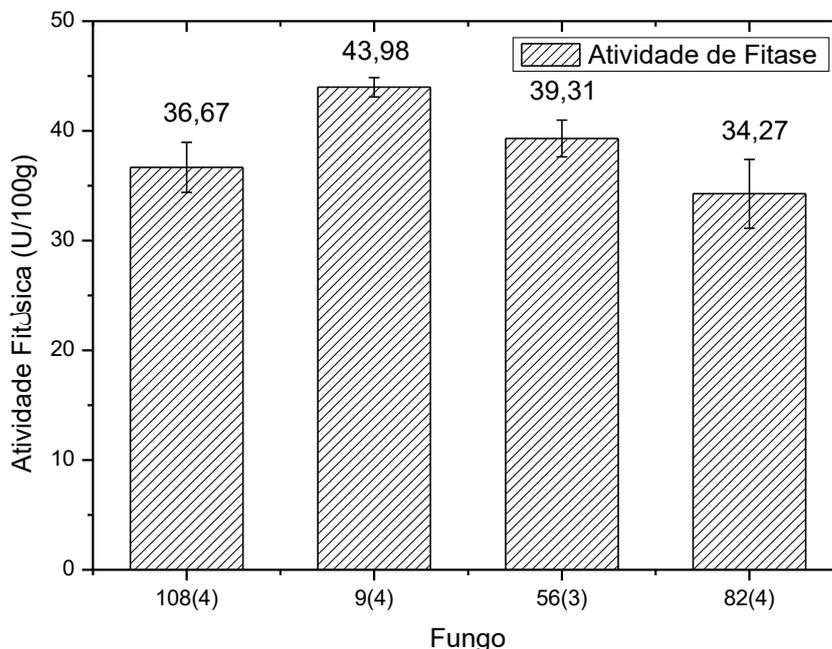
<b>Método</b>	<b>Atividade (U/100g)</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>Murphy e Riley (1962)</b>	5,41	1,01
<b>Gulati et al. (2007)</b>	4,33	0,78
<b>Rocky-Salimi et al. (2016)</b>	32,16	1,32
<b>Greiner et al. (2013)</b>	34,85	1,102
<b>Harland e Harland (1980)</b>	43,98	0,891

Nota-se na Tabela 4 que a metodologia de Murphy e Riley (1962) e a metodologia de Gulati et al. (2007) apresentaram atividades de fitase abaixo de 10 U/100 g de substrato, portanto, optou-se por outras metodologias. As metodologias de Rocky-Salimi et al. (2016) e Greiner et al. (2013) apresentaram atividades semelhantes, sendo a última levemente maior que a primeira. O que difere entre estes dois métodos é o tampão utilizado, sendo tampão Tris-HCl pH 7,0 na metodologia de Rock-Salimi et al. (2016) e tampão acetato de sódio 0,2M pH 5,5 na metodologia de Greiner et al. (2013). Esta diferença observada por ser explicada pela constituição do tampão em si como pelo pH utilizado. O pH refere-se à concentração de íons H<sup>+</sup> na solução, sendo que quanto menor o pH maior será a concentração destes íons. Assim, estes íons na solução podem interagir com as cadeias laterais dos aminoácidos do sítio ativo, e em outras partes da proteína as cadeias laterais podem ter uma participação essencial nas interações que mantêm a estrutura protéica (NELSON e COX, 2014), sendo que alterar a conformação da enzima afeta a sua atividade.

Dentre as metodologias testadas, a de Harland e Harland (1980) apresentou maior atividade de fitase para este extrato enzimático, 43,98 U/100g. Assim, optou-se por realizar as atividades de fitase seguintes seguindo somente a metodologia de Harlando e Harland (1980).

Após determinada a metodologia de atividade de fitase a ser utilizada, fez-se o cultivo FES em 72 h para os fungos pré-selecionados. Assim, as atividades de cada fungo após o período de incubação podem ser observadas na Figura 7.

Figura 7. Atividade fitásica das linhagens fúngicas endofíticas: *A. awamori* 108(4), *A. awamori* 9(4), *A. niger* 56(3) e *A. awamori* 82(4) após 72 h de cultivo em FES com farelo de soja como substrato.



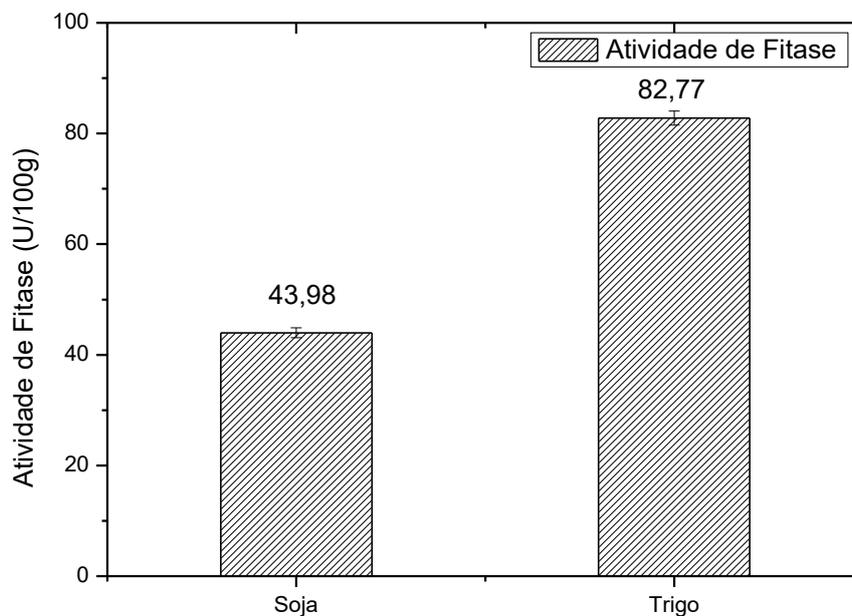
Nota-se que as 4 espécies de *Aspergillus* tiveram atividades fitásica próximas, sendo que a linhagem *A. awamori* 9(4) apresentou uma atividade ligeiramente maior que os outros, 43,98 U/100g de substrato. Portanto, optou-se por utilizar somente o fungo *A. awamori* 9(4) para experimentos futuros.

#### 4.3 Análise da produção de fitase com farelo de trigo como substrato

Visto que o cultivo com farelo de soja não apresentou uma atividade significativa, realizou-se um cultivo FES com farelo de trigo (Figura 8). Gunashree e Venkateswaran (2015) quando utilizaram como substrato somente o farelo de trigo conseguiram atividades de 6100 U/100g para *A. niger* CFR335 e 4100 U/100g para *A. ficuum* SGA01, com cultivo a 30 °C e 60% de umidade inicial do substrato. Além disso, cultivos com farelo de trigo têm sido amplamente reportados para produção de fitase em FES (PAPAGIANNI et al., 1999; BOGAR et al. 2003; AWAD et al. 2014; GUNASHREE e

VENKATESWARAN, 2008; GUPTA et al. 2014; BALA et al. 2014; CHADHA et al. 2004).

Figura 8. Atividade de fitase pelo fungo endofítico *Aspergillus awamori* 9(4) com 72 h de cultivo FES.



A utilização de farelo de trigo aumentou a atividade enzimática para 82,77 U/100g, sendo quase o dobro da atividade quando comparado com o cultivo utilizando farelo de soja (43,98 U/100g). O cultivo foi realizado sob as mesmas condições anteriores, alterando-se somente o substrato utilizado para farelo de trigo. O farelo de trigo apresenta quantidades próximas de 4,5% de ácido fítico (DINTZIS et al., 1992), enquanto o farelo de soja apresenta quantidade de 1,3% ácido fítico (SCHAEFER, 1986). Estas maiores quantidades de ácido fítico presente no farelo de trigo atuam como indutores na produção da enzima fitase, contribuindo para a maior atividade de fitase apresentada anteriormente quando comparada com o uso de farelo de soja para a produção.

Embora a atividade de fitase apresentada para o *A. awamori* 9(4) de 82,77 U/100g tenha sido relativamente baixa, nota-se que houve um aumento considerável ao se comparar com o uso de farelo de soja como substrato

(43,98 U/100g); assim, seguiu-se com as metodologias e estratégias adotadas para se obter maiores atividades com a fitase produzida por este fungo.

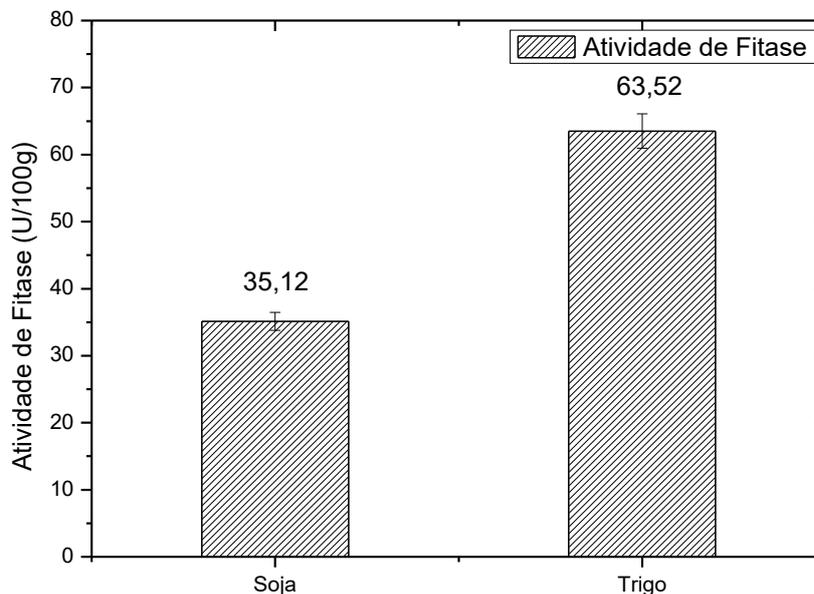
Os experimentos foram realizados com tempo de cultivo FES de 72 h, contudo, autores relatam tempos diferentes de cultivo para atividade máxima de fitase em FES. Chadha et al. (2004) relatam atividade de fitase de 705 U/100g para cultivo do fungo *R. pusillus*, utilizando farelo de trigo como substrato da FES a 50°C e 48 horas de cultivo. Spier et al. (2008) utilizaram polpa cítrica como substrato da FES, 60% de umidade com água ultrapura e 0,5% de citrato de amônio como fonte de nitrogênio, mantido à 30°C por 96 h o fungo *Aspergillus* sp FS3 atingiu atividade de 3200 U/100g. Sabu et al. (2002) utilizaram torta de coco como substrato da FES, mantido a 30°C por 96 h o fungo *Rhizopus oligosporus* atingiu atividade de fitase de 1430 U/100g. Assim, tem-se a necessidade de estudo do perfil temporal de produção da enzima fitase para este fungo.

#### **4.4 Efeito do indutor na atividade de fitase**

Para aumentar a produção da enzima fitase, optou-se pela utilização de um indutor, neste caso o  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , que em baixas concentrações induz o aumento da produção de fitase. Na literatura autores relatam aumento na produção de fitase a partir da utilização deste indutor. Gupta et al. (2014) relatam atividade máxima realizando cultivo com o fungo *A. niger* NRF9, sendo o cultivo feito com farelo de trigo como substrato e 0,01%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  como indutor, atingindo atividade de 7430 U/100g, cultivo realizado a 30 °C. Gunashree e Venkateswaran (2008) relataram que o uso de 0,015 e 0,025% m/v do indutor  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  aumentou a atividade da fitase em 30 e 20%, respectivamente, usando *Aspergillus niger* CFR 335.

Com a utilização de 1mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  como indutor na solução para umidificar o meio de cultivo FES, obteve-se as seguintes atividades para a linhagem *A. awamori* 9(4); como demonstrado na Figura 9.

Figura 9. Atividade de fitase para a linhagem *A. awamori* 9(4) com 72 h de cultivo FES e adição de 1mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .



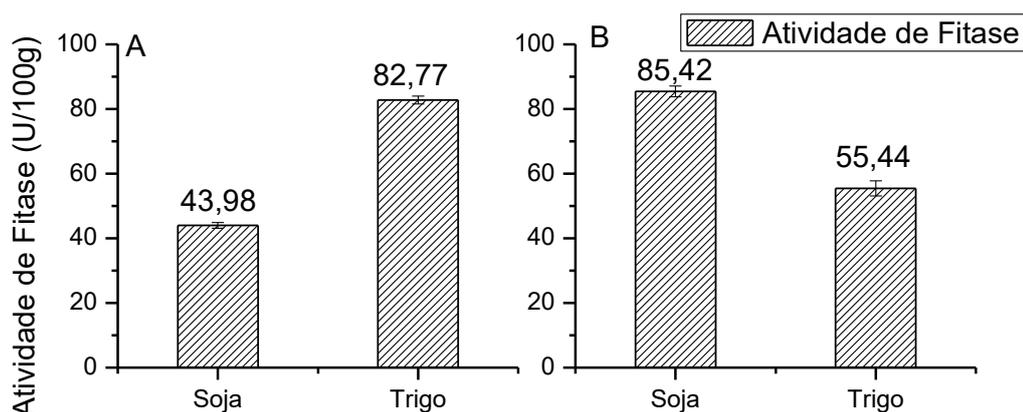
O resultado obtido foi o contrário do esperado, a atividade de fitase diminuiu com a adição de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  como indutor, queda de 20% da atividade de fitase quando utilizado farelo de soja, e queda de 23% com farelo de trigo. Spier et al. (2009) relatam que em baixas concentrações, fosfatos inorgânicos induzem a produção de fitase. Entretanto, a atividade de fitase pode ser inibida por íons  $\text{K}^+$ , como observado por Quan et al. (2004), Sato (2014) e Monteiro et al. (2015). O excesso de fosfatos inorgânicos adicionado também pode afetar negativamente na atividade da enzima fitase, como observado por Dvorakova et al. (1997), que relatam a inibição da enzima fitase produzida por *A. niger* em concentração de 2,85 mmol/L, e por Van Staden et al. (2007), que relatam inibição completa da enzima fitase em concentração de 0,5 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

Visto que a concentração de indutor utilizado no cultivo pode afetar negativamente na atividade, mas não necessariamente na produção da fitase, realizou-se uma etapa de purificação do extrato bruto para avaliar a produção da fitase. Esta etapa de purificação foi feita através de uma diálise.

#### 4.5 Efeito da diálise na atividade de fitase

Afim de estudar a influência da diálise na atividade de fitase, realizou-se esta breve purificação do extrato bruto, com a utilização de tubo Vivaspín 20, normalmente utilizado para concentração de amostras. Após o tempo de 10 min em centrífuga a 3000 rpm, o volume do extrato concentrado foi ajustado para o volume inicial com tampão aceto de sódio 0,2M e pH 5,5, mantendo a concentração de enzimas igual à concentração inicial. Fez-se a atividade de fitase com esta amostra dialisada do extrato bruto, tanto para cultivo com farelo de soja, como para o cultivo com farelo de trigo sem a adição de indutor. As atividades de fitase são apresentadas na Figura 10 a seguir.

Figura 10. Atividade de fitase para a linhagem *A. awamori* 9(4) com 72 h de cultivo FES sem indutor com farelo de soja e farelo de trigo como substrato. A: atividade com extrato bruto, B: atividade com dialise do extrato.

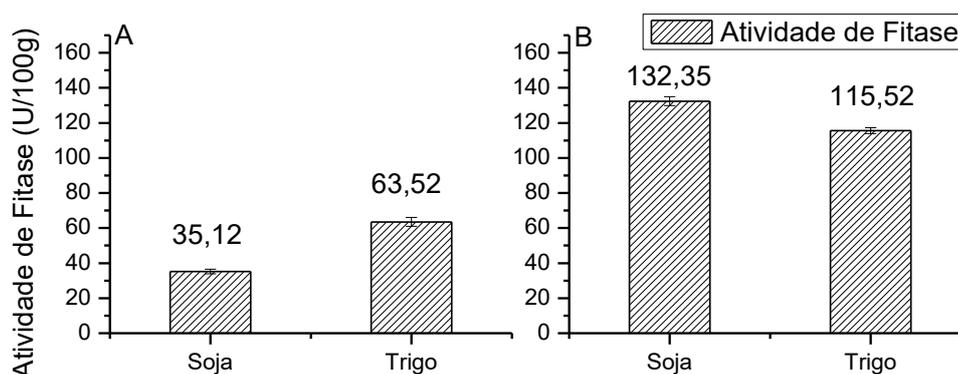


Com o extrato dialisado nota-se um grande aumento na atividade de fitase para o cultivo utilizando farelo de soja como substrato, aumentado quase 2 vezes quando comparado com o cultivo sem a diálise, de 43,98 U/100g para 85,42 U/100g. Entretanto, o cultivo utilizando farelo de trigo diminuiu a atividade enzimática, de 82,77 U/100g para 55,44 U/100g. Como fitases produzidas por micro-organismos apresentam tamanho entre 35 e 700 kDa (KUMAR et al., 2015), a diferença de atividade entre o extrato cru e o extrato dialisado deve-se à retirada de íons que afetam positivamente na atividade, como co-fatores, ou negativamente, como íons que prejudicam a estabilidade da enzima.

Com a diálise, moléculas menores que o tamanho específico da membrana (neste caso 10 kDa) são retiradas do extrato bruto. Assim, os íons que afetam na atividade da enzima por competição com o substrato, como por exemplo fosfatos, são retirados, e não influenciam mais na reação. Portanto, sem a interferências destes íons, a atividade de fitase tende a aumentar. No caso da diálise do extrato do cultivo com farelo de trigo, a queda de atividade observada pode ser devido à retirada de íons que afetam na estabilidade da fitase, como observado por El-Gindy et al. (2009), que relatam o aumento da atividade de fitase parcialmente purificada na presença de baixas concentrações de  $\text{Fe}^{+3}$  e altas concentrações de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$  e  $\text{Ca}^{+2}$ . Entretanto, experimentos devem ser feitos para a confirmação desta hipótese para a fitase da linhagem *A. awamori* 9(4).

Visto que o uso de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  como indutor na produção de fitase aumenta a produção de fitase, e a utilização da diálise como etapa de purificação que retira íons e moléculas que influenciam na atividade, fez-se então a atividade de fitase com a utilização destas duas etapas simultaneamente. Esta atividade está representada na Figura 11.

Figura 11. Atividade de fitase para a linhagem *A. awamori* 9(4) com 72 h de cultivo FES com indutor e com farelo de soja e farelo de trigo como substrato. A: atividade com extrato bruto, B: atividade com diálise do extrato.



Como esperado, realizando a adição do indutor  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  no cultivo e a diálise do extrato bruto aumentaram a atividade de fitase para ambos os extratos, farelo de soja e farelo de trigo. Para o cultivo com o farelo de soja houve um aumento de quase 4 vezes, de 35,12 U/100g para uma atividade de 132,25 U/100g; e para o cultivo com o farelo de trigo o aumento foi de quase 2

vezes, de 63,52 U/100g para uma atividade de 115,52 U/100g. Comprovando que de fato o indutor utilizado ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) aumenta a produção da enzima fitase, porém, o excesso de íons no extrato bruto afeta negativamente a atividade da enzima, tornando necessária a diálise para a retirada desses interferente e consequente aumento de atividade, como observado na Figura 11 apresentada.

## 5 CONCLUSÕES

Dentre as linhagens de fungos utilizadas para a seleção com meio diferencial PSM, teste qualitativo, somente as espécies de *Aspergillus* sp produziram a enzima fitase.

A metodologia de Harland e Harland (1980) mostrou-se ser mais adequada para a quantificação de atividade de fitase, sendo que o tempo de reação desta enzima para a análise foi determinado em 30 min, dentro da faixa linear da velocidade de hidrólise.

A produção da enzima com farelo de soja para a segunda seleção, teste quantitativo, mostrou que o fungo *A. awamori* 9(4) se destacou dentre os demais após 72 h de cultivo. O farelo de trigo apresentou maior atividade de fitase devido à presença de maiores quantidades de fitato comparando com o farelo de soja.

O uso da diálise mostrou-se importante para retirar interferentes da atividade de fitase. O uso de indutor, com posterior diálise do extrato, aumentou consideravelmente a atividade de fitase para os dois substratos. Isto indica que o indutor aumenta a produção de fitase, porém pode diminuir a atividade da enzima.

Os fungos endofíticos do mangue apresentam potencial biotecnológico para produção da enzima fitase. Vale ressaltar que, até o momento de produção deste trabalho, não há registros na literatura de produção de fitase por linhagens fúngicas endofíticas.

## 6 Perspectiva para Trabalhos Futuros

Visto que o fungo *A. awamori* 9(4) apresenta potencial para a produção de fitase, propõe-se que seja feito o perfil temporal da produção desta enzima para análise do período de tempo com a maior produção. Além disso, análise do pH inicial do cultivo e concentração de indutor pode ser feita para a melhoria da produção de fitase. A caracterização da enzima fitase torna-se necessária para a obtenção das melhores condições de temperatura e pH de atuação da mesma. A avaliação da extração da enzima fitase quanto ao uso de surfactantes, como Triton X100 e Tween80. Ainda, pode-se analisar a produção da fitase em biorreator para um melhor rendimento.

## REFERÊNCIAS

- ACUNA-ARGUELLES, M. E. et al. Production and properties of three pectinolytic activities produced by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 43, p. 808-814, 1995.
- AWAD, G. E. A. et al. Optimization of phytase production by *Penicillium purpurogenum* GE1 under solid state fermentation by using Box-Behnken design. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, p. 81-88, 2014.
- AZEVEDO J. L. et al. Endophytic fungi from Brazilian tropical hosts and their biotechnological applications. In: Kharwar RN, Upadhyay R, Dubey N, Raghuwansh R (eds) **Microbial diversity and biotechnology in food security**, Springer, New Delhi, p. 17-22, 2014.
- BALA, A. et al. Production of na extracelular phytase from a thermophilic mould *Humicola nigrescens* in solid state fermentation and its application in dephytinization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 259-264, 2014.
- BOGAR, B. et al. Optimization of phytase production by solid substrate fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 183-189, 2003.
- BROZ, J. et al. Effects of supplemental phytase on performance and phosphorus diet without addition of inorganic phosphates. **British Poultry Science**. v. 35, p. 273-280, 1994.
- CADWELL, B. A. et al. Utilization of major detrital substrates by dark-septate, root endophytes. **Mycologia**, v. 92(2), p. 230-232, 2000.
- CAIN, K. D.; GARLING, D. L.. Pretreatment of soybean meal with phytase for salmonid diets to reduce phosphorus concentration in hatchery effluents. **The Progressive Fish-Culturist**. v. 57, p. 114-119. 1995.
- CHADHA, B. S. et al. Phytase production by the thermophilic fungus *Rhizomucor pusillus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 105-109, 2004.

- CHOI, Y.M. et al. Isolation of a phytase-producing *Bacillus* sp, KHU-10 and its phytase production. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 9 (2), p. 223-226, 1999.
- COBAN, H. B.; DEMIRCI, A.. Screening of phytase and optimization of culture conditions for submerged fermentation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.37, p. 609-616, 2014.
- CORREA, R.C.G.C. et al. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzymes producers. 2014.
- CORRELL, D. L.. Phosphorus: a rate limiting nutrient in surface waters. **Poultry Science**. v. 78, p. 674-682. 1999.
- COWIESON, A. J. et al. Using the precision-feeding bioassay to determine the efficacy of exogenous enzymes - a new perspective. **Animal Feed Science and Technology**, v. 129, n. 1/2, p. 149-158, Aug. 2006.
- CUI, H. et al. Askaloids from the mangrove endophytic fungus *Diaporthe phaseolorum* SKS019. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 27, p. 803-807. 2017.
- DEL BIANCHI, V.L. et al. Fermentação em estado sólido. In: SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia industrial**. v.2. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.
- DINTZIS, F. R. et al. Phytate Content of Soft Wheat Brans as Related to Kernel Size, Cultivar, Location, and Milling and Flour Quality Parameters. **Cereal Chemistry**, v. 69, p. 577-581, 1992.
- DVORAKOVA, J. et al. Characterization of phytase produced by *Aspergillus niger*. **Folia Microbiologica**, v. 42(4), p. 349-352, 1997.
- EBUNE, A. et al. Production of phytase during solid-state fermentation using *Aspergillus ficuum* NRRL-3135 in canola-meal. **Bioresource Technology**, v. 53 (1), p. 7-12, 1995.
- EL-GINDY, A. et al. Extracellular phytase production by solid-state cultures of *Malbranchea sulfurea* and *Aspergillus niveus* on cost-effective medium. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v. 5(1), p. 42-62, 2009.

- FANG, H. et al. Optimization of enzymatic hydrolysis of steam-exploded corn stover by two approaches: Response surface methodology or using cellulase from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* NL02. **Bioresource Technology**. v.101, p.4111-4119, 2010.
- FARIA, O. L. V. et al. Remoção de fósforo de efluentes da parboilização de arroz por absorção biológica estimulada em reator em batelada sequencial (RBS). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 26(2), p. 309-317, 2006.
- FARINAS, C. S. et al. Desenvolvimentos em fermentação em estado sólido para produção de enzimas de interesse agroindustrial. In: NAIME, J. de M.; MATTOSO, L. H. C.; SILVA, W. T. L. da; CRUVINEL, P. E.; MARTIN-NETO, L.; CRESTANA, S.. (Org.). **Conceitos e aplicações da instrumentação para o avanço da agricultura**. 1ed.Brasília: Embrapa, v. 1, p. 211-241, 2014.
- FENG TIAN et al. Effect of *Sinorhizobium fredii* Sneb183 on the biological control of soybean cyst nematode in soybean. **Journal of Basic Microbiology**. v. 54, p. 1258-1263. 2014.
- FLORENCIO, C. et al. Validation of a Novel Sequential Cultivation Method for the Production of Enzymatic Cocktails from *Trichoderma* Strains. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 175(3): 1389-1402, 2015.
- GAIND, S.; SINGH, S. Production, purification and characterization of neutral phytase from thermotolerant *Aspergillus flavus* ITCC 6720. **International Biodeterioration & Biodegradation**. V. 99, p. 15-22. Jan 2015.
- GARGOVA, S. et al. Screening of fungi for phytase production. **Biotechnology Techniques**. v. 11 (4). p. 221-224. 1997
- GARYALI, S. et al. Enhancement of taxol production from endophytic fungus *Fusarium redolens*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**. v. 19, p. 908-915. 2014.
- GHORBANI-NASRABADI, R. et al. Identification and determination of extracellular phytate-degrading activity in actinomycetes. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. V28. P2601-2608. 2012.
- GOPAL, B.; CHAUHAN, M. Biodiversity and its conservation in the Sundarban Mangrove Ecosystem. **Aquatic Sciences**. v. 68, p. 338-354. Oct 2006.

GREINER, R. et al. M. A.. Production of partially myo-inositol phosphates using phytase immobilized on magnetic nanoparticles. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 375-383, 2013.

GREINER, R.; FAROUK, A.. Purification and Characterization of Bacterial Phytase Whose Properties Make it Exceptionally Useful as a Feed Supplement. **The Protein Journal**. v. 26. 2007.

GREINER, R.; KONIETZNY, U. Phytase for food application. **Food Technology and Biotechnology**. v. 44(2). p. 125–140. 2006.

GREINER, R.; KONIETZNY, U.; BLACKBURN, D. M.; JORQUERA, M. A.. Production of partially phosphorylated myo-inositol phosphates using phytases immobilized on magnetic nanoparticles. **Bioresource Technology**. v. 142, p. 375-383. 2013.

GULATI, H. K. et al. Production and characterization of thermostable alkaline phytase from *Bacillus laevolacticus* isolated from rhizosphere soil. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 34, p. 91-98. 2007.

GUNASHREE B. S.; VANKATESWARAN, G.. Phytase production by *Aspergillus niger* CFR 335 and *Aspergillus ficuum* SGA 01 through Submerged and Solid state fermentation. **The Scientific World Journal**. v. 2014

GUNASHREE, B. S.; VENKATESWARAN, G. Extracellular phytase from *Aspergillus niger* CFR 335: purification and characterization. **Journal of Food Science and Technology**, v 52, p. 4558-4564, 2015.

GUNASHREE, B. S.; VENKATESWARAN, G.. Effect of different cultural conditions for phytase production by *Aspergillus niger* CFR335 in submerged and solid-state fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 1587-1596, 2008.

GUNATILAKA, A. A. L.. Natural Products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity and implications of their occurrence. **Journal Natural Products**, Ohio, v. 69, p. 509-52, 2006.

GUPTA, R. K. et al. Isolation of thermotolerant phytase producing fungi and optimisation of phytase production by *Aspergillus niger* NRF9 in solid state

- fermentation using response surface methodology. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 19, p. 996-1004, 2014.
- HARLAND, B. F.; HARLAND, J. Fermentative Reduction of Phytase in Rye, White, and Whole Wheat Breads. **Cereal Chemistry**, v.57, p. 226-229, 1980.
- HAWKSWORTH, D. L.. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. **Mycological Research**, Cambridge, v. 95, p. 641-655, 1991.
- HOELKER, U. et al. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64(2), p. 175-186, 2004.
- HOWSON, S. J.; DAVIS, R. P. Production of phytate-hydrolyzing enzyme by some fungi. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 5, p. 377-382. 1983.
- KHAN, A. L. et al. Endophytic fungi from frankincense tree improves host growth and produces extracellular enzymes and indole acetic acid. **Plos One**, 2016. < DOI:10.1371/journal.pone.0158207 >
- KONIETZNY, U.; GREINER, R.. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). **International Journal of Food Science and Technology**. v. 37, p. 791-812. 2002.
- KUMAR, A. et al. Microbial production of phytases for combating environmental phosphate pollution and other diverse application. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, 2015.
- LACAVA, P. T.; AZEVEDO, J. L. . Biological Control of Insect-Pest and Diseases by Endophytes. In: Verma, Vijay C.; Gange, Alan C.. (Org.). **Advances in Endophytic Research**. 1ed. New Delhi: Springer-Verlag, v., p. 231-243, 2014.
- LACAVA, P. T.; AZEVEDO, J. L. Endophytic Bacteria: A Biotechnological Potential in Agrobiological System. In: Dinesh K. Maheshwari; Meenu Saraf; Abhinav Aeron. (Org.). **Bacteria in Agrobiological: Crop Productivity**. 1ed. Berlin: Springer-Verlag, v. VIII, p. 1-44, 2013.

LEDOUX, D. R. et al. Efficacy of phytase, a phytase containing transgenic canola, to improve phytate phosphorus utilization from cornsoybean meal diets fed turkey poult from day 1 to 35. **Poultry Science**. v. 77. 1998.

LEE, D. et al. Culture condition and characterization of a new phytase-producing fungal isolate, *Aspergillus* sp. L117. **Mycobiology**, v. 33(4), p. 223-229, 2005.

LI, H. et al. Peniphenones A-D from mangrove fungus *Penicillium dipodomycicola* HN4-3A as inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* phosphatase MptpB. **Journal of Natural Products**. 2013.

LIMA, M.B. et al. Produção de fitase por fermentação em estado sólido utilizando farelo de arroz e *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae*. XX **Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. 2014

LIU, Y. et al. Altenusin derivatives from mangrove endophytic fungus *Açternaria* sp. SK6YW3L. **The Royal Society of Chemistry**. v. 6, p. 72127-72132. 2016.

LIU, Z. et al. Aspterpenacids A and B, two sesterterpenoids from a mangrove endophytic fungus *Aspergillus terreus* H010. **Organic Letter**. 2016. DOI: 10.1021/acs.orglett.6b00336

MACHADO, L. C. et al. Valorização de dietas para aves e suínos a partir da inclusão de fitase. **III Semana de Ciência e Tecnologia IFMG - campus Bambuí - III Jornada Científica**, 2014.

MAYER, A.F. et al. An expression system matures: a highly efficient and cost-effective process for phytase production by recombinant strains of *Hansenula polymorpha*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 63 (3), p. 373-381, 1999.

MENDES, R. et al. Diversity of Cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. **Applied and Environmental microbiology**. v. 73, p. 7259-7267. Nov. 2007.

MENDES, R.; AZEVEDO, J. L.. Valor Biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: COSTA-MAIA, L.; MALOSSO, E.; YANO-MELO, A. M. (Org.). **Micologia: avanços no conhecimento**. Recife: UFPE. P. 129-140, 2007.

MITTAL, A. et al. Isolation and biochemical characterization of acidothermophilic extracellular phytase producing bacterial strain for potential application in poultry feed. **Jundishapur Journal of Microbiology**. v. 4, p. 273-282. 2011.

MONTEIRO, P. S. et al. Isolation of a thermostable acid phytase from *Aspergillus niger* UFV-1 with strong proteolysis resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 251-260, 2015.

MULLANEY, E. J. et al. Advances in phytase research. **Advances in Applied Microbiology**. v. 47, p. 157-199. 2000.

MURPHY, J. e RILLEY, J. P.. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. **Analytica Chimica ACTA**. v. 27, p. 31-39. 1962.

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

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NICOLETTI, R. e FIORENTINO, A.. Plant bioactive metabolites and drugs produced by endophytic fungi of Spermatopyta. **Agriculture**. v. 5, p. 918-970. 2015. doi:10.3390/agriculture5040918

OLIVEIRA JR, S. D. Produção de enzimas por fungos em fermentação sem-sólida utilizando bagaço de coco e pedúnculo de caju como substratos. 121f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN. 2014.

OLSTORPE, M. et al. Screening of yeast strains for phytase activity. **Federation of European Microbiological Societies**. v. 9, p. 478-488. 2009.

OWEN, N. L.; HUNDLEY, N. Endophytes – the chemical synthesizer inside plants. **Science Progress**. v. 87, p. 79-99. 2004.

PALAZZINI, J. M. et al. Biological control of *Fusarium graminearum* sensu stricto, causal agente of *Fusarium* head blight of wheat, using formulated

antagonists under field conditions in Argentina. **Biological Control**. v. 94, p. 56-61. 2016.

PANDEY, A. et al. Production, purification and properties of microbial phytases. **Bioresource Technology**. v. 77, p. 203-214, May 2001.

PANESAR, P. S. et al. Bioprocessing of Agro-industrial Wastes for Production of Food-grade Enzymes: Progress and Prospects. **Applied Food Biotechnology** v. 3(4), p. 208-227, 2016.

PAPAGIANNI, M. et al. Production of phytase by *Aspergillus niger* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 397-402, 1999.

PARK, Y-H. et al. Screening and characterization of endophytic fungi of Panax ginseng Meyer for biocontrol activity against ginseng pathogens. **Biological Control**. v. 91, p. 71-81. 2015.

PAZ, Z. et al. Antagonistic effect of the endophytic fungus *Meira geulakonigii* on the citrus rust mite *Phyllocoptruta oleivora*. **Journal of Applied Microbiology**. v. 103, p. 2570-2579. 2007.

PERNEY, K. M. et al. The effect of dietary phytase on growth performance and phosphorus utilization of broiler chicks. **Poultry Science**. v. 72, p. 2106-2114. 1993.

PETRINI, O. et al. Ecology, metabolite production, and substrate tilization in endophytic fungi. **Natural Toxins**, v.1, p. 185-196, 1992.

PIROTA, R. D. P. B. et al. Bioprocess developments for celulase production by *Aspergillus oryzae* cultivated under solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 33, p. 21-31, 2016.

PIROTA, R. D. P. B. et al. Enhancing xylanases production by a new Amazon Forest strain of *Aspergillus oryzae* using solid-state fermentation under controlled operation conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 465-471, 2013.

POLAINA, J., MACCABE, A. P.. Industrial enzymes, Springer, 2007.

- QUAN, C. et al. Purification and properties of a low-molecular-weight phytase from *Cladosporium* sp. FP-1. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 97, p. 260-266, 2004.
- RAGHAVARAO, K.S.M.S. et al. Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochem Eng Journal**. v. 13, p. 127–135, 2003.
- RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid state fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, 1998.
- RAVINDRAN, V. et al. Influence of microbial phytase on apparent ileal amino acid digestibility of feedstuffs for broiler. **Poultry Science**. v. 78, p. 699-706. 1999.
- REZGUI, A. et al. Endophytic bacteria with antagonistic traits inhabit the wood tissues of grapevines from Tunisian vineyards. **Biological Control**. v. 99, p. 28-37. 2016.
- ROCKY-SALIMI, K. et al. A novel phytase characterized by thermostability and high pH tolerance from rice phyllosphere isolated *Bacillus subtilis* B.S.46. **Journal of Advanced Research**. v. 7, p. 381-390. 2016.
- RODEHUTSCORD, M.; PFEFFER, E.. Effects of supplemental microbial phytase on phosphorus digestibility and utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Water Science Technology**. v. 31, p. 143-147. 1995.
- RODRIGUEZ, E. et al. Expression of the *Aspergillus fumigatus* phytase gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 268, p. 373-378. 2000.
- SABU, A. et al. Solid-state fermentation for production of phytase by *Rhizopus oligosporus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 102-103, 2002.
- SANO, K. et al. Phytase of the yeast *Arxula adenivorans*. **Biotechnology Letters** v. 21 (1), p. 33-38, 1999.
- SAQIB, A. A. N. et al. Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochemistry**. v. 45, p. 641-646, 2010.

- SATO, V. S. et al. 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(2), p. 177-187. 2014.
- SATO, V. S. Produção de Fitase por *Rhizopus microsporus* var. *microsporus*: Purificação, Caracterização Bioquímica e Aplicação. 158 f. Tese (Doutorado). Instituto de Química, UNESP, Araraquara, 2015.
- SCHAEFER, M. J. The phytic acid and trace mineral content of soybeans and their effects on tofu texture. Iowa State University: Retrospective Theses and Dissertations. Paper 8300, 1986.
- SEBASTIANES, F. L. S. Diversidade genética e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de manguezais do estado de São Paulo. 151 f. Tese (Doutorado em Ciências. Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas). Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2010.
- SEBASTIANES, F. L. S. et al. Species diversity of culturable endophytic fungi from Brazilian mangrove forests. **Current Genetics**. v. 59, p. 153-166. 2013.
- SEBASTIANES, F. S. S. et al. 3-Hydroxypropionic acid as an antibacterial agente from endophytic fungi *Diaporthe phaseolorum*. **Current Microbiology**, v. 65, p. 622-632, 2012b.
- SEBASTIANES, F. S. S. et al. Genetic transformation of *Diaporthe phaseolorum*, na endophytic fungus found in mangrove forests, mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Current Genetics**, v. 58, p. 21-33, 2012a.
- SEGUEILHA, L. et al. Reduction of phytate content in wheat bran and glandless cotton flour by *Schwanniomyces castellii*. **Journal of Agricultural And Food Chemistry** v. 41 (12), p. 2451-2454, 1993.
- SHAW, J. J. et al. Biosynthesis and genomic analysis of medium-chain hydrocarbon production by the endophytic fungal isolate *Nigrograna mackinnonii* E5202H. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 99, p. 3715-3728. 2015. Doi 10.1007/s00253-014-6206-5

SHIEH, T. R.; WARE, J. H. Survey of Microorganisms for the Production of Extracellular Phytase. **Applied Microbiology**, v. 16, p. 1348-135, 1968.

SIDHU, A. K. et al. Isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* gr., a novel endophytic laccase producing fungus from the leaves of a medicinal plant, *Piper betle*. **International Journal of Scientific & Engineering Research**, v.5, issue 2, Feb. 2014.

SILVEIRA, E. A. et al. Valorization of Palm Oil Industrial Waste as Feedstock for Lipase Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology** v. 179(4), p. 558-571, 2016.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M.. Overview of Fungal Lipase: A Review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.166, p. 486-520. 2012.

SINGHANIA, R. R. et al. Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enz. Microb. Tech.** v. 46, p. 541-549, 2010.

SINGHANIA, R. R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2009.

SPIER, M. R. et al. A simplified model for *A.niger* FS3 growth during phytase formation in solid state fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 151-158, Nov. 2009.

SPIER, M. R. et al. Phytase production using citric pulp and other residues of the agroindustry in SSF by fungal isolates. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, p. 178-182, 2008.

SREERAMULU, G. et al. Lactobacillus amylovorus as a phytase producer in submerged culture. Letters In **Applied Microbiology** v. 23 (6), p. 385-388, 1996.

STIERLE, A. et al. Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andreanae*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew. **Science**. v. 260(5105), p. 214-216, 1993.

SUNITHA, K. et al. Optimization of medium components for phytase production by *E. coli* using response surface methodology. **Bioprocess Engineering**. v. 21. p. 477-481. 1999.

- SUNITHA, V. H. et al. Extracellular enzymatic activity of endophytic fungal strains isolated from medicinal plants. **World Journal of Agricultural Sciences**, v.9(1), p. 1-9, 2013.
- SUZUKI, U. et al. About the enzyme “phytase”, which splits “anhydro-oxy-methylene diphosphoric acid”. **Bulletin of the College of Agriculture**, v. 7, p. 503-512, 1907.
- TEJEDOR, A. A. et al. Efeito da adição da enzima fitase sobre o desempenho e a digestibilidade ileal de nutrientes. **Revista Brasileira de Zootecnia**. V30. P 802-808. 2001.
- THATOI, H. et al. Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove ecosystems: a review. **Ann Microbiol** v. 63, p. 1 – 19, 2013. doi:10.1007/s13213-012-0442-7
- THOMPSON, L. U.; YOON, J. H. Starch digestibility as affected by polyphenols and phytic acid. **Journal of Food Science**. v. 49, p. 1228-1229. 1984.
- THYAGARAJAN, R. et al. Evaluation of phytase production by *Hypocrea lixii* SURT01 in submerged and solid-state fermentation. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, 2014.
- TRAPP, M. A. et al. Antibiotic oxylipins from *Alternanthera brasiliana* and its endophytic bacteria. **Phytochemistry**. v. 110, p. 72-82. 2015.
- UCHIDA, H. et al. Expression of *Aspergillus oryzae* phytase gene in *Aspergillus oryzae* RIB40 *niaD*-. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 102, p. 564-567, 2006.
- ULLAH, A.H.J.; CUMMINS, B.J. Purification, N-terminal amino acid sequence and characterization of pH 2.5 optimum acid phosphatase (EC 3.1.3.2) from *Aspergillus ficuum*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 17, p. 397-422, 1987.
- VAN DER HOMBERGH, J. P. T. W. et al. *Aspergillus* as host for heterologous protein production: the problem of proteases. **Trends Biotechnol.**, v.15 (7), p.256-263, 1997.
- VAN STADEN, J. et al. Phytase activity in *Cryptococcus laurentii* ABO 510. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 7, p. 442-448, 2007.

- VATS, P.; BANERJEE, U. C. Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. **Enzyme and Microbial Technology**. V 35. P 3-14. July 2004.
- VESCOVI, V. Extração, purificação e imobilização de lipases vegetais destinadas à síntese de biodiesel e ésteres. 79 f. Dissertação (Mestrado). Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2012.
- XIANG, L. et al. Biocontrol potential of endophytic fungi in medicinal plants from Wuhan Botanical Garden in China. **Biological Control**. v. 94, p. 47-55. 2016.
- YINNGUO, B. et al. Phytase production by fermentation of recombinant *Pichia pastoris* in monosodium glutamate wastewater. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 25, p. 1643-1649. 2009.
- YOON, S.J. et al. Isolation and identification of phytase-producing bacterium, *Enterobacter* sp 4, and enzymatic properties of phytase enzyme. **Enzyme And Microbial Technology** v. 18 (6), p. 449-454, 1996.
- YU, P.; CHEN, Y. Purification and characterization of a novel neutral and heat-tolerant phytase from a newly isolated strain *Bacillus nealsonii* ZJ0702. **BMC Biotechnology**. v. 13. 2013.
- ZHANG, W. et al. Adopting selected hydrogen bonding and ionic interactions from *Aspergillus fumigatus* phytase structure improves the thermostability of *Aspergillus niger* PhyA phytase. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 3069-3076, 2007.
- ZHANG, Z. B. et al. Comparison of genetically engineered microbial and plant phytase for young broilers. **Poultry Science**. v. 77. 1998.
- ZHOU, H.W. et al. Genetic diversity of dioxygenase genes in polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from mangrove sediments. **FEMS Microbiol Lett** v.262, p.148 – 157, 2006. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00379.x

ZUO, R. et al. Phytase gene expression in *Lactobacillus* and analysis of its biochemical characteristics. **Microbiological Research**, v. 165(4), p. 329-335, 2010.