

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

Estudo da produção, caracterização e aplicação de nova fitase de
Saccharomyces cerevisiae

EDI FRANCIELE RIES

Farmacêutica e Bioquímica – Tecnóloga de Alimentos

Prof^a. Dr^a. GABRIELA ALVES MACEDO

Orientadora

Tese de Doutorado apresentada à
Faculdade de Engenharia de
Alimentos da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do título
de Doutor em Ciência de Alimentos.

Campinas, 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

R445e Ries, Edi Franciele
Estudo da produção, caracterização e aplicação de nova fitase de
Saccharomyces cerevisiae / Edi Franciele Ries. -- Campinas, SP: [s.n],
2010.

Orientador: Gabriela Alves Macedo
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Engenharia de Alimentos.

1. Fitase. 2. Levedura. 3. Fitato. 4. Fermentação. 5.
Nutrição animal. I. Macedo, Gabriela Alves. II. Universidade
Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.
Título.

Título em inglês: Production, characterization and application of new phytase by *Saccharomyces cerevisiae*

Palavras-chave em inglês (Keywords): Phytase, Yeasts, Phytate, Fermentation, Animal nutrition.

Titulação: Doutor em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Gabriela Alves Macedo

Hélia Harumi Sato

Ranulfo Monte Alegre

Leila Picolli da Silva

Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

Este exemplar corresponde à redação final da tese “Estudo da produção, caracterização e aplicação de nova fitase de *Saccharomyces cerevisiae*” defendida em __/__/__ por Edi Franciele Ries aprovado pela comissão julgadora em __/__/__.

Banca Examinadora

Prof^ª. Dr^ª. Gabriela Alves Macedo
Orientadora – FEA/UNICAMP

Prof^ª. Dr^ª. Hélia Harumi Sato
Membro – FEA/UNICAMP

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
Membro – FEA/UNICAMP

Prof^ª. Dr^ª. Leila Picolli da Silva
Membro – UFSM

Prof^ª. Dr^ª. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli
Membro – USP

Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Júnior
Suplente – FEA/UNICAMP

Prof^ª. Dr^ª. Eleni Gomes
Suplente – UNESP

Prof^ª. Dr^ª. Aline Carvalho da Costa
Suplente – FEQ/UNICAMP

Aos meus pais Valter e Eva Ries

Minha irmã Carol e

Tia Dome

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Gabriela Alves Macedo pela oportunidade concedida e confiança depositada em meu trabalho, além de exemplo, apoio, orientação e amizade.

Aos grandes amigos e colegas do Laboratório de Bioquímica de Alimentos Ana Luiza, Bia, Carol, Danielle, Evandro, Fabiano, Haroldo, Janai, Joelise, Juliana, Júnior, Laira, Marcela, Márcio, Patrícia, Paula, Priscila Becker, Priscila Hoffmann, Val, Vânia e Viviane, pelo apoio, companheirismo e amizade inesquecíveis.

Aos meus magníficos pais e irmã, pelo alicerce e exemplo de vida e sabedoria. Pelo amor e apoio incondicional. Por incentivarem, acreditarem e fazerem parte da realização dos meus sonhos.

À amada Tia Dome, por todo amor, força e bênçãos.

A todos meus familiares pelo apoio e incentivo a meus estudos e trabalhos.

Às grandes amigas Aninha, Bela, Tati, Vi, Re e Danizinha, pelo amor, apoio em todas as horas, incentivo e amizade sincera.

Ao especial casal de amigos Vivi e Batata, pelo amor, amizade, confiança, amparo e ajuda incondicional.

Às amigas e colegas das repúblicas Casa das Sete Mulheres, Biribas e As 7 Belas, por tornarem os meus dias mais agradáveis, pelos tantos momentos de compreensão, apoio, amizade, companheirismo e divertimento.

Aos tantos e especiais amigos conhecidos em Campinas, pela amizade, força e inúmeros momentos de alegria.

Aos professores da banca examinadora pela contribuição valiosa à melhoria do trabalho.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos, especialmente Laboratório de Bioquímica de Alimentos pela possibilidade de realização do trabalho.

A todos os professores e funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos pela contribuição na formação pesquisadora e apoio à minha pesquisa.

À Professora Leila Picolli da Silva pela oportunidade, colaboração e orientação na realização de ensaio biológico na Universidade Federal de Santa Maria.

Aos amigos e colaboradores do Laboratório de Piscicultura da Universidade Federal de Santa Maria pela inestimável ajuda na condução de experimento biológico, amizade e carinho recebido.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa de estudo concedida.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta, contribuíram para concretização deste trabalho.

À Deus pela condução e todas as bênçãos recebidas.

“O Senhor é o meu Pastor e nada me faltará”.

Salmo 23

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xiii
RESUMO	1
SUMMARY	2
INTRODUÇÃO GERAL	3
OBJETIVOS	7
Objetivo geral	7
Objetivos específicos	7
CAPÍTULO 1: Fitases: visão geral e aplicações em alimentação animal	9
Resumo	9
Abstract	10
Introdução	11
Ácido fítico	11
Fitase	13
Produção, purificação e caracterização de fitases	15
Fontes e interesse comercial	17
Alimentação animal	20
Conclusões	23
Referências Bibliográficas	25
CAPÍTULO 2: Progressive screening of thermostable yeasts for phytase production	33
Abstract	33
Introduction	34
Material and Methods	35
Isolation and identification of microorganisms	35
Screening for potential hydrolyzing phytate yeasts using progressive temperature increase	36
Preinoculum preparation and culture conditions for phytase production	36
Phytase assay	37
Results and Discussion	38
Screening for potential hydrolyzing phytate yeasts using progressive temperature increase	38
Culture and phytase activity	40
References	47
CAPÍTULO 3: Improving phytase production by a newly <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain using statistical designs	51
Abstract	51
Material and Methods	53
Yeast and pre-inoculum preparation	53
Culture medium and conditions	53

Phytase assay.....	54
Biomass determination.....	55
Optimization of the medium composition for the production of phytase by <i>S. cerevisiae</i>	55
Optimization of the fermentation conditions for the production of phytase	56
Statistical analysis.....	57
Results and Discussion	57
Selection of the carbon and nitrogen sources and the inducers for the production of phytase.....	57
Optimization of the medium components for the production of phytase.....	60
Optimization of the fermentation conditions for the production of phytase	63
References.....	68
CAPÍTULO 4: Caracterização bioquímica da fitase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	73
Resumo	73
Abstract	74
Introdução	75
Material e Métodos	76
Produção do extrato enzimático.....	76
Determinação de proteínas totais.....	77
Determinação da atividade enzimática em substrato fitato de sódio.....	77
Determinação da atividade enzimática em substrato 4-nitrofenilfosfato dissódico hexahidratado	78
Determinação de pH ótimo e pH de estabilidade.....	78
Determinação de temperatura ótima e temperatura de estabilidade	79
Efeito de sais na atividade enzimática	79
Estudo da resistência à ação de proteases	79
Estudo de especificidade por diferentes substratos	80
Parâmetros cinéticos.....	80
Análise dos resultados	80
Resultados e Discussões	81
PH ótimo e pH estabilidade	81
Temperatura ótima e temperatura de estabilidade.....	85
Efeito de sais na atividade enzimática	88
Estudo da resistência à ação de proteases	91
Especificidade por substratos e parâmetros cinéticos.....	94
Conclusões	96
Referências Bibliográficas	98
CAPÍTULO 5: Aplicação de nova fitase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na alimentação de carpa capim (<i>Ctenopharyngodon idella</i>)	103
Resumo	103
Abstract	104
Introdução	105
Material e Métodos	106
Produção de pré-inóculo e inóculo de <i>S. cerevisiae</i>	106
Produção do extrato enzimático.....	107
Tratamento de farelo de arroz desengordurado (FAD) com fitase	107
Preparo das rações	108

Ensaio biológico: manejo dos animais e procedimento analítico	109
Análise dos resultados	111
Resultados e Discussões	111
Tratamento de farelo de arroz desengordurado (FAD) com fitase	111
Ensaio biológico	113
Conclusões	119
Referências Bibliográficas	120
CONCLUSÕES GERAIS	125
ANEXOS	126
Anexo 1 (Capítulo 4) Fluxograma de produção do extrato de fitase de <i>S. cerevisiae</i>	126
Anexo 2 (Capítulo 4): Determinações de Km e V_{máx}	127
Anexo 3 (Capítulo 5): Aprovação pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal para ensaio biológico	129

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 Estrutura molecular do ácido fítico.....	12
Figura 2 Ação da fitase em mioinositol-hexafosfato com liberação de mioinositol livre e fosfato inorgânico (Lei e Porres, 2003).....	13

CAPÍTULO 2

Figura 1 Screening for potential hydrolyzing phytate yeasts in solid media	39
Figura 2 Yeast strains tested and those positive for phytase production at the different temperatures.....	40
Figura 3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> phytase activities (U/mL) in the different substrates. .	44

CAPÍTULO 3

Figure 1 Response surface graph showing the effect of the interaction between sodium phytate and sucrose on the activity of phytase.	63
Figure 2 Response surface graph showing the effect of the interaction between temperature and agitation on the activity of phytase.	65
Figure 3 Phytase activity and yeast biomass at different time points.....	66

CAPÍTULO 4

Figura 1 pH ótimo de atividade de fitases de diferentes fontes em substrato 4-npp	81
Figura 2 pH ótimo de atividade de fitases de diferentes fontes em substrato fitato de sódio	82
Figura 3 pH de estabilidade da atividade de fitases de diferentes fontes em substrato 4-npp	84
Figura 4 pH de estabilidade da atividade de fitases de diferentes fontes em substrato fitato de sódio.....	84
Figura 5 Temperaturas ótimas de atividade de fitases de diferentes fontes em substrato 4-npp	85
Figura 6 Temperaturas ótimas de atividade de fitases de diferentes fontes em fitato de sódio	86
Figura 7 Temperaturas de estabilidade da atividade de fitases de diferentes fontes em substrato 4-npp	86
Figura 8 Temperaturas de estabilidade da atividade de fitases de diferentes fontes em substrato fitato de sódio.....	87
Figura 9 Resistência de fitases de diferentes fontes à ação de pepsina em substrato 4-npp	92
Figura 10 Resistência de fitases de diferentes fontes à ação de pepsina em substrato fitato de sódio.....	92
Figura 11 Resistência de fitases de diferentes fontes à ação de tripsina em substrato 4-npp	93
Figura 12 Resistência de fitases de diferentes fontes à ação de tripsina em substrato fitato de sódio.....	94

ANEXO 1

Figura 1 Fluxograma de produção de extrato de fitase *S. cerevisiae* 126

ANEXO 2

Figura 1 Gráfico duplo recíproco para hidrólise catalisada por nova fitase de *S. cerevisiae* em substratos a) 4-npp e b) fitato de sódio 128

Figura 2 Gráfico duplo recíproco para hidrólise catalisada por fitase Natuphos® em substratos a) 4-npp e b) fitato de sódio 128

Figura 3 Gráfico duplo recíproco para hidrólise catalisada por fitase Quantum® em substratos a) 4-npp e b) fitato de sódio 128

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Table 1 Phytase production and phytate hydrolysis at 48°C	41
Table 2 Phytase activity with 4-nitrophenylphosphate disodium salt hexahydrate substrate	42
Table 3 Phytase activity with sodium phytate as the substrate	43

CAPÍTULO 3

Table 1 Concentration ranges of the medium components as analyzed by RSM	60
Table 2 Experimental design and results for the optimization of the medium composition for phytase activity using RSM	61
Table 3 Analysis of variance and regression analysis for the optimization of the medium composition for phytase activity by <i>S. cerevisiae</i> in sodium phytate substrate	63
Table 4 Temperature and agitation ranges as analyzed by RSM	63
Table 5 Experimental design and results for the optimization of the fermentation conditions for phytase activity using RSM	64
Table 6 Analysis of variance and regression analysis for the optimization of the fermentation conditions for phytase activity by <i>S. cerevisiae</i> in sodium phytate substrate	65

CAPÍTULO 4

Tabela 1 Atividade relativa de fitases de <i>S. cerevisiae</i> , Natuphos® e Quantum® em substrato 4-npp em presença de diferentes sais (%)	89
Tabela 2 Atividade relativa de fitases de <i>S. cerevisiae</i> , Natuphos® e Quantum® em substrato fitato de sódio em presença de diferentes sais (%)	90
Tabela 3 Especificidade por substrato de fitases de diferentes fontes	95

CAPÍTULO 5

Tabela 1 Composição das rações experimentais (%)'	109
Tabela 2 Determinação de fósforo disponível e total e teor protéico em FAD e FAD desfitatizado enzimaticamente	112
Tabela 3 Parâmetros metabólicos e composição corporal dos juvenis de carpa capim (<i>Ctenopharyngodon idella</i>) observados no final do experimento ¹	115
Tabela 4 Determinação de fósforo nas águas dos tanques (mg/L) ¹	118

ANEXO 2

Tabela 1 Parâmetros cinéticos de fitases em diferentes substratos	127
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

S. cerevisiae: *Saccharomyces cerevisiae*

GRAS: reconhecidamente segura

BSE: encefalopatia espongiforme bovina

IP6: inositol hexafosfato

IP5: éster de inositol pentafosfato

IP4: éster de inositol tetrafosfato

IP3: éster de inositol trifosfato

IP2: éster de inositol bifosfato

IP1: éster de inositol monofosfato

P: fósforo

P_i: fosfato inorgânico

FTU: unidade de atividade de fitase

YM: meio Yeast Malt

PSM: meio para screening de fitase

4 – npp: 4-nitrofenilfosfato dissódico

4 – np: p-nitrofenol

FAD: farelo de arroz desengordurado

FAI: farelo de arroz integral

FAD – FS: farelo de arroz desengordurado tratado com fitase produzida por *Saccharomyces cerevisiae*

FAD – FN: farelo de arroz desengordurado tratado com Natuphos®

RESUMO

A maior parte do fósforo em cereais e sementes é estocada na forma de fitato. Entretanto, na alimentação, o fitato é um fator antinutricional devido à sua capacidade quelante de metais e ligação com proteína, conseqüentemente impossibilitando a absorção de nutrientes e minerais importantes nutricionalmente. Apesar do fitato servir como fonte principal de energia e fósforo para a germinação de sementes, dois terços deste mineral encontra-se indisponível para animais monogástricos, de forma que rações animais são suplementadas com fosfato inorgânico, ou alternativamente, com enzimas com capacidade de hidrolisar fitatos – fitases. A fitase está amplamente distribuída na natureza, é encontrada em animais, plantas e microrganismos. Considerando que fitases de leveduras sem utilização de engenharia genética ainda não são comerciais, este estudo buscou uma nova fonte de levedura potencialmente produtora de fitase termoestável para aplicação em ração animal. *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) strain zi (EU188613) foi selecionada entre 140 leveduras isoladas do solo por meio de screening com aumento gradual de temperatura até 48°C, mantendo a capacidade de hidrólise de fitato. O aumento na produção de fitase por *S. cerevisiae* foi cerca de 10 vezes após otimização da composição do meio de cultivo e parâmetros de fermentação pela técnica de Desenho Experimental, comparada à produção em meio não otimizado. A enzima de *S. cerevisiae* apresentou características desejáveis à aplicação na elaboração de rações animais, como atividades altas em ampla faixa de pH, resistência elevada à ação de proteases, ampla especificidade por substrato e atividade ótima e estabilidade térmica em faixas mais amplas (37 – 80°C). A aplicação da nova fitase de *S. cerevisiae* na alimentação de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) comprovou a eficiência da enzima pela hidrólise de ácido fítico de farelo de arroz desengordurado utilizado na elaboração da ração. As respostas metabólicas obtidas comparadas à ração controle com farelo sem tratamento enzimático e com adição de fosfato bicálcico sugerem que a ação da nova fitase na concentração de 550 FTU/Kg dispensa a suplementação com fontes externas de fósforo inorgânico. A nova fitase produzida por *S. cerevisiae* apresenta características bioquímicas relevantes e adicionalmente, o uso deste microrganismo é reconhecido como seguro para aplicação em alimentos.

SUMMARY

Most of the phosphorus in grains and seeds are stored in the form of phytate. However, in the diet, phytate is an anti-nutritional factor because of its capacity to chelate metals and link protein, thus preventing the absorption of nutrients and nutritionally important minerals. Although the phytate serve as the main source of energy and phosphorus for seed germination, two thirds of this mineral is unavailable to monogastric animals, so animal feeds are supplemented with inorganic phosphate, or alternatively, with enzymes capable of hydrolyzing phytate - phytases. The enzyme is widely distributed in nature, and can be found in animals, plants and microorganisms. Since phytases of yeast produced without the use of genetic engineering are yet not commercially available, this study sought a new source of yeast able to produce thermostable phytase aimed to be used in animal feed. *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) strain zi (EU188613) was selected from 140 yeasts isolated from soil by screening with a gradual increase in temperature to 48 °C, maintaining the capacity to hydrolyze phytate. Phytase production by *S. cerevisiae* increased about 10-fold after optimization of culture medium composition and fermentation parameters by experimental design techniques, compared to production in a non-optimized medium. The enzyme from *S. cerevisiae* showed desirable characteristics for application in the production of animal food as activity increases in a wide pH range, high resistance to the action of proteases, broad substrate specificity and optimum activity and thermal stability in wider ranges (37-80 ° C). The implementation of the new phytase *S. cerevisiae* in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) meals confirmed the efficiency of the enzyme by the hydrolysis of phytic acid in rice bran used in the food preparation. The metabolic responses obtained compared to the control diet with meal without enzyme treatment and the addition of dicalcium phosphate suggest that the effect of the new phytase at a concentration of 550 FTU / kg does not require supplementation with external sources of inorganic phosphorus. The new phytase, produced by *S. cerevisiae*, has relevant biochemical characteristics, furthermore the use of this microorganism in food is recognized to be safe.

INTRODUÇÃO GERAL

O uso de enzimas exógenas como aditivos na nutrição animal é crescente no mercado mundial. No Brasil as fitases têm sido usadas em rações animais visando a diminuição da adição de fontes de fósforo e redução do custo. Fitase é uma enzima éster hidrolase amplamente distribuída na natureza, encontrada em animais, plantas e microrganismos, capaz de reconhecer fitato como substrato. O emprego desta enzima na formulação de rações para alimentação animal pode ser o caminho para redução dos custos de produção sem prejuízo para o desempenho do animal. Aliada aos benefícios decorrentes da minimização dos fatores antinutricionais do ácido fítico, está a contribuição para conservação ambiental pela redução de fósforo nas águas decorrente da possibilidade de utilização de fósforo ligado ao fitato pelo animal.

Em condições apropriadas todas as fitases são capazes de separar o fósforo da molécula de fitato. As características bioquímicas não são as mesmas entre as fitases de diferentes fontes e determinam quão bem uma fitase irá funcionar. Em consequência, intensificam-se a busca por novas fontes e estudos de otimização da produção e atividade de fitases de fontes já conhecidas.

Grande parte das fitases disponíveis no mercado perdem rapidamente sua eficácia quando submetidas às altas temperaturas dos processos de peletização de rações, necessitando serem utilizadas na forma de spray no produto final. A inativação de fitases por proteases endógenas também deve ser considerada na eficiência e utilização destas, tanto quanto as fitases revestidas, que constituem um caso especial, pois primeiramente, o revestimento precisa ser decomposto para que a enzima possa atuar. A atividade e estabilidade em meio ácido é necessária para que a enzima atue no trato gastrointestinal, bem como é desejada a atuação em ampla faixa de pH para degradação efetiva do fitato ao longo de todo sistema digestório do animal. A engenharia genética contribuiu para o aumento da produção e utilização de fitases, visto que a grande maioria das enzimas disponíveis no mercado deriva de expressão de genes heterólogos. Percebe-se, no entanto, que estes fatores aumentam o custo com equipamentos, a complexidade do processo e limitam o uso das fitases. Embora existam fitases disponíveis no mercado, ainda não se

alcançou a enzima que reúna todas as características desejáveis das fitases para utilização ampla na produção de rações para alimentação animal.

Este estudo teve como objetivo inicial a busca de uma nova linhagem de levedura potencialmente produtora de fitase termoestável, visto que, fitases de leveduras sem utilização de engenharia genética ainda não são comerciais, e posteriormente a caracterização e otimização da produção desta nova fitase para aplicação na alimentação animal. O trabalho será apresentado na forma de artigos como segue:

O Capítulo um consiste numa revisão bibliográfica sobre a fitase e seu interesse comercial, principalmente sua potencial aplicação na alimentação animal.

O Capítulo dois apresenta a seleção da nova linhagem de levedura produtora de fitase dentre 140 leveduras isoladas do solo, identificada por taxonomia como *Saccharomyces cerevisiae* strain zi (EU188613) pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA). A pesquisa tem importância ressaltada por ser o primeiro encontrado na literatura consultada a utilizar *screening* com aumento gradual de temperatura e relevância de obter fitases termoestáveis. O estudo foi publicado na Revista *Food Science and Biotechnology*.

O Capítulo três descreve o estudo da produção de fitase de *S. cerevisiae* em frascos agitados empregando a metodologia de superfície de resposta. Previamente à otimização da composição do meio de cultivo e parâmetros da fermentação para produção de fitase em frascos agitados através da técnica de Desenho Experimental, foram realizados estudos de avaliação dos efeitos de fontes diferentes de carbono, nitrogênio e indutores para produção de fitase.

O Capítulo quatro relata a caracterização bioquímica da fitase produzida por *S. cerevisiae*. São apresentados dados de pH ótimo e de estabilidade; temperatura ótima e de estabilidade; efeito da concentração de substrato; resistência à ação de proteases; especificidade por diferentes substratos, parâmetros cinéticos e efeito da presença de íons no meio reacional. Adicionalmente, realizou-se a caracterização de duas fitases comerciais.

O quinto e último capítulo apresenta a aplicação da fitase produzida por *S. cerevisiae* na alimentação de peixes. Para fins comparativos da eficiência da fitase testada, foram realizados estudos paralelos com fitase comercial derivada de *Aspergillus niger* (Natuphos®) e uma ração controle sem tratamento enzimático. Este estudo é de grande

relevância, pois em alternativa à adição convencional da fitase na ração, foi realizado o tratamento enzimático prévio de um ingrediente da ração, o farelo de arroz, que apresenta elevado teor de fitato. O aumento do valor nutricional do farelo permitiu a utilização deste na elaboração de rações substituindo em partes ingredientes nutritivos normalmente utilizados, o que pode representar redução no custo de produção. O valor agregado ao farelo merece destaque ainda, pelo destino alternativo possível deste subproduto da indústria.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Estudo da produção de nova fitase de levedura termoestável e potencial aplicação na elaboração de ração para alimentação animal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleção de nova linhagem de levedura potencialmente produtora de fitase termoestável;
- Estudo do meio de cultivo mineral e parâmetros de fermentação para a otimização da produção da nova fitase em frascos agitados utilizando a técnica de Desenho Experimental;
- Caracterização Bioquímica da nova fitase de levedura;
- Estudo de aplicação da nova fitase através de tratamento de ingrediente utilizado na produção de ração para alimentação de peixes.

CAPÍTULO 1: FITASES: VISÃO GERAL E APLICAÇÕES EM ALIMENTAÇÃO ANIMAL

Edi Franciele Ries¹ e Gabriela Alves Macedo¹

RESUMO

A maioria dos vegetais são ricos em proteínas, gorduras e minerais mas possuem fatores anti-nutricionais como por exemplo o ácido fítico. A presença de fitato em excesso não só polui o meio ambiente como também atrapalha na dieta de animais monogástricos. O fitato se liga fortemente a cátions divalentes, formando sais insolúveis e impedindo a utilização desses nutrientes minerais. Este composto também se liga a grupos de proteínas e lipídios, reduzindo sua solubilidade e prejudicando a digestão. Nos últimos anos, tais efeitos antinutricionais e ambientais dos fitatos despertaram maior atenção dos cientistas da área de nutrição animal e biotecnologia para o estudo das fitases. Esta enzima é uma monoester fosfatase específica que pode ser distinta quanto à posição de ataque na molécula de ácido fítico: 3-fitase E.C. 3.1.3.8 ou 6-fitase E.C. 3.1.3.26. Fitases podem ser encontradas em animais superiores, vegetais e microrganismos. Novas fontes de fitases com características como termoestabilidade e resistência a baixos valores de pH e à proteases ácidas constituem a grande busca no setor destas enzimas, devido à sua potencial aplicação na elaboração de rações para alimentação animal.

Palavras chave: ácido fítico, fitases, fontes, interesse comercial.

¹ Faculdade de Engenharia de Alimentos – Departamento de Ciência de Alimentos. Rua Monteiro Lobato, 80. Caixa Postal 6121, CEP 13083-862, UNICAMP – Campinas – SP.
E-mail: gmacedo@fea.unicamp.br

Phytases: overview and applications in animal feed

ABSTRACT

Most of plants are rich in proteins, fat and minerals, but present anti-nutritional factors such as phytic acid. The presence of phytic acid in excess is not only a pollutant but it also has negative effects on diet of monogastric animals. Phytate binds strongly to divalent cations producing insoluble salts, making these minerals nutritional unavailable. This compound can also bind to protein and lipids, reducing their solubility and digestion. Lately, these antinutritional and environmental effects have gained more attention from researchers specialized in animal nutrition and biotechnology for the study of phytases. This enzyme is an specific monoester phosphatase which can be distinct according to the position it attacks the phytic acid molecule: 3-phytase E.C. 3.1.3.8 or 6-phytase E.C. 3.1.3.26. Phytases can be found in superior animals, plants and microorganisms. Due to their potential application in production of animal food, new sources of phytases with some characteristics such as thermostability and resistance to low pH and acid proteases consist in a prominent area of research in enzyme sector.

Key words: phytic acid, phytase, sources, commercial interest

INTRODUÇÃO

A hidrólise do ácido fítico, a principal forma de armazenamento de fósforo em sementes e pólen, para mioinositol e ácido fosfórico é um processo metabólico muito importante em muitos sistemas biológicos, que se acredita ser principalmente afetado pela fitase. Fitase é uma enzima éster hidrolase amplamente distribuída na natureza, encontrada em animais, plantas e microrganismos, capaz de reconhecer fitato como substrato (Konietzny e Greiner, 2002).

O potencial de uso de fitases é determinado por fatores econômicos e resulta em aumento de investigações de fontes pouco exploradas como leveduras, e busca de enzimas com características desejáveis para indústria de alimentação animal. As características mais procuradas nas novas fitases são a termoestabilidade, a fim de não se degradarem no processo de fabricação das rações peletizadas, além da estabilidade ácida, o que as tornaria estáveis em estômagos de monogástricos (Casey e Walsh, 2003).

ÁCIDO FÍTICO

Fitato ou fósforo fítico é a designação dada ao fósforo que faz parte da molécula de ácido fítico (hexa-fosfato de inositol), que é encontrado nos vegetais (Figura 1). O grupo ortofosfato encontra-se altamente ionizado em meio neutro ou alcalino, interagindo com outros componentes, formando complexos com uma variedade de cátions (Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+}); grupo amina de alguns aminoácidos; moléculas conjugadas de glicose (especialmente amido); enzimas digestivas e proteínas da dieta. Assim, a propriedade antinutricional do ácido fítico está além do não aproveitamento do fósforo, resultando em reduzida digestibilidade de minerais e proteínas, redução de energia para monogástricos e aumento do custo de rações e de minerais nas excretas de animais (Howson e Davis, 1983; Lehninger, 1995).

Tal efeito negativo do ácido fítico tem maior impacto em países em desenvolvimento, onde grande parte da população tem como principais fontes de zinco os cereais, tubérculos e as leguminosas e acesso limitado a alimentos de origem animal. Os efeitos benéficos do mioinositol na saúde, como agente anticarcinogênico e antioxidante,

têm maior impacto nos países desenvolvidos, onde a maior preocupação é com patologias associadas ao envelhecimento, como dano oxidativo e câncer (Brinch-Pedersen *et al.*, 2002). Animais com grande quantidade de fitato na dieta apresentam sinais de sub-nutrição, perda de peso, crescimento retardado e distúrbios no sistema reprodutor.

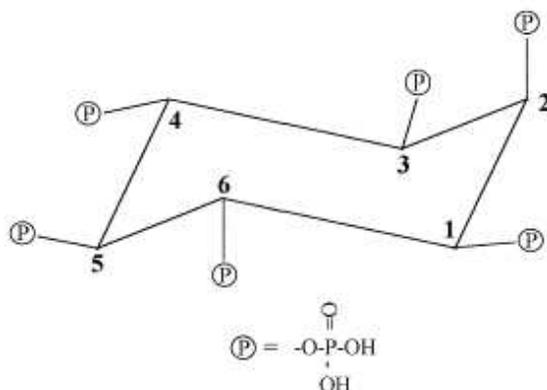


FIGURA 1 ESTRUTURA MOLECULAR DO ÁCIDO FÍTICO.

Durante o amadurecimento, cereais e sementes de leguminosas acumulam uma quantidade substancial de ácido fítico, o que representa de 60% a 80% do total de fósforo (Lei e Porres, 2003). Apesar do fitato servir como fonte principal de energia e fósforo para a germinação de sementes, o fósforo ligado é pouco disponível para animais monogástricos. De maneira que, o fósforo inorgânico, um mineral não-renovável e caro, é acrescentado nas dietas de suínos, peixes e aves para atender suas necessidades nutricionais (Vats e Banerjee, 2004).

O fósforo do fitato que não é utilizado é excretado nas fezes do animal que conseqüentemente ficam expostas no solo, particularmente em áreas de produção intensiva de criações zootécnicas (Common, 1989; Wash *et al.*, 1994), podendo chegar às águas causando eutrofização que resulta na redução do oxigênio na água, levando à morte de peixes e outros animais aquáticos (Mallin, 2000).

Outra alternativa à reduzida disponibilidade de fósforo é a adição de enzimas, que pode aumentar o valor nutritivo do alimento, melhorando a digestibilidade das proteínas e a disponibilidade de minerais pela hidrólise do fitato durante a digestão no estômago ou durante o processamento do alimento (Konietzny e Greiner, 2002).

FITASE

A enzima ou mioinositol-hexafosfato fosfohidrolase é uma monoéster fosfatase específica que pode ser diferenciada quanto à posição de ataque na molécula de ácido fítico. De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada e União Internacional de Bioquímica (IUPAC-IUB), duas categorias de fitases são reconhecidas conforme a posição onde a hidrólise do fitato é iniciada: 3-fitase (EC 3.1.3.8) que inicia removendo um grupo ortofosfato da posição C3, enquanto a 6-fitase (EC 3.1.3.26) realiza a remoção na posição C6 da molécula de mioinositol hexafosfato, sendo que a 3-fitase é principalmente de origem microbiana e 6-fitase é derivada de plantas (Pandey *et al.*, 2001; Konietzny e Greiner, 2002; Selle e Ravindran, 2006).

A reação de desfosforilação realizada pela fitase está ilustrada na Figura 2 e converte o ácido fítico em ácido fosfórico, inositol livre, e/ou compostos intermediários incluindo ésteres de inositol mono-, bi-, tri-, tetra, e pentafosfato (IP₁-IP₅) dependendo do grau de desfosforilação. O caminho da reação para a degradação do ácido fítico é: IP₆ → IP₅ → IP₄ → IP₃ → IP₂ → IP₁ → inositol (Dasgupta *et al.*, 1996).

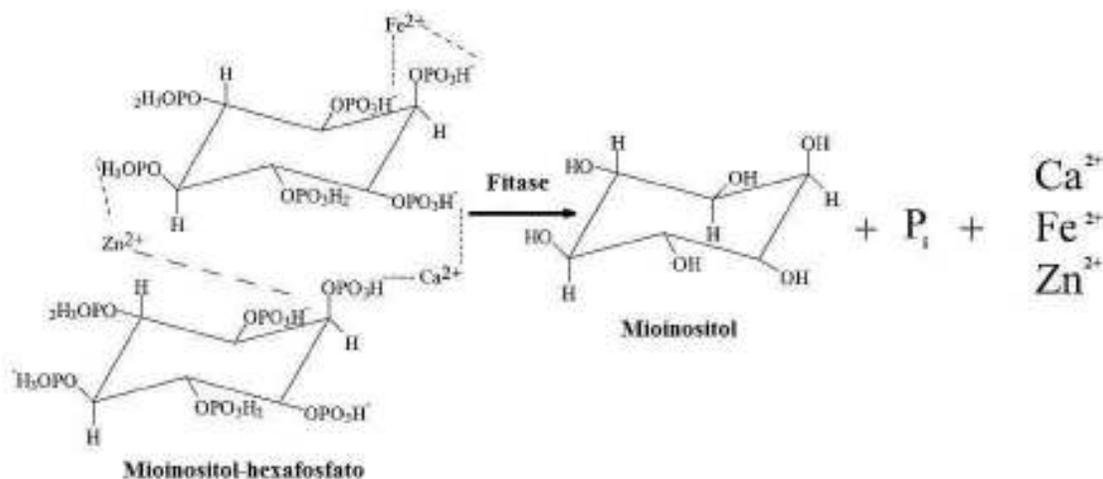


FIGURA 2 AÇÃO DA FITASE EM MIOINOSITOL-HEXAFOSFATO COM LIBERAÇÃO DE MIOINOSITOL LIVRE E FOSFATO INORGÂNICO (LEI E PORRES, 2003).

No caso da fitase da semente da planta, o fosfato na posição 6 é liberado primeiro, seguido pelos de posição 5 e 4, ou 1 e 3, ou ainda 1 e 4. Na fitase de microrganismos, a hidrólise do fosfato começa da posição 1 ou 3, exceto pela enzima de *E. coli* cuja ação começa pela posição 6. IP₆ e IP₅ são os inositolis-fosfato mais abundantes em células animais. Em microrganismos os inositolis mais encontrados foram IP₅, IP₄, IP₃ e IP₂ (Greiner e Konietzny, 1996).

A fitase é capaz de reconhecer fitato como substrato e coincide com as propriedades não-hidrolisantes de fosfatases não específicas. Em geral, grande parte das enzimas pertence à família da histidina ácido fosfatase, que é caracterizada por um sítio ativo conservado RHGXRXP e um dipeptídeo cataliticamente ativo HD (Kim *et al.*, 1998; Konietzny e Greiner, 2002). Estas enzimas raramente têm uma estrutura similar e a clivagem dos grupos fosfatos também não ocorre pelo mesmo mecanismo. Este grupo de enzimas catalisa a hidrólise do ácido fítico em duas etapas: ataque nucleofílico da histidina do sítio ativo da enzima na ligação do fosfoéster do ácido fítico mais fácil de ser quebrada e protonação do grupo restante pelo resíduo de ácido aspártico do HD (Ostanin *et al.*, 1992). A determinação da atividade enzimática utilizando sais de ácido fítico permite distinguir fitase de outras fosfatases ácidas, que são incapazes de degradar fitato. No entanto, a especificidade do substrato para fitase pode variar devido a diferenças nas características moleculares de enzimas purificadas de diferentes fontes.

O fosfato inorgânico hidrolisado é medido por um método baseado em colorimetria, sendo que metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa foi bem desenvolvida para separação e determinação de ácido fítico e inositolis-fosfato menores resultantes das reações de catálise da fitase. Além do inositol-hexafosfato, outros polifosfatos formados após ação da fitase também são posteriormente hidrolisados pela enzima (Liu *et al.*, 1998; Konietzny e Greiner, 2002).

Os ensaios colorimétricos para determinação de ortofosfatos inorgânicos baseiam-se principalmente na redução de um complexo fosfomolibdato por sulfato ferroso ou ácido ascórbico produzindo “molibdênio azul” (Engelen, *et al.*, 1994). O método colorimétrico de determinação de fósforo conhecido como método do ácido ascórbico de Fiske e Subbarow (1925), bem como adaptações originadas deste, têm sido utilizados durante décadas por diversos autores para determinação da atividade de fitases (Shieh e Ware, 1968; Heinonen e

Lahti, 1981; Lambrechts *et al.*, 1992 e 1993; Segueilha *et al.*, 1993; Bindu *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998; Bae *et al.*, 1999; Sano *et al.*, 1999; Shimizu, 1999; Casey e Walsh, 2003 e 2004; Singh e Satyanarayana, 2006; Vats e Banerjee, 2006).

A atividade da fitase pode também ser comprovada por meio da atividade de fosfatase ácida utilizando substratos sintéticos, como por exemplo, p-nitrofenilfosfato, conforme descrito por Ullah e Gibson (1986) sendo amplamente utilizada por diversos autores (Lambrechts *et al.*, 1992 e 1993; Segueilha *et al.*, 1992 e 1993; Kim *et al.*, 1998; Sano *et al.*, 1999; Stockmann *et al.*, 2003).

Normalmente, a atividade da fitase é medida pela quantidade de fosfato inorgânico (Pi) liberado pela ação da enzima. Uma unidade de atividade da enzima pode ser definida como a quantidade de enzima necessária para liberar um μmol de Pi por minuto de reação nas condições de pH, temperatura e concentração de fitato em que foram realizados os testes, sendo que não existe uma unidade internacional padrão para medida da atividade de fitase, o que dificulta a comparação da eficácia de fitases de diferentes fontes (Selle e Ravindran, 2006).

PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FITASES

O processo fermentativo é significativamente influenciado por vários parâmetros físicos e químicos. As condições de cultivo, tipo de linhagem, natureza do substrato e disponibilidade de nutrientes são fatores críticos que afetam a produção de fitases (Vats e Banerjee; 2004), obtida a partir da adição do fitato de sódio ao meio como fonte de fósforo inorgânico. Vitaminas, elementos traços e FeCl_3 podem ainda ser adicionados como descrito por Galzy (Galzy, 1964) e utilizado em alguns estudos (Segueilha *et al.*, 1992; Segueilha *et al.*, 1993 e Lambrechts *et al.*, 1993).

A produção de fitase é amplamente realizada em meio líquido (Segueilha *et al.*, 1992; Shimizu, 1992; Segueilha *et al.*, 1993; Lambrechts *et al.*, 1993; Mayer *et al.*, 1998; Mayson *et al.*, 2002; Casey e Walsh, 2004; Huang *et al.*, 2006; Meta *et al.*, 2009; Hang *et al.*, 2009), entretanto, recentemente a produção em meio sólido ganhou destaque pela possibilidade de utilização de resíduos agrícolas. Alguns estudos mostram a utilização de meios de cultivo alternativos na produção de fitases: aveia na produção de fitase por

Kodamaea ohmeri (Li *et al.*, 2008), resíduos de azeitonas secas na produção de fitase por *Aspergillus niger* (Vassilev *et al.*, 2007); melação de cana na produção de fitase por *Sporotrichum thermophile* (Singh e Satyanarayana, 2006) e por *Pichia anomala* (Vohra e Satyanarayana, 2004).

Objetivando menor custo e maior rentabilidade, grupos de pesquisa em biotecnologia têm utilizado otimização de parâmetros da produção de fitase, como meio de cultivo e determinação de níveis ótimos de fatores e taxas de alimentação do processo fermentativo (Sunitha *et al.*, 1999 e 2000; Vohra e Satyanarayana, 2002; Bogar *et al.*, 2003a e 2003b; Chadha *et al.*, 2004; Kaur e Satyanarayana, 2005; Singh e Satyanarayana, 2006 e 2008; Li *et al.*, 2008).

A etapa seguinte à produção é a purificação, que consiste numa série de processos que removem contaminantes até a obtenção de um produto de elevado grau de pureza. As enzimas são purificadas pelo emprego sucessivo de métodos químicos ou físicos, e a purificação de fitases normalmente envolve ultrafiltração, centrifugação, filtração em gel e separação por coluna cromatográfica ou ainda purificação parcial por precipitação com sulfato de amônio. O fracionamento de acordo com a solubilidade em soluções de sulfato de amônio é muito utilizado em isolamento de proteínas por fornecer preparações com menor grau de contaminação e mais enriquecidas das proteínas de interesse.

A filtração a gel normalmente segue a precipitação por sulfato de amônio, servindo para dessalinizar a preparação, assim como fracionar as proteínas pelo tamanho. Esta técnica já foi utilizada em processos de purificação de fitases de *Schwanniomyces castelli* (Segueilha *et al.*, 1992), *Rhizopus oligosporus* (Casey e Walsh, 2004) e *Saccharomyces cerevisiae* (Jin-In *et al.*, 2009), e baseia-se no efeito de peneira molecular. A cromatografia em coluna de troca iônica é considerada mais sensível e seletiva do que a cromatografia de fase reversa e amplamente utilizada em etapas de purificação de fitases (Nayini e Markakis, 1983; Segueilha *et al.*, 1992; Casey e Walsh, 2004; Garchow *et al.*, 2006; Jin-In *et al.*, 2009).

A eletroforese normalmente é utilizada para confirmação da purificação da fitase (Segueilha *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1998; Casey e Walsh, 2004; Garchow *et al.*, 2006; Jin-In *et al.*, 2009). A corrida simultânea de proteínas de massas moleculares conhecidas

permite determinar para cada gel a massa molecular da amostra por meio da relação entre massa molecular e distância de migração.

Na literatura, encontram-se estudos de purificação e caracterização de fitases de diferentes fontes, como de *Aspergillus ficcum* NRRL 3135 (Ullah e Gibson, 1987); *Schwanniomyces castelli* (Segueilha *et al.*, 1992); *Bacillus subtilis* (Shimizu, 1992); *Bacillus* sp. DS11 (Kim, *et al.*, 1998); *Arxula adenivorans* (Sano, *et al.*, 1999); *Peniophora lycci*, *Agrocybe pediades*, *Ceriporia* sp. e *Trametes pubescens* (Lassen, *et al.*, 2001); *Pichia anomala* (Vohra e Satyanarayana, 2002); *Rhizopus oligosporus* (Casey e Walsh, 2004); *Lilium longiflorum* (Garchow, *et al.*, 2006); *Aspergillus niger* (Casey e Walsh, 2003; Vats e Banerjee, 2006); *Yersinia intermedia* (Huang, *et al.*, 2006).

A maioria das fitases isoladas é ativa dentro da faixa de pH 4,5 – 6,0. As fitases podem ser classificadas de acordo com o pH ótimo de atividade, podendo agir em pH em torno de 5,0 (ácidas) ou ainda em torno de 8,0 (alcalinas). A estabilidade de enzimas de plantas decresce drasticamente em valores de pH abaixo de 4 ou maiores que 7,5, enquanto que a maioria das fitases de origem microbiana conserva atividade a valores de pH abaixo de 3,0 e acima de 8,0 (Konietzny e Greiner, 2002). Essa grande diferença em seus valores de pH ótimo pode ser parcialmente ou totalmente refletida na variação da estrutura molecular ou estereoespecificidade da enzima dependendo da fonte.

As fitases geralmente apresentam massa molecular entre 40 e 100 kDa e temperatura ótima de atividade na faixa de 45 – 60°C (Pandey *et al.*, 2001). A maioria das enzimas de plantas é inativada irreversivelmente em temperaturas superiores à 70°C, enquanto que microbianas retêm atividade significativa após períodos prolongados de incubação (Konietzny e Greiner, 2002). Fitases isoladas de *A. fumigatus* (Pasamontes *et al.*, 1997) e *S. castelli* (Segueilha *et al.*, 1992) são relatadas como resistentes à altas temperaturas.

FONTES E INTERESSE COMERCIAL

Nos animais, a fitase existe nos eritrócitos e plasma de várias espécies de vertebrados e no intestino delgado de mamíferos. Embora plantas como trigo e cevada sejam ricas em fitases intrínsecas, estas possuem atividade em uma estreita faixa de pH,

sendo menos eficazes que as microbianas (Cao *et al.*, 2007). Vários microrganismos, incluindo bactérias, leveduras e muitas espécies de fungos também produzem fitase. Normalmente, as fitases produzidas por fungos são extracelulares, ao contrário das enzimas de bactérias, exceto por *Bacillus subtilis* e *Enterobacter*. Os procedimentos completos utilizados na produção de fitase dependem da fonte de origem e da pureza requerida (Konietzny e Greiner, 2002).

A fitase foi descoberta por Suzuki *et al.* em 1908 e começou a ser estudada mais detalhadamente em 1960. A primeira fitase comercial derivada de *Aspergillus niger* com capacidade de liberar fósforo ligado ao fitato e reduzir sua excreção foi introduzida no mercado em 1991 (Engelen *et al.*, 1994; Selle e Ravindran, 2006), conhecida como Natuphos®, produzida e comercializada pela BASF. Natuphos® mostra uma ótima atividade nas condições presentes no trato digestivo de frangos e suínos (Engelen *et al.*, 1994).

Hoje, preparações de fitases são comercialmente disponíveis e utilizadas em alimentação animal, podendo ser possível futuramente a utilização no processamento de alimentos (Sandberg e Andlid; 2002). A maioria das enzimas produzidas em escala comercial é derivada de linhagens mutantes de fungos ou utilizam tecnologia de DNA recombinante. As três fitases comumente utilizadas são derivadas de *Aspergillus niger*, que é uma 3-fitase, e de *Peniophora lycci* e *Escherichia coli*, ambas 6-fitases (Selle e Ravindran, 2006; Cao *et al.*, 2007).

A utilização de fitases fúngicas em preparações para frangos, suínos e peixes demonstrou a eficácia da suplementação no aumento da disponibilidade de fósforo e minerais normalmente quelados ao fitato, como ferro e zinco. Além disso, a menor liberação de fósforo no ambiente reduz seu arraste pela água, reduzindo o impacto ambiental (Brinch-Pedersen *et al.*, 2002; Konietzny e Greiner, 2002). As primeiras fitases consideradas de segunda geração eram derivadas da bactéria *Escherichia coli* e demonstraram uma melhor influência no desempenho, aumento na mineralização óssea e na biodisponibilidade do fósforo para aves (Remus, 2008).

Estudos disponíveis na literatura de fitases produzidas ou expressas por leveduras como *Schwanniomyces castellii* (Segueilha *et al.*, 1992), *Schwanniomyces occidentalis* (Nakamura *et al.*, 1999), *Pichia anomala* (Vohra e Satyanarayana, 2002), *Arxula*

adenivorans (Sano *et al.*, 1999), *Hansenula polymorpha* (Mayer *et al.*, 1998; Stockmann *et al.*, 2003) e *Rhodotorula gracilis* (Bindu *et al.*, 1998), *Saccharomyces cerevisiae* (Han *et al.*, 1999), *Pichia pastoris* (Hang *et al.*, 2009) receberam atenção crescente devido à possibilidade de serem facilmente incorporadas em dietas de alimentação animal e serem ricas em nutrientes (Li *et al.*, 2008).

As leveduras são microrganismos comumente utilizados para expressar fitases heterólogas (Mayer *et al.*, 1999; Han *et al.*, 1999; Mayson *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2008; Hang *et al.*, 2009) por apresentarem características relacionadas principalmente a termoresistência e estabilidade em condições fisiológicas do trato gastrointestinal. Entretanto, ainda não há fitases de leveduras sem utilização de modificação genética disponíveis no mercado. Em geral, leveduras são microrganismos manipulados com facilidade em processos industriais, sendo consideradas células grandes, “fortes” e robustas por tolerarem certas condições desfavoráveis, além de não serem muito exigentes nutricionalmente (Silva, 1989).

Saccharomyces cerevisiae, em particular, tem habilidade reconhecida de fermentar diversos tipos de carboidratos e possui alta tolerância a concentrações elevadas de açúcar, álcool e a baixos teores de pH (Angelis, 1992), além de apresentar parede celular espessa e rígida, que a torna resistente à ação de enzimas digestivas. O genoma da levedura *S. cerevisiae* já foi seqüenciado e é um microrganismo bastante estudado e utilizado comercialmente. Este microrganismo tem-se mostrado excelente hospedeiro na produção de proteínas heterólogas, incluindo aquelas de importância medicinal, por não ser patogênica para humanos, ser livre de endotoxinas e apresentar ótimo crescimento em escala industrial (Meta *et al.*, 2009).

A intensificação dos estudos de produção e novas fontes de fitase deve-se principalmente ao interesse crescente em tais enzimas para aplicação em rações animais e mesmo na alimentação humana (Konietzny e Greiner, 2002). O importante papel das fitases na nutrição humana se dá tanto pela degradação do fitato durante processamento de alimentos quanto no trato gastrointestinal. Técnicas normalmente utilizadas no processamento de alimentos como cozimento, maltagem e fermentação podem aumentar a ação de fitases naturalmente presentes em cereais e legumes, sendo ainda a adição de enzimas produzidas por microrganismos uma alternativa para aumentar a degradação do

fitato e conseqüentemente a biodisponibilidade de ferro, zinco e fósforo (Sandberg e Andlid; 2002).

ALIMENTAÇÃO ANIMAL

O uso de dietas vegetais na alimentação de monogástricos aumentou significativamente com a incidência da BSE (encefalopatia espongiforme bovina), também conhecida como doença da vaca louca, quando Brasil e países da Comunidade Européia restringiram a utilização de produtos de origem animal, como farinhas de carne e ossos, na alimentação de ruminantes e monogástricos (Sá; 2005).

As dietas consideradas padrões na produção de ração para monogástricos têm como ingredientes principais o milho e o farelo de soja, ingredientes que mais contribuem para o aumento nos custos das rações. A sazonalidade interfere nos preços desses produtos, o que incentiva a busca por alimentos alternativos tais como os subprodutos agroindustriais (Grangeiro *et al.*, 2001). O farelo de soja possui uma superioridade conhecida e comprovada de teor de proteínas, e assim, a substituição deste ingrediente na formulação de rações só ocorre quando o custo favorecer a fonte alternativa de proteína.

Adicionalmente ao uso de fontes nutritivas alternativas, tem se a utilização de enzimas que permitem melhor aproveitamento de nutrientes presentes nos ingredientes das rações. No entanto, o uso de enzimas exógenas na formulação de dietas requer cuidados para garantia da eficiência e ação desejada, como por exemplo, a tolerância ao calor. A termoestabilidade da enzima indica se o produto deve ser adicionado após a peletização por meio de pulverização, ou se pode ser aplicado via adição direta na ração, mas não indica se há impacto na atividade *in vivo* da enzima desde que tenha sido corretamente aplicada à ração (não seja inativada pela peletização) (Remus, 2008).

Alvarenga *et al.* (2008) destacam ainda outros fatores na escolha da enzima: tipo de substrato utilizado na ração; capacidade das enzimas em ultrapassar barreiras encontradas no estômago (pH baixo e presença de enzimas proteolíticas); adequação da dosagem correta dependendo do substrato, da espécie e idade do animal e também do local no trato gastrintestinal sobre o qual atuará.

Um processo alternativo à adição de fitases em dietas vegetais com ingredientes ricos em fitato é o tratamento do cereal antes da inclusão na ração nas condições ótimas da enzima. A hidrólise do ácido fítico e redução dos fatores antinutricionais deste permite o aproveitamento dos ingredientes energéticos, protéicos e outros nutrientes do cereal e ração, reduzindo custos com suplementações e desenvolvimento de tecnologias para garantir a eficiência da enzima.

Storebakken *et al.* (1998) avaliaram o concentrado de proteína de soja como fonte protéica em dietas para salmão do Atlântico, e o efeito da aplicação de fitase na redução de ácido fítico e disponibilidade de proteína. O concentrado de soja utilizado nas dietas (12 Kg) foi previamente tratado com fitase (40 mL de preparação de fitase 5000 FTU/mL), e incubado durante 2 horas a 40°C. Os autores relataram redução do ácido fítico de 8g/Kg (dieta a base de farinha de peixe e proteína de soja) para 0,5 g/Kg (dieta com proteína de soja tratada com fitase). O tratamento prévio com fitase, também resultou em melhores índices de digestibilidade e retenção de proteínas, conversão da ração e redução na excreção de nitrogênio metabólico.

Tratamento semelhante foi realizado por Cúneo *et al.* (2000) utilizando farelo de arroz e água (1:4) adicionado de fitase exógena (Sigma de arroz, P-1259) na concentração de 1,3g/100g de farelo e pH ajustado com HCl para 5,15. O tratamento do farelo foi realizado com agitação contínua em banho a 55°C durante 24 horas. Neste experimento, o baixo nível de desfítatização encontrado pelos autores (37%) foi justificado como decorrente da agitação manual, que reduz o contato enzima – substrato.

Towo *et al.* (2006) encontraram maior redução do conteúdo de ácido fítico de grãos de sorgo com adição de fitase de trigo antes do processo fermentativo e adicionalmente um aumento no teor de ferro biodisponível de 3,1%. Schons (2009) avaliou a redução de fatores antinutricionais do sorgo com adição de enzimas fitase e tanase, observando diminuição de taninos e aumento da concentração de fósforo. O sorgo foi tratado com as enzimas na concentração de 100 FTU/Kg em um banho termostatizado a 34°C com agitação por meio de Turrax (QUIMIS) durante 24 horas. Após procedimento, o sorgo tratado foi utilizado na elaboração de dietas para ratos e efetivo na melhoria da digestibilidade aparente de fósforo, diminuição da excreção de fósforo e da concentração de glicose e colesterol no plasma sanguíneo.

Outros trabalhos também evidenciam efeitos benéficos da adição de fitase às rações. Farelo de arroz foi utilizado em dietas de frangos de corte para avaliar o efeito da fitase na biodisponibilidade e aproveitamento do fósforo do farelo (Conte *et al.*, 2002). Os autores analisaram quatro dietas com 15% de farelo de arroz integral (FAI) e diferentes níveis de fitase (0, 400, 800 e 1200 FTU/Kg), em comparação com dieta padrão sem FAI. As perdas endógenas fecais, a absorção aparente e verdadeira do fósforo e o fósforo no plasma aumentaram de maneira significativa ($p < 0,01$) com a utilização de níveis crescentes de fitase. A biodisponibilidade do fósforo foi de 38,06% na dieta com farelo de arroz sem adição de fitase, e aumentou para 51,54%, 61,31% e 59,54% com a utilização da enzima nos níveis de 400, 800 e 1200 FTU/Kg, respectivamente.

A utilização de fitase em diferentes níveis, 500 FTU/Kg e 750 FTU/Kg de ração em experimento realizado com aves, aumentou o ganho de peso dos animais em 3,4% e em 2,8%, respectivamente. Ambos os tratamentos melhoraram a conversão alimentar em 3% e a digestibilidade da proteína bruta, da energia bruta, do fósforo e do cálcio (Tejedor *et al.*, 2001).

Moreira *et al.* (2003) avaliaram a eficiência de cinco níveis diferentes de fitase (253, 759, 1265 e 1748 FTU/Kg de ração) sobre parâmetros de desempenho de 60 suínos. A ração do grupo controle não continha fitase, mas foi suplementada com fosfato bicálcico. Os níveis da enzima não afetaram o consumo diário de ração, conversão alimentar, ganho diário de peso, fósforo e cálcio no plasma, cinzas no osso e relação cálcio e fósforo no plasma e osso.

A adição de diferentes fitases microbianas em diferentes concentrações, fitase de *Escherichia coli*, 250 e 500 FTU/Kg (Quantum Q1 e Q2, respectivamente), *Aspergillus niger* 500 FTU/Kg (Natuphos®) e *Penicillium lycii* 750 FTU/Kg (Ronozyme P) foi avaliada na digestibilidade de fósforo e cálcio em dietas para suínos baseadas em soja e cevada (Guggenbuhl *et al.*, 2007). Os autores constataram que as diferentes fitases adicionadas nas dietas aumentaram a digestibilidade de fósforo em 13,8, 18,6, 18,3 e 17,9%, para Q1, Q2, Natuphos® e Ronozyme P, respectivamente. A excreta de fósforo e cálcio diminuiu em média 30 e 16%, respectivamente, comparando com os resultados obtidos para o grupo controle que não teve adição de enzima na dieta. Dentre as diferentes fontes e concentrações da enzima os resultados foram similares quanto a digestibilidade

aparente e excreção de fósforo e cálcio, exceto para a fitase Quantum na concentração de 250 U/Kg que ficou abaixo das demais.

Ludke *et al.* (2000) avaliaram o aproveitamento de energia de 24 leitões alimentados com dietas a base de milho e farelo de soja com diferentes níveis de proteína. A eficiência da enzima foi melhor quando adicionada em dietas contendo nível de proteína marginal (16%) comparado às dietas com 18% de proteína bruta. Aumento na biodisponibilidade dos nutrientes foi observado com adição de fitase em níveis entre 220 e 508 FTU/ Kg de ração.

Após avaliação do efeito da enzima no metabolismo do ferro em 48 fêmeas suínas alimentadas com ração adicionada de fitase (500 FTU/Kg de ração), sem suplemento vitamínico e mineral e com redução de fósforo inorgânico, Almeida *et al.* (2007) concluíram que o tratamento não desencadeou alterações significativas no metabolismo do ferro. Não foram observadas diferenças ($p < 0,05$) nos valores obtidos do eritograma, da contagem de reticulócitos, de ferro sérico e de transferrina para os animais nos tratamentos testados.

Furuya *et al.* (2001) avaliaram os efeitos da adição de diferentes níveis de fitase (0, 500, 1500 e 3000 FTU/kg de ração) em dietas para a tilápia do Nilo. A suplementação de fitase aumentou o desempenho, a retenção de minerais nos ossos, a digestibilidade da proteína e a disponibilidade de cálcio e fósforo. Os melhores resultados de desempenho, retenção de minerais nos ossos e digestibilidade foram obtidos com 700 FTU/kg de ração.

Nível de suplementação de fitase de 2000 FTU/Kg de ração em dietas para tilápia do Nilo aumentou a disponibilidade aparente de fósforo de farelo de milho, milho extrusado, sorgo com baixo teor de tanino, farelo de arroz, farelo de soja e glúten de milho, enquanto que o nível de 1000 FTU/Kg foi efetivo para o aumento da disponibilidade aparente de fósforo da soja extrusada e do farelo de girassol (Gonçalves *et al.*, 2007).

CONCLUSÕES

O uso de enzimas exógenas como aditivos na nutrição animal é crescente no mercado, por exemplo, a aplicação de fitases na alimentação de aves, suínos e peixes. Sendo o fósforo um mineral essencial em vários processos metabólicos e energéticos dos

animais, a ação desta enzima na liberação de fósforo de fitatos presentes nos ingredientes da ração é extremamente benéfica aos sistemas de produção animal. Aliadas aos benefícios decorrentes da redução dos fatores antinutricionais do ácido fítico refletidos diretamente na melhora nutricional das dietas e desempenho dos animais, estão a possibilidade de redução de custos com as formulações e a contribuição para conservação ambiental, decorrente da redução de excreção de fósforo ligado ao fitato e não utilizado pelo animal.

Apesar da disponibilidade de distintas fitases no mercado atualmente, pesquisas no sentido de investigar a existência de novas fontes microbianas de fitases sem necessidade de modificação genética tornam-se frequentes na busca de características como termoestabilidade e estabilidade ácida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, R.F.; LOPES, E.L.; NUNES, R.C.; MATOS, M.P.C.; FIORAVANTI, M.C.S.; OLIVEIRA, A.P.A.; RUFINO, L.M. Metabolismo do ferro em suínos recebendo dietas contendo fitase, níveis reduzidos de fósforo inorgânico e sem suplemento micromineral e vitamínico. *Ciên. Rur.*, v.37, p.1097-1103, 2007.
- ALVARENGA, R.R.; ZANGERÔNINO, M.G.; ALVARENGA, R.R. Adição de fitase em rações para frangos de corte. *PUBVET, Public. Medic. Vet. Zootec.*, v.17, artigo 347, 2008.
- ANGELIS, D.F.A. Agentes físicos, químicos e microbiológicos que afetam a fermentação etanólica. In.: Mutton, M.J.R.; Mutton, M.A. *Aguardentes de cana: Produção e qualidade Jaboticabal: FUNEP*, p.49-65, 1992.
- BAE, H.D.; YANKE, L.J.; CHENG, K.J.; SELINGER, L.B. A novel staining method for detecting phytase activity. *J. Microbiol. Meth.*, v.39, p.17-22, 1999.
- BINDU, S.; SOMASHEKAR, D.; JOSEPH, R. A comparative study on permeabilization treatments for *in situ* determination of phytase of *Rhodotorula gracilis*. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.27, p.336-340, 1998.
- BOGAR, B.; SZAKACS, G.; PANDEY, A.; ABDULHAMEED, S.; LINDEN, J. C.; TENGGERDY, R. P. Production of phytase by *Mucor racemosus* in solid-state fermentation. *Biotechnol. Progr.*, v.19, p.312-319, 2003a.
- BOGAR, B.; SZAKACS, G.; LINDEN, J.C.; PANDEY, A.; TENGGERDY, R.P. Optimization of phytase production by solid substrate fermentation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v.30, p.183-189, 2003b.
- BRINCH-PEDERSEN, H.; SØRENSEN, L.D.; HOLM, P.B. Engineering crop plants: getting a handle on phosphate. *Trends Plant Sci.*, v.7, p.118-125, 2002.
- CAO, L.; WANG, W.; YANG, C.; YANG, Y.; DIANA, J.; YAKUPITIYAGE, A.; LUO, Z.; Li, D.. Application of microbial phytase in fish feed. *Enzyme Microb. Tech.*, v.40, p.497-507, 2007
- CASEY, A.; WALSH, G. Purification and characterization of extracellular phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142. *Bioresource Technol.*, v.86, p.183-188, 2003.
- CASEY, A.; WALSH, G. Identification and characterization of a phytase of potential commercial interest. *J. Biotechnol.*, v.110, p.313-322, 2004.

- CHADHA, B.S.; GULATI, H.; MINHAS, M.; SAINI, H.S.; SINGH, N.. Phytase production by the thermophilic fungus *Rhizomucor pusillus*. World J. Microbiol Biotechnol., v.20, p.105-109, 2004.
- COMMON, F. Biological availability of phosphorus in pigs. Nature v.143, p.370-380, 1989.
- CONTE, A.J.; TEIXEIRA, A.S.; FIGUEIREDO, A.V.; VITTI, D.M.S.S.; FILHO, J.C.S. Efeito da fitase na biodisponibilidade do fósforo do farelo de arroz em frango de corte. Pesq. Agropec. Bras., v.37, p.547-552, 2002.
- CÚNEO, F.; FARFAN, J.A.; CARRARO, F. Distribuição dos fitatos em farelo de arroz estabilizado e tratado com fitase exógena. Ciên. Tecnol. Aliment., v.20, p.94-98, 2000.
- DASGUPTA, S.; DASGUPTA, D.; SEM, M.; BISWAS, B.B. Interaction of myoinositoltriphosphate-phytase complex with the intracellular Ca²⁺ mobilization in plants. Biochemistry, v.35, p.4994-5001, 1996.
- ENGELN, A.J.; HEEFT, VAN DER.; RANSDORP, H.G.P.; SMIT, L.C.E. Simple and rapid determination of phytase activity. J. AOAC Int., v.77, p.760-764, 1994.
- FISKE, C. H.; SUBBAROW, Y.. The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem., v.66, p.375-410, 1925.
- FURUYA, W.M.; GONÇALVES, G.S.; FURUYA, V.R.B.; HAYASHI, C. Fitase na alimentação da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), desempenho e digestibilidade. R. Bras. Zootec., v.30, p.924-929, 2001.
- GALZY, P. Etude génétique et physiologique du métabolisme de l'acide lactique chez *Saccharomyces cerevisiae*. Hansen. Ann. Technol. Agric., v.13, p.109-259, 1964..
- GARCHOW, B.G.; JOG, S.P.; MEHTA, B.D.; MONOSSO, J.M.; MURTHY, P.P.N. Alkaline phytase from *Lilium longiflorum*: Purification and structural characterization. Protein Expres. Purif., v.46, p.221-232, 2006.
- GONÇALVES, G.S.; PEZZATO, L.E.; PADILHA, P.M.; BARROS, M.M. Disponibilidade aparente do fósforo em alimentos vegetais e suplementação com enzima fitase para tilápia do Nilo. R. Bras. Zootec., v.36, p.1473-1480, 2007.
- GRANGEIRO, M.G.A.; FUENTES, M.F.F.; FREITAS, E.R.; ESPINDOLA, G.B., SOUZA, F.M. Inclusão da levedura de cana-de-açúcar (*Saccharomyces cerevisiae*) em dietas para frangos de corte. Rev. Bras. Zootec., v.30, p.766-773, 2001.

- GREINER, R.; KONIETZNY, U. Construction of a bioreactor to produce special breakdown products of phytate. *J. Biotech.*, v.48, p.153-159, 1996.
- GUGGENBUHL, P.; QUINTANA, A.P.; NUNES, C.S. Comparative effects of three phytases on phosphorous and calcium digestibility in the growing pig. *Livest. Prod. Sci.*, v.109, p.258-260, 2007.
- GUO, M.-J.; ZHUANG, Y.-P.; CHU, J.; ZHANG, S.-L.; XIONG, A.-S.; PENG, R.-H.; YAO, Q.-H.. Production and purification of a novel thermostable phytase by FPHY34. *Process Biochem.*, v.42, p.1660-1665, 2007.
- HAN, Y.; WILSON, D.B.; LEI, X.G. Expression of an *Aspergillus niger* phytase gene (pIpyA) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microb.*, p.1915-1918, 1999.
- HANG, H.; YE, X.; GUO, M.; CHU, J.; ZHUANG, Y.; ZHANG, M.; ZHANG, S. A simple fermentation strategy for high-level production of recombinant phytase by *Pichia pastoris* using glucose as the growth substrate. *Enzyme Microb. Technol.*, v.44, p.185-188, 2009.
- HEINONEN, J.K.; LAHTI, R.J. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its applications to the assay of inorganic pyrophosphate. *Anal. Biochem.*, v.113, p.313-317, 1981.
- HOWSON, S.J.; DAVIS, R.P. Production of phytate-hydrolysing enzyme by some fungi. *Enzyme Microb. Technol.*, v.5, p.377-343, 1983.
- HUANG, H.; HUIYING, L.; YANG, P.; MENG, K.; WANG, Y.; YUAN, T.; BAI, Y.; YAO, B. A novel phytase with preferable characteristics from *Yersinia intermedia*. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, v.350, p.884-889, 2006.
- JIN-IN, M.; WON-SEO, S.; KIM, D. C.; SOON-OH, N. Purification and biochemical properties of an extracellular acid phytase produced by the *Saccharomyces cerevisiae* CY strain. *Process Biochem.*, v.44, p.122-126, 2009.
- KAUR, P.; SATYANARAYANA, T.. Production of cell-bound phytase by *Picchia anomala* in an economical cane molasses medium: Optimization using statistical tools. *Process Biochem.*, v.40, p.3095-3102, 2005.
- KIM, Y.-O.; KIM, H.-K.; BAE, K.-S.; YU, J.-H.; OH, T.-K. Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11. *Enzyme. Microb. Technol.*, 22, 2-7, 1998.

- KONIETZNY, U.; GREINER, R. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). *Int. J. Food Tech.*, v.37, p.791-812, 2002.
- LAMBRECHTS, C.; BOZE, H., MOULIN, G.; GALZY, P. Utilization of phytate by some yeasts. *Biotechnol. Lett.*, v.14, p.61-66, 1992.
- LAMBRECHTS, C.; BOZE, H.; SEGUEILHA, L.; MOULIN, G.; GALZY, P.. Influence of culture. *Biotechnol. Lett.*, vol.15 p. 399-404, 1993.
- LASSEN, S.F.; BREINHOLT, J.; OSTERGAARD, P.R.; BRUGGER, R.; BISCHOFF, A.; WYSS, M.; FUGLSANG, C.C. Expression, gene cloning, and characterization of five novel phytases from four basidiomycete fungi : *Peniophora lycci*, *Agrocybe pediades*, *Ceriporia* sp., and *Trametes pubescens*. *Appl. Environ. Microb.*, p.4701-4707, 2001.
- LEHNINGER, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M. *Princípios de Bioquímica*. São Paulo: Sarvier, 1995.
- LEI, X.G.; PORRES, J.M. Phytase enzymology, applications and biotechnology. *Biotechnol. Lett.*, v.25, p.1787-1794, 2003.
- LI, X.Y.; LIU, Z.Q.; CHI, Z.M. Production of phytase by marine yeast *Kodamaea ohmeri* BG3 in an oats medium: Optimization by response surface methodology. *Bioresource Technol.*, v.99, p.6386-6390, 2008.
- LIU, B.-L.; RAFIQ, A.; TZENG, Y.-M.; ROB, A. The induction and characterization of phytase and beyond. *Enz. Microb. Technol.*, v.22, p.415-424, 1998.
- LUDKE, M.C.M.M.; LOPEZ, J.; BRUM, P.A.R. ; LUDKE, J.V. Influência da fitase na utilização de nutrientes em dietas compostas por milho e farelo de soja para suínos em crescimento. *R. Bras. Zootec.*, v.29, p.1402-1413, 2000.
- MALLIN, M.A. Impacts of industrial animal production on rivers and estuaries. *AM. Sci.*, v.88, p.26-37, 2000.
- MAYER, A.F.; HELLMUTH, K.; SCHLIEKER, H.; LOPEZ-ULIBARRI, R.; OERTEL, S.; DAHLEMS, U.; STRASSER, A.W.M., VAN LOON, A.P.G.M. An expression system matures : a highly efficient and cost-effective process for phytase production by recombinant strains of *Hansenula polymorpha*. *Biotechnol. Bioeng.*, v.63, p.373-381, 1998.

- MAYSON, B.E.; KILBURN, D.G.; ZAMOST, B.L.; RAYMOND, C.K.; LESNICKI, G.J.. Effects of methanol concentration on expression levels of recombinant protein in fed-cultures of *Pichia methanolica*. *Biotechnol. Bioeng.*, v.81, p.291-298, 2003.
- META, A.; NAKATAKE, H.; IMAMURA, T.; NOZAKI, C.; SUGIMURA, K. High-yield production and characterization of biologically active recombinant aprotinin expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expres. Purif.*, v.66, p.22-27, 2009.
- MOREIRA, J.A.; VITTI, D.M.S.S.; TRINDADE NETO, M.A.; LOPES, J.B. Phytase enzyme in diets containing defatted rice bran for growing swine. *Sci. Agric.*, v.60, p.631-636, 2003.
- NAKAMURA, T.; SUZUKI, T.; TOKUDA, J.; KATO, N.; SAKAI, Y.; MOCHIZUKI, D.; TAKHASHI, H. Secretory manufacture of *Schwanniomyces occidentalis* phytase using a *Candida boidinii* host. *Eur. Patent Appl. Ep.*, p.831-837, 1999.
- NAYINI, N.R.; MARKAKIS, P. The phytase of yeast. *Lebensm.-Wiss. U. –Technol.*, v.17, p.24-26, 1984.
- OSTANIN K.; HARMS, E.H.; STEVIS, P.E.; KUCIEL, ZHOU, M.; VAN ETTEN, R.L. Overexpression, site-directed mutagenesis and mechanism of *Escherichia coli* acid phosphatase. *J. Biol. Chem.*, v.267, p.22830-22836, 1992.
- PANDEY, A.; SZKACKS, G.; SOCCOL, C.R.; RODRIGUEZ-LEON, J.A.; SOCCOL, V.T. Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresource Technol.*, v.77, p.203-214, 2001.
- PASAMONTES, L.; HAIKER, M.; WYSS, M.; TESSIER, M.; LOON, A.P.G.M.. Gene cloning, purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microb.*, v.63, p.1696-1700, 1997.
- QIN, Y.; WEI, X.; LIU, X.; WANG, T.; QU, Y. Purification and characterization of recombinant endoglucanase of *Trichoderma reesei* expressed in *Saccharomyces cerevisiae* with higher glycosylation and stability. *Protein Expres. Purif.*, v.58, p.162-167, 2008.
- REMUS, J. A avicultura e o meio ambiente colhem os benefícios da nova geração de fitases. *Rev. AveWorld - Edição 27*, publicado em 28/05/2008, disponível em <http://www.aveworld.com.br/index.php/documento/3749>, acessado em 30/04/2010.

- SA, L.M. Ingredientes alternativos na alimentação de suínos – economia e segurança. Polinutri, publicado em setembro/2005, disponível em http://www.polinutri.com.br/conteudo_artigos_anteriores_setembro_05.htm, acessado em 06/01/2010.
- SANDBERG, A. S.; ANDLID, T.. Phytogetic and microbial phytases in human nutrition. Int. J. Food Tech., v.37, p.823-833, 2002
- SANO, K.; FUKUHARA, H.; NAKAMURA, Y. Phytase of the yeast *Arxula adenivorans*. Biotechnol. Lett., v.21, p.33-38, 1999.
- SCHONS, P.F. Detanificação e desfitinização de grãos de sorgo (*Sorghum bicolor*) por tanase e fitase e estudo biológico. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas/SP, 2009.
- SEGUEILHA, L.; LAMBRECHTS, C.; BOZE, H.; MOULIN, G.; GALZY, P.. Purification and properties of the phytase from *Schwanniomyces castelli*. J. Ferment. Bioeng., v.74, p.7-11, 1992
- SEGUEILHA, L.; MOULIN, G.; GALZY, P. Reduction of phytate content in wheat bran and glandless cotton flour by *Schwanniomyces castelli*. J. Agric. Food Chem., v.41, p.2451-2454, 1993.
- SELLE, P.H.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. Anim. Feed Sci. Technol., v.135, p.1-41, 2006.
- SHIEH, T.R.; WARE, J.H. Survey of microorganisms for the production of extracellular phytase. Appl. Microbiol., p.1348-1351, 1968.
- SHIMIZU, M. Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. Biosci. Biotech. Biochem., v.56, p.1266-1269, 1992.
- SILVA, L.F. Manutenção de culturas de leveduras. In.: Vitolo, M., Minami, P.S. (Ed), Leveduras em Biotecnologia – São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, p.37, 1989.
- SINGH, B.; SATYANARAYANA, T. A market enhancement in phytase productions by a thermophilis mould *Sporotrichum thermophile* using statistical designs in a cost effective cane molasses medium. J. Appl. Microbiol., v.101, p.344-352, 2006.

- SINGH, B.; SATYANARAYANA, T. Improved phytase production by a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* in submerged fermentation due to statistical optimization. *Bioresource Technol.*, v.99, p.824-830, 2008.
- STOCKMANN, C.; LOSEN, M.; DAHLEMS, U.; KNOCKE, C.; GELLISSEN, G.; BUCHS, J. Effect of oxygen supply on passaging, stabilizing and screening of recombinant *Hansenula polymorpha* production strains in test tube cultures. *FEMS Yeast Res.*, v.4, p.195-205, 2003.
- STOREBAKKEN, T.; SHEARER, K.D.; ROEM, A.J. Availability of protein, phosphorus and other elements in fish meal, soy-protein concentrate and phytase-treated soy-protein-concentrate-based diets to Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture.*, v.161, p.365-379, 1998.
- SUNITHA, K.; LEE, J.K.; OH, T.K. Optimization of medium components for phytase production by *E. coli* using response surface methodology. *Bioproc. Biosyst. Eng.*, v.21, p.4777 - 4781, 1999.
- SUNITHA, K.; KIM, Y-O.; LEE, J-K.; OH, T-K. Statistical optimization of seed and induction conditions to enhance phytase production by recombinant *Escherichia coli*. *Biochem. Eng. J.*, v.5, p.51-56, 2000.
- SUZUKI, U.; YOSHIMURA, K.; TAKASHI, M.. Ueber ein Enzym, "Phytase" das "Anhydro-Oxymwthylen diphosphorsaure" Spaltet. *Tokyo Imper. Univ. Coll. Bull.*, v.7, p.503-512, 1908.
- TEJEDOR, A.T.; ALBINO, L.F.T.; ROSTAGNO, H.S.; VIEITES, F.M. Efeito da adição da enzima fitase sobre o desempenho e a digestibilidade ileal de nutrientes. *R. Bras. Zootec.*, v.30, p.802-808, 2001.
- TOWO, E.; MATUSCHEK, E.; SVANBERG, U. Fermentation and enzyme treatment of tannin sorghum gruels: effects on phenolic compounds, phytate and in vitro accessible iron. *Food Chem.*, v.94, p.369-376, 2006.
- ULLAH, A.H.L.; GIBSON, D.M. Purification and characterization of acid phosphatase from cotyledons of germinating soybean seeds. *Arch. Biochem.*, v.260, p.514-520, 1986.

- ULLAH, A.H.J.; GIBSON, D.M. Extracellular phytase (E.C. 3.1.3.8) from *Aspergillus ficcum* NRRL 3135: purification and characterization. *Prep. Biochem.*, v.17, p.63-91, 1987.
- VASSILEV, N.; VASSILEVA, M.; BRAVO, V.; FERNÁNDEZ-SERRANO, M.; NIKOLAEVA, I. Simultaneous phytase production and rock phosphate solubilization by *Aspergillus niger* grown on dry olive wastes. *Ind. Crop. Prod.*, v.26, p.332-336, 2007.
- VATS, P.; BANERJEE, U.C.. Production studies and catalytic properties of phytases (*myo*-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. *Enz. Microb. Technol.*, v.35, p.3-14, 2004.
- VATS, P.; BANERJEE, U.C.. Catalytic characterization of phytase (*myo*-inosilhexakisphosphate phosphohydrolase) from *Aspergillus niger* van Teighem: Glycosylation pattern, kinetics and molecular properties. *Enz. Microb. Technol.*, v.39, p.596-600, 2006.
- VOHRA, A.; SATYANARAYANA, T. Statistical optimization of the medium components by response surface methodology to enhance phytase production by *Pichia anomala*. *Process Biochem.*, v.37, p.999-1004, 2002.
- VOHRA, A.; SATYANARAYANA, T. A cost-effective cane molasses medium for enhanced cell-bound phytase production by *Pichia anomala*. *J. Appl. Microbiol.*, v.97, p.471-476, 2004.

CAPÍTULO 2: PROGRESSIVE SCREENING OF THERMOSTABLE YEASTS FOR PHYTASE PRODUCTION

Edi Franciele Ries¹ and Gabriela Alves Macedo¹

Publicado em: *Food Science and Biotechnology*, Vol. 18, No 3, pp. 665-660 (2009)

ABSTRACT

Biotechnological phytase preparations are commercially available and are currently used in animal feeding. However, thermostability constraints, low yields and the high cost of the enzyme have limited its use. This study represents a new perspective for the food enzyme market. The research screened thermostable yeast strains for their ability to produce phytase. The screening was carried out with a gradual increase in temperature (30°C – 48°C). In this study, 16 strains (1 strain identified as *Saccharomyces cerevisiae*) maintained the ability to produce phytase at 48°C and their phytase activity was confirmed using two phytase assay methodologies. The yeast strains tested in this study seem to be potential efficient producers of phytase, indicating a possible new source of thermostable phytase of commercial interest, particularly that from *Saccharomyces cerevisiae*.

Keywords: phytase, thermostable, screening, yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*.

¹ Food Science Department, Faculty of Food Engineering, Campinas State University (UNICAMP), Campinas 13083 970, SP, BRAZIL
E-mail address: gmacedo@fea.unicamp.br

INTRODUCTION

Phytases (EC 3.1.3.8 and EC 3.1.3.26) are enzymes that release phosphate groups from phytic acid that represents the main storage form of phosphorus in cereal grains, legumes, pollens, oilseeds (1). The phosphate in phytate is unavailable and passes undigested through the digestive tract of monogastric animals and as consequence; feed for pig, poultry and fish must be supplemented with inorganic phosphate to supply nutritional requirements for phosphorus (2,3). The phosphorus from phytate that is not used is excreted in the animal feces, and consequently turns up in the soil particularly in areas of intensive monogastric livestock production (4,5), where it can reach the water sources causing eutrophication and affecting the amount of oxygen in the water, leading to the death of fish (6).

Another alternative for the reduced availability of phosphorus is the addition of enzymes, which can increase the nutritional value of the food due to phytate hydrolysis during its digestion in the stomach or during food processing. The improvement of the protein digestibility and availability of phosphorus and of other minerals usually chelated by phytate, such as iron and zinc (7), diminishes the anti-nutritive properties of phytate and environmental pollution. Phytases are produced by a wide range of sources (1,8). Phytase activities have been described for a number of plants, animals, fungi and bacteria but, many possible new sources of phytases continue unexplored (9).

The most frequently desired characteristics for new phytases are thermostability, in order to survive feed manufacturing processes, and acid stability, that would make the enzyme stable in monogastric stomachs, since commercial phytases are generally relatively heat and acid stable (10), and according to Selle and Ravindran (11), the ideal enzyme should have high catalytic specificity, resistance to proteolysis and good stability at room temperature.

On a commercial scale, phytase production is derived from mutated fungal strains or the use of recombinant DNA technology. Three phytases commonly used for application in animal feeding are derived from *Aspergillus niger*, which is a 3-phytase fungus, or from *Peniophora lycci* and *Escherichia coli*, which are 6-phytase organisms (11,12), to improve phosphorus and mineral availability. However, no corresponding approved enzyme is

available for human consumption. The use of yeasts may be an alternative to improve the mineral state in vulnerable human populations (13).

Phytase from baker's yeast has been studied in some detail (14). The phytase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is generally recognized as safe (GRAS, as defined by U.S. Food and Drug Administration) for food production (15). It would thus be an ideal candidate for use as a bioavailability improving food additive, if it demonstrates significant phytase activity (13). Some studies about other phytases produced by yeasts are available (16-19). The process based on recombinant yeast strains expressing different fungal phytases has currently become a subject of interest (20-24).

Yeasts have capacity to adapt their metabolism to anaerobic and to facultative anaerobic conditions (25). These microorganisms are extremely stable, presenting fast proliferation, resistance to infection and relatively simple fermentative process. The aim of the current research was to study and select yeast strains that could be considered as potential producers of thermostable phytase. This study was innovative since it considered yeast screening with a gradual increase in temperature, which is an important parameter, since thermostability is an important property in the application of these enzymes in animal feeding and food processing.

MATERIAL AND METHODS

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS

Soil samples were collected from different areas in the states of São Paulo and Rio Grande do Sul. 10 mL aliquots of sterilized water were added to 1 g of soil sample and incubated in a rotary shaker (TECNAL TE 421, Piracicaba, SP, BR) at 30°C (100 rpm for 24 hr). The cultures were inoculated into Petri Plates containing Yeast Malt Agar (YMA) and incubated at 28°C for 48 hr for yeast isolation and growth, which was visually identified as yeast growth. The purified yeast strains were maintained in assay vials containing YMA and stored in the refrigerator at 4°C until used.

SCREENING FOR POTENTIAL HYDROLYZING PHYTATE YEASTS USING PROGRESSIVE TEMPERATURE INCREASE

The yeast strains isolated (total of 140 strains) were tested for phytase production in solid medium. The screening was carried out on agar plates containing calcium phytate as sole phosphorus source (26). The phytase screening medium (PSM) agar was composed as follows (g/L): glucose, 15.0; calcium phytate, 1.0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5; KCl, 0.5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.1; and agar 15.0; and made up to volume with distilled water. The pH was adjusted to 5.5 using 0.1 N NaOH and then autoclaved at 121°C and 1 atm for 15 min. The inoculated plates were incubated at 30°C for 120 hr. During this time, colony growth and phytase production were observed in the plates.

This primary screening in solid media was carried out with a gradual increase in temperature, and then all positive strains were re-inoculated in PSM agar and incubated at 35°C for 5 days. This process was repeated at 38°C, 40°C, 42°C, 45°C and 48°C in order to screen for the thermostable yeast strains able to produce phytase. The strains screened at 48°C were maintained in YMA tubes and stored at 4°C until assayed for phytase. Calcium phytate was acquired from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

PREINOCULUM PREPARATION AND CULTURE CONDITIONS FOR PHYTASE PRODUCTION

The preinoculum was prepared suspending the spores from YMA culture in 2.5 mL of sterilized water. This suspension was used to inoculate the culture medium. The culture medium (g/L) was composed of sucrose, 10.0; sodium phytate, 0.5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5; KCl, 0.5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.0075, and CaCl_2 0.1, the pH adjusted to 4.5 and autoclaved at 121°C and 1 atm for 15 min. A sample of 15 mL of culture medium and 1 mL of preinoculum were added to conical flasks. The cultures were incubated in a rotary shaker at 35°C, (150 rpm) for 96 hr. After culture development, the tubes were centrifuged (7,100 x g) at 10°C for 15 min in a Beckman Coulter Allegra X-22R Centrifuge (Fullerton, CA, USA), and the culture supernatant used directly for the enzyme assay. The phytase assay was repeated after 24, 48, 72 and 96 hr. Sodium phytate was acquired from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

PHYTASE ASSAY

Phytase activity was determined by the method proposed by Stockamnn *et al* (23) using a synthetic substrate for phosphatases. This reaction was based on the hydrolysis of 4-nitrophenylphosphate to phosphate and p-nitrophenol. The substrate (1000 μL of 5 mM 4-nitrophenylphosphate disodium salt hexahydrate) was added to a mixture of 500 μL of 0.8 M sodium acetate buffer (pH 5.0) and 500 μL of enzyme preparation. The tubes were incubated at 37°C for 10 min and the reaction was stopped by the addition of 2000 μL of 0.1 N NaOH. The p-nitrophenol liberated was determined colorimetrically at 410 nm in a Beckman Coulter DU640 Spectrophotometer (Fullerton, CA, USA). A calibration curve was plotted for p-nitrophenol concentrations from 0.0719 to 7.1891 μM . Natuphos® was used to adapt the methodology.

Phytase activity was also measured by following the liberation of inorganic phosphate in the presence of sodium phytate. Free inorganic phosphate was assayed in the culture supernatant based on the phosphate concentration released after hydrolysis of the sodium phytate by phytase (27). Each assay tube contained 600 μL of 2 mM sodium phytate in 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) supplemented with 2 mM of CaCl_2 and 150 μL of enzyme solution, and was incubated at 37°C for 30 min. After incubation, the reaction was stopped by the addition of 750 μL of 5% trichloroacetic acid and then, 1.5 mL of the color reagent was added producing phosphomolybdate. The inorganic orthophosphate (Pi) was determined colorimetrically at 700 nm in a Beckman Coulter DU640 Spectrophotometer (Fullerton, CA, USA). The color reagent was prepared daily by mixing 4 volumes of 1.5% (w/v) ammonium molybdate solution with 5.5% (v/v) sulfuric acid and 1 volume of 2.7% (w/v) ferrous sulfate solution. The results were compared with a standard curve prepared with inorganic phosphate (K_2HPO_4 concentrations of 0.0448 to 2.8706 μM). Natuphos® was used to adapt the methodology.

One unit of phytase activity (U) was defined as the amount of enzyme capable of releasing one μmol of inorganic phosphate per min under the defined reaction conditions. All analyses were carried out in triplicate and the results presented as mean \pm standard deviation. The Tukey test was performed to determine significant differences between the mean values for the fermentation times ($p < 0.05$).

Synthetic substrate for phosphatases was purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) and p-nitrophenol was acquired from Vetec (São Paulo, SP, Brazil). The commercial phytase Natuphos® was kindly donated by Basf.

RESULTS AND DISCUSSION

SCREENING FOR POTENTIAL HYDROLYZING PHYTATE YEASTS USING PROGRESSIVE TEMPERATURE INCREASE

A total of 140 yeast strains were screened for their ability to hydrolyse calcium phytate in solid media with a gradual increase in temperature. The insolubility of calcium phytate in aqueous media gives a white turbidity to an agar plate, and the appearance of a clear area or disappearance of the precipitate is a visual indication of phytase production (26).

Currently there are still few screening studies about yeast strain phytase producers, but the present results were interesting when compared to the few available in the literature. It is notable that no such research with a gradual increase in temperature was found. The vast majority of the yeast strains already presented growth (Fig. 1a) after 24 hr at all the temperatures tested (data not presented), and less than 5% of the total strains evaluated in the present study were unable to grow on solid phytase screening media. Furthermore, in the study carried out by Sano *et al.* (18), the majority of the strains tested (about 1,200 yeasts) did not grow on medium containing sodium phytate as the sole source of phosphate and carbon.

The absence of yeast growth on solid medium containing phytate has already been evidenced by other authors (18,28) and can be explained by one or more of the following reasons, depending on the characteristics of each yeast strain: very high temperature, inadequate pH, high phytate concentration in the medium or even the absence of phytase production and consequent lack of available nutrients and important minerals for microbial growth.

Phytase production in solid media can be visualized in Fig. 1b, showing a clear halo of phytate hydrolysis around the growth. Similar to growth, the vast majority of the strains

hydrolyzed the phytate after 24 hr, but no relationship between the gradual increase in temperature and the time required for medium hydrolysis could be established. While some strains lost the capacity or required more time to hydrolyse the phytate with increase in temperature, other yeasts produced the enzyme in a shorter time when submitted to high temperatures, evidencing an increase in metabolism. In general, considering all the strains producing phytase at the experimental temperatures, the number of positives strains decreased as the temperature increased (Fig. 2). About 11% of the yeasts (16 strains) maintained the ability to produce phytase at the highest temperature (48°C). Amongst these, 87.5% of the strains hydrolyzed phytate after 24 hr.



FIGURA 1 SCREENING FOR POTENTIAL HYDROLYZING PHYTATE YEASTS IN SOLID MEDIA

a) Plates showing growth. b) Translucent halo of hydrolysis originated by phytase production.

Lambrechts *et al.* (28) observed the phytase production by 21 yeast strains in solid medium with 0.5% calcium phytate during 5 days at 28°C. This work, 4 strains presented a weak transparent halo around the colonies and 8 showed very limited growth and absence of the characteristic hydrolysis halo. Only 9 strains (43% of the total) hydrolyzed phytate and they produced a translucent zone 2 times smaller than the diameter of the colonies. This percentage was small when compared to that found in the present study, where about 70% and 94% of the yeasts showed phytase production at 30°C and 48°C, respectively.

In another study on phytase producing fungi (29), although 2 strains presented translucent zones around the colonies in solid medium, no activity was detected in liquid

medium. According to Chelius and Wodzinski (30), in this case this was due to acid production by the *Aspergillus*, with the formation of a translucent zone around the colonies.

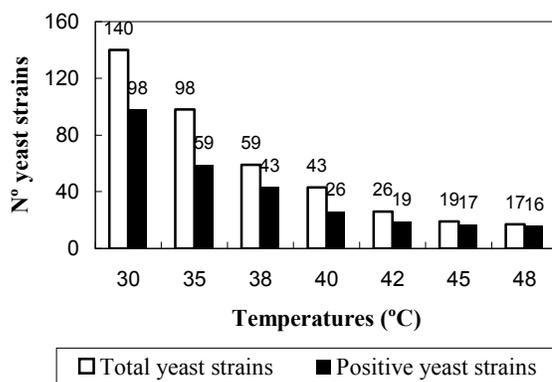


FIGURA 2 YEAST STRAINS TESTED AND THOSE POSITIVE FOR PHYTASE PRODUCTION AT THE DIFFERENT TEMPERATURES.

The last parameter analyzed in the screening was the phytate hydrolysis intensity as evidenced by the dimension of the transparent halo produced, and a possible relationship with enzyme concentration. Table 1 shows the intensity of the hydrolysis produced by the strains at 48°C, being indicated by signs going from (-) to (++++), representing the absence of hydrolysis and hydrolysis of the entire medium, respectively. 14 strains displayed a translucent zone whose diameter was narrower than 2.0 cm, and 1 strain showed greater hydrolytic capacity than the others and a particularly vigorous growth at all the temperatures tested. This strain was identified by molecular taxonomy as *Saccharomyces cerevisiae* strain zi (EU188613). This strain is deposited in CBMAI (Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria) collection. *S. cerevisiae* shows useful properties, as resistance against high sugar and alcohol (31), and a higher growth rate with higher culture temperature (32).

CULTURE AND PHYTASE ACTIVITY

Assays for phytase activity include hydrolysis using organic and synthetic substrates, such as sodium phytate and 4-nitrophenylphosphate (33). Although 4-

nitrophenylphosphate has been described as a phytase substrate, research on selectivity has shown phytate to be the preferred substrate (27,34,35). Phytase activity was assayed using both sodium phytate and 4-nitrophenylphosphate as substrates for the 16 yeast strains selected at 48°C. The results are presented in Tables 2 and 3, respectively. The enzymatic activity of all the yeast strains tested that produced phytase at 48°C was confirmed by both methodologies at all the times tested, except for Strain 3. No phytase activity was detected for this strain when sodium phytate was used as the substrate.

TABLE 1 PHYTASE PRODUCTION AND PHYTATE HYDROLYSIS AT 48°C

Strain	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr	120 hr
03	+	+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	++	++	++	+++	+++
17	+	+	+	+	+
34	+	+	+	+	+
38	+	+	+	+	+
40	+*	+	+	+	+
44	-	+	+	+	+
109	+	+	+	+	+
113	+	+	+	+	+
119	++	++	++	++	++
124	+	+	+	+	+
128	+	+	+	+	+
146	+	+	+	+	+
163	-	-	-	-	-
164	+	+	+	+	+
166	-	-	-	+	+
167	+*	+	+	+	+

-: absence of hydrolysis, +*: small sign of hydrolysis under the colony, +: hydrolysis diameter \leq 2.0 cm, ++: 2.0 cm < hydrolysis diameter < 3.0 cm. +++: hydrolysis of practically all of the medium, ++++: hydrolysis of all of the medium.

TABLE 2 PHYTASE ACTIVITY WITH 4-NITROPHENYLPHOSPHATE DISODIUM SALT HEXAHYDRATE SUBSTRATE

Phytase activity (U/mL) ¹⁾ in different incubation periods				
Yeasts strains	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr
03	0.04 (< 0.01) ^a	0.03 (< 0.01) ^b	0.03 (< 0.01) ^b	0.03 (< 0.01) ^b
<i>S. cerevisiae</i>	0.06 (0.01) ^a	0.04 (< 0.01) ^a	0.07 (0.01) ^a	0.04 (0.01) ^a
17	0.03 (0.01) ^a	0.03 (< 0.01) ^a	0.04 (0.01) ^a	0.04 (0.01) ^a
34	0.05 (< 0.01) ^a	0.05 (0.01) ^a	0.05 (0.01) ^a	0.05 (0.01) ^a
38	0.06 (0.01) ^a	0.08 (0.01) ^a	0.08 (0.01) ^a	0.08 (0.03) ^a
40	0.06 (0.01) ^a	0.08 (0.01) ^a	0.05 (0.01) ^a	0.06 (0.02) ^a
44	0.04 (0.01) ^a	0.05 (< 0.01) ^a	0.05 (< 0.01) ^a	0.04 (< 0.01) ^a
109	0.03 (0.01) ^a	0.04 (0.01) ^a	0.06 (0.01) ^a	0.05 (0.01) ^a
113	0.02 (< 0.01) ^a	0.03 (< 0.01) ^{ab}	0.04 (< 0.01) ^b	0.03 (0.01) ^{ab}
119	0.06 (0.01) ^a	0.13 (0.01) ^b	0.08 (< 0.01) ^{ab}	0.09 (0.02) ^{ab}
124	0.03 (0.01) ^a	0.04 (< 0.01) ^a	0.06 (0.01) ^a	0.05 (0.01) ^a
128	0.03 (0.01) ^a	0.04 (0.01) ^a	0.04 (0.01) ^a	0.05 (0.01) ^a
146	0.03 (0.01) ^a	0.03 (0.01) ^a	0.03 (0.01) ^a	0.03 (0.01) ^a
164	0.06 (0.01) ^a	0.05 (0.01) ^a	0.04 (0.01) ^a	0.04 (< 0.01) ^a
166	0.03 (0.01) ^a	0.05 (< 0.01) ^a	0.07 (0.01) ^b	0.05 (0.01) ^a
167	0.03 (0.01) ^a	0.04 (0.01) ^a	0.04 (0.01) ^a	0.05 (< 0.01) ^a

1) Mean and standard deviation presented in brackets.
 Similar superscript letters in same line indicate no significant difference between means ($p < 0.05$).

TABLE 3 PHYTASE ACTIVITY WITH SODIUM PHYTATE AS THE SUBSTRATE

Phytase activity (U/mL) ¹⁾ after different incubation periods				
Yeast strains	24 hr	48 hr	72 hr	96 hr
03	UD ²⁾	UD	UD	UD
<i>S. cerevisiae</i>	0.15 (< 0.01) ^a	0.13 (< 0.01) ^a	0.13 (0.01) ^a	0.15 (0.01) ^a
17	0.04 (0.01) ^a	0.02 (0.01) ^a	0.03 (0.01) ^a	0.04 (0.01) ^a
34	0.07 (0.01) ^a	0.11 (0.01) ^a	0.06 (< 0.01) ^a	0.08 (0.02) ^a
38	0.06 (0.01) ^a	0.06 (0.01) ^a	0.06 (0.01) ^a	0.06 (< 0.01) ^a
40	0.06 (< 0.01) ^a	0.07 (< 0.01) ^a	0.06 (< 0.01) ^a	0.07 (< 0.01) ^a
44	0.06 (0.01) ^a	0.07 (0.01) ^a	0.06 (< 0.01) ^a	0.06 (0.01) ^a
109	0.06 (0.01) ^a	0.06 (< 0.01) ^a	0.06 (0.01) ^a	0.06 (< 0.01) ^a
113	0.06 (< 0.01) ^a	0.05 (0.01) ^a	0.06 (0.01) ^a	0.06 (< 0.01) ^a
119	0.09 (0.01) ^a	0.11 (0.01) ^a	0.12 (0.03) ^a	0.11 (0.01) ^a
124	0.05 (0.01) ^a	0.05 (< 0.01) ^a	0.05 (0.01) ^a	0.06 (0.01) ^a
128	0.06 (< 0.01) ^a	0.05 (0.01) ^a	0.06 (0.01) ^a	0.06 (0.01) ^a
146	0.07 (< 0.01) ^a	0.06 (< 0.01) ^a	0.06 (< 0.01) ^a	0.06 (< 0.01) ^a
164	0.06 (0.01) ^a	0.05 (0.01) ^a	0.07 (< 0.01) ^a	0.06 (< 0.01) ^a
166	0.07 (0.01) ^a	0.06 (< 0.01) ^a	0.07 (< 0.01) ^a	0.06 (0.01) ^a
167	0.06 (0.01) ^a	0.07 (< 0.01) ^a	0.07 (0.01) ^a	0.06 (< 0.01) ^a

1) Mean and standard deviation in brackets.

2) Undetectable level (UD).

Similar superscript letters in the same line indicate no significant difference between the means ($p < 0.05$).

The vast majority of the yeast strains tested showed best enzyme activities with sodium phytate as the substrate. According to previously observed for the phytase produced

by *Schwanniomyces castelli* (36). Particularly, a clear substrate preference for sodium phytate was shown in the tests with *S. cerevisiae*, the activities determined in the medium with 4-nitrophenylphosphate being about 2.8 times smaller.

The phytase activities were determined after 24 hr, 48 hr, 72 hr and 96 hr. It was not possible to establish a direct relationship between the culture time in the shaker and phytase activity. Some yeast strains presented their highest activity after 24 hr while others presented it after 96 hr, but the majority of the strains showed no significant differences in their phytase activities between the four incubation times.

There is no international unit to express phytase activity, once this depends on the enzyme assay used, such as the substrate concentration, temperature and pH, it being difficult to compare the efficacy of different phytase sources (11). In the present study, one phytase activity unit (U) was defined as the amount of enzyme to release one μmol of inorganic phosphate per min under the reaction conditions defined.

The yeast strain in which the highest enzymatic activities were detected in sodium phytate was *S. cerevisiae* (0.15 U/mL at 24 hr and 96 hr) and the Fig. 3 shows the levels of phytase activity determined in the 2 substrates at all the fermentation times for this strain.

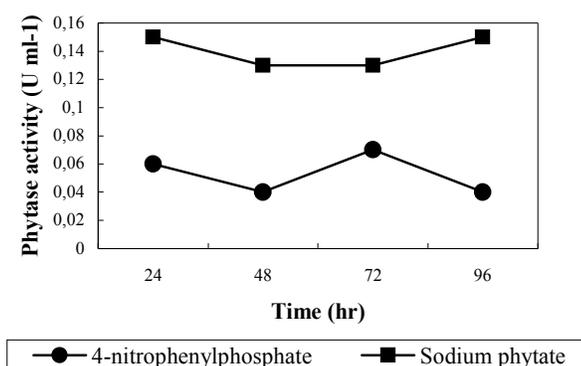


FIGURA 3 *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* PHYTASE ACTIVITIES (U/ML) IN THE DIFFERENT SUBSTRATES.

S. cerevisiae also presented particularly vigorous growth in the solid medium containing phytate, and a high capacity for phytate hydrolysis. The relative extension of the translucent halo produced by hydrolysis was estimated and correlated with phytase activity. Sano *et al.* (18) had already established a similar relationship for phytase production by *Arxula adeninivorans*.

The enzymatic activities determined for *S. cerevisiae* were higher than the initial rate of phosphate released in the presence of sodium phytate of 0.138 mM by the phytase from *S. castelli* (0.025 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$). They also showed that the phytase from *S. castelli* hydrolyzed phytic acid in other substances. The initial phosphate release rates from wheat bran and cotton flour were 0.024 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$ and 0.026 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$, respectively. The hydrolysis was performed at pH 4.4 and 70°C, which were the optimal conditions of the previously studied phytase from *S. castelli* (36).

Considering the phytase activities measured by Sano *et al.* (18) at 42°C for 11 yeasts, only 1 yeast strain (*Arxula adenivorans* CBS 8335) showed enzyme levels superior to those detected for *S. cerevisiae* in the present research. Moreover, when compared to phytase producing fungi (29), the enzyme levels detected for *S. cerevisiae* were less than 60% of the phytase activities obtained from *Aspergillus spp.* when tested at pH 5.5. In study of phytase properties from *Bifidobacterium animalis*, the cells did not grow in shaking culture (37).

Other research on *S. cerevisiae* phytase activity was carried out in the context of yeast degrading inositol hexaphosphate (IP6), and showed the importance of the study of this promising phytase source. Andlid *et al.* (13) studied *S. cerevisiae* phytase activity as well as the phosphatase (PHO) system and IP6 as the substrate. The PHO system seemed to be aimed at yeast growth in the absence of inorganic phosphate. The yeast genes were all expressed as *A. niger*. The experiments showed that *S. cerevisiae* was well adapted to use extracellular IP6 as the phosphorus source and that repression of the IP6-degrading enzymes was not only dependent on the extracellular concentration of inorganic phosphate, but also on the pH and medium composition.

Veide and Andlid (15) investigated different strategies to increase extracellular phytase activity in a *S. cerevisiae* strain, and assessed the relative IP6 degradation capacities of different improved strains using only *S. cerevisiae* genes, by modifications of the PHO system. In this study, the most effective strain was YD80 (pPHO5) (deletion of the negative regulator PHO80 combined with over expression of PHO5), which showed a 9-fold increase in biomass specific phytate degradation as compared to the de-repressed wild-type.

In the future, a high-phytase *S. cerevisiae* strain, with corresponding modifications and preferably without the use of any heterologous DNA, might be a suitable organism for food applications such as traditionally fermented foods or for producing new kinds of low-phosphate (low-IP6) foods (15). *S. cerevisiae* was selected due to its performance and promising results, to continue the studies on the characterization and optimization of phytase production.

Considering that the enzymatic activities measured for *S. cerevisiae* after 24 hr and 96 hr did not differ significantly, the phytase production will be carried out at 24 hr. This has special significance in the fermentative process in order to reduce costs and increase enzyme production. Obtaining phytase from *S. cerevisiae* is of particular interest, since this yeast is recognized as safe for food production and potential applications.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for the scholarship.

REFERENCES

1. Pandey A, Szkacks G, Soccol CR, Rodriguez-Leon JA, Soccol VT. Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresource Technol.* 77: 203-214 (2001)
2. Casey A, Walsh G. Identification and characterization of a phytase of potential commercial interest. *J. Biotechnol.* 110: 313-322 (2004)
3. Vats P, Banerjee UC. Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. *Enzyme Microb. Tech.* 35: 3-14 (2004)
4. Common F. Biological availability of phosphorus in pigs. *Nature* 143: 370-380 (1989)
5. Walsh GA, Power RF, Headon DR. Enzymes in the animal feed industry. *Trends. Food. Sci. Tech.* 5: 81-87 (1994)
6. Mallin MA. Impacts of industrial animal production on rivers and estuaries. *Am. Sci.* 88: 26-37 (2000)
7. Konietzny U, Greiner R. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). *Int. J. Food Sci. Tech.* 37: 791-812 (2002)
8. Liu BL, Rafiq A, Tzeng YM, Rob, A. The induction and characterization of phytase and beyond. *Enzyme Microb. Tech.* 22: 415-424 (1998)
9. Bae HD, Yanke LJ, Cheng KJ, Selinger LB. A novel staining method for detecting phytase activity. *J. Microbiol. Meth.* 39: 17-22 (1999)
10. Casey A, Walsh G. Purification and characterization of extracellular phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142. *Bioresource Technol.* 86: 183-188 (2003)
11. Selle PH, Ravindran V. Microbial phytase in poultry nutrition. *Anim. Feed Sci. Tech.* 135: 1-41 (2006)
12. Cao L, Wang W, Yang C, Yang Y, Diana J, Yakupitiyage A, Luo ZLD. Application of microbial phytase in fish feed. *Enzyme Microb. Tech.* 40: 497-507 (2007)
13. Andlid TA, Veide J, Sandberg AS. Metabolism of extracellular inositol hexaphosphate (phytate) by *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 97: 157-169 (2004)
14. Nayini NR, Markakis P. The phytase of yeast. *Lebensm. Wiss. Technol.* 17: 24-26 (1984)

15. Veide J, Andlid T. Improved extracellular phytase activity in *Saccharomyces cerevisiae* by modifications in the PHO system. *Int. J. Food Microbiol.* 108: 60-67 (2006)
16. Segueilha L, Lambrechts C, Boze H, Moulin G, Galzy P. Purification and properties of the phytase from *Schwanniomyces castelli*. *J. Ferment. Bioeng.* 74: 7-11 (1992)
17. Lambrechts C, Boze H, Segueilha L, Moulin G, Galzy P. Influence of culture conditions on the biosynthesis of *Schwanniomyces castelli* phytase. *Biotechnol. Lett.* 15: 399-404 (1993)
18. Sano K, Fukuhara H, Nakamura Y. Phytase of the yeast *Arxula adenivorans*. *Biotechnol. Lett.* 21: 33-38 (1999)
19. Vohra A, Satyanarayana T. Phytase production by the yeast *Pichia anomala*. *Biotechnol. Lett.* 23: 551-554 (2001)
20. Mayer AF, Hellmuth K, Schlieker H, Lopez-Ulibarri R, Oertel S, Dahlems U, Strasser AWM, Van Loon APGM. An expression system matures : a highly efficient and cost-effective process for phytase production by recombinant strains of *Hansenula polymorpha*. *Biotechnol. Bioeng.* 63: 373-381 (1998)
21. Han Y, Wilson DB, Lei XG. Expression of an *Aspergillus niger* phytase gene (pIpyA) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microb.* 65: 1915-1918 (1999)
22. Han Y, Lei XG. Role of glycosylation in the functional expression of an *Aspergillus niger* phytase (phyA) in *Pichia pastoris*. *Arch. Biochem. Biophys.* 364: 83-90 (1999)
23. Stockmann C, Losen M, Dahlems U, Knocke C, Gellissen G, Buchs J. Effect of oxygen supply on passaging, stabilizing and screening of recombinant *Hansenula polymorpha* production strains in test tube cultures. *FEMS Yeast Res.* 4: 195-205 (2003)
24. Huang H, Huiying L, Yang P, Meng K, Wang Y, Yuan T, Bai Y, Yao B. A novel phytase with preferable characteristics from *Yersinia intermedia*. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 350: 884-889 (2006)
25. Letícia O. Biotechnological characteristics of some *Saccharomyces* species isolated from wine yeast culture. *Food Sci. Biotechnol.* 14: 722-726 (2005)
26. Howson SJ, Davis RP. Production of phytate-hydrolysing enzyme by some fungi. *Enzyme Microb. Tech.* 5: 377-382 (1983)
27. Shimizu M. Purification and characterization of Phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. *Biosci. Biotech. Bioch.* 56: 1266-1269 (1992)

28. Lambrechts C, Boze H, Moulin G, Galzy P. Utilization of phytate by some yeasts. *Biotechnol. Lett.* 14: 61-66 (1992)
29. Kim DS, Godber S, Kim HR. Culture conditions for a new phytase-producing fungus. *Biotechnol. Lett.* 27: 1077-1081 (1999)
30. Chelius MK, Wodzinski RJ. Strain improvement of *Aspergillus niger* for phytase production. *Appl. Microbiol. Biot.* 41: 79-83 (1994)
31. Jung H-K, Park C-D, Bae D-H, Hong J-H. Isolation of alcohol-tolerant amyolytic *Saccharomyces cerevisiae* and its application to alcohol fermentation. *Food Sci. Biotechnol.* 17: 1160-1164 (2008)
32. Kim S-D, Kim M-K, Woo C-J, Rhee C-H, Lee S-H. Characterization of psychrophilic yeast in Kimchi. *Food Sci. Biotechnol.* 9: 277-279 (2000)
33. Engelen AJ, Van der Heeft, Ransdorp HGP, Smit LCE. Simple and rapid determination of phytase activity. *J. AOAC Int.* 77: 760-764 (1994)
34. Ullah AHL, Gibson DM. Extracellular phytase (E.C. 3.1.3.8.) from *Aspergillus ficcum* NRRL 3135: Purification and characterization. *Prep. Biochem.* 17: 63-91 (1987)
35. Kim YO, Kim HK, Bae KS, Yu JH, Oh TK. Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus sp.* DS11. *Enzyme Microb. Tech.* 22: 2-7 (1998)
36. Segueilha L, Moulin G, Galzy P. Reduction of phytate content in wheat bran and glandless cotton flour by *Schwanniomyces castelli*. *J. Agr. Food Chem.* 41: 2451-2454 (1993)
37. Oh N-S, Lee BH. Phytase properties from *Bifidobacterium animalis*. *Food Sci. Biotechnol.* 16: 580-583 (2007)

**CAPÍTULO 3: IMPROVING PHYTASE PRODUCTION BY A NEWLY
SACCHAROMYCES CEREVISIAE STRAIN USING STATISTICAL DESIGNS**

Edi Franciele Ries¹ and Gabriela Alves Macedo¹

Enviado para publicação em: Process Biochemistry, maio 2010.

ABSTRACT

Using statistical optimization, we enhanced the production of phytase by a new *Saccharomyces cerevisiae* strain cultured in mineral medium. The carbon and nitrogen sources and the inducers of phytase production were selected using the one-variable-at-a-time approach before the central composite design (CCD). Urea was fixed as nitrogen source in culture medium at a concentration of 0.15% (w/v). The 2² full factorial CCD and response surface methodology (RSM) was used to optimize the composition of the culture medium. We found that a culture medium consisting of 2.5% sucrose and 0.5% sodium phytate optimally supported the maximum phytase activity by *S. cerevisiae*. In addition, we found that shaking culture of the yeast at 35 °C, 150 rpm supported maximum phytase production. Furthermore, the pre-inoculum concentration was fixed at 1 mL. The validity of this model was verified by culturing the organisms in flasks on a shaker. Using the optimized media and growth conditions, we obtained a 10-fold improvement in the production of phytase by *S. cerevisiae*.

Keywords: Phytate, phytase, yeast, response surface methodology

Running title: Optimization of phytase production by *Saccharomyces cerevisiae*

¹ Food Science Department, Faculty of Food Engineering, Campinas State University (UNICAMP), Campinas 13083 970, SP, BRAZIL
E-mail address: gmacedo@fea.unicamp.br

Introduction

Phytate degradation is an important metabolic process in many biological systems. Although phytate is the major storage form of phosphorus found in cereals, grains, vegetables, pollens and seeds [1], it is not widely available to monogastric animals, such as swine and poultry. Consequently, inorganic phosphorus, a non-renewable and expensive mineral, is added to the diets of pigs, fish and poultry to meet their nutritional phosphorus requirements [2,3]. However, any phosphorus not used by the animals' body is excreted, causing environmental problems in areas of intensive livestock production [3,4]. In addition, phytic acid acts as an anti-nutrient because it chelates nutritionally important metals, such as iron, zinc, magnesium and calcium, and binds proteins and lipids, thus diminishing the bioavailability of these important nutrients [5].

Phytase (*myo*-inositol hexaphosphate phosphohydrolase, EC 3.1.3.8) catalyzes the hydrolysis of phytate to *myo*-inositol pentaphosphate and orthophosphate. Improving the digestibility of proteins and increasing the availability of phosphorus and other minerals, which are usually chelated by phytic acid [6], diminishing the anti-nutritive properties of phytate and preventing environmental pollution. Thus, the ideal enzyme for the catalysis of such processes should have high catalytic specificity, resistance to proteolysis [7] and stability at elevated temperatures and under acidic conditions [8].

Phytase is widely distributed in plants, animal tissues and microorganisms. Phytases are produced by yeast either naturally [17-20] or by processes based on recombinant DNA technology using different yeast strains [21-26]. *Saccharomyces cerevisiae* possesses several properties that make it useful for biotechnological applications, such as its resistance to high sugar and alcohol concentrations [27] and a high growth rate at increasing temperatures [28]. Phytases have been studied in different yeast strains, such as baker's yeast [29]. An extracellular acid phytase from *S. cerevisiae* recently purified and characterized [30]. Additionally, a phytase-producing yeast strain, identified as *S. cerevisiae* strain zi (EU188613), was isolated from soil samples in São Paulo, Brazil [31]. This strain is potentially a new source of thermostable phytases with commercial interest, particularly because the screen for this yeast was performed using gradual temperature increases.

The process of fermentation is significantly influenced by several physical and chemical factors. In addition, phytase production is affected by growth conditions, strain, substrate and availability of nutrients [2]. Statistical plans are currently used to find ways to enhance phytase production at a reduced cost. The use of response surface methodology (RSM) in biotechnological processes has gained great importance in the optimization of enzyme production because it helps to determine the optimum parameters for enzyme activity [9-16].

In this study, our aim was to optimize the medium composition and culture conditions to maximize the production of phytase by *S. cerevisiae* strain zi (EU188613) using statistical designs.

MATERIAL AND METHODS

YEAST AND PRE-INOCULUM PREPARATION

Yeast strain was isolated from Eutrophic Red Latosol (Oxisol) samples from northeast São Paulo state (Brazil), regions of sugarcane cultivate using no-tillage system. The yeast strain was identified as *S. cerevisiae* strain zi (EU188613) by molecular taxonomy [31] and deposited at the CBMAI (Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e Indústria) collection. Yeast cultures were maintained in assay vials containing yeast malt gar (YMA) and stored at 4 °C until they were used for preparation of the pre-inoculum, which was done by suspending the spores in 2.5 mL of sterile water. This suspension was used to inoculate the culture medium.

CULTURE MEDIUM AND CONDITIONS

Standard culture medium (10 g/L sucrose, 0.5 g/L sodium phytate [purchased from Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany], 3.0 g/L (NH₄)₂SO₄, 0.5 g/L MgSO₄·7H₂O, 0.5 g/L KCl, 0.001 g/L FeSO₄·7H₂O, 0.0075 g/L MnSO₄·H₂O and 0.1 g/L CaCl₂) was adjusted to a pH of 4.5 and autoclaved at 121 °C, 1 atm for 15 min. Fifteen milliliters of culture medium and 1 mL of yeast pre-inoculum were mixed in conical flasks, that were incubated in a rotary shaker (TECNAL TE 421, Piracicaba, SP, BR) at 150 rpm, 35 °C for 120 h. After

allowing the yeast to grow, the flasks were centrifuged at $7100 \times g$, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 min in a Beckman Coulter Allegra X-22R centrifuge (Fullerton, CA, USA). The culture supernatant was then used directly for the phytase assay, and the pellet was used for biomass determination after 24, 72 and 120 h of fermentation.

PHYTASE ASSAY

Phytase production was measured using a colorimetric method by following the release of inorganic phosphate from phytic acid. Free inorganic phosphate was assayed in the culture supernatant based on the concentration of phosphate released after hydrolysis of sodium phytate by phytase [32]. For this purpose, 150 μL of enzyme solution were mixed to 600 μL of 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) supplemented with 2 mM sodium phytate and 2 mM of CaCl_2 and incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min. The reaction was then stopped by adding 750 μL of 5% trichloroacetic acid, after which 1.5 mL of the color reagent were added to generate phosphomolybdate. The concentration of inorganic orthophosphate (Pi) in this mixture was determined colorimetrically by measuring the absorbance of the solution at 700 nm using a Beckman Coulter DU640 Spectrophotometer (Fullerton, CA, USA). The color reagent was prepared fresh by mixing 4 volumes of 1.5% (w/v) ammonium molybdate solution supplemented with 5.5% (v/v) sulfuric acid and 1 volume of 2.7% (w/v) ferrous sulfate solution. The results were compared to a standard curve prepared using K_2HPO_4 as a source of inorganic phosphate at concentrations ranging from 0.0448 to 2.8706 μM .

Phytase production was also assayed using the method proposed by Stockmann *et al.* [24] with adaptations to use a synthetic phosphatase substrate. This method is based on the hydrolysis of 4-nitrophenyl phosphate (4-NPP) to phosphate and p-nitrophenol. The substrate (1000 μL of 5 mM 4-NPP disodium salt hexahydrate) was added to a mixture of 500 μL of 0.8 M sodium acetate buffer (pH 5.0) and 500 μL of enzyme solution. The mixture was incubated at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 min, and the reaction was stopped by the addition of 2000 μL of 0.1 N NaOH. The concentration of released p-nitrophenol was determined colorimetrically by measuring the absorbance of the mixture at 410 nm using a Beckman Coulter DU640 spectrophotometer (Fullerton, CA, USA). The results were compared to a

standard curve prepared using p-nitrophenol at concentrations ranging from 0.0719 to 7.1891 μM .

One unit (U) of phytase activity was defined as the concentration of inorganic phosphate, in μmol , released per min per mL of enzyme preparation (U/mL) under defined reaction conditions.

BIOMASS DETERMINATION

In order to determine the dry weight of the yeast, the cell pellets were washed twice with distilled water and dried in pre-weighed tubes at 60 °C to a constant weight.

OPTIMIZATION OF THE MEDIUM COMPOSITION FOR THE PRODUCTION OF PHYTASE BY *S. CEREVISIAE*

The optimization of the medium composition for the production of phytase was carried out in two stages as described below.

Selection of the carbon and nitrogen sources and the inducers for the production of phytase using the one-variable-at-a-time approach

For the control culture medium, glycerol and soy oil at a concentration of 1% (w/v) and urea, corn steep liquor, yeast extract, peptone, sodium nitrate and potassium nitrate at a concentration of 0.3% were substituted for sucrose and ammonium sulfate, respectively. As the inducers of phytate production, we used 0.5% (v/v) methanol, 0.5% (w/v) KH_2PO_4 and 0-0.35% (w/v) sodium phytate. Fermentation was carried out under the conditions described, the phytase activity and biomass of the yeast were determined.

Optimization of the medium composition for the production of phytase using RSM

The selected inducers of phytase production and the carbon sources (i.e., sodium phytate and sucrose, respectively) were further optimized in the synthetic medium by RSM and by using central composite design (CCD). In this manner, we sought to determine the optimal concentrations of these compounds and to study their interactions. Urea was fixed as nitrogen source at a concentration of 0.15% (w/v). The concentrations of these two

variables [sodium phytate concentration (A) and sucrose concentration (B)] were optimized using the CCD plan and Statistica[®] software (version 7.0). Each variable in the design was studied at five different levels (Table 1). A 2² factorial design, with four axial points and three replicates at the center point and a total of 11 experiments were employed (Table 2). The average maximum phytase activity in *S. cerevisiae* cultured in sodium phytate substrate was measured after 36 h of fermentation. The behavior of the system can be explained by the following quadratic equation:

$$Y = \beta_0 + \beta_1A + \beta_2B + \beta_{11}A^2 + \beta_{22}B^2 + \beta_{12}AB,$$

where Y is the predicted response, β_0 is the intercept, β_1 and β_2 are linear coefficients, β_{11} and β_{22} are squared coefficients, β_{12} is the interaction coefficient and A , B , A^2 , B^2 and AB are the levels of the independent variables. The corresponding ANOVA values are shown in Table 3.

OPTIMIZATION OF THE FERMENTATION CONDITIONS FOR THE PRODUCTION OF PHYTASE

The production of phytase in optimized medium was studied under different culture conditions. One milliliter of yeast pre-inoculum was used in all the experiments. To determine the optimum temperature (A) and agitation (B) for the production of phytase and to study their interactions, RSM using CCD was applied. The two independent variables (A and B) were studied at five different levels ($-\alpha$, -1 , 0 , $+1$, $+\alpha$; Table 4), and a total of 11 experiments were performed (Table 5). The average maximum phytase activity in *S. cerevisiae* cultured in sodium phytate substrate was measured after 36 h of fermentation. The behavior of the system can be explained by the following quadratic equation:

$$Y = \beta_0 + \beta_1A + \beta_2B + \beta_{11}A^2 + \beta_{22}B^2 + \beta_{12}AB,$$

where Y is the predicted response, β_0 is the intercept, β_1 and β_2 are linear coefficients, β_{11} and β_{22} are squared coefficients, β_{12} is the interaction coefficient and A , B , A^2 , B^2 and AB are the levels of the independent variables.

STATISTICAL ANALYSIS

The analyses were performed in triplicate, and the results were presented as the mean \pm standard deviation. The Tukey test was used to determine significant differences between the mean values for the different components. *P*-values of ≤ 0.05 were considered statistically significant. Statistica[®] 7.0 software was used to perform statistical analysis of the experimental data.

RESULTS AND DISCUSSION

SELECTION OF THE CARBON AND NITROGEN SOURCES AND THE INDUCERS FOR THE PRODUCTION OF PHYTASE

Prior to optimizing the components of the medium, we selected the sources of carbon and nitrogen and the inducers for the production of phytase using the one-variable-at-a-time approach. As a read-out of the tests, we evaluated the activity of phytase in yeast cultured in sodium phytate-containing medium after 24, 72 and 120 h of fermentation. We chose to use this method to evaluate the activity of phytase because it yields clear results and because *S. cerevisiae* has a preference for sodium phytate. In addition, we also evaluated the enzyme activity using 4-NPP and by evaluating the biomass of the yeast as a way to determine the correlation between biomass production and phytase activity.

Carbon is a major component of the cell, and certain fats and oils are used as carbon sources and as inducers of enzyme production by several microorganisms [33]. Carbon is an important energy source for the growth of microorganisms [34]. Our study showed that soy oil yielded higher phytase activities, but the biomass of the yeast was approximately 8.0-fold lower than the control, a result which is likely to be due to the absence of sugar supplementation for growth and biomass production. Ramachandram *et al.* [35] investigated the use of oil cakes as substrates and the effect of saccharide supplementation on the production of phytase, and they found that carbon supplementation increased the production of phytase by *Rhizopus* spp.

Generally, yeast can synthesize all the amino acids and nitrogen bases that are necessary for its cellular growth from ammonium ions. Indeed, yeast grows at a faster rate

in the presence of organic nitrogen [36]. We evaluated the effect of six different organic and inorganic nitrogen sources (urea, corn steep liquor, yeast extract, peptone, sodium nitrate and potassium nitrate), as substitutes for ammonium sulfate, on the production of phytase. The activity levels of phytase from *S. cerevisiae* cultured in sodium phytate substrate were comparable to those from *S. cerevisiae* cultured in medium containing potassium nitrate (0.16 ± 0.01 U/mL after 120 h of fermentation), sodium nitrate (0.16 ± 0.02 U/mL and 0.168 ± 0.003 U/mL after 72 and 120 h of fermentation, respectively), urea (0.16 ± 0.01 U/mL after 24 and 72 h of fermentation) and corn steep liquor (0.171 ± 0.002 U/mL after 120 h of fermentation). However, the enzymatic activity (0.194 ± 0.002 U/mL) obtained after culture of the yeast on substrate containing urea for 120 h was higher and significantly differed from the activity obtained with the other components.

The highest yeast biomass was obtained when yeast extract was used as a nitrogen source, but the results did not significantly differ between the time points analyzed for this component (data not shown). Similarly, Malta [36] replaced yeast extract for ammonium sulfate as a nitrogen source during fermentation and noted a 2.2-fold increase in cell mass. The use of sodium nitrate and potassium nitrate as nitrogen sources in the substrate yielded a lower yeast biomass. This result was expected because, normally, yeast can assimilate ammonia, but do not always assimilate nitrates, nitrites, amines and certain amino acids. Many yeast strains, such as *Saccharomyces*, are characterized by their inability to assimilate nitrate [37]. In addition, when either urea or ammonium sulfate is provided as a nitrogen source, this yeast species does not immediately assimilate it [36].

Analysis of phytase activity using the 4-NPP substrate showed that the highest enzyme activity (0.12 ± 0.01 U/mL after 120 h of fermentation) was obtained when sodium nitrate was used as a nitrogen source. However, this result did not significantly differ from the enzymatic activity (0.082 ± 0.003 U/mL) obtained after 72 h of fermentation using the same nitrogen source, as well as when using other sources, such as potassium nitrate (0.085 ± 0.002 U/mL at 120 h) and urea (0.10 ± 0.01 U/mL at 120 h).

Urea, beef extract, peptone, corn steep liquor and ammonium nitrate are the preferred nitrogen sources for the production of phytase by *Aspergillus ficuum* [5], *Pichia anomala* [10], *Arxula adenivorans* [19], *A. niger* [38] and *Rhizopus* spp. [35],

respectively. Kaur and Satyanarayana [13] reported that urea is the best nitrogen source for the production of phytase by *P. anomala* when cultured in sugar cane molasses medium.

The ability of sodium phytate (at four different concentrations), KH_2PO_4 and methanol to induce the production of phytase by *S. cerevisiae* was also analyzed. We found that the activity of phytase and the biomass of the yeast were significantly enhanced when *S. cerevisiae* was cultured in medium containing increasing concentrations (from 0% to 0.35%) of sodium phytate, suggesting that sodium phytate can induce phytase production by *S. cerevisiae*. When *S. cerevisiae* was cultured in medium containing 0.35% of sodium phytate, the highest activity in 4-NPP substrate obtained was 0.1 U/mL after 120 h of fermentation. In contrast, methanol did not increase the phytase activity of *S. cerevisiae* cultured in sodium phytate. This result was expected because previous reports have shown that methanol can only induce the production of phytase in *Pichia* and *Hansenula* strains [26], which are methylotrophic yeasts that have been developed for the heterologous expression of foreign proteins.

Vassilev *et al.* [38] previously reported that the addition of soluble phosphorus (P) to the fermentation medium increases the biomass of yeast. Similarly, in this study, the highest biomass was obtained when *S. cerevisiae* was cultured in the presence of KH_2PO_4 at all time points, but not when cultured in the presence of sodium phytate. This result could be due to the ability of sodium phytate to repress enzyme synthesis in the presence of high levels of inorganic phosphate, an effect which has been previously reported [2,14,15,35].

It is important to note that the growth conditions that support maximum cell growth may not necessarily be those that support the maximum yield of a metabolic product [36]. Vohra and Satyanarayana used statistical analysis to optimize the production of phytase by *P. anomala*. They observed that the biomass of the yeast increased with increased concentrations of carbon (5.5% glucose) and nitrogen (2% beef extract). However, the production of phytase by the yeast was not associated with its growth because, at these concentrations of glucose and beef extract, the production of phytase was low [10].

According to our findings *S. cerevisiae* requires sucrose for its growth and that urea and sodium phytate have a positive influence on the production of phytase by this organism, we used these parameters to optimize the composition of the medium in order to

enhance the activity of phytase when the yeast was cultured in the presence of sodium phytate.

Prior to optimization, we defined the experimental fermentation time as 36 h. The experiments were carried out at the center point at 12, 24, 36 and 48 h. The results indicated that yeast biomass increases with increased fermentation time. However, the activity of phytase when the yeast was cultured in both substrates increased only up to 36 h (0.55 ± 0.01 U/mL and 0.051 ± 0.004 in sodium phytate and 4-NPP substrates, respectively) and significantly decreased after 48 h.

OPTIMIZATION OF THE MEDIUM COMPONENTS FOR THE PRODUCTION OF PHYTASE

We analyzed different concentrations of urea (0-0.30% w/v) to determine the best concentration that promotes the production of phytase. Higher concentrations of urea result in decreased phytase activity when *S. cerevisiae* was cultured in sodium phytate substrate. At a concentration of 0.15% urea, the activity of phytase was 0.41 U/mL, while at 0.30% urea we observed an activity of 0.33 U/mL.

The concentrations of sucrose and sodium phytate were further optimized by RSM using CCD, and the data were analyzed using the analysis of variance (ANOVA). Table 1 shows the ranges of the selected variables analyzed for their effects on the production of phytase, and the predicted and observed responses are shown in Table 2.

TABLE 1 CONCENTRATION RANGES OF THE MEDIUM COMPONENTS AS ANALYZED BY RSM

Factor	Variables	Range examined	Levels				
			$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
A	Sodium phytate (% w/v)	0.15 – 0.55	0.15	0.2	0.35	0.5	0.55
B	Sucrose (% w/v)	0.5 – 2.5	0.5	0.8	1.5	2.2	2.5

The effects of these variables on the activity of phytase in *S. cerevisiae* cultured in sodium phytate substrate can be predicted by the model:

$$Y = 0.4333 + 0.0406A + 0.0387B - 0.0393A^2 + 0.0355AB,$$

where Y is the activity (U/mL) of phytase in sodium phytate, A is the concentration of sodium phytate and B is the concentration of sucrose. The corresponding ANOVA values are shown in Table 3. The coefficient of determination (R^2) was 0.9417, which accounts for the 94.17% variability of the model. The R^2 -value should be between 0 and 1, and a value ≥ 0.75 indicates aptness of the model [13]. The ANOVA shows a high performance of the F -value for the regression analysis (the calculated values are approximately 5-fold higher than those listed), which indicates that the terms of the model is significant.

TABLE 2 EXPERIMENTAL DESIGN AND RESULTS FOR THE OPTIMIZATION OF THE MEDIUM COMPOSITION FOR PHYTASE ACTIVITY USING RSM

Run n°	Sodium phytate (% w/v)	Sucrose (% w/v)	Phytase activity in sodium phytate medium (U/mL)	
			Experimental	Predicted
1	-1	-1	0.35	0.34
2	+1	-1	0.36	0.35
3	-1	+1	0.35	0.34
4	+1	+1	0.51	0.50
5	-1.41	0	0.29	0.29
6	+1.41	0	0.40	0.41
7	0	-1.41	0.34	0.35
8	0	+1.41	0.45	0.46
9	0	0	0.43	0.43
10	0	0	0.43	0.43
11	0	0	0.43	0.43

The three-dimensional plot (**Fig. 1**) shows the optimal concentrations and interactions of the sodium phytate and sucrose variables for the production of phytase. At high concentrations of sodium phytate and sucrose (0.55% and 2.5% w/v, respectively), we observed an increase in the production of phytase. The maximum predicted activity for

phytase was 0.50 U/mL, while the experimental activity was 0.51 U/mL, indicating that the predicted and experimental values were in agreement.

TABLE 3 ANALYSIS OF VARIANCE AND REGRESSION ANALYSIS FOR THE OPTIMIZATION OF THE MEDIUM COMPOSITION FOR PHYTASE ACTIVITY BY *S. CEREVISIAE* IN SODIUM PHYTATE SUBSTRATE

Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F value
Regression	0.037781	4	0.009445	24.22
Residual	0.002339	6	0.00039	
Lack of fit	0.002338	4	0.000585	
Pure error	0.000001	2	0.0000005	
Total	0.04012	10		

Coefficient of determination (R^2) = 0.9417; $F_{4;6; 0.05} = 4.53$

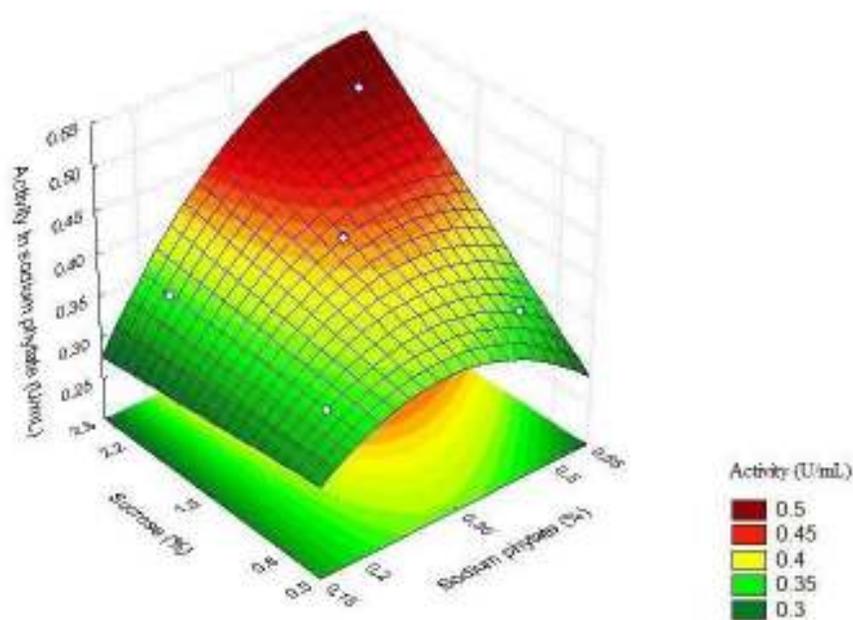


FIGURE 1 RESPONSE SURFACE GRAPH SHOWING THE EFFECT OF THE INTERACTION BETWEEN SODIUM PHYTATE AND SUCROSE ON THE ACTIVITY OF PHYTASE.

The statistical model for phytase activity in response to sodium phytate was validated by ANOVA and by repeating the experiments using the optimized conditions. Experimentally, we found the activity of phytase was 0.49 ± 0.01 U/mL, while the predicted activity was 0.50 U/mL. Based on these results, we used sucrose at a concentration of 2.5% to further optimization of the fermentation conditions, and due to its high cost, we used sodium phytate at a concentration of 0.5%.

OPTIMIZATION OF THE FERMENTATION CONDITIONS FOR THE PRODUCTION OF PHYTASE

Experimentally, we determined that a 1-ml volume of pre-inoculum (equivalent to 0.43 U/mL) was optimal for the production of phytase. When the concentration of the pre-inoculum was increased, we observed a decrease in the production of phytase and only minimal enzymatic activity (0.35 U/mL) at the highest concentration of pre-inoculum (3 mL). This result may have been due to the competition between yeast cells for carbon sources and nutrients. Similar results were reported by Roospesh *et al.* [34] for *Mucor racemosus* and by Ramachandram *et al.* [35] for *Rhizopus* spp., who suggest that there is a balance between the nutrients available and the proliferating yeast cells, resulting in decreased enzyme synthesis.

We also optimized the temperature and agitation conditions by RSM using CCD. Table 4 shows the different temperature and agitation ranges analyzed for their effects on phytase production, and Table 5 shows the experimental and predicted phytase activity values obtained.

TABLE 4 TEMPERATURE AND AGITATION RANGES AS ANALYZED BY RSM

Factor	Variables	Range examined	Levels				
			$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
A	Temperature (°C)	25 – 45	25	28	35	42	45
B	Agitation (rpm)	70 – 230	70	93	150	207	230

TABLE 5 EXPERIMENTAL DESIGN AND RESULTS FOR THE OPTIMIZATION OF THE FERMENTATION CONDITIONS FOR PHYTASE ACTIVITY USING RSM

Run n°	Temperature (°C)	Agitation (rpm)	Phytase activity in sodium phytate (U/mL)	
			Experimental	Predicted
1	-1	-1	0.53	0.49
2	+1	-1	0.45	0.46
3	-1	+1	0.40	0.41
4	+1	+1	0.37	0.43
5	-1.41	0	0.29	0.32
6	+1.41	0	0.36	0.31
7	0	-1.41	0.59	0.61
8	0	+1.41	0.58	0.54
9	0	0	0.61	0.61
10	0	0	0.62	0.61
11	0	0	0.61	0.61

The effects of these variables on the activity of phytase in *S. cerevisiae* cultured in sodium phytate substrate can be predicted by the model:

$$Y = 0.6133 - 0.1485A^2,$$

where Y is the activity of phytase (U/mL) in sodium phytate and A is the temperature. This optimized model for the activity of phytase in response to sodium phytate was validated by ANOVA, and the results are shown in Table 6.

The quadratic parameter for the temperature was a significant term in the model for phytase production ($p < 0.05$). The R^2 was calculated to be 0.8648, which accounts for the 86.48% variability of the model. The high F -value for the regression analysis (the calculated values are approximately 11-fold higher than those listed) indicates that the terms of the model are significant.

The three dimensional plot shows the interaction between temperature and agitation for the production of phytase (Fig. 2). The results show that the highest phytase activity (0.62 U/mL) in response to sodium phytate was obtained at central point conditions (35 °C

and 150 rpm), which were previously used. The maximum experimental phytase activity obtained was 0.62 U/mL, whereas the predicted value was 0.61 U/mL.

TABLE 6 ANALYSIS OF VARIANCE AND REGRESSION ANALYSIS FOR THE OPTIMIZATION OF THE FERMENTATION CONDITIONS FOR PHYTASE ACTIVITY BY *S. CEREVISIAE* IN SODIUM PHYTATE SUBSTRATE

Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F value
Regression	0.12658	1	0.13162	57.59
Residual	0.01978	9	0.001643	
Lack of fit	0.01972	7	0.002818	
Pure error	0.00006	2	0.00003	
Total	0.14636	10		

Coefficient of determination (R^2) = 0.8648; $F_{1, 9; 0.05}$ = 5.12

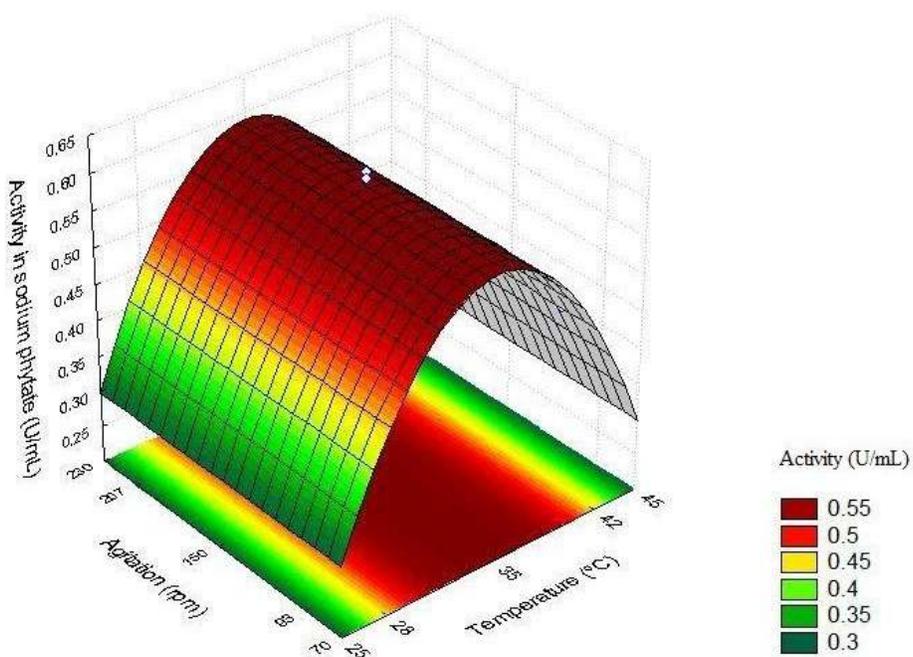


FIGURE 2 RESPONSE SURFACE GRAPH SHOWING THE EFFECT OF THE INTERACTION BETWEEN TEMPERATURE AND AGITATION ON THE ACTIVITY OF PHYTASE.

The model was also validated by repeating the experiments using the optimized conditions. The predicted activity of phytase was 0.61 U/mL, while the experimental activity was 0.58 ± 0.02 U/mL.

The phytase activity obtained in unoptimized medium was 0.06 U/mL after 24 h of fermentation by *S. cerevisiae*. After optimization of the medium composition and the fermentation conditions, the activity of phytase in response to sodium phytate was approximately 10-fold higher (0.62 U/mL). After statistical optimization, the activity of phytase increased 1.75-fold in *P. anomala* cultured in synthetic medium [10], 1.7-fold in *Aspergillus ficcum* [11], 1.3-fold in *Rhizomucor pusillus* [12], 3.73-fold in *Sporotrichum thermophile* [15] and 1.8-fold in *M. racemosus* [39].

The activity of phytase in response to sodium phytate after 120 h of fermentation by *S. cerevisiae* was analyzed using the following optimized conditions: 0.5% sodium phytate, 2.5% sucrose, 35 °C and 150 rpm. The activity of phytase in response to sodium phytate and the biomass of *S. cerevisiae* at different time points are shown in Figure 3.

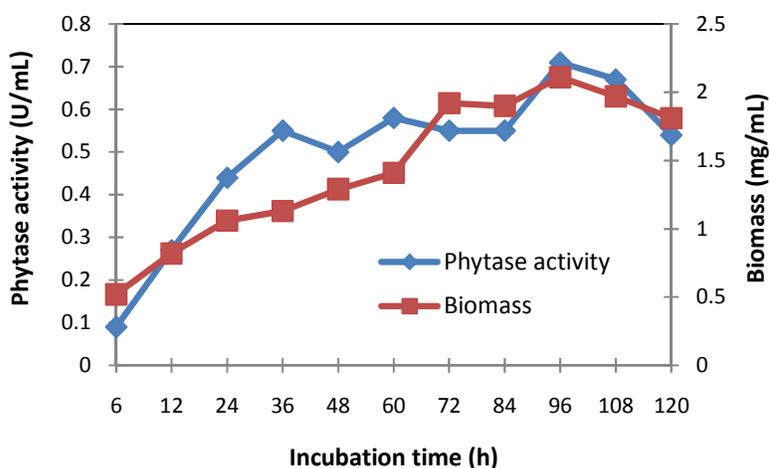


FIGURE 3 PHYTASE ACTIVITY AND YEAST BIOMASS AT DIFFERENT TIME POINTS.

The activity of phytase and the biomass of the yeast increased progressively over time, and the maximum phytase activity (0.710 ± 0.002 U/mL) and biomass (2.11 ± 0.03 mg/mL) were obtained after 96 h of fermentation. However, the enzyme yield significantly declined after further incubation times ($p < 0.05$), which is possibly due to the reduced levels

of nutrients available in the medium, as reported by Roospesh *et al.* [34]. In agreement with this result, the maximum phytase activity and biomass for *M. racemosus* was reported to be obtained after 96 h of fermentation, suggesting a relationship between enzyme production and maximum growth [34].

S. cerevisiae produces extracellular phytase in simple mineral medium, and RSM has proved to be effective for optimizing the activity of phytase. Few studies have reported the use of RSM to improve the production of phytase by yeast, and this is the first study that was carried out to enhance the production of phytase by *S. cerevisiae*. Thus, this yeast strain has potential applications for the reduction of phytate in animal feed.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support.

REFERENCES

- [1] Pandey A, Szkacks G, Soccol CR, Rodriguez-Leon JA, Soccol VT. Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresource Technol* 2001,77:203-214.
- [2] Vats P, Banerjee UC. Production studies and catalytic properties of phytases (*myo*-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. *Enzyme Microb Tech* 2004,35:3-14.
- [3] Casey A, Walsh G. Identification and characterization of a phytase of potential commercial interest. *J Biotechnol* 2004,110:313-322.
- [4] Walsh GA, Power RF, Headon DR. Enzymes in the animal feed industry. *TIFS* 1994,5:81-87.
- [5] Howson SJ, Davis RP. Production of phytate-hydrolysing enzyme by some fungi. *Enzyme Microb Tech* 1983,5:377-383.
- [6] Konietzny U, Greiner R. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). *Int J Food Sci Tech* 2002,37:791-812.
- [7] Selle PH, Ravindran V. Microbial phytase in poultry nutrition. *Anim Feed Sci Tech* 2006,135:1-41.
- [8] Casey A, Walsh G. Purification and characterization of extracellular phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142. *Bioresource Technol* 2003,86:183-188.
- [9] Sunitha K, Lee JK, Oh TK. Optimization of medium components for phytase production by *Escherichia coli* using response surface methodology. *Bioprocess Biosyst Eng* 1999,21:4777-4781.
- [10] Vohra A, Satyanarayana T. Statistical optimization of the medium components by response surface methodology to enhance phytase production by *Pichia anomala*. *Process Biochem* 2002,37:999-1004.
- [11] Bogar B, Szakacs G, Linden JC, Pandey A, Tengerdy RP. Optimization of phytase production by solid substrate fermentation. *J Ind Microbiol Biot* 2003,30:183-189.
- [12] Chadha BS, Gulati H, Minhas M, Saini HS, Singh N. Phytase production by the thermophilic fungus *Rhizomucor pusillus*. *World J Microb Biot* 2004,20:105-109.
- [13] Kaur P, Satyanarayana T. Production of cell-bound phytase by *Pichia anomala* in an economical cane molasses medium: Optimization using statistical tools. *Process Biochem* 2005,40:3095-3102.

- [14] Singh B, Satyanarayana T. A market enhancement in phytase productions by a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* using statistical designs in a cost effective cane molasses medium. *Journal Appl Microbiol* 2006,101:344-352.
- [15] Singh B, Satyanarayana T. Improved phytase production by a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile* in submerged fermentation due to statistical optimization. *Bioresource Technol* 2008,99:824-830.
- [16] Li XY, Liu ZQ, Chi ZM. Production of phytase by marine yeast *Kodamaea ohmeri* BG3 in an oats medium: Optimization by response surface methodology. *Bioresource Technol* 2008,99:6386-6390.
- [17] Segueilha L, Lambrechts C, Boze H, Moulin G, Galzy P. Purification and properties of the phytase from *Schwanniomyces castelli*. *J Ferment Bioeng* 1992,74:7-11.
- [18] Lambrechts C, Boze H, Segueilha L, Moulin G, Galzy P. Influence of culture conditions on the biosynthesis of *Schwanniomyces castelli* phytase. *Biotechnol Lett* 1993,15:399-404.
- [19] Sano K, Fukuhara H, Nakamura Y. Phytase of the yeast *Arxula adenivorans*. *Biotechnol Lett* 1999,21:33-38.
- [20] Vohra A, Satyanarayana T. Phytase production by the yeast *Pichia anomala*. *Biotechnol Lett* 2001,23:551-554.
- [21] Mayer AF, Hellmuth K, Schlieker H, Lopez-Ulibarri R, Oertel S, Dahlems U, Strasser AWM, Van Loon APGM. An expression system matures: a highly efficient and cost-effective process for phytase production by recombinant strains of *Hansenula polymorpha*. *Biotechnol Bioeng* 1998,63:373-381.
- [22] Han Y, Wilson DB, Lei XG. Expression of an *Aspergillus niger* phytase gene (pIpyA) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microb* 1999,65:1915-1918.
- [23] Han Y, Lei XG. Role of glycosylation in the functional expression of an *Aspergillus niger* phytase (phyA) in *Pichia pastoris*. *Arch Biochem Biophys* 1999,364:83-90.
- [24] Stockmann C, Losen M, Dahlems U, Knocke C, Gellissen G, Buchs J. Effect of oxygen supply on passaging, stabilizing and screening of recombinant *Hansenula polymorpha* production strains in test tube cultures. *FEMS Yeast Res* 2003,4:195-205.

- [25] Huang H, Huiying L, Yang P, Meng K, Wang Y, Yuan T, Bai Y, Yao B. A novel phytase with preferable characteristics from *Yersinia intermedia*. *Biochem Bioph Res Co* 2006,350:884-889.
- [26] Guo MJ, Zhuang YP, Chu J, Zhang SL, Xiong AS, Peng RHe, Yao QH. Production and purification of a novel thermostable phytase by *Pichia pastoris* FPHY34. *Process Biochem* 2007,42:1660-1665.
- [27] Jung HK, Park CD, Bae DH, Hong JH. Isolation of alcohol-tolerant amyolytic *Saccharomyces cerevisiae* and its application to alcohol fermentation. *Food Sci Biotechnol* 2008,17:1160-1164.
- [28] Kim SD, Kim MK, Woo CJ, Rhee CH, Lee SH. Characterization of psychrophilic yeast in Kimchi. *Food Sci Biotechnol* 2000,9:277-279.
- [29] Nayini NR, Markakis P. The phytase of yeast. *Lebensm Wiss Technol* 1984,17:24-26.
- [30] Jin-In M, Won-Seo S, Kim DC, Soon-Oh N. Purification and biochemical properties of an extracellular acid phytase produced by the *Saccharomyces cerevisiae* CY strain. *Process Biochem* 2009, 44:122-126.
- [31] Ries EF, Macedo GA. Progressive screening of thermostable yeasts for phytase production. *Food Sci Biotechnol* 2009,18:655-660.
- [32] Shimizu M. Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. *Biosci Biotech Bioch* 1992,56:1266-1269.
- [33] Tan T, Zhang M, Wang B, Ying C, Deng L. Screening of high lipase producing *Candida* sp and production of lipase by fermentation. *Process Biochem* 2003,39:459-465.
- [34] Roospesh K, Ramachandran S, Nampoothiri KM, Szakacs G, Pandey A. Comparison of phytase production on wheat bran and oilcakes in solid-state fermentation by *Mucor racemosus*. *Bioresource Technol* 2006,97:506-511.
- [35] Ramachandran S, Roopesh K, Nampoothiri KM, Szakacs G, Pandey A. Mixed substrate fermentation for the production of phytase by *Rhizopus* spp. using oilcakes as substrates. *Process Biochem* 2005, 40:1749-1754.
- [36] Malta HL. Estudos de parâmetros de propagação de fermento (*Saccharomyces cerevisiae*) para produção de cachaça de alambique. Brazil: Minas Gerais University; Ph.D. thesis; 2006. p. 23,25-26.

- [37] Mendonça AT. Identificação e estudo das características fisiológicas de *Saccharomyces cerevisiae* presentes em fermentação espontânea de cana-de açúcar. Brazil: Lavras University; Ph.D. thesis; 1999. p. 9;11;13.
- [38] Vassilev N, Vassileva M, Bravo V, Fernández-Serrano M, Nikolaeva I. Simultaneous phytase production and rock phosphate solubilization by *Aspergillus niger* grown on dry olive wastes. *Ind Crop Prod* 2007, 26:332-336.
- [39] Bogar B, Szakacs G, Pandey A, Abdulhameed S, Linden JC, Tengerdy RP. Production of phytase by *Mucor racemosus* in solid-state fermentation. *Biotechnol Prog* 2003,19:312-319.

CAPÍTULO 4: CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DA FITASE DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Edi Franciele Ries¹ e Gabriela Alves Macedo¹

RESUMO

As características bioquímicas da fitase de *Saccharomyces cerevisiae* strain zi (EU188613) foram verificadas e comparadas àquelas determinadas para duas fitases comerciais: fitase de *Aspergillus niger* (Natuphos®) e fitase de *Escherichia coli* (Quantum®). A caracterização bioquímica tem importância ressaltada em estudos de novas fontes de fitase visando à busca por enzimas com características desejáveis para indústria de alimentação animal. Para uma boa utilização destas, sua atividade biológica deve ser preservada mesmo sob os rigores dos processos de fabricação e estocagem da ração, resistir ao baixo pH, altas temperaturas e às enzimas proteolíticas do trato digestivo. A enzima de *Saccharomyces cerevisiae* apresentou atividades altas em ampla faixa de pH, com picos em pH 3,0 e pH 5,6, resistência elevada à ação de proteases, ampla especificidade por substrato e atividade ótima e estabilidade térmica em faixas mais amplas em substrato fitato de sódio (37 – 80°C). A adição de íons Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Na⁺, K⁺ e EDTA no sistema reacional na concentração de 1 mM não apresentou efeitos significativos na atividade de fitase de *S. cerevisiae* em substrato fitato de sódio.

Palavras chave: fitase, levedura, microrganismo, estabilidade ácida, termoestabilidade.

¹ Faculdade de Engenharia de Alimentos – Departamento de Ciência de Alimentos. Rua Monteiro Lobato, 80. Caixa Postal 6121, CEP 13083-862, UNICAMP – Campinas – SP.
E-mail: gmacedo@fea.unicamp.br

Characterization of phytase from *Saccharomyces cerevisiae*

ABSTRACT

Biochemical characteristics of phytase from *Saccharomyces cerevisiae* strain zi (EU188613) were verified and compared to that ones determined for two commercial phytases: phytase de *Aspergillus niger* (Natuphos®) e phytase de *Escherichia coli* (Quantum®). Biochemical characterization is of great relevance in studies of new sources of phytase aiming the search of enzymes with desirable characteristics for the animal food industry. In order to make a good use of them, their biological activity must be preserved even under the strict conditions of processing and storage of animal food, must resist low pH, high temperatures and the proteolytic enzymes of digestive system. The *Saccharomyces cerevisiae* enzyme presented high activities in a large pH range, with peaks in pH 3.0 and 5.6, high resistance to protease action, great substrate specificity, and optimal activity and thermal stability in large ranges for sodium phytate substrate (37 – 80°C). The addition of Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Na^+ , K^+ ions and EDTA in system, concentrated at 1 mM, did not show significant effects in *S. cerevisiae* phytase activity in sodium phytate substrate.

Key words: phytase, yeast, microorganism, acid stability, thermostability

INTRODUÇÃO

O fitato age como um antinutriente ligando-se a proteínas, aminoácidos e lipídios e quelando minerais como cálcio, ferro, zinco e magnésio formando sais insolúveis (Howson e Davis, 1983). A primeira fitase comercial derivada de *Aspergillus niger* com capacidade de liberar fósforo ligado ao fitato e reduzir sua excreção no ambiente foi introduzida no mercado em 1991 (Engelen *et al.*, 1994; Selle e Ravindran, 2006) e desde então foi intensamente usada na Europa como suplemento comercial à alimentação (Konietzny e Greiner, 2002).

A maioria das fitases isoladas são ativas dentro da faixa de pH 4,5 – 6,0 e a estabilidade da atividade enzimática decresce drasticamente em valores de pH abaixo de 3 ou maiores que 7,5; no entanto fitases de *Enterobacter* e *Lilium longiflorum* (pólen) têm pH ótimo em torno de 7,5. Estas enzimas mostram alta atividade na faixa de 50 – 70°C, sendo a temperatura ótima para a atividade da enzima de 45 – 60°C (Liu *et al.*, 1998).

São disponíveis na literatura estudos de purificação e caracterização de fitases de diferentes fontes, como de *Aspergillus ficcum* NRRL 3135 (Ullah e Gibson, 1987); *Schwanniomyces castelli* (Segueilha *et al.*, 1992); *Bacillus subtilis* (Shimizu, 1992); *Bacillus* sp. DS11 (Kim, *et al.*, 1998); *Arxula adenivorans* (Sano, *et al.*, 1999); *Peniophora lycci*, *Agrocybe pediades*, *Ceriporia* sp. e *Trametes pubescens* (Lassen, *et al.*, 2001); *Pichia anomala* (Vohra e Satyanarayana, 2002); *Rhizopus oligosporus* (Casey e Walsh, 2004); *Lilium longiflorum* (Garchow, *et al.*, 2006); *Aspergillus niger* (Casey e Walsh, 2003; Vats e Banerjee, 2006) e *Yersinia intermedia* (Huang, *et al.*, 2006).

Estudo de caracterização enzimática tem importância ressaltada na busca de fitases com características desejáveis, as chamadas fitases ideais, as quais de acordo com Sandberg e Andlid (2002) devem apresentar: pH e temperatura ótimos desejáveis; estabilidade a baixos valores de pH; estabilidade a altas temperaturas; resistência a enzimas proteolíticas; alta atividade específica; atividade extracelular; fácil cultivo e purificação; elevado nível de expressão; ausência de capacidade alergênica e ausência de toxicidade.

Muitas das enzimas disponíveis e utilizadas no mercado hoje reúnem algumas das características citadas, sendo que nenhuma pode ser considerada como ideal. Desta forma, pesquisas continuam principalmente buscando enzimas que apresentem resistência a baixos

valores de pH, enzimas proteolíticas e altas temperaturas, visando aplicação em ração animal sem necessidade de revestimento.

Apesar de fitases de leveduras sem utilização de tecnologia de DNA recombinante ainda não serem disponíveis no mercado, tem-se uma fonte potencial da enzima. As leveduras são microrganismos comumente utilizados para expressar fitases de outras origens (Mayer *et al.*, 1999; Mayson *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2007; Qin *et al.*, 2008), por apresentarem características relacionadas principalmente a termoresistência e estabilidade em condições fisiológicas do trato gastrointestinal.

Saccharomyces cerevisiae (*S. cerevisiae*) strain zi (EU188613) foi selecionada por Ries e Macedo (2009) como potencial produtora de fitase termoestável. O presente trabalho objetivou a caracterização bioquímica da fitase de *Saccharomyces cerevisiae* strain zi (EU188613) e paralelamente de duas fitases comerciais (Natuphos® e Quantum®).

MATERIAL E MÉTODOS

PRODUÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO

S. cerevisiae strain zi (EU188613) foi armazenada em tubos contendo meio Yeast Malt (YM) sólido inclinado sob refrigeração a 4°C. Na produção do pré-inóculo foram acrescentados 2,5 mL de água estéril em cada tubo e a massa celular retirada e homogeneizada com auxílio de alça de platina previamente esterilizada. Esse homogeneizado foi denominado pré-inóculo. O extrato enzimático foi produzido em frascos agitados, sendo o meio mineral de cultivo líquido composto por (%): Sacarose 2,5; ácido fítico sal dihidratado dodecasódico 0,5; uréia 0,15; MgSO₄.7H₂O 0,05; KCl 0,05; FeSO₄.7H₂O 0,0001; MnSO₄.H₂O 0,00075; CaCl₂ 0,01. Foi adicionado 1 mL de pré-inóculo e os frascos incubados em agitador rotatório incubador (TECNAL TE 421, Piracicaba, SP, BR) a 35°C com agitação de 150 rpm por 36 horas. Após desenvolvimento da cultura, os meios foram centrifugados (Beckman Coulter Allegra X-22R, Fullerton, CA, USA) a 7100 x g à temperatura de 4°C, por 30 minutos. A fração sobrenadante foi denominada extrato enzimático extracelular.

A massa celular foi lavada com Tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,0, centrifugada a 7100 x g à temperatura de 4°C, por 10 minutos e ressuspensa no mesmo tampão. A mistura foi submetida ao processo de sonicação (180 – 200 watts) 3 vezes por 15 segundos em Ultrasonicador Tip Labsonic Systems Lab Line Instruments. O extrato obtido foi novamente centrifugado a 7100 x g à temperatura de 4°C, por 10 minutos e o sobrenadante (denominado extrato enzimático intracelular) adicionado ao sobrenadante do processo fermentativo (extrato enzimático extracelular) compondo o extrato enzimático total. Um fluxograma para visualização do processo de produção do extrato enzimático é apresentado em anexo (Anexo 1).

Os testes de caracterização bioquímica foram realizados diretamente no extrato enzimático bruto, que continha as frações extra e intracelulares para fitase de *Saccharomyces cerevisiae*, e paralelamente em enzimas comerciais Natuphos® e Quantum® nas concentrações de 0,01 mg/mL e 0,1 mg/mL, respectivamente. Uma unidade de atividade da enzima (FTU) foi definida como μmol de P_i liberado por minuto de reação nas condições testadas por mg de proteína. Natuphos® e Quantum® foram doadas pelos fabricantes BASF e Syngenta, respectivamente.

DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS

A determinação de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford (Bradford 1976) utilizando albumina bovina como padrão.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM SUBSTRATO FITATO DE SÓDIO

A determinação da atividade de fitase utilizando ácido fítico sal diidratado dodecasódico ou fitato de sódio foi realizada segundo Shimizu (1992). O substrato foi composto por 600 μL de solução 2 mM de fitato de sódio em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,0 suplementado com 2 mM de CaCl_2 , acrescidos de 150 μL de extrato enzimático total. Esta mistura foi incubada em tubo de ensaio por 30 minutos em banho sob aquecimento a 37°C. Após o tempo de reação esta foi paralisada pela adição de 750 μL de solução ácido tricloroacético 5% (TCA). À mistura de reação foram adicionados 1,5 mL do reagente de

cor (4:1) com formação de fosfomolibdato. O reagente de cor utilizado foi composto por: 4 volumes de molibdato de amônio 1,5% em solução de H₂SO₄ 5,5% e 1 volume de solução de sulfato ferroso 2,7%. Em paralelo, preparou-se um branco com o meio de cultivo incubado com 1 mL de água destilada estéril. O fosfato inorgânico liberado foi determinado fotometricamente a 700 nm em espectrofotômetro Beckman Coulter DU640 (Fullerton, CA, USA). Ácido fítico sal dihidratado dodecasódico foi adquirido da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). O curso da reação foi acompanhado por uma curva padrão de K₂HPO₄ com concentrações de 0,0448 a 2,8706 µmol/L.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA EM SUBSTRATO 4-NITROFENILFOSFATO DISSÓDICO HEXAHIDRATADO

Empregando substrato sintético para fosfatases – 4-nitrofenilfosfato dissódico hexahidratado (4-npp), foi realizada determinação de atividade enzimática conforme procedimento proposto por Stockmann *et al.*, (2003), modificado. A 1000 µL de solução 5 mM de 4-npp, foram adicionados 500 µL de tampão acetato 0,8 M pH 5,0 e 500 µL de extrato enzimático total. Após 10 minutos de reação em banho maria à 37°C, a reação foi paralisada com adição de 2000 µL de NaOH 0,1 N com desenvolvimento de coloração amarela proporcional à liberação de p-nitrofenol, que foi quantificada a 410 nm em espectrofotômetro Beckman DU640. O curso da reação foi acompanhado por uma curva padrão de p-nitrofenol com concentrações de 0,0719 a 7,1891 µmol/L. Em paralelo, preparou-se um branco com o meio de cultivo incubado com 1 mL de água destilada estéril. 4-nitrofenilfosfato dissódico hexahidratado e p-nitrofenol foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) e Vetec (São Paulo, SP, Brasil), respectivamente.

DETERMINAÇÃO DE pH ÓTIMO E pH DE ESTABILIDADE

Para determinação do pH ótimo foram utilizadas as soluções tampão: tampão citrato 0,1M pH 2,6 e 3,0; tampão acetato 0,1M pH 3,7; 4,0; 4,5; 5,0 e 5,6; tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,0 e 8,0; tampão borato 0,1M pH 9,0 e 10,0 e tampão borato-NaOH pH 11,0. A atividade de fitase foi determinada utilizando-se os substratos fitato de sódio e 4-npp.

Para determinação do pH de estabilidade da atividade enzimática, 1 mL do extrato enzimático ou das soluções de enzimas comerciais, foi misturado a 1 mL de soluções tampões citadas em diferentes valores de pH permanecendo a 50°C por 2 horas. Após o tratamento, os diferentes valores de pH foram ajustados para os valores correspondentes às duas metodologias de atividade. Em paralelo, foram preparados tubos brancos e a atividade enzimática foi determinada em substratos fitato de sódio e 4-npp.

DETERMINAÇÃO DE TEMPERATURA ÓTIMA E TEMPERATURA DE ESTABILIDADE

O efeito da temperatura na atividade enzimática foi determinado de acordo com o método descrito na determinação de atividade enzimática utilizando-se as temperaturas de incubação de 25°C, 30°C, 35°C, 37°C, 40°C, 45°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, 90°C e ebulição. Para determinação de temperatura de estabilidade da atividade enzimática, o extrato enzimático e soluções de enzimas comerciais foram incubados nas temperaturas descritas acima durante 1 hora. Após o tratamento térmico, a atividade da enzima remanescente foi determinada utilizando-se os substratos fitato de sódio e 4-npp.

EFEITO DE SAIS NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A influência de sais minerais na atividade enzimática foi verificada pela adição dos sais $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, KCl , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Na_2SO_4 , CuSO_4 , Li_2SO_4 , H_2O , BaSO_4 , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , HgCl_2 e EDTA ao sistema reacional nas concentrações de 1 e 10 mM. As reações foram realizadas conforme descrito para determinações de atividades de fitase, tendo como controle a reação realizada sem adição de sais.

ESTUDO DA RESISTÊNCIA À AÇÃO DE PROTEASES

Este estudo foi realizado com incubação do extrato enzimático de *S. cerevisiae* ou soluções de enzimas comerciais Natuphos® e Quantum® a 37°C com 0,1% (p/v) de tripsina ou pepsina, por 10, 30, 60 e 120 minutos. Após incubação, foi determinada a atividade residual de fitase contra um experimento controle sem adição de protease,

conforme metodologia descrita na determinação de atividade enzimática para os substratos fitato de sódio e 4-npp.

ESTUDO DE ESPECIFICIDADE POR DIFERENTES SUBSTRATOS

A hidrólise catalisada pela fitase foi verificada pela liberação e posterior quantificação de fosfato inorgânico dos substratos fitato de sódio, 4-nitrofenilfosfato dissódico (4-npp), α -gliceraldeído 3-fosfato e pirofosfato de sódio dibásico (Na_2H_2 -pirofosfato) para determinação da especificidade de ação da enzima. A atividade enzimática foi determinada conforme descrito para o substrato fitato de sódio.

PARÂMETROS CINÉTICOS

O efeito da concentração da concentração de substrato na atividade de fitase foi determinado utilizando-se fitato de sódio nas concentrações: 0,125 mM; 0,25 mM; 0,5 mM; 1 mM; 2 mM; 3 mM; 4 mM e 5mM como descrito anteriormente. Foi também testado o efeito da concentração de 4-npp (0,5 mM; 1 mM; 2 mM; 3 mM; 4 mM; 5 mM; 6 mM e 7 mM) na atividade de fitase conforme metodologia descrita anteriormente. A velocidade de reação definida como μmol de P_i liberado por minuto de reação (U) por mg de proteínas totais. Os valores das constantes de Michaelis Menten (K_m) foram determinados por interpolação pelo método gráfico de Lineweaver-Burk.

ANÁLISE DOS RESULTADOS

Na determinação de diferença significativa em testes comparativos realizados em triplicata foi aplicado o teste Tukey ao nível de 95% de confiança. As análises foram realizadas utilizando-se o pacote estatístico SAS 9.1.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

PH ÓTIMO E PH ESTABILIDADE

As Figuras 1 e 2 mostram as faixas de pH ótimo de atividade das três fitases analisadas em substratos 4-npp e fitato de sódio respectivamente. As faixas de pH ótimo de atividade nos dois substratos foram diferentes para algumas preparações de fitases, indicando possivelmente tratar-se de duas frações distintas da enzima.

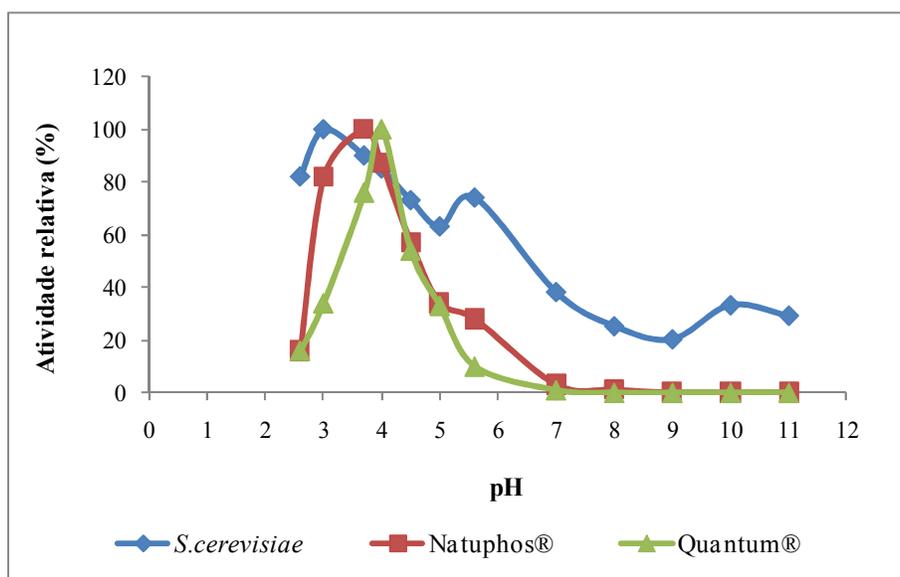


FIGURA 1 PH ÓTIMO DE ATIVIDADE DE FITASES DE DIFERENTES FONTES EM SUBSTRATO 4-NPP

A ação de fosfatase ácida em substrato 4-npp resultou em maiores atividades em pH em torno de pH 3,0 – 4,0 com picos em pH 3,0, 3,7 e 4,0 para as fitases de *S. cerevisiae*, Natuphos® e Quantum®, respectivamente. Observou-se que acima de pH 4,0 a atividade das fitases comerciais decaem drasticamente. Em substrato fitato de sódio a atividade máxima foi observada em pH 5,6 para Natuphos® e na faixa de pH 4,0 – 5,6 para Quantum®, decaindo após pH 5,6.

A maioria das fitases apresenta atividade ótima em pH 4,5 – 6,0 (Liu *et al.*, 1998), podendo ser identificados dois picos de atividades, um maior em pH 5,0 – 5,6, e outro menor em pH 2,5 (Casey e Walsh, 2004). Algumas fitases apresentam atividade em duas faixas de pH provavelmente devido à diferenças na distribuição de cargas no sítio de

ligação do substrato, desse modo influenciando diretamente na interação do substrato (Casey e Walsh, 2004).

A fitase extracelular de *S. cerevisiae* descrita por Jin-In *et al.*, (2009) apresentou atividade ótima em pH 3,6 enquanto que a fitase intracelular de levedura de panificação mostrou maior atividade em pH 4,6 (Nayini e Markakis, 1984). Chantasartrasamee *et al.*, (2005) observou o pH 5,0 como sendo ótimo para atividade de fitase de *Aspergillus oryzae* AK9, relatando também alta atividade em pH 2,0 – 2,5. Duas faixas ótimas de pH (2,0 – 2,5 e 5,0 – 5,5) foram determinadas também para fitase de *A. niger* expressa em *S. cerevisiae*, *A. ficcum* e *Rhizopus oligosporus* (Han *et al.*, 1999; Howson e Davis, 1983; Casey e Walsh, 2004).

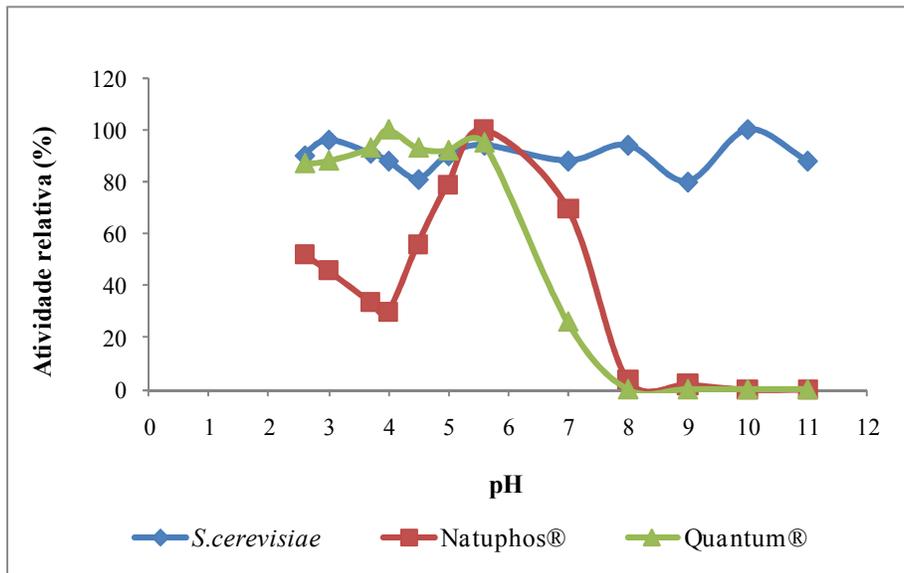


FIGURA 2 pH ÓTIMO DE ATIVIDADE DE FITASES DE DIFERENTES FONTES EM SUBSTRATO FITATO DE SÓDIO

Shieh e Ware (1968) separaram 2 picos de atividade de fitase por cromatografia, atribuindo a atividade em pH 2,0 à fração de fosfatase ácida não específica e a atividade em pH 5,5 à fração de fitase. Esses 2 picos podem representar 2 enzimas diferentes que exibem marcadas propriedades e estabilidades térmicas diferentes. No entanto, não é possível distinguir enquanto não se separam os 2 centros ativos por eletroforese de gel ou outro método de visualização (Irving e Cosgrove, 1974 apud Howson e Davis, 1983).

A fitase de *S. cerevisiae* apresentou atividades altas em ampla faixa de pH, com picos em pH 3,0 e pH 5,6. Observou-se também em substrato fitato de sódio, que a atividade manteve-se elevada em valores de pH acima de 7,0. Segundo Oshima (1997), existem pelo menos 6 espécies de fosfatases ácidas e alcalinas em *S. cerevisiae* com diferentes localizações celulares, o que pode justificar a atividade elevada em ampla faixa de pH comprovada neste estudo e desejável para aplicação da enzima.

Outro fato relatado pelo autor corresponde a expressão e repressão da maioria dos genes que codificam tais fosfatases ser dependente da concentração de fosfato inorgânico (Pi) no meio de crescimento. Ressalta-se que a atividade enzimática detectada neste estudo foi em extrato bruto total, que contém todos os componentes do meio de cultivo. A síntese de fosfatases ácidas é regulada por um efector simples: concentração de Pi no meio de cultivo, enquanto a regulação de fosfatases alcalinas, localizadas no interior das células, se dá por mecanismos semelhantes e a atividade é detectada após permeabilização do substrato nas células (Oshima 1997).

As Figuras 3 e 4 mostram o pH de estabilidade do extrato enzimático bruto de fitase de *S. cerevisiae* e de duas preparações comerciais de fitase. Observou-se que as fitases Natuphos® e Quantum® apresentaram para ambos os substratos, estabilidade em pH 4,5 – 5,0 e pH 5,6, respectivamente, e também um pico máximo de atividade em pH 2,6 para Natuphos® em substrato 4-npp. Chantasartramee *et al.*, (2005) verificaram que a preparação de fitase de *Aspergillus oryzae* AK9 apresentou estabilidade em duas faixas de pH (2,0 – 3,6 e 5,0 – 7,0) e sugeriram a presença de duas fitases distintas.

Em substrato 4-npp a fitase de *S. cerevisiae* manteve estabilidade na faixa de pH 2,6 – 5,0 e em fitato de sódio a enzima mostrou elevada atividade em todos os valores de pH analisados acima pH de 3,0. Huang *et al.*, (2006) encontraram faixa de estabilidade semelhante para atividade de fitase extracelular de *Yersinia intermedia* expressa em *Pichia pastoris* (pH 3,5 – 10,0).

Verificou-se que os resultados encontrados para fitase de *S. cerevisiae* são fisiologicamente relevantes, considerando principalmente os diferentes pHs encontrados no sistema digestivo de animais: glândula salivar (pH 5,0 e 7,0), estômago (alimentado pH 6,5 e sob estímulo de secreção de ácido pH 3,5 – 4,5), parte superior do duodeno (pH 4,0 – 6,0)

(Casey e Walsh 2004), por apresentar alta atividade e estabilidade em todas as faixas citadas em comparação às enzimas comerciais analisadas.

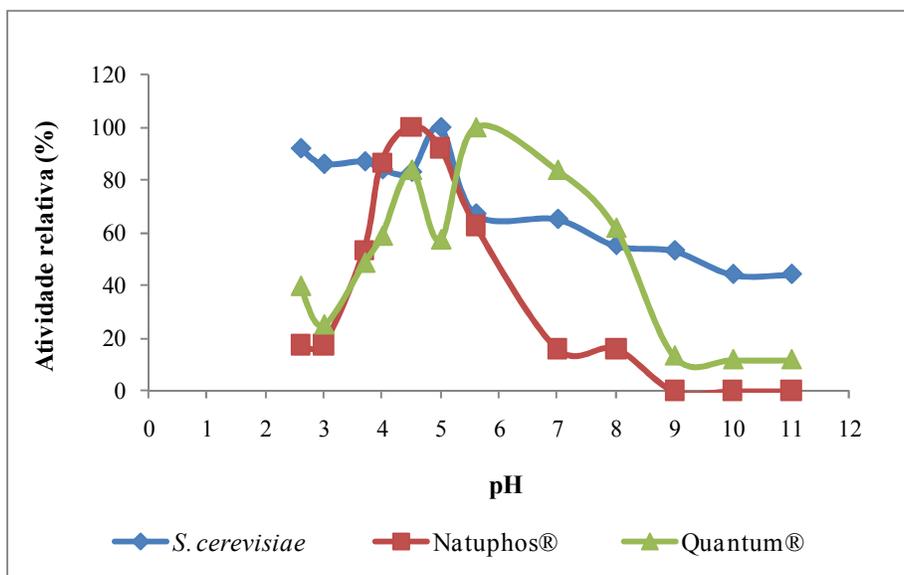


FIGURA 3 pH DE ESTABILIDADE DA ATIVIDADE DE FITASES DE DIFERENTES FONTES EM SUBSTRATO 4-NPP

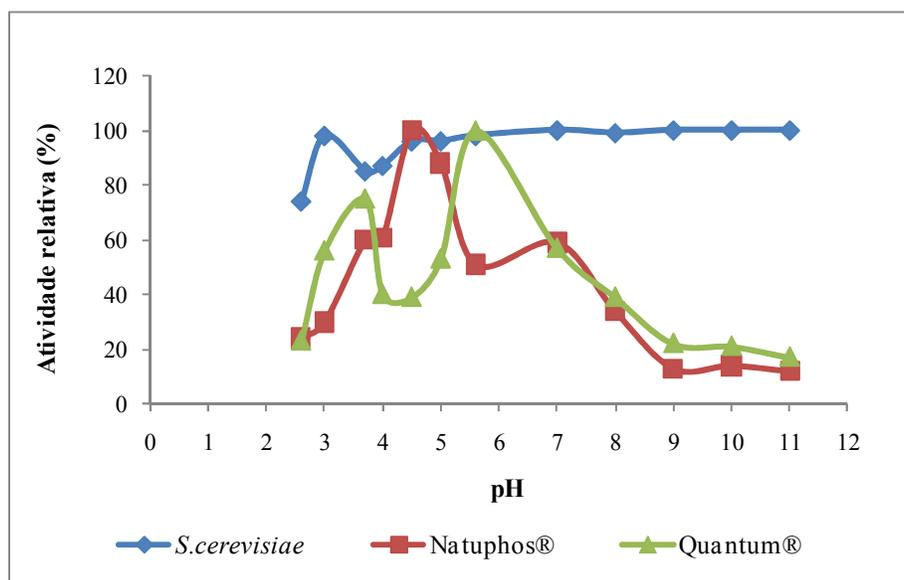


FIGURA 4 pH DE ESTABILIDADE DA ATIVIDADE DE FITASES DE DIFERENTES FONTES EM SUBSTRATO FITATO DE SÓDIO

TEMPERATURA ÓTIMA E TEMPERATURA DE ESTABILIDADE

As Figuras 5 e 6 apresentam as temperaturas ótimas de atividade para as fitases analisadas em substratos 4-npp e fitato de sódio, respectivamente, enquanto que o efeito do tratamento térmico na atividade de fitases de diferentes fontes pode ser observado nas Figuras 7 e 8.

A enzima Natuphos® apresentou faixas de temperatura ótima de atividade semelhante nos dois substratos (40 – 50°C em 4-npp e 37 – 45°C em fitato de sódio). Após 1 hora de tratamento térmico, esta fitase mostrou estabilidade apenas em baixas temperaturas (abaixo de 45°C). Em dados relatados por Cao *et al.*, (2007) manteve 75% da atividade em temperaturas inferiores à 75°C por 15 minutos.

Em geral as fitases mostram alta atividade na faixa de 50 – 70°C, sendo a temperatura ótima para atividade da enzima de 45 – 60°C. A enzima de origem vegetal não resiste ao tratamento térmico, sendo a maioria inativada irreversivelmente em temperaturas superiores à 70°C. Já as microbianas retêm atividade significativa após períodos prolongados de incubação (Konietzny e Greiner, 2002), dependendo do microorganismo produtor e da linhagem (Sandberg e Andlid; 2002). Algumas fitases relatadas como mais resistentes à altas temperaturas foram isoladas de *S. castellii* (Segueilha *et al.*, 1992), *A. fumigatus* (Pasamontes *et al.*, 1997) e *Rhizopus oligosporus* (Casey e Walsh, 2004).

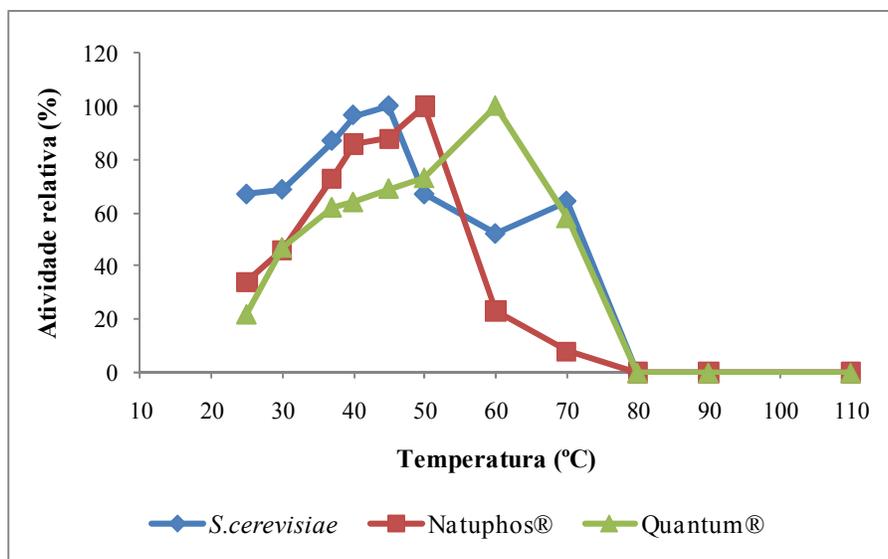


FIGURA 5 TEMPERATURAS ÓTIMAS DE ATIVIDADE DE FITASES DE DIFERENTES FONTES EM SUBSTRATO 4-NPP

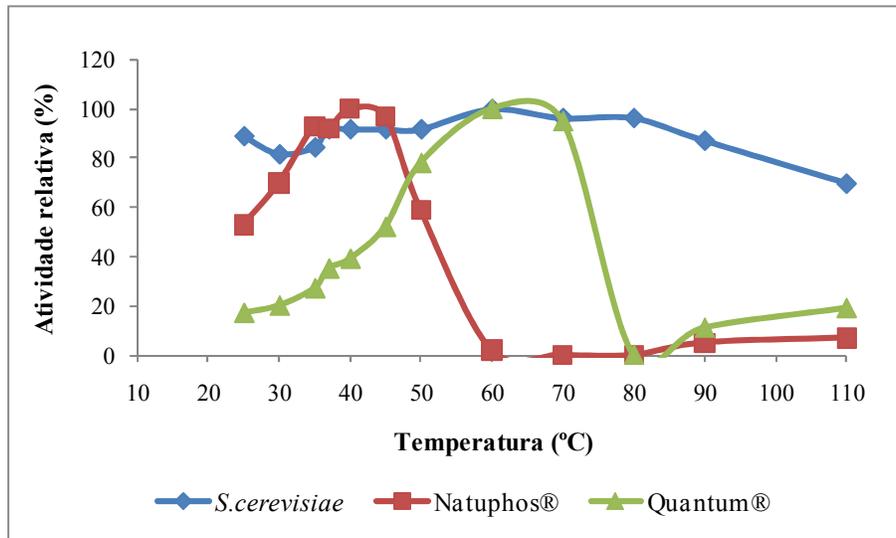


FIGURA 6 TEMPERATURAS ÓTIMAS DE ATIVIDADE DE FITASES DE DIFERENTES FONTES EM FITATO DE SÓDIO

Fitases de diversas origens, *Aspergillus niger*, *Escherichia coli* e *Yersinia intermedia* (Han *et al*,1999; Casey e Walsh, 2003; Huang *et al.*, 2006), apresentaram atividade ótima em temperaturas na faixa de 55 – 65°C.

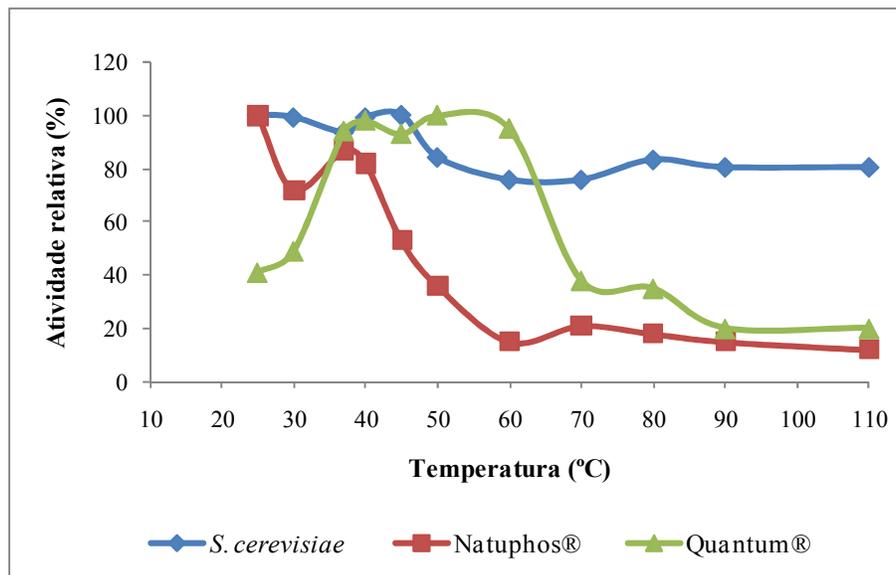


FIGURA 7 TEMPERATURAS DE ESTABILIDADE DA ATIVIDADE DE FITASES DE DIFERENTES FONTES EM SUBSTRATO 4-NPP

Nayini e Markakis (1984) e Jin-In *et al.*, (2009) verificaram que as fitases intracelular e extracelular de *S. cerevisiae* apresentaram temperatura ótima de atividade a 45°C e 40°C, respectivamente. A fitase de *S. cerevisiae* aqui estudada apresentou atividade ótima e estabilidade térmica em faixas mais amplas em substrato fitato de sódio (37 – 80°C). Temperaturas elevadas também foram determinadas como ótimas para fitase de *Aspergillus oryzae* AK9 (70 – 75°C), a qual manteve 80% e 66% da atividade à 70°C e 80°C, respectivamente (Chantasartasamee *et al.*, 2005).

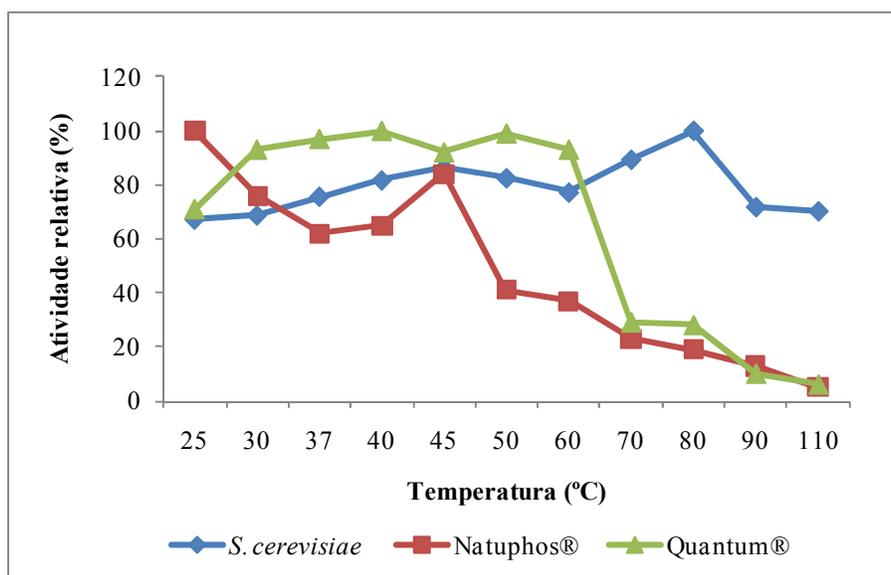


FIGURA 8 TEMPERATURAS DE ESTABILIDADE DA ATIVIDADE DE FITASES DE DIFERENTES FONTES EM SUBSTRATO FITATO DE SÓDIO

O efeito da temperatura na estabilidade de uma enzima depende de um número de fatores que incluem pH e a força iônica do meio e a presença ou ausência de ligantes. A tolerância superior observada para fitase de *S. cerevisiae* comparadas às demais comerciais estudadas pode ser devida a maior resistência apresentada pela levedura e considerando o fato desta linhagem ter sido selecionada com aumento gradual de temperatura (Ries e Macedo, 2009) bem como por fatores relacionados ao extrato enzimático total.

Alguns fatores extrínsecos de termostatização comuns em enzimas intracelulares citados por Gomes *et al.*, (2007) como a estabilização pelo próprio substrato, presença de solutos como fosfato di-inositol, e presença de sais orgânicos, podem ter contribuído na tolerância verificada, considerando que o extrato bruto continha enzima extra e intracelular.

Acrescenta-se a presença de íons cálcio no meio, que pode ajudar a estabilizar a enzima tornando-a mais resistente ao aumento de temperatura, como já relatado por Kim *et al.*, (1998) para fitase de *Bacillus SP* DS11.

EFEITO DE SAIS NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Os efeitos de diferentes sais, nas concentrações de 1 mM e 10 mM, na atividade de fitase foram verificados em substratos 4-npp e fitato de sódio e estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. O controle corresponde ao procedimento padrão de reação enzimática sem adição de sais e foi considerado como 100% de atividade de fitase.

Na reação enzimática com substrato 4-npp, observou-se aumento da atividade de fitase das três fontes testadas em presença de íons Fe^{3+} e de Natuphos® e Quantum® em presença de íons Fe^{2+} . A adição de íons Fe^{3+} na concentração de 1 mM resultou em aumento da atividade das fitases em substrato fitato de sódio, enquanto que a concentração de 10 mM reduziu as atividades enzimáticas. Greiner *et al.*, (1997) atribuíram a redução da atividade de fitase em presença de Fe^{2+} e Zn^{2+} devido a menores concentrações do substrato pela formação de complexos pouco solúveis íons – fitato. Para fitase de *Aspergillus niger* a presença de íons Fe^{2+} e Fe^{3+} não apresentou efeitos apreciáveis (Casey e Walsh, 2003).

Ressalta-se o efeito da adição de K_2HPO_4 na atividade enzimática, inibindo fortemente ou completamente a atividade das fitases analisadas em ambos os substratos. Este efeito era esperado devido à inibição da atividade de fitase em presença de concentrações elevadas de fosfato (Shieh e Ware, 1968; Howson e Davis, 1983; Kim *et al.*, 1999; Casey e Walsh, 2004) como as aqui testadas. Desde que a fitase é produzida quando as concentrações de fosfato inorgânico são limitadas, os organismos estão fornecidos com meios de obter o fosfato inorgânico de fosfatos orgânico quando necessário (Shieh e Ware, 1968).

Íons Mn^{2+} aumentaram a atividade de fitases comerciais em substrato 4-npp e inibiram completamente a atividade de fitase de *S. cerevisiae*, na concentração 10 mM. A adição de íons Hg^{2+} reduziu as atividades de Natuphos® e Quantum® em ambos os substratos. Para fitase de *S. cerevisiae*, embora não tenham sido observados efeitos significativos em fitato de sódio, a adição de Hg^{2+} em meio reacional com 4-npp, resultou em redução significativa de atividade na concentração de 1 mM e aumento de atividade na

concentração de 10 mM. Aumento de atividade também foi verificado para fitase de *Aspergillus niger* na presença de íons Hg^{2+} na concentração de 200 mM (Casey e Walsh, 2003).

TABELA 1 ATIVIDADE RELATIVA DE FITASES DE *S. CEREVISIAE*, NATUPHOS® E QUANTUM® EM SUBSTRATO 4-NPP EM PRESENÇA DE DIFERENTES SAIS (%)

Sais	<i>S. cerevisiae</i>		Natuphos®		Quantum®	
	1 mM	10 mM	1 mM	10 mM	1 mM	10 mM
Controle	100 ^{b,c}	100 ^d	100 ^e	100 ^d	100 ^{c,d,e}	100 ^d
MnSO ₄	70 ^{c,d}	0	146 ^d	2208 ^c	119 ^{c,d}	566 ^c
KCl	70 ^{d,e}	54 ^d	83 ^{e,f}	74 ^d	86 ^{d,e,f}	87 ^d
FeSO ₄ **	61 ^{d,e}	139 ^d	1096 ^b	11624 ^a	452 ^b	3834 ^a
Fe ₂ (SO ₄) ₃ **	123 ^b	5577 ^a	2035 ^a	7454 ^b	802 ^a	2762 ^b
CaCl ₂	42 ^{d,e}	49 ^d	84 ^{e,f}	62 ^d	85 ^{d,e,f}	106 ^d
MgSO ₄	41 ^{d,e}	45 ^d	67 ^{f,g}	41 ^d	71 ^{e,f}	53 ^d
Na ₂ SO ₄	34 ^{e,f}	42 ^d	67 ^{f,g}	31 ^d	73 ^{e,f}	43 ^d
CuSO ₄ **	39 ^{d,e}	871 ^c	61 ^{f,g}	28 ^d	47 ^{f,g}	20 ^d
Li ₂ SO ₄	48 ^{d,e}	42 ^d	59 ^{f,g}	41 ^d	79 ^{d,e,f}	41 ^d
BaSO ₄ **	267 ^a	3602 ^b	206 ^c	252 ^d	131 ^c	61 ^d
ZnSO ₄ **	0	0	54 ^{f,g}	22 ^d	67 ^{e,f}	26 ^d
CoCl ₂ **	37 ^{d,e}	39 ^d	85 ^{e,f}	88 ^d	83 ^{d,e,f}	83 ^d
K ₂ HPO ₄	33 ^{e,f}	45 ^d	45 ^g	37 ^d	58 ^{e,f,g}	32 ^d
HgCl ₂	57 ^{d,e}	272 ^d	42 ^g	17 ^d	24 ^g	16 ^d
EDTA	37 ^{d,e}	55 ^d	134 ^d	70 ^d	95 ^{c,d,e}	83 ^d

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (teste Tukey $p < 0,05$) entre as atividades enzimáticas médias (não apresentadas) na presença dos diferentes sais.

*Observação de precipitação

**Observação de coloração

TABELA 2 ATIVIDADE RELATIVA DE FITASES DE *S. CEREVISIAE*, NATUPHOS® E QUANTUM® EM SUBSTRATO FITATO DE SÓDIO EM PRESENÇA DE DIFERENTES SAIS (%)

Sais	<i>S. cerevisiae</i>		Natuphos®		Quantum®	
	1 mM	10 mM	1 mM	10 mM	1 mM	10 mM
Controle	100 ^{a,b}	100 ^{c,b,d}	100 ^{f,g}	100 ^e	100 ^c	100 ^{c,d}
MnSO ₄ [*]	105 ^{a,b}	98 ^{c,d}	116 ^{e,f}	190 ^{b,c}	93 ^{c,d,e}	142 ^b
KCl	102 ^{a,b}	97 ^{b,c}	121 ^{d,e}	92 ^e	98 ^{c,d}	91 ^{c,d,e}
FeSO ₄ [*]	72 ^b	103 ^{c,b,d}	124 ^{d,e}	224 ^{a,b}	85 ^e	45 ^{f,g}
Fe ₂ (SO ₄) ₃ [*]	105 ^{a,b}	64 ^e	134 ^{c,d}	68 ^e	173 ^a	8 ^h
CaCl ₂	106 ^{a,b}	96 ^d	133 ^{d,e}	293 ^a	100 ^c	161 ^b
MgSO ₄	108 ^{a,b}	101 ^{c,b,d}	152 ^{b,c}	213 ^b	93 ^{c,d,e}	63 ^{e,f}
Na ₂ SO ₄	110 ^{a,b}	98 ^{c,d}	117 ^{d,e,f}	123 ^{c,d,e}	98 ^{c,d}	80 ^{c,d,e}
CuSO ₄ ^{**}	111 ^{a,b}	104 ^b	28 ⁱ	97 ^e	0	1 ^h
Li ₂ SO ₄	110 ^{a,b}	102 ^{c,b,d}	66 ^h	106 ^{d,e}	91 ^{d,e}	69 ^{d,e,f}
BaSO ₄ [*]	107 ^{a,b}	98 ^{c,b,d}	168 ^{a,b}	246 ^{a,b}	99 ^{c,d}	106 ^c
ZnSO ₄ [*]	110 ^{a,b}	103 ^{c,b,d}	0	102 ^e	30 ^h	67 ^{d,e,f}
CoCl ₂ ^{**}	111 ^{a,b}	100 ^{c,b,d}	121 ^{d,e}	175 ^{b,c,d}	74 ^f	142 ^b
K ₂ HPO ₄	68 ^b	0	39 ⁱ	0	54 ^g	26 ^{g,h}
HgCl ₂	110 ^{a,b}	101 ^{c,b,d}	84 ^g	81 ^e	36 ^h	44 ^{f,g}
EDTA	118 ^a	122 ^a	170 ^a	185 ^{b,c}	133 ^b	253 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (teste Tukey $p < 0,05$) entre as atividades enzimáticas médias (não apresentadas) na presença dos diferentes sais.

*Observação de precipitação

**Observação de coloração

A adição de Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, K⁺ e EDTA no sistema reacional não apresentou efeitos significativos na atividade de fitase de *S. cerevisiae* em substrato fitato de sódio, assim como para fitase de *Yersinia intermedia* expressa em *Pichia pastoris* de acordo com dados relatados por Huang *et al.*, (2006). Jin-In *et al.*, (2009) analisaram o efeito de agentes quelantes na atividade de fitase extracelular purificada de *S. cerevisiae* em substrato fitato de sódio. Após verificar ausência de efeito inibitório com adição de EDTA e oxalato na concentração de 5 mM, sugerem que metais não são requeridos para a atividade de fitase de *S. cerevisiae*.

No mesmo estudo, os pesquisadores observaram o efeito de íons na concentração de 5 e 10 mM na atividade de fitase de *S. cerevisiae*. Com os íons Zn^{2+} , K^+ , Mn^{2+} , Li^+ , Ca^{2+} a atividade variou de 50 – 90%, sendo inibida fortemente pelos íons Ba^{2+} , Co^{2+} , Cu^+ , Fe^{2+} , Mg^{2+} e Sn^{2+} e completamente por Fe^{3+} e Hg^{3+} (Jin-In *et al.*, 2009).

No entanto, Nayini e Markakis (1984) obtiveram diferentes resultados quanto ao efeito de sais na atividade de fitase intracelular de *S. cerevisiae*. Na concentração de 0,01 mM os autores não registraram nenhum efeito apreciável pela adição dos sais testados. Na concentração de 1 mM, a hidrólise de fitato de sódio foi acelerada pelos íons Cu^+ , Fe^{2+} , e inibida fortemente pelos íons Hg^{3+} , Mn^{2+} e Cd^{2+} , enquanto que os íons Co^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} e Zn^{2+} não produziram efeitos apreciáveis na reação enzimática.

Não foi observada atividade de fitase de *Aspergillus oryzae* AK9 quando íons Zn^{2+} foram adicionados ao sistema reacional, semelhantemente ao encontrado neste estudo para a fitase de *S. cerevisiae* em substrato 4-npp. Fitase de *Aspergillus oryzae* AK9 teve atividade aumentada com o íon Fe^{2+} e nenhum efeito apreciável foi verificado com os íons Mg^{2+} , Ca^{2+} e Mn^{2+} (Chantasartrasamee *et al.*, 2005).

ESTUDO DA RESISTÊNCIA À AÇÃO DE PROTEASES

Foram realizados testes comparativos de resistências das fitases de *S. cerevisiae*, Natuphos® e Quantum® à ação de pepsina (Figuras 9 e 10) e tripsina (Figuras 11 e 12) em quatro tempos distintos. A resistência foi expressa como atividade residual após os diferentes tempos de incubação com a protease, considerando como 100% o teste controle sem adição de pepsina ou tripsina.

A fitase de *S. cerevisiae* mostrou susceptibilidade às proteases pepsina e tripsina similar à fitase comercial Natuphos®, quando a atividade residual foi testada com substratos 4-npp e fitato de sódio. As Figuras 9 e 10 mostram que a enzima Quantum® foi progressivamente inativada pela protease, com atividade residual de 14 e 22% em substratos 4-npp e fitato de sódio, respectivamente, após 120 minutos de incubação. As atividades relativas verificadas para Quantum® foram significativamente inferiores ao controle em todos os tempos testados ($p < 0,05$).

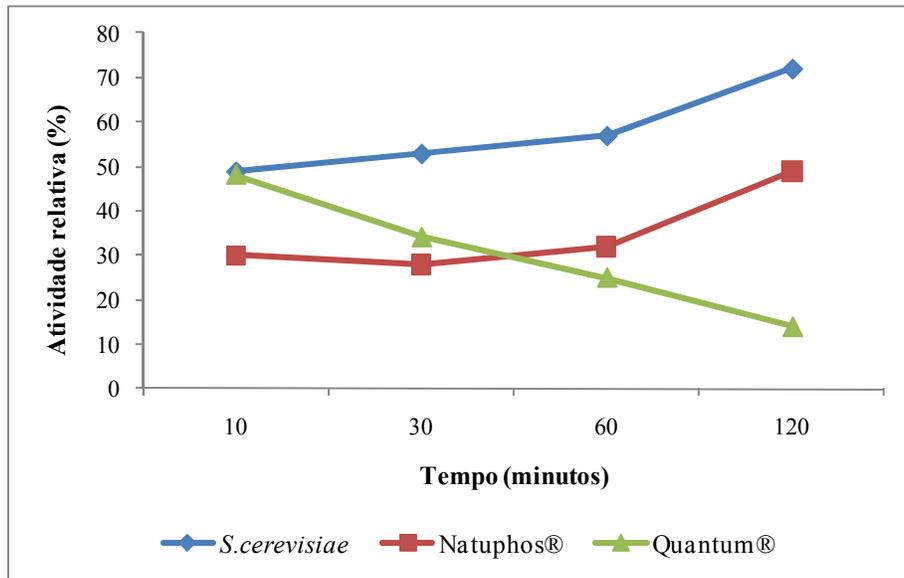


FIGURA 9 RESISTÊNCIA DE FITASES DE DIFERENTES FONTES À AÇÃO DE PEPSINA EM SUBSTRATO 4-NPP

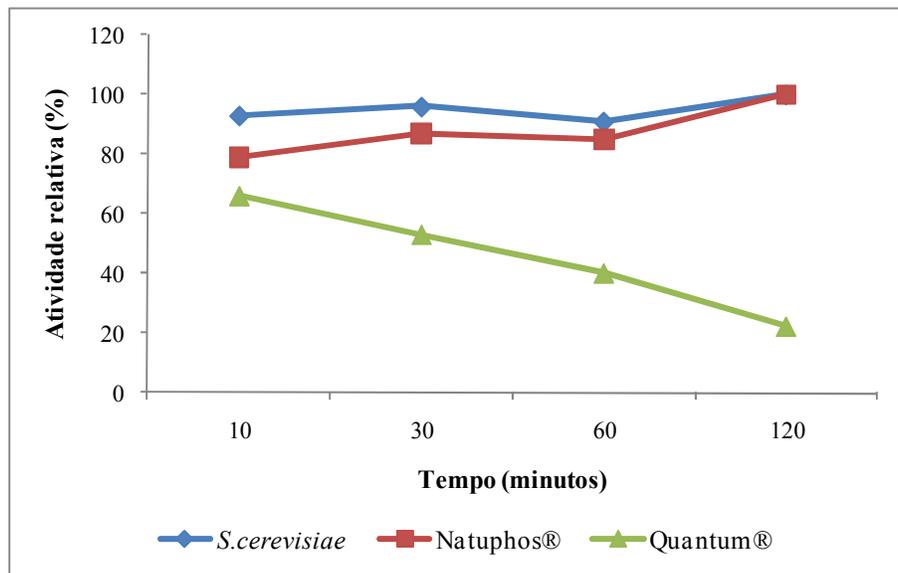


FIGURA 10 RESISTÊNCIA DE FITASES DE DIFERENTES FONTES À AÇÃO DE PEPSINA EM SUBSTRATO FITATO DE SÓDIO

Atividade residual elevada foi observada para fitase de *Aspergillus oryzae* AK9 – 85% após 2 horas de incubação com tripsina (Chantasartasamee *et al.*, 2005) e *Aspergillus niger* – 78 e 80% após 2 horas de incubação com pepsina e tripsina, respectivamente (Huang *et al.*, 2006).

Destaca-se aqui, a resistência observada para fitase de *S. cerevisiae* após 120 minutos de incubação a 37°C com ambas as proteases, que manteve atividade residual acima de 70% em substrato 4-npp e de 98% em substrato fitato de sódio. A maior estabilidade contra digestão gástrica proporcionada por sistemas de leveduras já foi utilizada na produção de fitases, como a enzima de *Yersinia intermedia* expressa em *Pichia pastoris* (Huang *et al.*, 2006). A fitase de *Yersinia intermedia* manteve 82 e 87% de atividade após 2 horas de incubação com tripsina e pepsina, respectivamente (Huang *et al.*, 2006).

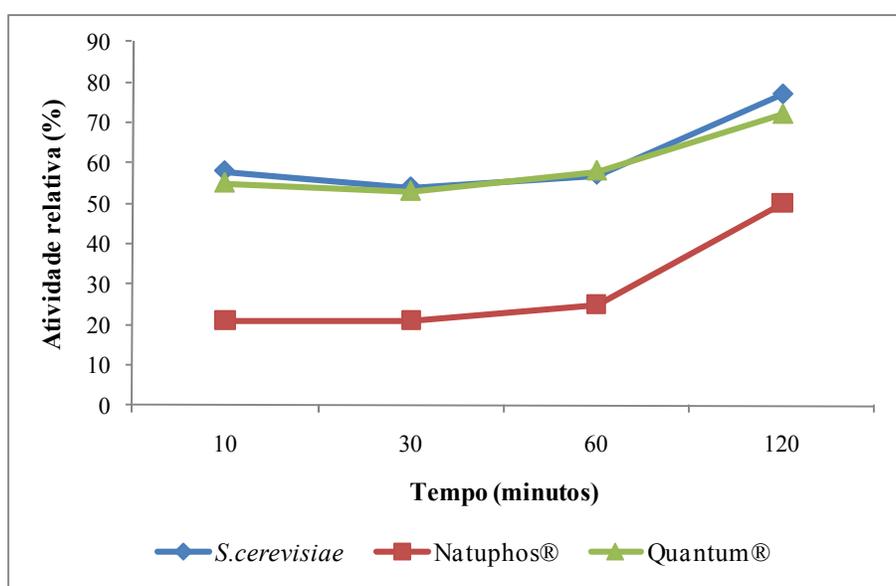


FIGURA 11 RESISTÊNCIA DE FITASES DE DIFERENTES FONTES À AÇÃO DE TRIPSINA EM SUBSTRATO 4-NPP

As fitases usadas em rações, por serem proteínas, são suscetíveis ao ataque de proteases endógenas dos animais. A resistência à ação de proteases é um fator importante a ser analisado na aplicação de fitases visando ação efetiva no trato gastrointestinal. A estabilidade gástrica superior proporciona a base para uma prolongada liberação de fósforo-fitado no animal (Remus, 2008).

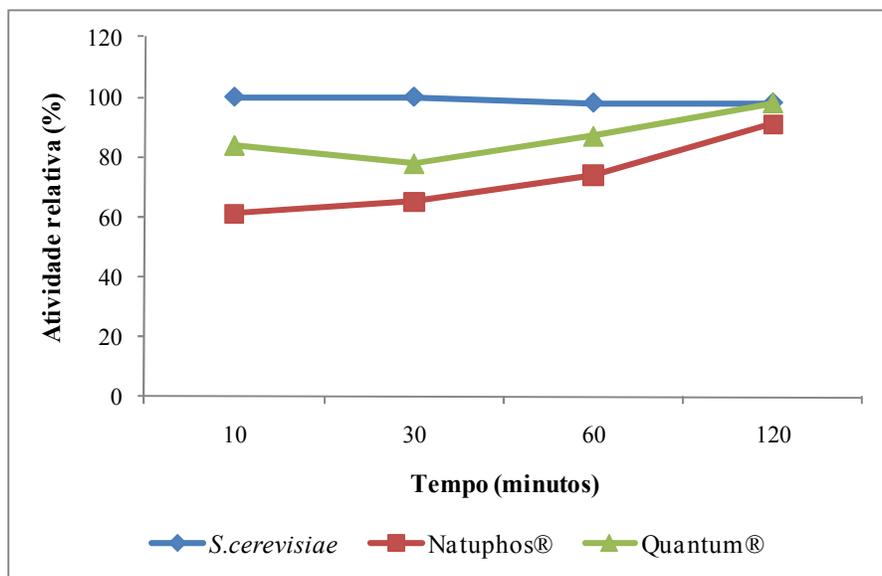


FIGURA 12 RESISTÊNCIA DE FITASES DE DIFERENTES FONTES À AÇÃO DE TRIPSINA EM SUBSTRATO FITATO DE SÓDIO

ESPECIFICIDADE POR SUBSTRATOS E PARÂMETROS CINÉTICOS

A especificidade de fitases por substrato normalmente é ampla, e enzimas secretadas são inespecíficas. A distinta seletividade pode ser observada neste estudo onde a especificidade por substratos foi analisada com fitato de sódio, 4-nitrofenilfosfato dissódico, α -gliceraldeído 3-fosfato e pirofosfato de sódio dibásico, bem como em outros trabalhos similares (Tabela 3).

Verifica-se que a fitase de *S. cerevisiae*, apresentou elevada atividade nos substratos testados, apesar destas diferirem estatisticamente ($p < 0,05$). A ampla especificidade é preferível para propósitos de nutrição animal comparada à enzimas específicas para fitato de sódio (Jin-In *et al.*, 2009), sendo que o mesmo não foi observado para as fitases comerciais.

Algumas fitases como de *Rhizopus oligosporus* (Casey e Walsh, 2004) apresentam ampla faixa de especificidade, agindo em outros substratos fosforilados, enquanto que fitase de *Bacillus SP DS11* (Kim *et al.*, 1999) é específica para fitato de sódio não demonstrando atividade em outros ésteres de fósforo ou p-nitrofenilfosfato, substrato comum de fosfatases ácidas.

TABELA 3 ESPECIFICIDADE POR SUBSTRATO DE FITASES DE DIFERENTES FONTES

Origem da fitase	Atividade relativa (%)			
	Fitato de sódio ¹	ρ -nitrofenil- fosfato	α -gliceraldeído 3-fosfato	Na ₂ H ₂ - pirofosfato
<i>S. cerevisiae</i> ²	100 ^a	92 ^b	80 ^c	92 ^b
Natuphos® ²	100 ^a	ND	ND	4 ^b
Quantum® ²	100 ^a	1 ^b	ND	3 ^b
<i>A. niger</i> ³	100	10	-	-
<i>S. cerevisiae</i> ⁴	100	22	-	0
<i>Baker's phytase</i> ⁵	100	-	206	37125
<i>E. coli</i> ⁶	100	12,3	-	0

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (teste Tukey $p < 0,05$) entre as atividades enzimáticas médias (não apresentadas) na presença de diferentes substratos.

ND: atividade não detectada

¹ Taxa de hidrólise de fitato de sódio foi tomada como 100% para comparação

² Este estudo

³ Liu *et al.*, (1998)

⁴ Jin-In *et al.*, (2008)

⁵ Nayini e Markakis (1984)

⁶ Greiner *et al.*, (1993)

As diversas fosfatases de *S. cerevisiae* além de apresentarem diferentes localizações celulares mostram diferentes especificidades, sendo uma delas – fosfatase alcalina codificada pelo gene PHO13 expresso constitutivamente – com especificidade somente para p-nitrofenilfosfato (Oshima, 1997).

A determinação da atividade enzimática utilizando sais de ácido fítico permite distinguir fitase de outras fosfatases ácidas, que são incapazes de degradar fitato. No entanto, a especificidade do substrato para fitase pode variar devido a diferenças nas características moleculares de enzimas purificadas de diferentes fontes (Liu *et al.*, 1998).

Até quando se considera a mesma fonte de fitase, como por exemplo, as fitases de *S. cerevisiae*, diferentes especificidades são observadas. Neste caso ressalta-se que neste estudo foi analisado extrato enzimático, enquanto que as fitases pesquisadas por Jin-In *et al.*, (2009) e Nayini e Markakis (1984) eram purificadas e correspondentes à frações extra e intracelular, respectivamente.

Verificou-se neste estudo que as fitases de Natuphos® e Quantum® seguem a cinética de Michaelis-Menten, e que possivelmente o extrato enzimático de *S. cerevisiae* apresente isoenzimas. Para efeitos conclusivos necessitam-se estudos adicionais de purificação da fitase. As determinações de Km foram realizadas pelo método gráfico de Lineweaver-Burk para fins comparativos (Anexo 2), sendo que a fitase de *S. cerevisiae* mostrou uma maior afinidade por ambos os substratos, 4-npp e fitato de sódio.

As constantes de Michaelis-Menten (Km) determinadas para substrato 4-npp foram de 0,16 mM, 1,35 mM e 3,08 mM para as fitases de *S. cerevisiae*, Natuphos® e Quantum®, respectivamente. Valores de Km de 7,78 mM e 18,16 mM foram relatados para fitases de *Escherichia coli* (Greiner *et al.*, 1993) e *Aspergillus niger* sp expressa em *Pichia pastoris* GS115 (Zhao *et al.*, 2007), respectivamente.

Em substrato fitato de sódio, o valor de Km foi de 0,02 mM para fitase de *S. cerevisiae*, 0,91 mM para Natuphos® e 7,43 mM para Quantum®. A afinidade da fitase de *S. cerevisiae* por substrato fitato de sódio foi inferior à determinada por Casey e Walsh, (2004) para *R. oligosporus* ATCC 22959 (10,4 µM), entretanto, é notável comparada com outras fontes de fitase. Encontram-se na literatura valores de Km de: 0,038 mM para *Schwanniomyces castelii* (Segueilha *et al.*, 1992); 0,5 mM para *Bacillus subtilis* (Shimizu, 1992); 0,1 mM para *Aspergillus niger* ATCC 9142 (Casey e Walsh, 2003); 0,13 mM para *Escherichia coli* (Greiner *et al.*, 1993). Considerando fitases produzidas por *S. cerevisiae*, o Km determinado neste estudo foi cerca de 33 vezes inferior ao determinado por Jin *et al.*, (2009) e 3 vezes inferior ao determinado por Nayini e Markakis (1984), evidenciando a notável afinidade por fitato de sódio apresentada por esta linhagem em particular.

CONCLUSÕES

As características bioquímicas determinadas para fitase de *S. cerevisiae* neste estudo mostraram-se desejáveis para aplicação na elaboração de rações para alimentação animal, no entanto, testes de aplicação são necessários para verificar o potencial efetivo de ação e uso comercial da enzima.

A enzima de *S. cerevisiae* apresentou superioridade de ação nas condições presentes no trato digestivo, como estabilidade ácida e atividade em ampla faixa de pH, como

também resistência à ação de proteases. Adicionalmente, a fitase de *S. cerevisiae* estudada manteve atividade em tratamentos com temperaturas elevadas.

Esta enzima possivelmente não apresenta uma necessidade específica de sais para reação enzimática com fitato de sódio como substrato, pois a adição da grande maioria de íons analisados não resultou em efeitos apreciáveis na atividade. A fitase de *S. cerevisiae* exibiu notável afinidade por substrato fitato de sódio e ampla especificidade por substrato, agindo em fitato de sódio e outros ésteres de fosfato, assim como em 4-npp, substrato comum para fosfatases ácidas, o que a torna preferível para aplicação em rações animais quando comparadas às enzimas específicas para fitato.

Dados do trabalho como diferentes valores de pH ótimo de atividade e diferentes perfis enzimático em substratos fitato de sódio e 4-npp sugerem ainda, a possível existência de duas frações distintas da enzima. Isto poderá ser confirmado com testes futuros de purificação e separação por cromatografia e eletroforese de gel.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, p.248-254, 1976.
- CAO, L.; WANG, W.; YANG, C.; YANG, Y.; DIANA, J.; YAKUPITIYAGE, A.; LUO, Z.; LI, D. Application of microbial phytase in fish feed. *Enzyme Microb. Tech.*, v.40, p.497-507, 2007.
- CASEY, A., WALSH, G. Purification and characterization of extracellular phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142. *Bioresource Technol.*, v.86, p.183-188, 2003.
- CASEY, A.; WALSH, G. Identification and characterization of a phytase of potential commercial interest. *J. Biotechnol.*, v.110, p.313-322, 2004.
- CHANTASARTRASAMEE, K.; NA-AYUTHAYA, D. I.; INTARAREUGSORN, S.; DHARMSTHITI, S.. Phytase activity from *Aspergillus oryzae* AK9 cultivated on solid state soybean meal medium. *Process Biochem.*, v.40, p.2285-2289, 2005.
- ENGELEN, A. J.; HEEFT, VAN DER.; RANSDORP, H. G. P.; SMIT, L. C. E. Simple and rapid determination of phytase activity. *J. AOAC Int.*, v.77, p. 760-764, 1994.
- GARCHOW, B.G.; JOG, S.P.; MEHTA, B.D.; MONOSSO, J.M.; MURTHY, P.P.N. Alkaline phytase from *Lilium longiflorum*: Purification and structural characterization. *Protein Expres. Purif.*, v.46, p.21-232, 2006.
- GOMES, E.; GUEZ, M.A.U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Quim. Nova*, v.30, p.136-145, 2007.
- GREINER, R.; KONIETZNY, U.; JANY, KL.-D. Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.303, p.107-113, 1993.
- GREINER, R.; HALLER, E.; KONIETZNY, U.; JANY, KL.-D. Purification and characterization of a phytase from *Klebsiella terrigena*. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.341, p.201-206, 1997.
- GUO, M-J.; ZHUANG, Y-P.; CHU, J.; ZHANG, S-L.; XIONG, A-S.; PENG, R-HE.; YAO, Q-H. Production and purification of a novel thermostable phytase by FPHY34. *Process Biochem.*, v.42, p.1660-1665, 2007.
- HAN, Y.; WILSON, D.B.; LEI, X.G. Expression of an *Aspergillus niger* phytase gene (pIpyA) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microb.*, p.1915-1918, 1999.

- HOWSON, S.J.; DAVIS, R.P. Production of phytate-hydrolysing enzyme by some fungi. *Enzyme Microb. Technol.*, v.5, p.377-343, 1983.
- HUANG, H.; HUIYING, L.; YANG, P.; MENG, K.; WANG, Y.; YUAN, T.; BAI, Y.; YAO, B. A novel phytase with preferable characteristics from *Yersinia intermedia*. *Biochem. Bioph. Res. Co.*, v.350, p.884-889, 2006.
- IRVING, G.C.J.; COSGROVE, D.J. Inositol phosphate phosphatases of microbiological origin. Some properties of the partially purified phosphatases of *Aspergillus Ficum* NRRL 3135. *Aust. J. Biol. Sci.*, v.27, p.361-368, 1974.
- JIN-IN, M.; WON-SEO, S.; KIM, D. C.; SOON-OH, N. Purification and biochemical properties of an extracellular acid phytase produced by the *Saccharomyces cerevisiae* CY strain. *Process Biochem.*, v.44, p.122-126, 2009.
- KIM, Y.-O., KIM, H.-K., BAE, K.-S., YU, J.-H., OH, T.-K. Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11. *Enzyme Microb. Technol.*, v.22, p.2-7, 1998.
- KIM, D.-S., GODBER, S., KIM, H.-R. Culture conditions for a new phytase-producing fungus. *Biotechnol. Lett.*, v.27, p.1077-1081, 1999.
- KONIETZNY, U., GREINER, R. Molecular and catalytic properties of phytate-degrading enzymes (phytases). *Int. J. Food Tech.*, v.37, p.791-812, 2002.
- LASSEN, S.F.; BREINHOLT, J.; OSTERGAARD, P.R.; BRUGGER, R.; BISCHOFF, A.; WYSS, M.; FUGLSANG, C.C.. Expression, gene cloning, and characterization of five novel phytases from four basidiomycete fungi : *Peniophora lycci*, *Agrocybe pediades*, a *Ceriporia* sp., and *Trametes pubescens*. *Appl. Environ. Microb.*, p.4701-4707, 2001.
- LIU, B.-L., RAFIQ, A., TZENG, Y.-M., ROB, A. The induction and characterization of phytase and beyond. *Enzyme Microb. Technol.*, v.22, p.415-424, 1998.
- MAYER, A.F., HELLMUTH, K., SCHLIEKER, H., LOPEZ-ULIBARRI, R., OERTEL, S., DAHLEMS, U., STRASSER, A.W.M., VAN LOON, A.P.G.M. An expression system matures : a highly efficient and cost-effective process for phytase production by recombinant strains of *Hansenula polymorpha*. *Biotechnol. Bioeng.*, v.63, p.373-381, 1998.
- NAYINI, N.R.; MARKAKIS, P. The phytase of yeast. *Lebensm.-Wiss. U. –Technol.*, v.17, p.24-26, 1984.
- OSHIMA, Y. The phosphatase system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Genet. Syst.*, v.72, p.323-334, 1997.

- PASAMONTES, L.; HAIKER, M.; WYSS, M.; TESSIER, M.; LOON, A.P.G.M. Gene cloning, purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Appl. Environ. Microb.*, v.63, p.1696-1700, 1997.
- QIN, Y.; WEI, X.; LIU, X.; WANG, T.; QU, Y. Purification and characterization of recombinant endoglucanase of *Trichoderma reesei* expressed in *Saccharomyces cerevisiae* with higher glycosylation and stability. *Protein Expres. Purif.*, v.58, p.162-167, 2008.
- REMUS, J. A avicultura e o meio ambiente colhem os benefícios da nova geração de fitases. *Ver. AveWorld - Edição 27*, publicado em 28/05/2008, disponível em <http://www.aveworld.com.br/index.php/documento/3749>, acessado em 30/04/2010.
- RIES, E.F.; MACEDO, G.A. Progressive screening of thermostable yeasts for phytase production. *Food Sci. Biotechnol.*, v.18, p.655-660, 2009.
- SANDBERG, A.S.; ANDLID, T. Phytogenic and microbial phytases in human nutrition. *Int. J. Food Tech.*, v.37, p.823-833, 2002.
- SANO, K.; FUKUHARA, H.; NAKAMURA, Y. Phytase of the yeast *Arxula adenivorans*. *Biotechnol. Lett.*, v.21, p.33-38, 1999.
- SEGUEILHA, L.; LAMBRECHTS, C.; BOZE, H.; MOULIN, G.; GALZY, P. Purification and properties of the phytase from *Schwanniomyces castelli*. *J. Ferment. Bioeng.*, v.74, p.7-11, 1992.
- SELLE, P.H.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v.135, p.1-41, 2006.
- SHIEH, T. R.; WARE, J. H. Survey of microorganisms for the production of extracellular phytase. *Appl. Microbiol.*, p.1348-1351, 1968.
- SHIMIZU, M. Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. *Biosci. Biotech. Biochem.*, v.56, p.1266-1269, 1992.
- STOCKMANN, C.; LOSEN, M.; DAHLEMS, U.; KNOCKE, C.; GELLISSEN, G.; BUCHS, J. Effect of oxygen supply on passaging, stabilizing and screening of recombinant *Hansenula polymorpha* production strains in test tube cultures. *FEMS Yeast Res.*, v.4, p.195-205, 2003.
- ULLAH, A.H.J.; GIBSON, D.M. Extracellular phytase (E.C. 3.1.3.8) from *Aspergillus ficcum* NRRL 3135: purification and characterization. *Prep. Biochem.*, v.17, p.63-91, 1987.
- VATS, P.; BANERJEE, U.C. Catalytic characterization of phytase (myo-inosilhexakisphosphate phosphohydrolase) from *Aspergillus niger* van Teighem:

Glycosylation pattern, kinetics and molecular properties. *Enz. Microb. Technol.*, v.39, p.596-600, 2006.

VOHRA, A.; SATYANARAYANA, T. Phytase production by the yeast *Pichia anomala*. *Biotechnol. Lett.*, v.13, p.551-554, 2002.

ZHAO, D.M.; WANG, M.; MU, X.J.; SUN, M.L.; WANG, X.Y. Screening, cloning and overexpression on *Aspergillus niger* phytase (phyA) in *Pichia pastoris* with favourable characteristics. *Lett. App. Microbiol.*, v.45, p.522-528, 2007.

**CAPÍTULO 5: APLICAÇÃO DE NOVA FITASE DE *SACCHAROMYCES
CEREVISIAE* NA ALIMENTAÇÃO DE CARPA CAPIM (*CTENOPHARYNGODON
IDELLA*)**

**Edi Franciele Ries¹, Cristiano Costenaro Ferreira², Fernanda Rodrigues Goulart²,
Leila Picolli da Silva² e Gabriela Alves Macedo¹**

RESUMO

As fitases vêm sendo utilizadas na nutrição de peixes a fim de hidrolisar o ácido fítico, facilitando o aproveitamento dos nutrientes e causando redução na contaminação ambiental pelo aumento da digestibilidade da dieta. Neste trabalho avaliaram-se efeitos da hidrólise de fitatos de farelo de arroz desengordurado (FAD) por meio de tratamento prévio com fitase não comercial produzida por *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) comparados aos efeitos da aplicação de Natuphos® (fitase comercial produzida pela empresa BASF). Os FADs tratados previamente com as fitases foram utilizados na elaboração de rações para carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*), não suplementadas com fosfato bicálcico, paralelamente a ração controle, elaborada com FAD sem tratamento enzimático e suplementada com fosfato bicálcico. Observou-se superioridade no aproveitamento das proteínas nas dietas com farelo tratado enzimaticamente pela maior deposição protéica hepática e corporal. Não foram observados efeitos da utilização de fitase sobre metabolismo de magnésio, ferro, fosfatase alcalina, colesterol e triglicérides. Maior concentração de fósforo sérico foi observada na formulação com fitase de *S. cerevisiae* enquanto que maiores níveis de cálcio e relação Ca/P foi verificada no tratamento controle. Os efeitos do tratamento do FAD com fitase de *S. cerevisiae* na concentração de 550 FTU/Kg de farelo foram semelhantes ao tratamento com fitase comercial e comparados ao tratamento controle sugerem que a utilização da enzima, na concentração analisada, dispensa a suplementação da dieta com fontes externas de fósforo inorgânico. O estudo mostra o grande o potencial de aplicação de nova fitase não comercial de *S. cerevisiae*.

Palavras chave: ácido fítico, farelo de arroz, nutrição de peixes, disponibilidade de fósforo.

¹ Faculdade de Engenharia de Alimentos – Departamento de Ciência de Alimentos. Rua Monteiro Lobato, 80. Caixa Postal 6121, CEP 13083-862, UNICAMP – Campinas – SP. E-mail:

gmacedo@fea.unicamp.br

² Centro de Ciências Rurais – Departamento de Zootecnia. UFSM – RS.

Application of new phytase from *Saccharomyces cerevisiae* on diet feed of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

ABSTRACT

Phytases have been used in fish nutrition in order to hydrolyse phytic acid, increasing the nutrients utilization and reducing environmental contamination for the improvement of digestibility in diet. In this work, the effects of phytate hydrolyse from defatted rice bran through previous treatment with non commercial phytase produced by *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) compared to the effects of application of Natuphos® (commercial phytase produced by BASF) were evaluated. The rice bran previously treated with the phytases were used in the production of food for grass carp (*Ctenopharyngodon idella*), not supplemented with bicalcium phosphate, within the control food, made with rice bran without enzymatic treatment and supplemented with bicalcium phosphate. It was observed that the quality of proteins on diet with enzymatic treated bran was superior due to the higher hepatic and body protein deposition. Effects of phytase use on magnesium, iron, alkaline phosphatase, cholesterol and triglycerides metabolism were not observed. A higher content of serum phosphorus was observed in the formulation with *S. cerevisiae* phytase while higher levels of calcium and Ca/P ratio were verified on the control treatment. The effects of rice bran treatment with *S. cerevisiae* phytase in 550 FTU/Kg concentrations were similar to the ones with the commercial phytase and suggest that the use of the enzyme, in the analysed concentration, exempts the diet supplementation with external sources of inorganic phosphorus when compared to the control treatment. This study shows the great potential for the use of non commercial new phytase produced by *S. cerevisiae*.

Key words: phytic acid, rice bran, fish nutrition, phosphorus availability

INTRODUÇÃO

Os produtos de origem animal por muito tempo foram considerados indispensáveis na formulação de rações animais pelo elevado valor biológico de suas proteínas e presença de macro e micro minerais essenciais. No entanto, as diversas zoonoses relatadas como pandemias mundiais nas últimas décadas (por exemplo, a encefalopatia espongiforme aguda bovina – BSE, conhecida como doença da vaca louca, que pode ser transmitida ao homem adquirindo neste, características da doença de Creutzfeldt-Jakob – CJD) obrigaram a criação de barreiras restritivas ao uso desses ingredientes em vários países, incluindo o Brasil, levando ao estudo de fontes alternativas, geralmente de origem vegetal, a fim de suprir a crescente demanda de nutrientes na criação animal (Sá, 2005). Entretanto, o conteúdo de fatores antinutricionais em ingredientes de origem vegetal, tais como o ácido fítico, tem constituído um dos principais obstáculos para maior utilização de muitos ingredientes vegetais na formulação de rações para as diversas espécies de interesse zootécnico, onde se incluem os peixes (Storebakken *et al.*, 2000).

A busca por formulações com redução de custos e garantia de máximo desempenho do animal também é refletida na composição mineral das rações. O fósforo (P) destaca-se pela sua participação em inúmeras funções do organismo e elevado custo na suplementação. Grande parte do mineral presente em alimentos de origem vegetal encontra-se complexado e indisponível à monogástricos devido ao conteúdo de fitatos (Conte *et al.*, 2002), de maneira que o fósforo inorgânico, um mineral não-renovável e caro, é acrescentado nas dietas de peixes, suínos e aves para atender suas necessidades nutricionais (Vats e Banerjee, 2004; Remus 2008). O excesso de fósforo adicionado às rações, bem como o fósforo e outros minerais ligados ao fitato que não são utilizados, são excretados nas fezes do animal contribuindo para contaminação ambiental (Common, 1989; Wash *et al.*, 1994; Mallin, 2000).

A utilização do fósforo presente em alimentos de origem vegetal adicionados na formulação de rações torna-se possível pela ação da fitase, sendo que a variabilidade no conteúdo de fitato entre as espécies vegetais afeta diretamente a biodisponibilidade do fósforo (Conte *et al.*, 2002). A ação da fitase pode resultar em melhora de variáveis zootécnicas, como formação da estrutura óssea, menor incidência de problemas locomotores e melhor uniformidade dos lotes dos animais (Alvarenga *et al.*, 2008).

Entre os alimentos de origem vegetal, o farelo de arroz possui uma das maiores percentagens de fósforo total (1,5%), enquanto que o milho e farelo de soja possuem 0,28% e 0,65%, respectivamente (National Research Council, 1994). Conte *et al.* (2002) ressaltam o fato deste alimento possuir uma das menores taxas de disponibilidade de fósforo devido ao seu alto teor de fitato, que em farelo de arroz estabilizado foi de 7,53% (Cúneo *et al.*, 2000) sendo superior a outros cereais e mostrando-se como potencial fonte de fósforo após processo de desfitatização. Apesar de ser possível a ativação da fitase endógena do farelo com eliminação quase completa do ácido fítico, este tratamento não se apresenta vantajoso ou compensatório economicamente (Cúneo *et al.*, 2000). O farelo de arroz desengordurado (FAD) é encontrado no mercado por preços mais baixos, e seu uso permite a redução do custo final dos alimentos (Moreira *et al.*, 2003).

Considerando o exposto e o fato de que fitases de leveduras sem utilização de engenharia genética ainda não são comerciais, o presente estudo foi conduzido com o objetivo de verificar a eficiência de uma nova fitase de *S. cerevisiae* na hidrólise do ácido fítico presente em farelo de arroz utilizado na elaboração de ração para alimentação de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*). Foi realizado estudo comparativo com a enzima comercial Natuphos®, e ração controle formulada com farelo de arroz sem tratamento com fitase suplementada com fosfato bicálcico.

MATERIAL E MÉTODOS

PRODUÇÃO DE PRÉ-INÓCULO E INÓCULO DE *S. CEREVISIAE*

A levedura utilizada no estudo foi *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) strain zi (EU188613) selecionada como potencial produtora de fitase termoestável por Ries e Macedo, (2009) na Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. O microrganismo foi armazenado em tubos contendo meio Yeast Malt (YM) sólido inclinado sob refrigeração à 4°C. Na produção do pré-inóculo foi acrescentado 2,5 mL de água estéril em cada tubo e a massa celular retirada e homogeneizada com auxílio de alça de platina previamente esterilizada. Esse homogeneizado foi denominado pré-inóculo.

O inóculo foi preparado conforme descrito: à 100 mL de meio constituído por: extrato de levedura 10 g/L; peptona 20 g/L e glicose 20 g/L, foram adicionados 3 mL de

pré-inóculo, e mantida fermentação por 12 horas em Mini Reatores de Bancada Marconi com agitação MA 505 à 35°C e nível de agitação 3.

PRODUÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO

A produção de fitase de *S. cerevisiae* foi realizada no Laboratório de Bioquímica de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, em Mini Reatores de Bancada Marconi com agitação MA 505. O meio de cultivo líquido foi composto por (%): Sacarose 2,5; Fitato de sódio 0,5; uréia 0,15; MgSO₄.7H₂O 0,05; KCl 0,05; FeSO₄.7H₂O 0,0001; MnSO₄.H₂O 0,00075; CaCl₂ 0,01. Foi adicionado inóculo na concentração de 10% e a fermentação foi conduzida em mini reatores de bancada a 30°C em nível 6 de agitação durante 36 horas. Após desenvolvimento da cultura, os meios foram centrifugados (Centrífuga Hitachi modelo himac CR 21GII) a 7100 x g à temperatura de 4°C, por 30 minutos. A fração sobrenadante foi denominada extrato enzimático extracelular.

A massa celular foi lavada com Tampão Tris-HCl pH 7,0 0,1 M, centrifugada a 7100 x g à temperatura de 4°C, por 10 minutos e ressuspensa no mesmo tampão. A mistura foi submetida ao processo de sonicação (180 – 200 watts) 3 vezes por 15 segundos em Ultrasonicador Tip Labsonic Systems Lab Line Instruments. O extrato obtido foi novamente centrifugado a 7100 x g à temperatura de 4°C, por 10 minutos e o sobrenadante (denominado extrato enzimático intracelular) adicionado ao sobrenadante do processo fermentativo (extrato enzimático extracelular) compondo o extrato enzimático total.

TRATAMENTO DE FARELO DE ARROZ DESENGORDURADO (FAD) COM FITASE

O tratamento enzimático do farelo de arroz desengordurado foi realizado conforme método proposto por Storebakken *et al.* (1998) modificado. O FAD foi incubado com extrato enzimático na proporção de 1:3 (p/v), pH 5,5, com agitação a fim de facilitar a atividade enzimática. O extrato enzimático produzido por *S. cerevisiae* strain zi (EU188613) apresentava nesta proporção, atividade de 550 FTU/Kg de FAD. A enzima comercial Natuphos® 10000G foi utilizada em atividade equivalente para efeitos comparativos, e o farelo incubado com água a 40°C completando a proporção de 1:3 (p/v). A mistura foi realizada com batedeira manual durante 2 horas. Iniciou-se com

agitação constante durante 30 minutos, e após, agitação de 5 minutos a cada 15 minutos de repouso até término do período de incubação, durante o qual, a mistura foi mantida em banho a 40°C. Finalizada a incubação, a mistura foi levada para estufa a 55°C até atingir umidade inferior a 12%. Após resfriado, o FAD foi moído e utilizado no preparo das rações. Natuphos® foi doada pela empresa fabricante BASF.

O teor protéico do FAD tratado ou não enzimaticamente, foi determinado pelo Método de Kjeldahl (AOAC, 1995). Para análise do teor de fósforo dos farelos, inicialmente realizou-se tratamento deste com HCl 1,0N pH 3,0 na proporção de 1:10 (p/v) durante 30 minutos sob agitação seguido de 3 centrifugações sucessivas (1320 x g por 5 min) para liberação do fósforo solúvel. Na fração remanescente do processo, determinou-se o fósforo insolúvel após digestão ácida utilizando mistura catalítica de sulfato de cobre e sulfato de potássio. Após aquecimento e digestão, o extrato foi ressuspenso em água destilada. A determinação de fósforo total foi feita após digestão ácida do farelo, e ressusensão do extrato em água destilada. A quantificação das frações de fósforo dos farelos foi realizada por espectrofotometria conforme proposto por Schons (2009). Adicionou-se 0,5 mL do extrato e 1,5 mL de uma solução constituída por 4 partes de 1,5% de molibdato de amônio em solução de ácido sulfúrico 5,5% e 1 parte de sulfato ferroso 2,7% (Shimizu, 1992). O fosfato inorgânico liberado foi determinado fotometricamente a 700 nm e a quantificação foi feita por meio de curva de calibração com K₂HPO₄.

PREPARO DAS RAÇÕES

Foram avaliadas três formulações de dieta, denominadas: FAD – ração controle formulada com uso de farelo de arroz desengordurado sem tratamento prévio, suplementada com fosfato bicálcico; FAD-FS – ração formulada com uso de farelo de arroz desengordurado com tratamento prévio com fitase de *S. cerevisiae* e FAD-FN – ração formulada com uso de farelo de arroz desengordurado com tratamento prévio com Natuphos®. A composição das três formulações é apresentada na Tabela 1. Após a moagem, os ingredientes foram misturados, sendo as rações peletizadas em moedor de carne e secas em estufa a 50°C por 24 horas.

TABELA 1 COMPOSIÇÃO DAS RAÇÕES EXPERIMENTAIS (%)¹

Ingredientes	FAD	FAD-FS	FAD-FN
Farelo soja	43	40,5	40,5
Farinha de peixe	5	5	5
Milho	16,54	20,84	20,84
Farelo trigo	7	7	7
FAD	20	0	0
FAD-FS	0	20	0
FAD-FN	0	0	20
Óleo Soja	3,9	3,9	3,9
Fosfato Bicálcico	1,8	0	0
Premix vitamínico ² /mineral ³	1,5	1,5	1,5
Colina	0,75	0,75	0,75
Sal	0,5	0,5	0,5
BHT	0,01	0,01	0,01
TOTAL %	100	100	100
COMPOSIÇÃO (%)	FAD	FAD-FS	FAD-FN
Matéria seca	92,6	92,1	90,9
Matéria mineral	9,7	7,88	7,78
Proteína bruta	28,5	28,1	27,74
Extrato etéreo	7,54	7,59	7,49
Fibra em detergente neutro	19,52	20,55	20,28
Extrato não nitrogenado	34,74	35,88	36,71
Cálcio (Ca)	0,96	0,52	0,52
Fósforo total (P)	1,43	1,11	1,10
Fósforo disponível	0,83	0,86	0,86
Energia Digestível Kcal/Kg	2888,58	2904,47	2901,48
SUPLEMENTAÇÃO AA	FAD	FAD-FS	FAD-FN
Lisina	0,078	0,14	0,14
Metionina + Cisteína	0,302	0,326	0,327

¹ Calculada com base na análise dos ingredientes

² Composição da mistura vitamínica (kg de produto/MigPlus): Ác. Fólico: 1200mg, Ác. Nicotínico: 24000mg, Ác. Pantotênico: 12000mg, Biotina: 48 mg, Vit.A: 1200000UI, Vit. B1: 4800mg, Vit. B2: 4800mg, Vit. B6: 4800mg, Vit. B12: 4800mcg, Vit. C: 48 g, Vit. D3: 200000UI, Vit. E: 12000 mg, Vit. K3: 2400mg.

³Composição da mistura mineral (kg de produto/MigPlus): Cobalto: 10mg, Cobre: 3000mg, Ferro: 50000mg, Iodo: 100mg, Manganês: 20000mg, Selênio: 100mg, Zinco: 3000mg.

ENSAIO BIOLÓGICO: MANEJO DOS ANIMAIS E PROCEDIMENTO ANALÍTICO

O experimento biológico foi conduzido no Setor de Piscicultura do Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, após ser aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da UFSM sob processo nº 23081.003109/2010-21 (Anexo 3). Foram utilizados 180 juvenis de carpa capim, distribuídos em nove tanques de 280L úteis (com sistemas individuais de abastecimento, escoamento e aeração) conectados em sistema de

recirculação de água contendo dois filtros biológicos e um reservatório principal com dois termostatos e duas resistências para a manutenção da temperatura da água.

Cada tratamento foi conduzido em três repetições, sendo que cada repetição foi representada por um tanque contendo 20 animais. Diariamente, às 8:30, 14:30 e 17:00 foi fornecida ração na proporção de 3% do peso vivo e realizadas sifonagens dos tanques às 11:00 e 15:30. A quantidade de ração fornecida foi ajustada após 15 dias mediante pesagem dos animais. O experimento biológico foi realizado entre os meses de fevereiro e março com duração total de 35 dias, seguindo o abate dos animais. Neste experimento, não foi utilizada alimentação das carpas com forragem com intuito de verificar efeitos decorrentes exclusivamente das diferentes formulações de dieta em questão. Os animais foram pesados no início e final do experimento para verificação de ganho peso.

Previamente às coletas de sangue e órgãos, os animais passaram por jejum de 24 horas.

Para realização de análises sanguíneas, 27 animais por formulação FAD, FAD-FS ou FAD-FS foram anestesiados por imersão em solução de tri-fenóxi-tanol (0,03%, diluído em água), em seguida foi feita a coleta de sangue e massagem no local para evitar refluxo e/ou hematomas. A coleta de sangue foi realizada utilizando seringas descartáveis contendo EDTA, heparina ou sem anticoagulante, conforme exigências analíticas posteriores. Foram realizadas análises de proteínas totais, glicose, triglicérides, colesterol, cálcio, ferro, fosfato e fosfatase alcalina utilizando Kits comerciais Doles e análise de magnésio utilizando kit comercial Katal, de acordo com protocolos dos fabricantes.

Para análises de órgãos, nove animais alimentados com formulação FAD, FAD-FS ou FAD-FS foram abatidos por imersão (dez minutos ou mais) em tanques contendo hidrocloreto de benzocaína (110 mg/mL) e em seguida realizou-se a coleta do fígado e trato digestivo. Foi utilizado tampão de homogenização para enzimas digestivas pH 7,0 para preparação de extrato do trato digestivo e posterior determinação de tripsina e quimiotripsina utilizando metodologias descritas por Hummel (1959). As atividades de tripsina e quimiotripsina foram determinadas em substratos Toluenesulphonyl- L-arginine methyl ester hydrochloride (TAME) e Benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTEE), respectivamente, e uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 µg de substrato (TAME ou BTEE) por 1 minuto por mg proteína. As análises realizadas no fígado foram determinação de glicose (Dubois,

et al., 1956); glicogênio (Bidinotto *et al.*, 1997) e proteínas totais pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

A análise da composição centesimal do peixe inteiro foi realizada com nove animais alimentados com formulação FAD, FAD-FS ou FAD-FN. Os animais foram abatidos conforme descrito anteriormente, triturados (inteiros) em processador de alimentos para posterior análise de massa seca, cinzas, e proteína seguindo as metodologias descritas na AOAC (1995) e determinação de gordura pelo método de Bligh-Dyer (1959).

Aos 20 e 30 dias de experimento foram realizadas determinações de fósforo total nas águas dos tanques pelo método colorimétrico por redução com ácido ascórbico, conforme metodologia da ABNT (NBR 12772/1992). Parâmetros físico-químicos da água foram monitorados por análises diárias (temperatura e oxigênio dissolvido utilizando oxímetro digital YSI modelo 550A) ou semanais (pH por meio de aparelho pHmetro Digimed® NTA210 e dureza conforme ADAD, 1982). A água para análise era coletada junto aos filtros biológicos do circuito.

ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste Duncan ou teste Tukey ($p < 0,05$). Análise de variância de Kruskal-Wallis foi utilizada para avaliar dados com distribuição não-paramétrica. As análises foram realizadas utilizando-se o pacote estatístico SAS 9.1.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

TRATAMENTO DE FARELO DE ARROZ DESENGORDURADO (FAD) COM FITASE

O aumento da disponibilidade de fósforo após tratamento com fitases foi verificada neste estudo e apresentado na Tabela 2. Observa-se que no farelo de arroz analisado, apenas 33% do fósforo encontrava-se disponível, e que o tratamento do FAD com fitase resultou em redução do teor de fitato do farelo, refletida na liberação do fósforo (95% para ambos tratamentos enzimáticos do farelo: FAD-FS e FAD-FN).

As fitases catalisam a hidrólise do ácido fítico e o fosfato inorgânico hidrolisado é utilizado como medida do fósforo disponível no farelo para utilização pelo animal. Os dados de ação efetiva das fitases na concentração de 550 FTU/Kg de FAD apresentam-se superiores a alguns estudos semelhantes encontrados na literatura sem, no entanto, ter sido realizado estudo de biodisponibilidade de fósforo.

TABELA 2 DETERMINAÇÃO DE FÓSFORO DISPONÍVEL E TOTAL E TEOR PROTÉICO EM FAD E FAD DESFITATIZADO ENZIMATICAMENTE.

Tratamentos	Fósforo Disponível (%)	Fósforo Total (%)	Proteínas totais (%)
FAD	0,94 ^b	2,83 ^a	16,89 ^b
FAD-FS	2,73 ^a	2,87 ^a	21,46 ^a
FAD-FN	2,72 ^a	2,86 ^a	21,50 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (teste Tukey $p < 0,05$) entre as diferentes formulações de dieta.

FAD – ração controle formulada com uso de farelo de arroz desengordurado sem tratamento prévio, suplementada com fosfato bicálcico; FAD-FS – ração formulada com uso de farelo de arroz desengordurado com tratamento prévio com fitase de *S. cerevisiae* e FAD-FN – ração formulada com uso de farelo de arroz desengordurado com tratamento prévio com Natuphos®.

O tratamento de concentrado de soja para base de dietas em peixes em experimento realizado por Storebakken *et al.* (1998), resultou em aumento da solubilidade de fósforo de 64% e 70%, após 10 e 60 minutos de incubação, respectivamente. Cúneo *et al.* (2000) avaliaram a desfitatização de farelo de soja com fitase exógena e observaram redução do teor de ácido fítico do farelo sem tratamento de apenas 37%. Os pesquisadores atribuem a baixa eficiência da fitase exógena pelo limitado contato entre enzima e substrato que resulta da mistura manual, em relação à disposição com que os reagentes enzima e substrato se encontram naturalmente na matriz do grão, quando a fitase é endógena. No entanto, no presente estudo a mistura também foi realizada de forma manual, e o grau de eficiência enzimática foi 2,6 vezes superior ao relatado.

A disponibilidade de fósforo pela tilápia do Nilo alimentada com rações contendo farelo de soja suplementadas com fitase comercial (BASF 5000 FTU/g) foi de 65,23% (500 FTU/Kg de ração) e 72,63% (1500 FTU/Kg de ração), enquanto que no tratamento sem enzima a disponibilidade do mineral foi de 38,21% (Furuya *et al.*, 2001). Em pesquisa realizada para avaliar o efeito da fitase Natuphos® na biodisponibilidade de fósforo de farelo de arroz integral em dietas para frangos de corte,

observaram-se biodisponibilidades de 51,54% e 61,31%, com a utilização de 400 e 800 FTU/Kg, respectivamente (Conte *et al.*, 2002).

O conteúdo total de fósforo determinado no farelo de arroz desengordurado foi de 2,83% neste estudo. Os valores encontrados na literatura para esta determinação são muito variados: 1,5% (National Research Council, 1994); 2,02% (Ludke *et al.*, 2002); 2,13% (EMBRAPA, 1985); 2,33% (Moreira *et al.*, 2003). As divergências também foram relatadas na determinação do teor protéico (16,89% neste estudo), sendo encontrado valor de 14% por Ludke *et al.* (2002) e 16% relatado por Sá (2005), o que é decisivamente influenciado pelas formas de processamento e cultivares de origem.

Após determinação da composição dos ingredientes da ração, em particular, determinações de fósforo disponível e teor protéico em FAD e FAD tratado enzimaticamente, as rações foram formuladas conforme apresentado em procedimento experimental. Ressalta-se a adição de fosfato bicálcico na formulação controle (FAD) com intuito de padronizar o teor de fósforo disponível nas três formulações. As dietas apresentaram teor de fósforo acima das exigências estabelecidas pelo National Research Council (NRC, 1993) para as carpas (0,6%) e composição final semelhante de nutrientes. Esta elaboração foi desejada para que as respostas observadas pudessem ser correlacionadas às diferentes formulações de dietas e verificados os efeitos da hidrólise do ácido fítico do FAD na qualidade, disponibilização e aproveitamento de nutrientes.

ENSAIO BIOLÓGICO

Os valores dos parâmetros físico-químicos da água demonstraram-se satisfatórios, não comprometendo o ambiente onde foram realizados os experimentos, e estão de acordo com os tolerados para peixes (Osório *et al.*, 1978; Baldisserotto e Neto, 2004). Os resultados obtidos foram: temperatura de $26,0 \pm 1,8^\circ\text{C}$, oxigênio dissolvido de $5,6 \pm 0,5$ mg/L; pH de $6,9 \pm 0,1$ e dureza de $0,20 \pm 0,08$ mg CaCO_3/L .

Neste estudo, a carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) foi utilizada como modelo biológico para aplicação de fitase, alimentando-a unicamente com as dietas elaboradas a fim de verificar os efeitos das formulações FAD; FAD-FS e FAD-FN. A suplementação alimentar com rações é um meio de incrementar a produção de carpas herbívoras, podendo ser usada ainda, alimentação alternativa com subprodutos (misturas) de grãos, farinhas e resíduos de culturas (Mukhopadhyay e Kaushik, 2001).

O ganho de peso médio por animal ao final do experimento não se apresentou significativo ($p < 0,05$) em decorrência das diferentes dietas. Para os animais alimentados com a formulação controle FAD, o ganho de peso foi de $3,9 \pm 0,94$ g por animal, enquanto que para os animais que receberam as dietas FAD-FS e FAD-FN os valores foram de $3,8 \pm 1,4$ g e $4,0 \pm 1,7$ g, respectivamente.

A Tabela 3 apresenta os resultados das análises realizadas após 35 dias de alimentação. Não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) nas determinações sanguíneas de magnésio, ferro, fosfatase alcalina, glicose, proteínas, colesterol e triglicérides, sugerindo que o tratamento prévio do FAD com fitases não interferiu nas concentrações normais destas variáveis.

Aumento da disponibilidade do magnésio, cobre, zinco e manganês em vegetais utilizados na alimentação de tilápia do Nilo foi observado por Gonçalves *et al.* (2005) após suplementação das dietas com fitase. Conforme observado neste estudo, a adição de fitase em ração para outras espécies, tais como o suíno (500 FTU/Kg de ração) não desencadeou alterações significativas no metabolismo do ferro de acordo com pesquisa realizada por Almeida *et al.* (2007).

As análises de fósforo e cálcio no plasma dos animais alimentados com as diferentes dietas também não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) para estes minerais. Esperava-se uma determinação de fósforo superior nas amostras de carpas alimentadas com ração controle FAD visto que esta formulação foi suplementada com fosfato bicálcico apresentando assim, maior teor de fósforo total na ração elaborada. Estes resultados divergem também de estudo semelhante realizado por Moreira *et al.* (2003), onde as maiores concentrações de fósforo no plasma foram detectadas no tratamento controle sem fitase e suplementado com fosfato inorgânico. A presença de fósforo nas dietas é importante para crescimento e metabolismo dos peixes. Aumento no crescimento e prevenção de deformidades do crânio em carpas foram observadas com a adição do mineral à dietas (Halver e Hardy, 2002). O fósforo é intensamente envolvido em processos do metabolismo, participando de todas as reações onde o consumo de energia é necessário. Portanto, quando a ingestão de alimento deficiente em fósforo ocorre, o sistema fisiológico promove reciclagem de fósforo ósseo, reduz a excreção e aumenta a absorção, afetando o desempenho dos animais quando a deficiência é elevada (Moreira *et al.*, 2003).

TABELA 3 PARÂMETROS METABÓLICOS E COMPOSIÇÃO CORPORAL DOS JUVENIS DE CARPA CAPIM (*CTENOPHARYNGODON IDELLA*) OBSERVADOS NO FINAL DO EXPERIMENTO¹

Análises	FAD	FAD-FS	FAD-FN	CV(%)
Análises sanguíneas				
Cálcio (mg/dL)	6,09 ± 0,48	5,55±0,41	5,77±0,17	16,63
Fósforo (mg/dL)	3,55 ± 0,36	4,37±0,38	3,72±0,38	26,96
Relação Ca:P	1,90 ± 0,12 ^a	1,41±0,08 ^b	1,65±0,14 ^{ab}	19,49
Magnésio (mg/dL)	2,32 ± 0,16	2,65±0,19	2,57±0,12	18,71
Ferro (µg/dL)	31,52 ± 2,01	34,25±2,81	31,88±2,04	18,17
Fosfatase (UI/L) ²	29,06±2,97	32,05±2,19	33,38±1,73	22,23
Glicose (mg/dL)	72,19±8,17	82,89±7,57	76,27±7,33	28,74
Proteína (g/dL)	1,95±0,13	1,85±0,20	1,70±0,18	28,64
Colesterol (mg/dL)	170,23±16,01	135,93±10,54	169,63±16,84	25,84
Triglicérides ³ (mg/dL)	187,14±18,62	179,69±21,33	170,27±14,78	30,22
Análises hepáticas				
Glicose (µmol/g tec)	432,02±36,95	295,08±64,74	318,56±41,56	40,42
Glicogênio (µmol/g tec)	1267,14±202,33 ^a	677,14±37,76 ^b	679,65±35,34 ^b	18,40
Proteína (mg/g tecido) ^{3,4}	22,11±2,14 ^b	52,51±4,04 ^a	57,01±1,15 ^a	18,22
Análises intestinais				
Tripsina (UI/mg) ⁵	7,62±0,59	7,95±0,47	6,77±0,34	17,35
Quimiotripsina (UI/mg) ⁵	3069,16±280,19	3387,07±199,45	2884,75±144,00	19,55
Composição centesimal				
Proteína (%)	12,64±0,18	12,95±0,16	12,90±0,17	3,76
Gordura (%)	9,23±0,41 ^b	9,37±0,44 ^b	10,56±0,33 ^a	11,11
Matéria seca (%)	25,68±0,70	25,19±0,48	26,42±0,51	6,20
Cinzas (%)	2,47±0,10	2,43±0,11	2,54±0,11	11,78

CV: Coeficiente de variação (%).

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os tratamentos (teste Duncan $p<0,05$).

¹resultados apresentados como média ± desvio padrão.

² Uma UI de fosfatase é a quantidade de enzima que catalisa o desdobramento de 1µmol de substrato/ minuto/ litro de soro.

³ Análise de variância de Kruskal-Wallis (não-paramétrica).

⁴ Grau de significância da análise de variância: ($p<0,0001$).

⁵ Uma UI de enzima é a quantidade de enzima que catalisa a hidrólise de 1µg de substrato/ minuto/ mg de proteína.

Considerando os níveis sérios determinados para o cálcio, ressalta-se que a suplementação de cálcio nas dietas para peixes assume importância secundária, considerando que a maior quantidade do mineral utilizado em seu metabolismo é captada da água de cultivo via branquial (Halver e Hardy, 2002; Baldisserotto, Chowdhury e Wood, 2005). O cálcio desempenha importantes funções relacionadas, por exemplo, à contração muscular, coagulação sanguínea, transmissão nervosa, manutenção da integridade das membranas celulares pelo controle da permeabilidade das membranas e absorção de nutrientes pela célula (Halver e Hardy, 2002).

Observaram-se níveis significativamente superiores para relação cálcio/fósforo na formulação FAD comparados à relação na ração FAD-FS, que podem ser devidos à suplementação da dieta controle FAD com fosfato bicálcico. Remus (2008) destaca preocupação especial com os teores de cálcio quando se diminuem as concentrações de fósforo na dieta. O cálcio possui menor afinidade para se ligar ao fitato, mas é o que está presente nos níveis mais altos nas dietas. A relação total 2:1 (Ca/P) ou maior reduz a utilização do fitato, o desempenho e absorção destes minerais. O metabolismo do fósforo está diretamente relacionado ao metabolismo de e suas variações no plasma é pequena devido a seu mecanismo fisiológico eficiente, que envolve hormônios da paratireóide, calcitonina e vitamina D (Halver e Hardy, 2002; Moreira *et al.*, 2003).

Verificou-se uma tendência inversamente proporcional entre as determinações de glicose e glicogênio e a determinação de proteínas totais no tecido, sendo esta última, significativamente inferior na formulação FAD. Considerando ainda o fato de que, as análises de tripsina e quimiotripsina mostram que a composição das dietas não acarretou efeitos significativos sobre a ação das proteases, tem-se a hipótese de que ocorreu deficiente digestibilidade e deposição de proteínas na formulação controle. Semelhantemente, Sajjadi e Carter (2004) não observaram efeito na atividade de tripsina após inclusão de ácido fítico em dietas de salmão do Atlântico (*Salmo salar*). Entretanto, a presença de ácido fítico resultou em significativa redução na digestibilidade de proteínas, que foi neutralizada pela adição de fitase às dietas.

A ausência de efeitos sobre a atividade de tripsina e quimiotripsina era esperada neste experimento, visto que as formulações apresentavam composição de nutrientes semelhantes e foram fornecidas na mesma concentração. O aumento das enzimas digestivas de alevinos e adultos de carpa capim ocorre devido ao aumento da oferta de alimentos que necessitam destas enzimas para sua digestão e absorção (Das e Tripathi, 1991). Lazzari *et al.*, (2007) destacam ainda que as proteases alcalinas em especial, não

respondem linearmente ao nível protéico da dieta, estando mais sujeitas à presença de substâncias inibitórias e que quando associadas à parâmetros metabólicos são indicadores confiáveis do estado nutricional de peixes. Redução significativa na atividade de tripsina somente foi observada em larvas de carpa comum (*Cyprinus carpio*) alimentadas com dietas com altos níveis de concentrado protéico de soja e inibidores da tripsina de soja (Escaffre *et al.*, 1997). Os valores de tripsina e quimiotripsina determinados no presente experimento foram superiores aos determinados para jundiás (*Rhamdia quelen*) alimentados com dietas com conteúdo semelhante de proteína bruta (27%) (Lazzari *et al.*, 2007).

Nas formulações FAD-FS e FAD-FN, encontraram-se concentrações superiores de proteína hepática. Acredita-se que a superioridade observada possa ser devida ao melhor aproveitamento de proteínas e biodisponibilidade de aminoácidos ocasionados pela ação das fitases no pré-tratamento do farelo de arroz. Sabe-se que a presença de ácido fítico nas dietas reflete-se também na digestibilidade protéica devido à formação de complexos insolúveis. Desta forma, a hidrólise de complexos nutritivos pela fitase pode contribuir para obtenção de uma dieta de qualidade nutricional superior com maior digestibilidade dos nutrientes. O pré-tratamento de concentrado de proteína de soja em dietas para salmão do Atlântico (*Salmo salar*) com fitase mostrou redução do ácido fítico e melhores índices de digestibilidade e retenção de proteínas (Storebakken *et al.*, 1998).

Os valores de proteínas corporal nas formulações com FAD deste estudo foram superiores aos valores determinados para alevinos de carpa capim alimentados com gramíneas em experimento realizado por Camargo *et al.*, (2006), onde ocorreu adicionalmente, mobilização das reservas corporais.

Os níveis de glicogênio e glicose hepática encontraram-se inferiores nas formulações FAD-FS e FAD-FN, provavelmente pela utilização desejável destes no suprimento da demanda energética do animal com preservação das reservas protéicas. Os níveis de lipídeos na composição corporal foram inferiores aos determinados para salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (Sajjadi e Carter, 2004). Os autores relatam que os peixes alimentados com dietas adicionadas de fitase, em comparação com formulações contendo ácido fítico, apresentaram maior teor de lipídeos, o que foi verificado neste estudo apenas no tratamento FAD-FN, que apresentou deposição significativamente superior de gordura corporal e conseqüentemente matéria seca mais elevada.

Níveis próximos de fitase aos utilizados neste estudo forneceram resultados satisfatórios em pesquisas semelhantes. A inclusão de 500 FTU/Kg de ração foi suficiente para permitir adequado desempenho e deposição de fósforo no osso para bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) e alevinos (2 g) de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), conforme relatado por Jackson *et al.* (1996) e Cain e Garling (1995), respectivamente.

Furuya *et al.* (2001) observaram que os melhores resultados de desempenho, retenção de minerais nos ossos e digestibilidade foram obtidos com suplementação de fitase de 700 FTU/Kg de ração em dietas para a tilápia do Nilo. Moreira *et al.* (2003) relataram que a utilização de 759 unidades da enzima em rações à base de milho, farelo de soja e farelo de arroz desengordurado para suínos na fase de crescimento permite a eliminação das fontes tradicionais de fósforo.

Neste trabalho, o nível de inclusão de FAD nas dietas foi de 20%, sendo que o pré-tratamento do farelo com fitase mostrou-se preferível à suplementação com fosfato bicálcico. Diferentemente do verificado por Ludke *et al.* (2000) para o desempenho de suínos, onde dietas com e sem FAD suplementadas com fitase tiveram a mesma eficiência que as suplementadas com fosfato bicálcico.

As respostas metabólicas observadas para formulação elaborada com FAD tratado com enzima não comercial produzida por *S. cerevisiae* são notáveis e semelhantes às determinadas após utilização de enzima comercial amplamente aplicada em alimentação animal. Adicionalmente, destaca-se a redução significativa do conteúdo de fósforo nas águas dos tanques conforme pode ser observado na Tabela 4.

TABELA 4 DETERMINAÇÃO DE FÓSFORO NAS ÁGUAS DOS TANQUES (MG/L)¹

Análise	Tratamentos			Dias experimentais	
	FAD	FAD – FS	FAD – FN	20 dias	30 dias
Fósforo	1,38 ± 0,14 ^a	1,09 ± 0,18 ^b	1,21 ± 0,14 ^b	1,13 ± 0,20 ^b	1,32 ± 0,13 ^a

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as formulações e dias (teste Duncan, p<0,05).

¹ Resultados apresentados como média ± desvio padrão.

O maior teor deste mineral nas águas da formulação controle era esperado em decorrência da suplementação da dieta com fosfato bicálcico e conseqüentemente, maior concentração total. A eficiente hidrólise do ácido fítico por fitase de *S. cerevisiae* permitiu a utilização de fósforo presente no farelo de arroz utilizado na elaboração da

ração sem necessidade de adição de fontes externas do mineral. A adição de fontes de fósforo constitui um problema ambiental, uma vez que não utilizado pelo animal é excretado nas águas causando eutrofização e afetando a quantidade de oxigênio na água, levando à morte de peixes (Mallin, 2000).

O efeito cumulativo da excreção de fósforo nas águas dos tanques também pode ser observado neste estudo, visto que a determinação de fósforo após 30 dias de experimento foi significativamente superior ($p < 0,05$) ao valor determinado em 20 dias, a exemplo da excreção contínua que ocorre no ambiente aquático. As implicações da utilização de fitase sobre a menor descarga de nutrientes nos tanques de criação de peixes já foram ressaltadas por outros autores e, apesar de ser um elemento essencial em rações para peixes, a concentração de fósforo na dieta deve atender às exigências necessárias para o bom desempenho sem, no entanto, comprometer a qualidade da água de cultivo (Gonçalves *et al.*, 2007).

CONCLUSÕES

A nova fitase produzida por *S. cerevisiae* mostrou-se efetiva na hidrólise do ácido fítico de farelo de arroz, permitindo agregação de valor nutricional e utilização do farelo na elaboração de ração para peixes. O destino alternativo deste subproduto da indústria possibilitou alterações nas formulações das rações de forma a minimizar o custo, maximizando o uso de um ingrediente energético e protéico.

Os efeitos do tratamento enzimático do farelo utilizado na elaboração de rações para carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) mostraram-se benéficos e sugerem que a utilização de fitase na concentração de 550 FTU/Kg de farelo pode substituir a suplementação da ração com fontes externas de fósforo. Assim, a disponibilização de fósforo presente no FAD proporcionada pelo tratamento com fitase de *S. cerevisiae* contribui adicionalmente para diminuição da contaminação ambiental pela redução significativa da excreção nas águas de fósforo não utilizado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAD, J.M.P. Controle Químico de Qualidade. Rio de Janeiro: GB-2, p.203, 1982.
- ALMEIDA, R.F.; LOPES, E.L.; NUNES, R.C.; MATOS, M.P.C.; FIORAVANTI, M.C.S.; OLIVEIRA, A.P.A.; RUFINO, L.M. Metabolismo do ferro em suínos recebendo dietas contendo fitase, níveis reduzidos de fósforo inorgânico e sem suplemento micromineral e vitamínico. *Ciên. Rur.*, v.37, p.1097-1103, 2007.
- ALVARENGA, R.R.; ZANGERÔNINO, M.G.; ALVARENGA, R.R. Adição de fitase em rações para frangos de corte. *PUBVET, Public. Medic. Vet. Zootec.*, v.17, artigo 347, 2008.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT, NBR 12772. Água – Determinação de fósforo, p.3-5, 1992.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. In: *Official Methods of Analysis*, 16.ed. AOAC, Washington, DC, 1995.
- BALDISSEROTTO, B.; RADÜNZ NETO, J. Criação de jundiá. Santa Maria. Editora UFSM, p.74-79, 2004.
- BALDISSEROTTO, B.; CHOWDHURY, M.J.; WOOD, C.M. Effects of dietary calcium and cadmium on cadmium accumulation, calcium and cadmium uptake from the water, and their interactions in juvenile rainbow trout. *Aquat. Toxicol.*, v.72, p.99-117, 2005.
- BIDINOTTO, P.M.; SOUZA, R.H.S.; MORAES, G. Hepatic glycogen in eight tropical freshwater teleost fish: A procedure for field determinations of microsamples. *Bol. Téc. CEPTA*, v.10, p.53-60, 1997.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid. Extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, v.37, p.911–917, 1959.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, p.248-254, 1976.
- CAIN, K.; GARLING, D.L. Pretreatment of soybean meal with phytase for salmonid diets to reduce phosphorus concentrations in hatchery effluents. *Prog. Fish Cult.*, v.57, p.114-119, 1995.
- CAMARGO, J.B.J.; RAÜNZ NETO, J.; EMANUELLI, T.; LAZZARI, R.; COSTA, M.L.; LOSEKANN, M.E.; LIMA, R. L.; SCHERER, R.; AUGUSTI, P.R.;

- PEDRON, F.A.; MEDEIROS, T.S. Cultivo de alevinos de carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*) alimentados com ração e forragens cultivadas. R. Bras. Agrociên., v.12, p.211-215, 2006.
- COMMON, F. Biological availability of phosphorus in pigs. Nature v.143, p.370-380, 1989.
- CONTE, A.J.; TEIXEIRA, A.S.; FIGUEIREDO, A.V.; VITTI, D.M.S.S.; FILHO, J.C.S. Efeito da fitase na biodisponibilidade do fósforo do farelo de arroz em frango de corte. Pesq. Agropec. Bras., v.37, p.547-552, 2002.
- CÚNEO, F.; FARFAN, J.A.; CARRARO, F.. Distribuição dos fitatos em farelo de arroz estabilizado e tratado com fitase exógena. Ciên. Tecnol. Aliment., v.20, p. 94-98, 2000.
- DAS, K.M.; TRIPATHI, S.D. Studies of digestive enzymes of grass carp (*Ctenopharyngodon idella* Val.). Aquaculture, v.92, p.21-32, 1991.
- DUBOIS, M.G.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; ROBERTS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem., v.28, p.350-358. 1956.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Tabela de composição química e valores energéticos de alimentos para suínos e aves. 2.ed. Concórdia: Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves, p.8, 1985
- ESCAFFRE, A.M.; INFANTE, J.L.Z.; CAHU, C.L.; MAMBRINI, M.; BERGOT, P.; KAUSHIK, S.J. Nutritional value of soy protein concentrate for larvae of common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. Aquaculture, v.153, p.63-80, 1997.
- FURUYA, W.M.; GONÇALVES, G.S.; FURUYA, V.R.B.; HAYASHI, C. Fitase na alimentação da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), desempenho e digestibilidade. R. Bras. Zootec., v.30, p.924-929, 2001.
- GONÇALVES, G.S.; PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; KLEEMAN, G.K.; ROCHA, D.F. Efeitos da suplementação de fitase sobre a disponibilidade aparente de Mg, Ca, Zn, Cu, Mn e Fe em alimentos vegetais para Tilápi do Nilo. R. Bras. Zootec., v.34, p.2155-2163, 2005.
- GONÇALVES, G.S.; PEZZATO, L.E.; PADILHA, P.M.; BARROS, M.M.. Disponibilidade aparente do fósforo em alimentos vegetais e suplementação com enzima fitase para tilápia do Nilo. R. Bras. Zootec., v.36, p.1473-1480, 2007.

- HALVER, J.E.; HARDY, R.W. Fish nutrition, Third Edition, Elsevier Science, p.272-278, 2002.
- HUMMEL, B.C.W. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and thrombin. *Can. J. Biochem. Phys.*, v.37, p.1393-1399, 1959.
- JACKSON, L.S.; LI, M.H.; ROBINSON, E.H. Use of microbial phytase in channel catfish *Ictalurus punctatus* diets to improve utilization phytate phosphorus. *J. World Aquacult. Soc.*, v.27, p.309-313, 1996.
- LAZZARI, R.; RADUNZ NETO, J.; CORREIA, V.; SUTILI, F.J.; LORO, V.L.; PRETTO, A.; FILIPETTO, J.E.S. Atividades de proteases em jundiás alimentados com diferentes níveis de proteína e separados por sexo. 1º Congresso Brasileiro de Produção de Peixes Nativos de Água Doce, 2007.
- LUDKE, M.C.M.M.; LÓPEZ, J.; NICOLAIEWSKY, S. Efeito da fitase em dietas com ou sem fosfato inorgânico para suínos em crescimento. *R. Bras. Zootec.*, v.29, p.485-494, 2000.
- LUDKE, M.C.M.M.; LÓPEZ, J.; LUDKE, J.V. ; NICOLAIEWSKY, S. Utilização da fitase em dietas com ou sem farelo de arroz desengordurado para suínos em crescimento/terminação. *R. Bras. Zootec.*, v.31, p.2002-2010, 2002.
- MALLIN, M. A. Impacts of industrial animal production on rivers and estuaries. *AM. Sci.*, v.88, p.26-37, 2000.
- MOREIRA, J.A.; VITTI, D.M.S.S.; TRINDADE NETO, M.A.; LOPES, J.B. Phytase enzyme in diets containing defatted rice bran for growing swine. *Sci. Agric.*, v.60, p.631-636, 2003.
- MUKHOPADHYAY, P.K.; KAUSHIK, S.J. Nutritional requirements of the Indian major carps. *Int. Aqua Feed.*, v.1, p.28-32, 2001.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC (Washington, Estados Unidos). Nutrient requirements of warmwater fishes and shellfishes. 9ed. Washington: National Academy of Sciences, p.102, 1993.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC (Washington, Estados Unidos). Nutrient requirements of poultry. 9ed. Washington: National Academy of Sciences, p.155, 1994.
- OSÓRIO, F.M.F.; MELO, J.S.C.; KULIKOSKY, J.M.; KULIKOSKY, R. Manual programado de piscicultura (cultivo: carpa, nilólita, tilápia, tucunaré). Brasília, Ministério da Agricultura/SEDEAD, v.2, 1978.

- OSTANIN K., HARMS, E.H., STEVIS, P.E., KUCIEL, ZHOU, M., VAN ETTEN, R.L. Overexpression, site-directed mutagenesis and mechanism of *Escherichia coli* acid phosphatase. *J. Biol. Chem.*, v.267, p.22830-22836, 1992.
- REMUS, J. A avicultura e o meio ambiente colhem os benefícios da nova geração de fitases. *Rev. AveWorld - Edição 27*, publicado em 28/05/2008, disponível em <http://www.aveworld.com.br/index.php/documento/3749>, acessado em 30/04/2010.
- RIES, E.F.; MACEDO, G.A. Progressive screening of thermostable yeasts for phytase production. *Food Sci. Biotechnol.*, v.18, p.655-660, 2009.
- SA, L.M. Ingredientes alternativos na alimentação de suínos – economia e segurança. *Poli nutri*, publicado em setembro/2005, disponível em http://www.polinutri.com.br/conteudo_artigos_anteriores_setembro_05.htm, acessado em 06/01/2010.
- SAJJADI, M.; CARTER, C.G. Effect of phytic acid and phytase on feed intake, growth, digestibility na trypsin activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). *Aquacult. Nutr.*, v.10, p.135-142, 2004.
- SCHONS, P.F. Detanificação e desfitinização de grãos de sorgo (*Sorghum bicolor*) por tanase e fitase e estudo biológico. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas/SP, 2009.
- SHIMIZU, M. Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. *Biosci. Biotech. Biochem.*, v.56, p.1266-1269, 1992.
- STOREBAKKEN, T.; SHEARER, K.D.; ROEM, A.J. Availability of protein, phosphorus and other elements in fish meal, soy-protein concentrate and phytase-treated soy-protein-concentrate-based diets to Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, v.161, p.365-379, 1998.
- STOREBAKKEN, T.; REFSTIE, S.; RUYTER, B. Soy products as fat and protein sources in fish feeds for intensive aquaculture. In: Drackley, J.K. (Ed.), *Soy in Animal Nutrition*. Fed. Anim. Sci. Soc. Savoy, p.127–170, 2000.
- VATS, P.; BANERJEE, U.C. Production studies and catalytic properties of phytases (*myo*-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. *Enzyme Microb. Technol.*, v.35, p.3-14, 2004.
- WALSH, G.A.; POWER, R.F.; HEADON, D.R. Enzymes in the animal feed industry. *TIFS*, v.5, p.81-87, 1994.

CONCLUSÕES GERAIS

- Os estudos de leveduras produtoras de fitase disponíveis hoje na literatura são poucos, ressaltando-se ainda o fato da maioria destes empregarem técnicas de recombinação genética e expressão de genes heterólogos. Estes estudos devem ser intensificados dados os relatos de que leveduras constituem fontes importantes e ainda pouco exploradas de fitase termoestável;
- *Saccharomyces cerevisiae* strain zi (EU188613) destaca-se como fonte potencial de fitase além de ser reconhecida como segura para aplicação em alimentos. A seleção de linhagem produtora da enzima foi realizada a 48°C e estudos de caracterização da fitase de *S. cerevisiae* confirmam a ampla faixa de estabilidade térmica. Após estudos de otimização da composição do meio de cultivo e parâmetros da fermentação, a produção de fitase por *S. cerevisiae* aumentou 10 vezes comparada à produção em meio não otimizado. A enzima apresentou ainda atividades altas em ampla faixa de pH e resistência elevada à ação de proteases, características desejáveis para aplicação em ração animal;
- Os testes de aplicação da enzima na elaboração de ração para peixes, por meio de tratamento prévio de ingrediente com alto teor de fitatos – farelo de arroz desengordurado – confirmam a ação efetiva da fitase de *S. cerevisiae* e benefícios da hidrólise do ácido fítico com a liberação de fósforo, dispensando suplementação com fontes externas do mineral;
- Além da contribuição direta pelo estudo da produção de nova fitase de levedura termoestável e potencial aplicação em alimentação animal, adiciona-se a proposta de agregação de valor nutricional ao farelo de arroz e utilização como ingrediente potencial na formulação de rações; e a contribuição ambiental, pela redução de fósforo nas águas decorrente da possibilidade de utilização de fósforo ligado ao fitato pelo animal, e pelo destino alternativo de um subproduto da indústria.

ANEXOS

ANEXO 1 (CAPÍTULO 4) FLUXOGRAMA DE PRODUÇÃO DO EXTRATO DE FITASE DE *S. CEREVISIAE*

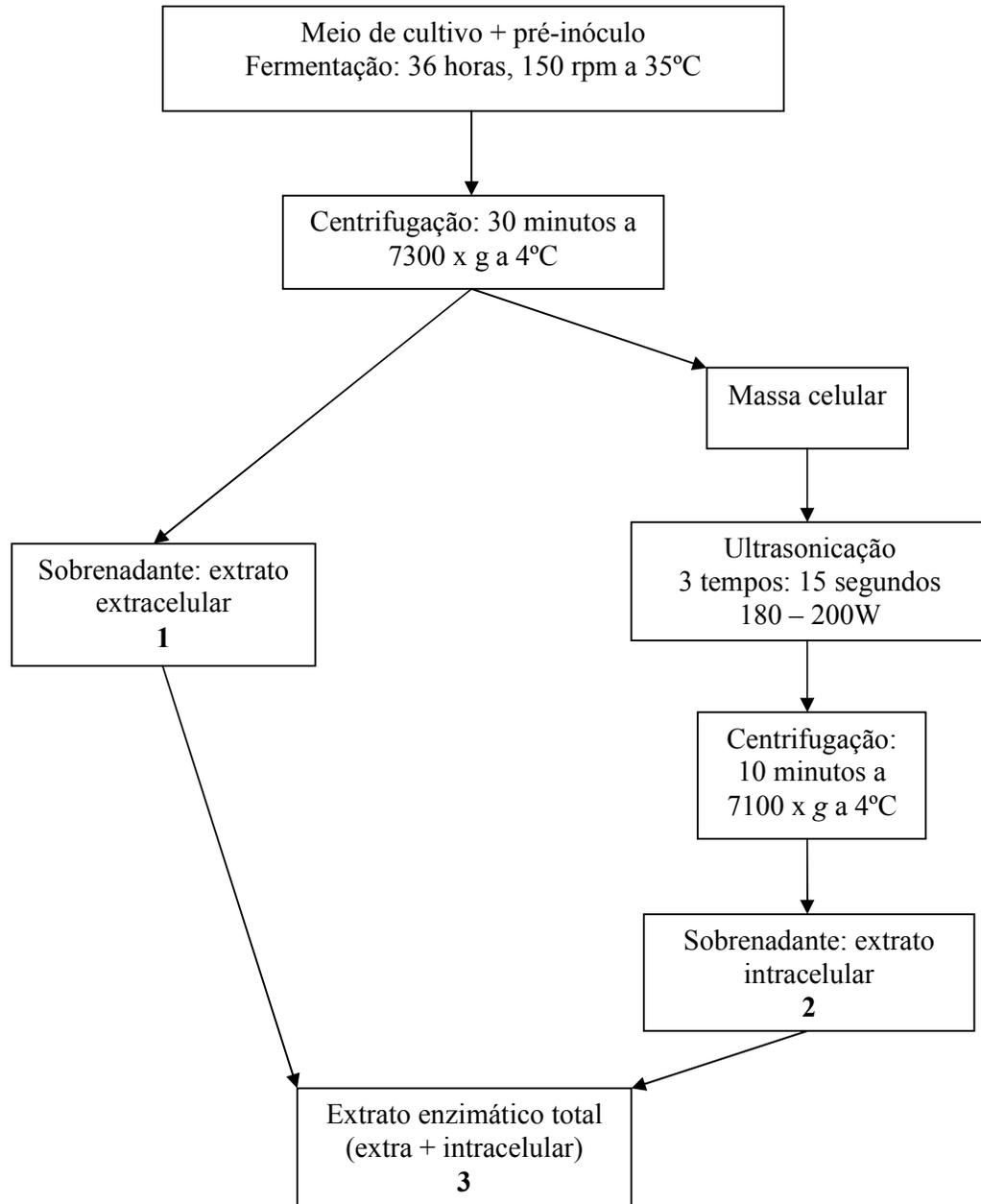


FIGURA 1 FLUXOGRAMA DE PRODUÇÃO DE EXTRATO DE FITASE DE *S. CEREVISIAE*

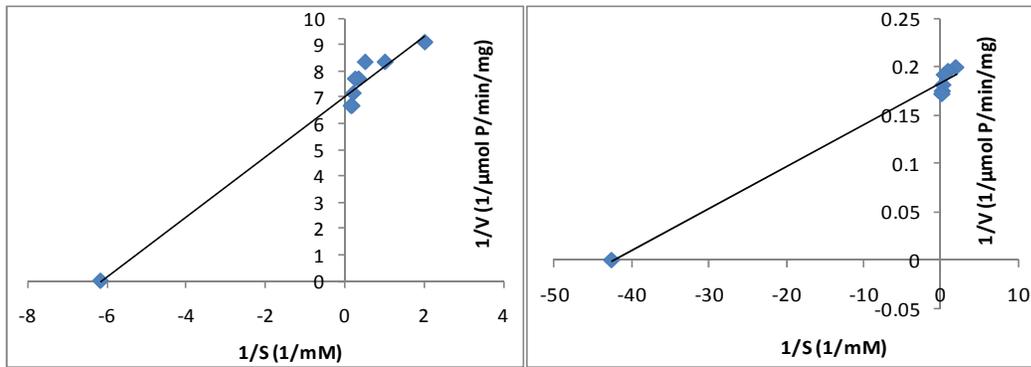
ANEXO 2 (CAPÍTULO 4): DETERMINAÇÕES DE K_m E $V_{m\acute{a}x}$

A maioria das enzimas apresenta cinética do tipo Michaelis-Menten. À medida que a concentração de substrato aumenta, a atividade catalítica de uma concentração fixa de uma enzima aumentará de forma hiperbólica, aproximando-se da velocidade máxima, $V_{m\acute{a}x}$, característica na qual toda a enzima está na forma de complexo ES (enzima-substrato). A concentração de substrato que produz a metade da velocidade máxima é a constante de Michaelis-Menten ou K_m , que é característica para cada enzima, agindo sobre um dado substrato. Todas essas enzimas que exibem uma dependência hiperbólica de V_0 em relação a $[S]$ são ditas seguir a cinética de Michaelis-Menten. A equação de Michaelis-Menten relaciona a velocidade inicial de uma reação enzimática com a concentração do substrato e a $V_{m\acute{a}x}$ através da constante K_m e pode ser transformada algebricamente em formas que são mais úteis na determinação prática de K_m e $V_{m\acute{a}x}$, como equação de Lineweaver-Burk. Para enzimas que obedecem a equação de Michaelis-Menten, obtemos uma linha reta quando $1/V_0 \times 1/[S]$ são lançados no gráfico de Lineweaver-Burk. A linha reta obtida tem inclinação igual a $K_m/V_{m\acute{a}x}$, o intercepto no eixo $1/V_0$ é igual a $1/V_{m\acute{a}x}$ e o intercepto no eixo $1/[S]$ é igual a $-1/K_m$. O gráfico de Lineweaver-Burk tem a vantagem de permitir uma determinação acurada de $V_{m\acute{a}x}$ e K_m , o que pode ser feito apenas aproximadamente em gráficos de $V_0 \times [S]$ (Lehninger *et al.*, 1995).

Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ (Tabela 1) foram determinados para substratos 4-npp e fitato de sódio pelo método gráfico de Lineweaver-Burk, apresentados nas Figuras 1, 2 e 3 para a fitase de *S. cerevisiae*, Natuphos® e Quantum®.

TABELA 1 PARÂMETROS CINÉTICOS DE FITASES EM DIFERENTES SUBSTRATOS

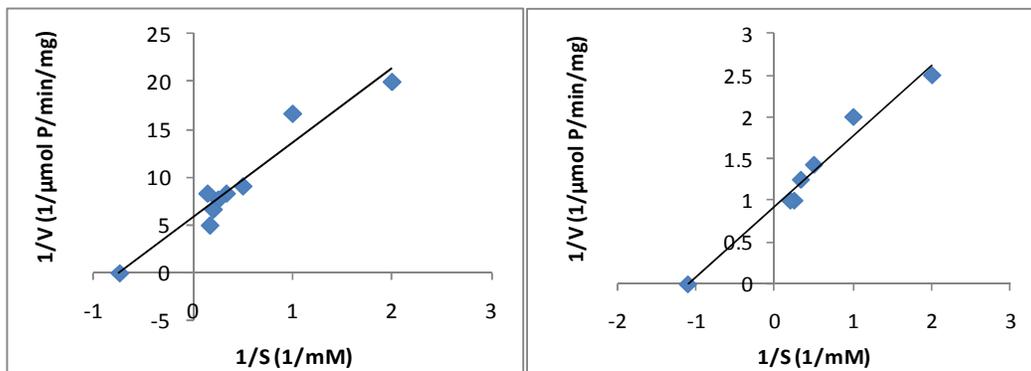
Fitase	Substrato 4-npp		Substrato fitato de sódio	
	K_m (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ (μmol P/min/mg)	K_m (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ (μmol P/min/mg)
<i>S. cerevisiae</i>	0,16	0,14	0,02	5,46
Natuphos®	1,35	0,17	0,91	1,08
Quantum®	3,08	0,75	7,43	7,43



a)

b)

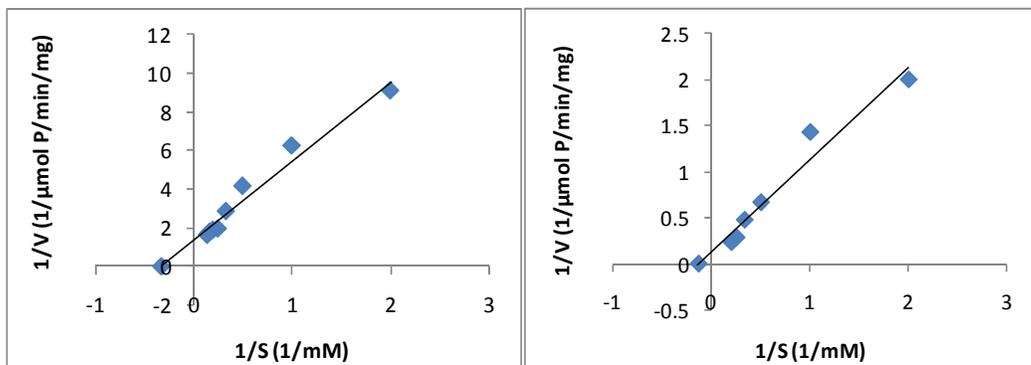
FIGURA 1 GRÁFICO DUPLO RECÍPROCO PARA HIDRÓLISE CATALISADA POR NOVA FITASE DE *S. CEREVISIAE* EM SUBSTRATOS A) 4-NPP E B) FITATO DE SÓDIO



a)

b)

FIGURA 2 GRÁFICO DUPLO RECÍPROCO PARA HIDRÓLISE CATALISADA POR FITASE NATUPHOS® EM SUBSTRATOS A) 4-NPP E B) FITATO DE SÓDIO



a)

b)

FIGURA 3 GRÁFICO DUPLO RECÍPROCO PARA HIDRÓLISE CATALISADA POR FITASE QUANTUM® EM SUBSTRATOS A) 4-NPP E B) FITATO DE SÓDIO

Bibliografia: Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M. Princípios de Bioquímica. São Paulo: Sarvier, 1995.

**ANEXO 3 (CAPÍTULO 5): APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA E
EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL PARA ENSAIO BIOLÓGICO**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA E EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL**

**Emissão de Parecer
05/2010 (2)**

Nº Processo:	23081.003109 /2010-21
Título:	"Estudo da aplicação de fitase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na nutrição de peixes"
Pesquisador Responsável:	Profª. Leila Picoli da Silva
Instituição:	UFSM
Área:	Depto. de Zootecnia - ZOT
Data de Entrada:	03/03/2010
Data do Parecer:	10/05/2010

Termo de compromisso com o bem estar animal:

- Termo de compromisso assinado pelo Coordenador e outros executores do projeto
- Termo de compromisso assinado pelo Coordenador se responsabilizando pelos demais executores do projeto
- Termo de compromisso assinado unicamente pelo Coordenador
- Termo de compromisso ausente no processo

Adequação e relevância do projeto:

- Relevante
- Irrelevante

Caráter do projeto/ Linha de pesquisa quanto aos resultados esperados e benefícios potenciais, para a área em estudo e/ ou setores de aplicação da sociedade brasileira:

- Inovador / novo conceito
- Confirmatório
- Pouco relevante

- O projeto necessita de animais para responder a pergunta científica
 O projeto não necessita de animais e pode ser realizado com metodologia in vitro ou similar

Análise do número de animais a ser utilizado no projeto:

- Adequado
 Inadequado

Base científica para classificar como inadequado e sugestão do número de animais que deverá ser utilizado:

Currículo do pesquisador em relação à área de abrangência do projeto:

- Adequado
 Inadequado

Avaliação global do projeto:

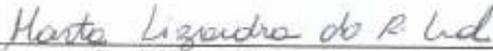
- Aprovado
 Pendente _____

- Reprovado (a proposta não está de acordo com a ética e bem estar animal)

Detalhe os pontos relevantes que o(a) levaram a avaliar negativamente o projeto:

Santa Maria, 10 de Maio de 2010.

Declaramos que o projeto "Estudo da aplicação de fitase de *Saccharomyces cerevisiae* na nutrição de peixes" coordenado pela pesquisadora Prof^a. Leila Picolli da Silva, cumpriu todas as exigências em relação ao Bem Estar Animal.



Prof^a. Marta Lizandra do Rego Leal
Presidente do Comitê de Ética e Experimentação Animal

**OBSERVAÇÃO: ENTREGAR RELATÓRIO AO FINAL DA EXECUÇÃO AO
TÉRMINO DO PROJETO.**