

Avaliação do perfil hidrolítico *in vitro* e atividade anti proteolítica da fitase produzida por *Aspergillus niger* em rações de aves e suínos

Júlio César dos Santos Nascimento¹, Lucilo Bioni da Fonsêca Filho², Gilcifran Prestes de Andrade³, Priscilla Virginio de Albuquerque⁴, Marleyne José Afonso Accioly Lins de Amorim⁵, Maria Eduarda Luiz Coelho de Miranda⁶, Silvia Fernanda de Alcantara⁷, Emanuela Polimeni de Mesquita⁸, Lourival Barros de Sousa Brito Pereira⁹, Ana Lúcia Figueiredo Porto¹⁰

¹Professor do Centro Universitário Maurício de Nassau, Curso de Medicina Veterinária, Recife-PE Brasil. E-mail: juliozootecnista@hotmail.com

²Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife –PE Brasil. E-mail: lucilofilho@gmail.com

³Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife –PE Brasil. E-mail: gilcifran.andrade@ufrpe.br

⁴Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife –PE Brasil. E-mail: priscilla2009w@hotmail.com

⁵Professor Titular da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Tecnologia Rural, Recife-PE Brasil – E-mail: mjaamorim@yahoo.com.br

⁶Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife –PE Brasil. E-mail: eduardamiranda_bio@outlook.com

⁷Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife –PE Brasil. E-mail: alcantarabio35@gmail.com

⁸Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife –PE Brasil. E-mail: polimeni.emanuela@gmail.com

⁹Médico Veterinário, Recife-PE Brasil. E-mail: lorinho2013.1@hotmail.com

¹⁰Professor Titular da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE Brasil. E-mail: analuporto@yahoo.com.br

* Autor para correspondência

RESUMO. Ácido fítico é a maior forma de armazenamento de fósforo em sementes de plantas e está presente como grande parte do fósforo orgânico encontrado no solo. Contudo, o fitato não pode ser diretamente usado por vegetais e alguns animais não ruminantes, tais como suínos, aves e peixes. Fitases formam uma classe de enzimas fosfatases que possui atividade de hidrolisar o fitato e liberar os íons ortofosfatos ligados à estrutura do fitato. Sistema de duas fases aquosas é um método de extração e purificação, o qual está sendo considerado uma alternativa eficaz na redução de etapas dos processos de purificação. O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito do extrato enzimático pré-purificado e extrato pós-purificado em S DFA PEG/citrato na hidrólise do ácido fítico em rações comerciais para aves e para suínos, bem como estudar a atividade anti-proteolítica da enzima frente à ação da pepsina e tripsina. Observa-se que a enzima pré-purificada foi inibida em concentrações de fósforo de 6 μ moles de PO_4^{2-} , entretanto a fitase pós-purificada em S DFA PEG/citrato foi inibida em concentração de fósforo menor do que a pré-purificada. O tratamento enzimático das rações comerciais de aves e suínos utilizando a fitase de *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 foi bastante promissor, pois se mostrou-se eficiente na hidrólise do fitato, liberando aproximadamente 6 μ moles de PO_4^{2-} , entretanto com 4 U/mL de enzima em 8 minutos de incubação. A fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 mostrou-se com bom desempenho na resistência proteolítica, bem como na hidrólise do fitato em rações comerciais de aves e suínos, características bioquímicas essenciais para uma enzima com potencial aplicação industrial.

Palavras-chave: *Aspergillus niger*, fitato, resistência proteolítica

Evaluation of in vitro hydrolytic profile and anti-proteolytic activity of phytase produced by Aspergillus niger in poultry and pork rations

ABSTRACT. Phytic acid is the largest form of phosphorus storage in plant seeds and is present as a large part of the organic phosphorus found in soil. However, phytate cannot be directly used by plants and some non-ruminant animals, such as pigs, birds and fish. Phytases form a class of phosphatase enzymes that have the activity of hydrolyzing phytate and releasing the orthophosphate ions bound to phytate estrus. Aqueous two-phase system

is a method of extraction and purification, which is being considered an effective alternative in reducing steps of the purification processes. The objective of this work was to analyze the effect of pre-purified enzyme extract and post-purified extract on PEG / citrate SDFA on hydrolysis of phytic acid in commercial poultry and pork feeds, as well as to study the anti-proteolytic activity of the enzyme action of pepsin and trypsin. It is observed that the pre-purified enzyme was inhibited at phosphorus concentrations of 6 μmol of PO_4^{2-} , however the phytase after purified in PEG / citrate SDFA was inhibited at a lower phosphorus concentration than the pre-purified one. The enzymatic treatment of commercial poultry and pork rations using phytase from *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 was very promising, as it proved to be efficient in the phytate hydrolysis, releasing approximately 6 μmol of PO_4^{2-} , however with 4 U / mL of enzyme in 8 minutes of incubation. Phytase produced by *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 showed good performance in proteolytic resistance, as well as in phytate hydrolysis in commercial poultry and pork feeds, essential biochemical characteristics for an enzyme with potential industrial application.

Keywords: *Aspergillus niger*, phytase, phytate, hydrolytic profile, proteolytic resistance

Evaluación del perfil hidrolítico in vitro y actividad anti proteolítica de la fitasa producida por Aspergillus niger en raciones de aves y cerdos

RESUMEN. El ácido fítico es la mayor forma de almacenamiento de fósforo en semillas de plantas y está presente como gran parte del fósforo orgánico encontrado en el suelo. Sin embargo, el fitato no puede ser utilizado directamente por vegetales y algunos animales no rumiantes, como porcinos, aves y peces. Las cintas forman una clase de enzimas fosfatasa que tienen actividad de hidrolizar el fitato y liberar los iones ortofosfatos ligados a la estructura del fitato. El sistema de dos fases acuosas es un método de extracción y purificación, el cual está siendo considerado una alternativa eficaz en la reducción de etapas de los procesos de purificación. El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto del extracto enzimático pre-purificado y extracto post-purificado en SDFA PEG / citrato en la hidrólisis del ácido fítico en raciones comerciales para aves y para cerdos, así como estudiar la actividad anti-proteolítica de la enzima frente a la acción de la pepsina y tripsina. Se observa que la enzima pre-purificada fue inhibida en concentraciones de fósforo de 6 μmoles de PO_4^{2-} , sin embargo, la fitasa post-purificada en SDFA PEG / citrato fue inhibida en concentración de fósforo menor que la pre-purificada. El tratamiento enzimático de las raciones comerciales de aves y cerdos utilizando la fitasa de *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 fue bastante prometedor, pues se mostró eficiente en la hidrólisis del fitato, liberando aproximadamente 6 μmoles de PO_4^{2-} , sin embargo, con 4 U / mL de enzima en 8 minutos de incubación. La fitasa producida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 se mostró con buen desempeño en la resistencia proteolítica, así como en la hidrólisis del fitato en raciones comerciales de aves y porcinos, características bioquímicas esenciales para una enzima con potencial aplicación industrial.

Palabras clave: *Aspergillus niger*, fitasa, fitato, perfil hidrolítico, resistencia proteolítica

Introdução

Ácido fítico é a maior forma de armazenamento de fósforo em sementes de plantas e está presente como grande parte do fósforo orgânico encontrado no solo ([Silva et al. 2003](#)). Contudo, o fitato não pode ser diretamente usado por vegetais e alguns animais não ruminantes, tais como suínos, aves e peixes, e inclusive também o ser humano, fósforo este que se acumula no solo causando uma contaminação ambiental ([Johnson et al. 2010](#); [Fan et al. 2013](#)).

Fitases formam uma classe de enzimas fosfatases que possui atividade de hidrolisar o fitato e liberar os íons ortofosfatos ligados à estrutura do ácido fítico, fosfatídeos de inositol e inositol ([Fan et al. 2013](#)). Além disso, fitase tem sido utilizada como suplemento alimentar de aves e suínos com o objetivo de melhorar a qualidade nutricional dos alimentos ricos em fitato e eventualmente redução da poluição ambiental ([Acuña et al. 2011](#)). Fitases são principalmente encontradas em plantas, microrganismos, e bem como em alguns animais ([Dai et al. 2011](#)).

Estudos têm sido conduzidos acerca da utilização de enzimas exógenas na alimentação de animais não ruminantes, com o intuito de melhorar a digestão e absorção. Há um destaque para o uso de fitases, que tem se destacado para aplicação, principalmente, em rações de aves e suínos (Abioye et al. 2010; Ramos et al. 2012). Em escala industrial utilizam-se microrganismos para a produção das fitases a partir de diferentes processos fermentativos (Fan et al. 2013). Os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* são os microrganismos mais utilizados para a produção industrial de fitases comerciais, de acordo com Vats and Banerjee (2004). Para que enzimas sejam utilizadas industrialmente uma das características bioquímicas mais apreciada é a estabilidade quanto às condições de reação, sem que ocorram perdas significativas em sua atividade catalítica (Shah & Madamwar 2005).

O custo do processo produtivo e purificação de uma enzima é o principal entrave para a aplicação dos produtos enzimáticos às indústrias. Com o objetivo de aumentar o rendimento da produção enzimática é necessário otimizar os processos e aumentar o escalonamento de produção das enzimas (Raj et al. 2012). Entretanto, para que um bio-produto seja comercializado, é necessário que ele esteja puro ou parcialmente purificado. Diante do exposto, diversos métodos de extração e purificação vêm sendo estudados. Dentre estes, tem-se a bio-conversão ou fermentação extrativa utilizando sistema de duas fases aquosas (SDFA), o qual está sendo considerado uma alternativa eficaz na redução de etapas dos processos de purificação, reduzindo desta maneira o custo para obtenção do produto final (Nalinanon et al. 2009).

A fermentação extrativa é um processo de produção e recuperação integrada e simultânea de bio-produtos. O SDFA é formado pela mistura de duas soluções aquosas de (polímeros-polímero ou polímero-sal) acima de certa concentração crítica, indicada por um diagrama de fases em que a formação de duas fases aquosas imiscíveis é observada. Em um comportamento desejável, espera-se que os componentes do meio devam se concentrar em uma das fases do sistema, enquanto que a biomolécula-alvo deva preferir a fase oposta. Esse comportamento facilita a extração do produto, levando-o a uma purificação parcial e eliminando a influência de inibidores presentes no processo (Ng et al. 2013).

O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito do extrato bruto enzimático (pré-purificado) e

extrato pós purificado em SDFA PEG/citrato na hidrólise do ácido fítico em rações comerciais para aves e para suínos, bem como estudar a atividade anti-proteolítica do extrato bruto enzimático (pré-purificado) e extrato pós-purificado em SDFA PEG/citrato frente à ação da pepsina e tripsina.

Material e Métodos

Microrganismo

O fungo utilizado para a produção da fitase foi *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924, o qual foi obtido da coleção de culturas URM do Departamento de Micologia (Universidade Federal de Pernambuco). O meio de cultura utilizado para a manutenção do micro-organismo foi o ágar extrato de malte. O meio de cultura utilizado para esporulação foi o BDA. A esterilização dos meios de cultura foi realizada em autoclave a 121° C, 1 atm de pressão, durante 20 minutos. As culturas foram incubadas em estufa microbiológica a 30° C por sete dias.

Produção do extrato bruto enzimático pré-purificado

A produção do extrato bruto enzimático (pré-purificado) foi realizada em *erlenmayers* (250 mL) contendo meio de cultura com a seguinte composição: farelo de arroz 1.0% (m/v), como fonte de carbono, milhocina 3.0% (v/v) como fonte de nitrogênio, 0.5 g/L KCl, 1.5 g/L MgSO₄.7H₂O, 2.0 g/L CaCl₂.2H₂O, 1.5 g/L Fe₂SO₄.7H₂O, diluídos em tampão acetato 0.2 M pH 4.0. Os meios de culturas foram esterelizados em autoclave a 121° C por 20 minutos. Em seguida, procedeu-se o inóculo com concentração final de esporos em 10⁶ esporos/mL. Os frascos foram incubados em agitador orbital a 30° C, 100 rpm por 96 horas de cultivo.

Produção do extrato bruto pós-purificado em SDFA

A produção do extrato enzimático pós-purificado foi preparado utilizando *Erlenmayers* (250 mL), solução de citrato e solução de PEG e acrescido de meio de cultura descrito no item anterior. A composição do sistema foi a seguinte: massa molar do PEG (M_{PEG} , 8000 g/mol), concentração do PEG (C_{PEG} , 20 m/m), concentração de citrato (C_{CIT} , 20,0% m/m), pH (6,0) e agitação (100 rpm). Água ultrapura foi adicionada para um sistema com volume final de 50 mL e inóculo com concentração de 10⁶ esporos/mL. Após a pesagem das soluções que formam os sistemas, agitou-se em vortex por 1 minuto e foram autoclavados a

121°C por 20 minutos. Os sistemas foram incubados em agitador orbital a 30°C. Ao final do processo, os *erlenmeyers* foram mantidos em repouso por 2 h para separação das fases que foram posteriormente centrifugadas separadamente a 11.000 xg por 20 minutos para obtenção da fase superior (rica em PEG) e as fases foram submetidas às determinações analíticas.

Determinação da atividade fitásica

A atividade fitásica foi determinada pela utilização do método do molibdato de amônio modificado, de acordo com [Heinonen and Lahti \(1981\)](#). Tampão acetato de sódio (350 µL at 0.2 M, pH 4.8) diluído em fitato de sódio (875 nmol), utilizado como substrato. Após uma pré-incubação a 37°C por 10 min, a reação enzimática foi iniciada pela adição de 50 µL do extrato bruto enzimático. A solução foi incubada por 30 min a 37°C. Com o objetivo de estimar a quantidade de fosfato inorgânico liberado em catálise, 1.5 mL de uma solução de acetona: 2.5 M H₂SO₄: 10 mM molibdato de amônio (2:1:1 v/v/v) previamente preparada, e acrescido de 100 µL de ácido cítrico ao volume final. A absorbância foi medida a 355 nm após 10 min de reação. Uma unidade de foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de fosfato inorgânico por minutos sob as condições padrão de ensaio. A atividade enzimática foi expressa em unidades por mL (U/mL). A curva-padrão foi realizada utilizando solução de fosfato de potássio dibásico de 10 to 600 µM de fosfato por mL. O conteúdo de fosfato inorgânico presente no meio de cultura antes do inóculo do microrganismo foi determinado com o objetivo de diminuir as interferências que os resíduos de Pi podem causar nas análises de atividade enzimática.

Determinação quantitativa do fósforo inorgânico

O fósforo inorgânico do extrato enzimático foi determinado utilizando água ultrapura (350 µL) mais o extrato enzimático (50 µL) acrescido da solução AAM e ácido cítrico 1,0 M como descrito pelo método anteriormente citado. A quantidade de fósforo total para o cálculo da atividade fitásica foi o valor obtido no ensaio da determinação quantitativa subtraído da quantidade de fósforo inorgânico contido no extrato bruto. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Determinação da atividade anti proteolítica

A resistência da fitase pré-purificada e pós-purificada em SDFA frente à pepsina gástrica e

tripsina foi realizada de acordo com [Zhang et al. \(2010\)](#) e algumas modificações. As amostras foram liofilizadas e foram diluídas na seguinte forma: 0,2 µg/mL, pepsina/enzima na proporção 1:1 v/v em tampão glicina-HCl 0,1 M (pH 2,5) e 0,2 µg/mL na proporção 1:1 (v/v) em tampão TRIS-HCl 0,1 M (pH 8,0). As amostras foram incubadas por até 60 minutos a 37°C. Como controle, os extratos enzimáticos foram incubados nas mesmas condições; entretanto sem adição das enzimas pepsina e tripsina. A pepsina e tripsina utilizados foram da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). A atividade residual da fitase foi realizada de acordo com o ensaio descrito anteriormente.

Hidrolise in vitro em rações comerciais de aves e suínos

Com o objetivo de avaliar o efeito das propriedades catalíticas da fitase pré-purificada e após a purificação em SDFA, rações comerciais de aves e suínos foram utilizadas. Após pesar 1,0 grama de amostra das rações, as mesmas foram auto clavadas (121°C por 15 minutos) e posteriormente foram diluídas em 5,0 mL de tampão glicina - HCl 0,1 M (pH 2,5) em frascos shot de 50 mL e adicionada à mistura extratos pré e pós purificados da enzima (5 U/mL). Para manter o controle experimental, amostras de ração auto clavadas foram incubadas com água ultrapura (sem o extrato enzimático). Os frascos shot foram incubados em agitador orbital (50°C a 200 rpm). Alíquotas foram retiradas até 8h de incubação, sendo armazenadas a 4°C e posteriormente centrifugadas (5000 x g, 15 minutos, a 4°C). Coletou-se o sobrenadante após a centrifugação, o qual foi utilizado para quantificação do fósforo inorgânico através da reação colorimétrica, de acordo com a metodologia de determinação anteriormente descrita.

Resultados e Discussão

Atividade anti-proteolítica

[A Figura 1](#) representa a atividade residual (%) da fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 após ser submetida a ação proteolítica da pepsina gástrica e tripsina entérica. A atividade residual é definida como a porcentagem de atividade catalítica que uma enzima apresenta após ser submetida a um tratamento experimental ao longo do tempo. A atividade catalítica da enzima no tempo inicial é considerada como 100%, e a partir deste ponto se calcula a atividade remanescente.

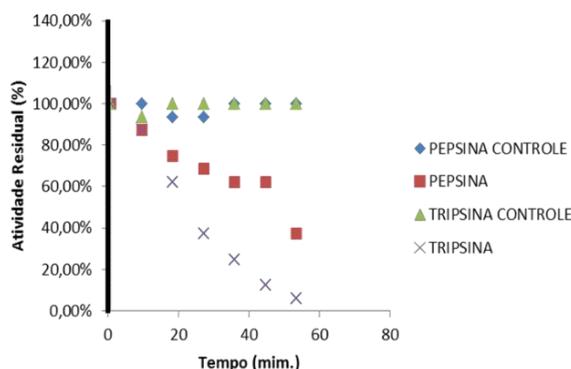


Figura 1. Atividade da fitase (U/mL) produzida por *Aspergillus niger* var. *phoenicis* URM 4924 tratada com enzimas proteolíticas (pepsina e tripsina).

Em comparação com os tratamentos controle, a fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 manteve 60,0% da sua atividade residual por 40 minutos. No entanto, quando exposta a atividade proteolítica da tripsina entérica, a fitase manteve aproximadamente 20,0% da atividade residual.

Zhang et al. (2010) estudaram sobre a resistência à proteólise da fitase de *Aspergillus niger*. Os mesmos autores relataram que a fitase estudada apresentou 90% da atividade residual quando expostas a atividade proteolítica da pepsina e tripsina por 20 minutos. Neste trabalho a fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 apresentou aproximadamente 70,0% da atividade residual quando submetida ao tratamento com pepsina. Fugthong et al. (2010) estudaram a resistência proteolítica da fitase extracelular e recombinante produzida por *Eupenicillium parvum* BCC 17694. Os autores concluíram que esta enzima apresentou-se como pouco resistente em relação a resistência à proteólise da pepsina e tripsina, mantendo cerca de 30,0% da atividade residual após 2 horas de exposição à tripsina entérica. No presente a estudo a fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 apresentou 40,0% da atividade residual após 2 horas de exposição a pepsina gástrica suína. Estes resultados corroboram como Wang et al. (2007), os quais investigaram sobre a resistência proteolítica da fitase produzida por *Aspergillus fumigatus* WY-2, enzima esta que se mostrou sensível a ação proteolítica da tripsina, apresentando 30,0% da atividade residual após 2 h de incubação com extratos purificados de tripsina.

De acordo com Cao et al. (2007), a termo estabilidade e a resistência à proteólise estão entre as características bioquímicas mais importantes

em relação à utilização comercial das fitases, devido as elevadas temperaturas adotadas nos processamentos das rações para aves e suínos, e também por causa da ação catalítica das enzimas digestivas durante à passagem pelo trato gastrointestinal dos animais. Estes resultados mostram que a fitase em estudo possui características de resistência proteolítica compatíveis com outras fitases microbianas em estudo, e apresenta-se como uma enzima com uso potencial em ração animal.

Hidrólise *in vitro* do fitato em ração em ração comercial de aves e suínos

A Figura 2A e 2B representam o perfil hidrolítico da fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 em ração comercial de aves, utilizando a enzima pré purificada e a pós-purificada utilizando S DFA PEG/citrato, respectivamente.

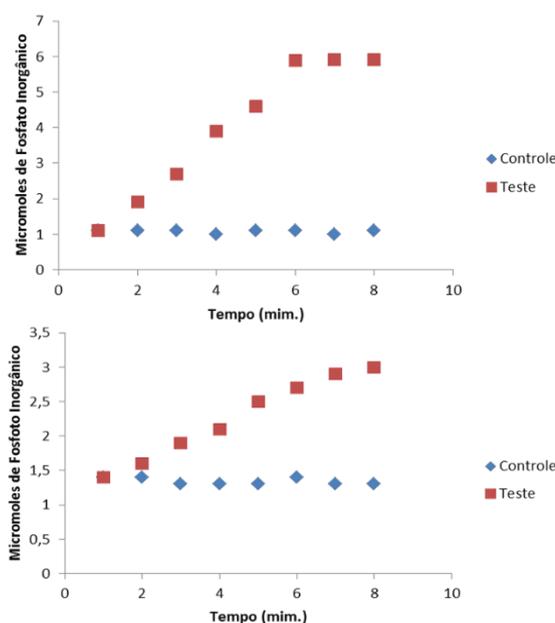


Figura 2. A) Perfil hidrolítico da fitase pré-purificada produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 e em ração comercial de aves ($\mu\text{moles de PO}_4^{2-}/\text{mim}$); B) Perfil hidrolítico da fitase pós-purificada em S DFA PEG/citrato produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 em ração comercial de aves ($\mu\text{moles PO}_4^{2-}/\text{mim}$).

A enzima fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 apresentou-se eficaz na liberação do fósforo fítico em rações de aves comerciais, tanto na forma pré-purificada, quanto após a extração e purificação utilizando sistemas de duas fases aquosas PEG/citrato. Através da Figura 2A e 2B nota-se que a hidrólise da enzima pré-purificada foi mais efetiva, pois aos 6 minutos de hidrólise a enzima liberou aproximadamente 6

μmoles de PO_4^{2-} , enquanto a enzima pré-purificada liberou 3 μmoles de PO_4^{2-} do fitato da ração em 8 minutos de reação enzimática. Observa-se também que a enzima pré-purificada foi inibida em concentrações de fósforo de 6 μmoles de PO_4^{2-} (após minutos de reação), entretanto a fitase pós-purificada em S DFA PEG/citrato foi inibida em concentração de fósforo menor do que a pré-purificada (3 μmoles de PO_4^{2-} após 8 minutos de reação enzimática).

De acordo com [Vats et al. \(2009\)](#) que estudaram sobre a utilização de fitase produzida por *Aspergillus niger* van Teighem na hidrólise do fitato em rações comerciais, conseguindo uma liberação de 48 nm de PO_4^{2-} a 55°C. Estes dados são diferentes aos encontrados neste trabalho. Entretanto, os resultados obtidos neste trabalho mostram o potencial hidrolítico da fitase em estudo. Na [Figura 3A e 3B](#) está representado o perfil hidrolítico da fitase pré-purificada e pós-purificada em S DFA/PEG citrato produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 em ração comercial de suínos (μmoles de $\text{PO}_4^{2-}/\text{mim}$).

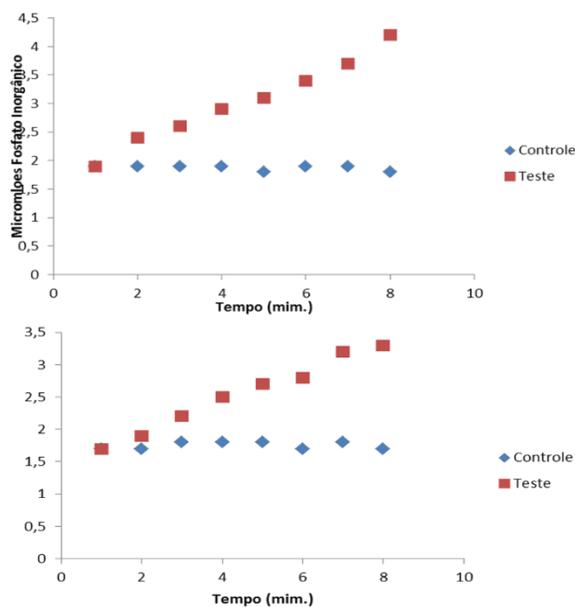


Figura 3. A) Perfil hidrolítico da fitase pré-purificada produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 em ração comercial de suínos (μmoles de $\text{PO}_4^{2-}/\text{mim}$); B) Perfil hidrolítico da fitase pós-purificada em S DFA PEG/citrato produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 em ração comercial de suínos ($\mu\text{moles PO}_4^{2-}/\text{mim}$).

A fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* URM 4924 mostrou-se eficiente na liberação do fósforo fítico em ração comercial de suínos, tanto na forma pré-purificada, quanto após a extração e purificação utilizando sistemas de duas fases aquosas PEG/citrato (4,5 $\mu\text{moles PO}_4^{2-}$ para a

fitase pré-purificada e 3,4 $\mu\text{moles PO}_4^{2-}$ para a fitase pós-purificada em S DFA PEG/citrato). No entanto, a hidrólise em ração comercial de aves foi mais efetiva quando comparada a hidrólise em ração comercial de suínos.

[Ramos et al. \(2012\)](#) investigaram o potencial de hidrólise da fitase produzida por *A. niger* 11T53A9 em farinha de sorgo. O tratamento enzimático da farinha de sorgo com 400 e 800U/kg da fitase de *A. niger* 11T53A9 foi capaz de hidrolisar 88 e 93% do ácido fítico presente na farinha de sorgo, reduzindo-o drasticamente nos tempos de 4 e 3 horas, respectivamente, enquanto o efeito da enzima comercial, nas mesmas concentrações, foi de 57,6 e 59,4% em 6 horas de hidrólise.

[Costa et al. \(2007\)](#) ressaltaram que diversas pesquisas têm sido realizadas adicionando-se fitase à matéria-prima ou à ração, principalmente quando se trata de nutrição animal, para que tenha ação hidrolítica no trato gastrointestinal. Porém, outra estratégia pode ser utilizada, trata-se da incubação *in vitro* da matéria-prima contendo fitase exógena para obtenção de produtos de origem vegetal com baixo teor de fitato.

Considerações Finais

A fitase produzida por *A. niger* var. *phoenicis* mostrou-se com bom desempenho na resistência proteolítica, bem como na hidrólise do fitato em rações comerciais de aves e suínos, características bioquímicas essenciais para uma enzima com potencial aplicação industrial.

Referências Bibliográficas

- Abioye S., Ige D., Akinremi O., Nyachoti M. & Flaten D. 2010. Characterizing fecal and manure phosphorus from pigs fed phytase supplemented diets. *Journal of Agricultural Science* **2**, 3-12.
- Acuña J., J., Jorquera M., A., Martínez O., A., Menezes-Blackburn D., Fernández M., T., Marschner P., Greiner R. & Mora M., L., 2011. Indole acetic acid and phytase activity produced by rhizosphere bacilli as affected by pH and metals. *Journal of soil science and plant nutrition* **11**, 1-12.
- Cao L., Wang W., Yang C., Yang Y., Diana J., Yakupitiyage A., Luo Z. & Li D. 2007. Application of microbial phytase in fish feed. *Enzyme and microbial technology* **40**, 497-507.
- Costa F.G.P., Brandão P.A., Brandão J.S. & Silva J.H.V. 2007. Efeito da enzima fitase nas rações

- de frangos de corte, durante as fases pré-inicial e inicial. *Ciência e Agrotecnologia* **31**, 865-70.
- Dai F., Qiu L., Ye L., Wu D., Zhou M. & Zhang G. 2011. Identification of a phytase gene in barley (*Hordeum vulgare* L.). *PloS one* **6**, e18829.
- Fan C.-M., Wang Y.-H., Zheng C.-Y. & Fu Y.-F. 2013. Fingerprint motifs of phytases. *African Journal of Biotechnology* **12**, 1138-47.
- Fugthong A., Boonyapakron K., Sornlek W., Tananongpipat S., Eurwilaichitr L. & Pootanakit K. 2010. Biochemical characterization and in vitro digestibility assay of *Eupenicillium parvum* (BCC17694) phytase expressed in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification* **70**, 60-7.
- Heinonen J.K. & Lahti R.J. 1981. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Analytical biochemistry* **113**, 313-7.
- Johnson S.C., Yang M. & Murthy P.P.N. 2010. Heterologous expression and functional characterization of a plant alkaline phytase in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification* **74**, 196-203.
- Nalinanon S., Benjakul S., Visessanguan W. & Kishimura H. 2009. Partitioning of protease from stomach of albacore tuna (*Thunnus alalunga*) by aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry* **44**, 471-6.
- Ng H.S., Ooi C.W., Mokhtar M.N., Show P.L., Ariff A., Tan J.S., Ng E.-P. & Ling T.C. 2013. Extractive bioconversion of cyclodextrins by *Bacillus cereus* cyclodextrin glycosyltransferase in aqueous two-phase system. *Bioresource Technology* **142**, 723-6.
- Raj A., Khess N., Pujari N., Bhattacharya S., Das A. & Rajan S.S. 2012. Enhancement of protease production by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from dairy effluent sludge and determination of its fibrinolytic potential. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **2**, S1845-S51.
- Ramos G.D.M., Ascheri J.R., Silva L.G., Damaso M.C.T., Sousa G.F. & Couri S. 2012. Estabilidade da fitase de *Aspergillus Níger* 11T53A9 ao armazenamento e sua aplicação na hidrólise do ácido fítico na farinha de sorgo. *Current Agricultural Science and Technology* **18**, 95-106.
- Shah A.R. & Madamwar D. 2005. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. *Process Biochemistry* **40**, 1763-71.
- Silva M.A., Nóbrega J.C.A., Curi N., Siqueira J.O., Sá J.J.G., Marques M. & Motta P.E.F. 2003. Frações de fósforo em Latossolos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **38**, 1197-207.
- Vats P. & Banerjee U.C. 2004. Production studies and catalytic properties of phytases (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. *Enzyme and microbial technology* **35**, 3-14.
- Vats P., Bhushan B. & Banerjee U.C. 2009. Studies on the dephosphorylation of phytic acid in livestock feed using phytase from *Aspergillus niger* van Teighem. *Bioresource Technology* **100**, 287-91.
- Wang Y., Gao X., Su Q., Wu W. & An L. 2007. Cloning, expression, and enzyme characterization of an acid heat-stable phytase from *Aspergillus fumigatus* WY-2. *Current microbiology* **55**, 65-70.
- Zhang G.Q., Dong X.F., Wang Z.H., Zhang Q., Wang H.X. & Tong J.M. 2010. Purification, characterization, and cloning of a novel phytase with low pH optimum and strong proteolysis resistance from *Aspergillus ficuum* NTG-23. *Bioresource Technology* **101**, 4125-31.

Article History:

Received 18 April 2018

Accepted 3 May 2018

Available online 12 June 2018

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 4.0, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.