
Parámetros cinéticos de la fitasa extracelular de *Penicillium expansum*

N. Canquill¹, M. Villarroel^{1,2}, S. Bravo¹, C. Vergara¹, C. Shene^{1,2*}.

¹Departamento de Ingeniería Química, Universidad de La Frontera, Casilla 54-D, Temuco, Chile.

²Centro de Genómica Nutricional Agroacuícola. Unidad de Tecnología y Procesos. Universidad de La Frontera. Casilla 54-D. Temuco. Chile.

*Kinetic parameters of the extracellular phytase from *Penicillium expansum**

*Paràmetres cinètics de la fitasa extracel·lular de *Penicillium expansum**

Recibido: 10 de octubre de 2007; revisado: 16 de mayo de 2008; aceptado: 4 de agosto de 2008

RESUMEN

En este trabajo se presenta la caracterización bioquímica de la hidrólisis del ácido fítico por la enzima producida por una cepa nativa de *Penicillium expansum*. La fitasa de *P. expansum* es sintetizada durante la fase estacionaria, cuando el crecimiento tiene lugar en extracto de malta. El peso molecular de la enzima fue entre 35 y 45 kDa (SDS-PAGE). Las condiciones óptimas de pH y temperatura para la hidrólisis del ácido fítico (277 nkat por mg de proteína) fueron 2,5 y 40 °C, respectivamente. La enzima es térmicamente inestable; un 32 % de actividad fue retenida cuando la proteína se incubó a 80 °C durante 400 s. Los valores de los parámetros cinéticos de V_{max} (55,01 nkat por mg de proteína) y K_m (0,549 mM) fueron estimados para concentraciones de ácido fítico inferiores a 3,5 mM. A mayores concentraciones del ácido fítico (3,5 - 10 mM) se observó una importante disminución de la velocidad de hidrólisis, no registrándose actividad a concentración de 10 mM.

Palabras clave: *Penicillium expansum*. Fitasa. Ácido fítico. Parámetros cinéticos.

SUMMARY

The biochemical characterization of the phytase from a native strain of *P. expansum* is presented. The enzyme is produced in the stationary growth rate phase when the culture media was malt extract. The enzyme showed a molecular weight between 35 and 45 kDa by SDS-PAGE. Optimal pH and temperature for phytic acid hydrolysis were 2.5 and 40 °C, respectively. The enzyme was highly sensitive to temperature; residual activity was 32% when the protein was incubated at 80 °C for 400 s. Values for V_{max} (55.01 nkat per mg of protein) and K_m (0.549 mM)

were estimated from data obtained with phytic acid concentrations lower than 3.5 mM. Higher substrate concentrations (3.5 - 10 mM) significantly decreased the hydrolysis rate and at the highest concentration no activity was observed.

Key words: *Penicillium expansum*. Phytase. Phytic acid. Kinetic parameters.

RESUM

En aquest treball, es presenta la caracterització bioquímica de la hidròlisi de l'àcid fític per l'enzim produït per una soca nativa de *Penicillium expansum*. La fitasa de *P. expansum* es sintetitza durant la fase estacionària, quan el creixement té lloc en extract de malt. El pes molecular de l'enzim és entre 35 i 45 kDa (SDS-PAGE). Les condicions òptimes de pH i temperatura per a la hidròlisi de l'àcid fític (277 nkat per mg de proteïna) són 2,5 i 40 °C, respectivament. L'enzim és tèrmicament inestable; un 32 % d'activitat és retinguda quan la proteïna s'incuba a 80 °C durant 400 s. Els valors dels paràmetres cinètics de V_{max} (55,01 nkat per mg de proteïna) i K_m (0,549 mM) s'estimen per a concentracions d'àcid fític inferiors a 3,5 mM. A concentracions superiors de l'àcid fític (3,5 - 10 mM), s'observa una important disminució de la velocitat d'hidròlisi, no registrant-se activitat a concentració de 10 mM.

Mots clau: *Penicillium expansum*. Fitasa. Àcid fític. Paràmetres cinètics.

* Autor de correspondència.

E-mail: cshene@ufro.cl. Teléfono: 56 45 325491.

Fax: 56 45 325053

INTRODUCCIÓN

Las fitasas pertenece al grupo de fosfatasa capaces de hidrolizar los fitatos. Estas enzimas han llamado la atención ya que son capaces de generar fósforo disponible y reducir los efectos antinutricionales de los fitatos, por lo que pueden ser usadas como aditivos en la producción de alimentos para animales. Las características de las enzimas destinadas a tales usos son elevada actividad y estabilidad térmica, requerida para productos cuyo procesamiento involucra una etapa de extrusión.

El fósforo es un elemento necesario para la construcción de diferentes moléculas biológicas (ADN, ARN, proteínas y polisacáridos) por lo que las fosfatasa se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza (plantas, ciertos tejidos de animales y microorganismos, particularmente los hongos). Dependiendo del enlace fosfo-éster hidrolizado, las fitasas se clasifican como 3-fitasas (EC 3.1.3.8), 4-fitasas y 6-fitasas (EC 3.1.3.26). De las diversas fitasas reportadas, las histidinas ácido fosfatasa phyA y phyB, son las mejor caracterizadas. Estas dos fitasas difieren en el pH al que alcanzan la óptima actividad catalítica. La enzima phyA posee dos óptimos de pH (5 y 2,5) en tanto el pH óptimo de phyB es 5. Otra diferencia es la mayor especificidad de phyA por el sustrato^(1,2). Estas diferencias son explicadas debido a la distribución de cargas en el sitio de unión del sustrato⁽³⁾.

Penicillium expansum Link, es un hongo fitopatógeno que posee un amplio rango de hospederos. Se ha señalado como responsable de enfermedades en 21 géneros de plantas, siendo las frutas cítricas la excepción⁽⁴⁾. Como otros hongos azules *P. expansum* es un parásito que infecta a través de zonas con daño mecánico, heridas y lesiones causadas por insectos o durante la recolección de frutos. Varias enzimas hidrolíticas sintetizada por *P. expansum* han sido estudiadas, polygalacturonasa⁽⁵⁾, pectinasa⁽⁶⁾, β -glicosidasa⁽⁷⁾, pectina liasa⁽⁸⁾ y lipasa⁽⁹⁾. En este trabajo se caracteriza la enzima extracelular, con actividad sobre ácido fítico, producida por una cepa nativa de *P. expansum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo y condiciones de crecimiento. La cepa de *P. expansum* utilizada en este trabajo fue aislada desde frutos infectados e identificada usando la metodología propuesta por Pitt (2000)⁽¹⁰⁾. El hongo fue cultivado durante 7 días a 25 °C en agar Czapek levadura (CYA), agar extracto de malta (MEA) y agar glicerol nitrato (G25N) [para 1 L: NaNO₃ 3 g, K₂HPO₄ 1 g, KCl 0,5 g, MgSO₄·7H₂O 0,5 g, FeSO₄·7H₂O 0,01 g, extracto de levadura 5 g, agar 15 g; el pH fue fijado en 6; una vez disuelto el agar se agregaron, 250 g de glicerol a 750 g de medio]. Los metabolitos secundarios del indol, que son producidos por varias especies de *Penicillium* cuando el crecimiento ocurre en CYA, fueron detectados directamente en el cultivo usando papel filtro mojado con reactivo de Ehrlich (1 % p-dimetilamino-benzaldehído en HCl 1 N) disuelto en etanol (50 %). Los metabolitos fueron visualizados por la formación de una zona violeta sobre el papel al cabo de 10 min⁽¹¹⁾. Cultivos puros fueron crecidos en agar extracto de malta por 10 días a temperatura ambiente. Las esporas fueron cosechadas usando Tween 80 (0,01 %) estéril. Para el crecimiento del hongo, se usó extracto de malta. La razón medio de cultivo: inóculo fue de 150:1, con una concentración de esporas de 10⁷ por mL. La incubación fue realizada a 20 °C en agitador orbital a 300 rev/min.

Obtención de la enzima. El sobrenadante del cultivo crecido fue filtrado bajo 0,2 μ m y el pH fue fijado en 5 con

NaOH 1M. La solución fue concentrada por ultrafiltración bajo 30 kDa. La proteínas contaminantes fueron removidas a través de la precipitación con (NH₄)₂SO₄ (50 % saturación, 24 h a 4 °C) y posterior centrifugación (10000 g, 30 min, 4 °C). La concentración de sal del sobrenadante fue ajustada a 85% saturación. Luego de 24 h a 4 °C, el precipitado fue recuperado por centrifugación (10000 g, 30 min, 4 °C), disuelto en buffer acetato (pH 5,5 50 mM) y dializado durante 3 días a 4 °C con cambios diarios de buffer acetato. La solución obtenida se mantuvo a 4 °C hasta su uso.

Actividad enzimática. La actividad de fitasa fue estimada a través de la liberación de fósforo inorgánico desde ácido fítico⁽¹²⁾. Los valores de absorbancia fueron interpolados en curva de calibración construida con KH₂PO₄ y convertidos a nmoles de fósforo. La solución de enzima (100 μ L) fue incubada (50 °C, 30 min) con 100 μ L de solución de ácido fítico (myo-inositol hexakis (dihidrógeno fosfato) sal hidratada dodecasodio, C₆H₁₆O₂₄P₆·12Na·xH₂O) 2,5 mM (en buffer acetato 50 mM, pH 4,5). La reacción fue detenida a través de la adición de 100 μ L de ácido tricloacético (5 % w/v). Los buffers usados en los experimentos realizados para establecer el efecto del pH fueron glicina/HCl (pH 2,5-3,5), acetato de sodio/ácido acético (pH 3,5-5,5), MES/HCl (pH 5,5-7), HEPES/HCl (pH 7-8). En aquellos casos en los que se usaron distintos buffers para el mismo pH, la actividad enzimática fue medida en ambos buffers. Una unidad de fitasa se define como la cantidad de enzima que libera un nmol de fósforo por segundo (nkat). Las pruebas fueron realizadas en triplicado.

Contenido de proteínas y azúcares. La concentración de proteínas fue determinada por el método de Bradford (1976)⁽¹³⁾. Los valores de absorbancia fueron interpolados en una curva de calibración construida con albúmina de suero de bovino.

Análisis de electroforesis. Las muestras fueron sometidas a electroforesis en gel denaturante (SDS-PAGE)⁽¹⁴⁾. Para el teñido de los geles se usó azul de Coomassie R-250.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observaron las características morfológicas macroscópicas (textura color de la colonia en el anverso y reverso, pigmentos difusibles, exudados) y microscópicas (tipos de conidióforos, presencia o ausencia de rugosidad, agrupación, ramificación, morfometría de métulas, fiálides y conidios) en MEA y CYA. El diámetro de las colonias verde oscuro en CYA y MEA fue de entre 28 a 35 mm; en G25N el diámetro de las colonias fue de entre 16 a 20 mm. Los conidióforos se observaron lisos, fasciculados a coremiformes en los bordes de las colonias, penicilios típicamente tervertilizados, métulas de 10 a 13 μ m de largo y fiálides ampuliformes a cilíndricas, apretadas con collula corta, de 7 a 10 μ m de largo. Conidios elipsoidales de 2,8 a 3,3 μ m de largo de pared lisa, en cadenas largas e irregulares. La cepa de *P. expansum* aislada no presentó crecimiento a 37 °C y la reacción con el reactivo de Ehrlich fue positiva indicando la presencia de metabolitos del indol. La Figura 1 muestra conidióforos, métulas, fiálides y conidios de la cepa de *P. expansum* aislada.

La producción de fitasa por *P. expansum*, durante la fermentación del extracto de malta, presentó un máximo a las 60 h (Tabla 1). Este tiempo coincide con la disminución de la concentración del fósforo residual (Pi) en el medio de cultivo a niveles no detectados (no se muestra), lo que indica que la síntesis de la enzima está sujeta a inhibición.

Reportes previos muestran que altas concentraciones de fosfato reprimen la síntesis de fosfatasa ácida y fitasa en hongos, y que condiciones de crecimiento limitadas por fosfato favorecen la síntesis. *A. niger* NRRL 31335 produce la mayor cantidad de fitasa (113 nkat/mL) cuando el contenido de fósforo inorgánico se encuentra en el rango 0,0001-0,005 %^(15,16).

La Figura 2 muestra los resultados del análisis de electroforesis de la solución de proteína que retiene la actividad sobre el ácido fítico, para los diferentes tiempos de fermentación. De acuerdo a estos resultados la metodología de separación no elimina completamente las proteínas contaminantes. Sin embargo, permite concentrar la enzima ya que no se detectó actividad enzimática en la fracción de proteína precipitada con un 50 % de saturación de sulfato de amonio. La Figura 2, muestra que para el tiempo en el cual se alcanza la mayor actividad de fitasa, se obtiene una única banda correspondiente a una proteína de peso molecular entre 35 y 45 kDa. El peso molecular de las fitasas producidas por diferentes cepas de hongos se encuentra entre 48 a 120 kDa⁽¹⁷⁻²¹⁾. *A. niger* NRRL 3135 produce dos enzimas con actividad sobre el ácido fítico; una de ellas (*phyA*) posee un peso molecular de 85 kDa y elevado nivel de glicosilación⁽²²⁾. La segunda es una proteína monomérica no glicosilada cuyo peso molecular es de 48,5 kDa⁽²⁾.

El gráfico en la Figura 3 a, muestra que la menor actividad enzimática se obtiene a pH 5,5 (34 % en buffer acetato, 28 % en MES). La mayor actividad catalítica (262 n kat por mg de proteína) se obtiene a pH 2,5 mientras que a pH 4,5 se obtiene un 97 % de la actividad máxima obtenida. No se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en la actividad de la enzima en el rango de pH entre 5,5 y 7. Este comportamiento coincide con el reportado para la fitasa *phyA* de *A. niger* NRRL 3135 la que presenta dos óptimos de pH^(1,2). El comportamiento bimodal de la actividad enzimática en función del pH en fitasas de hongos ha sido reportado^(15, 21, 23, 24) y se explica por la configuración de aminoácidos en el sitio activo. En el sitio activo de la enzima *phyA* de *A. niger* NRRL

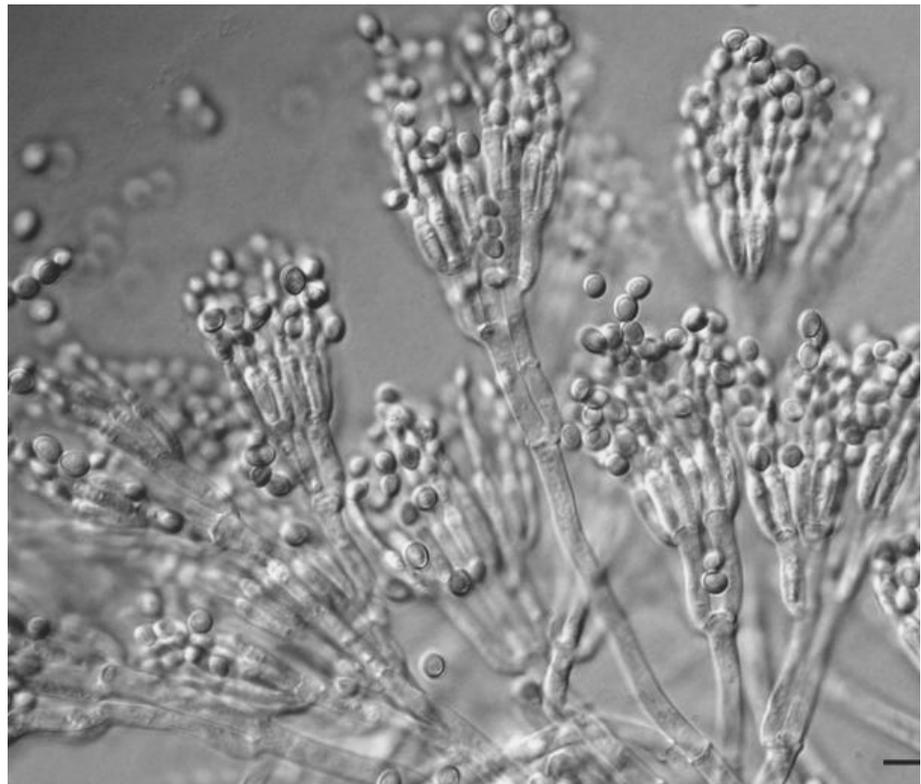


Figura 1. Conidióforos, métulas, fiálides y conidios de *P. expansum*.

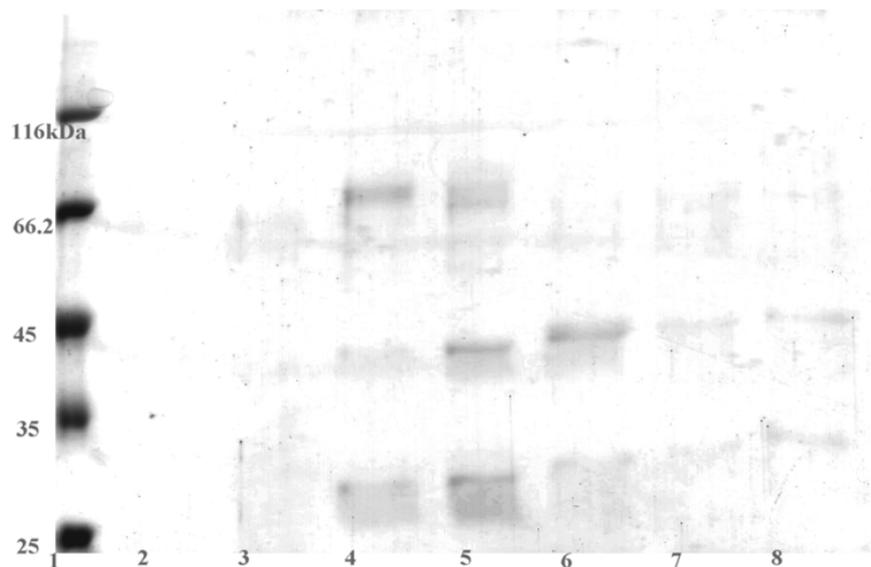


Figura 2. Análisis de electroforesis de la solución de proteínas obtenida desde el medio de cultivo de *P. expansum* a diferentes tiempos de fermentación. Carril 1: marcadores de peso molecular. Carriles 2 al 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 h.

3135 se encuentran 2 aminoácidos ácidos (Glu205, Asp239) y 4 aminoácidos básicos (Asp239, Lys68, Lys71, Lys227 y Lys228)⁽⁹⁾. A pH 2,5 los aminoácidos básicos estarían cargados positivamente permitiendo la atracción de la molécula de sustrato (negativamente cargada) por efecto de la carga electrostática local. Igual cosa ocurriría aun a pH 5 gracias a la carga positiva de los aminoácidos básicos⁽⁹⁾.

La mayor actividad específica (223,6 nkat por mg de proteína) de la enzima de *P. expansum* sobre el ácido fítico se obtiene a 40 °C (Figura 3 b). La actividad enzimática a temperaturas superiores a 50 °C es significativamente más baja y a 70 °C se obtiene solo un 9 % del valor máximo obtenido. La mayoría de las fitasas de origen fúngico, estudiadas hasta ahora, muestran una temperatura óptima de 58 °C e inactivación térmica sobre 70 °C⁽¹⁵⁾. La temperatura óptima de la fitasa comercial Natuphos[®] y la de la enzima recombinante sintetizada por *A. awamori* pGP209 es 50 °C, mientras que la de la fitasa AllzymeTM es de 55 °C⁽²⁵⁾.

Los parámetros cinéticos (gráfica de Lineweaver-Burk) de la enzima de *P. expansum* fueron estimados desde ensayos realizados con concentraciones de ácido fítico en el rango 0,01 a 10 mM. La Figura 4 compara las velocidades de reacción enzimática determinadas experimentalmente, con aquellas calculadas usando valores de V_{max} y K_m iguales a 55,01 nkat por mg de proteína y 0,549 mM, respectivamente. Los valores de estos parámetros fueron estimados a partir de datos de velocidad obtenidos con concentraciones de sustrato inferiores a 3,5 mM. Mayores concentraciones del sustrato resultan en una menor velocidad enzimática y para una concentración de 10 mM no se detectó actividad sobre el ácido fítico. Estos resultados indican que la actividad de la enzima se ve afectada por inhibición por sustrato. De acuerdo al valor estimado de K_m la fitasa de *P. expansum* presenta una moderada afinidad por el sustrato en relación a otras fitasas de origen fúngico, las que generalmente poseen valores en el rango de 27 mM hasta 813 mM⁽²⁶⁾. Para las fitasas phyA y phyB de *A. niger* NRRL 3135 los valores de K_m son 27 y 103 mM, respectivamente.

La enzima de *P. expansum* es térmicamente inestable (Figura 5); luego de 60 y 400 s de incubación a 80 °C, la actividad residual es de 50 y 32 % del valor obtenido con la enzima sin tratamiento térmico, respecti-

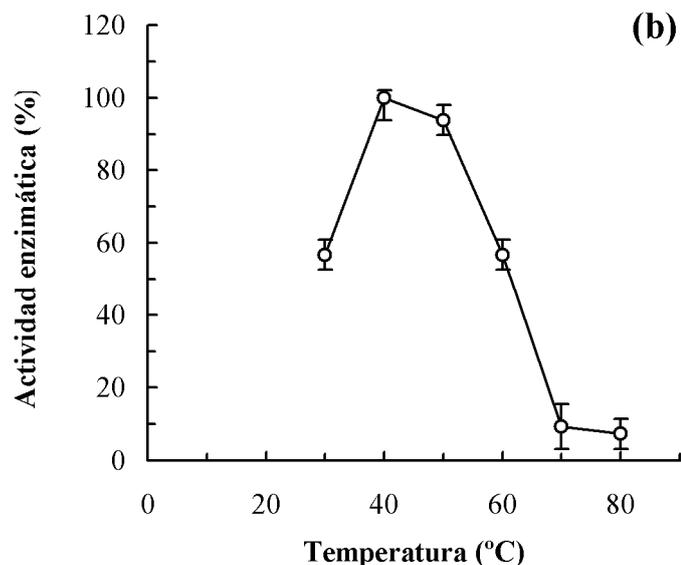
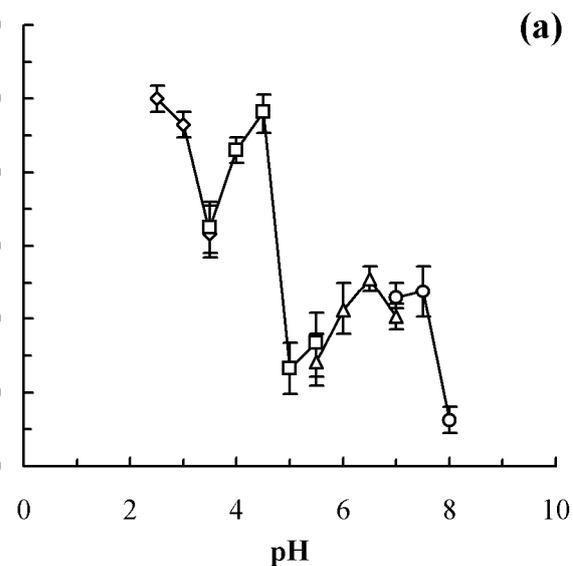
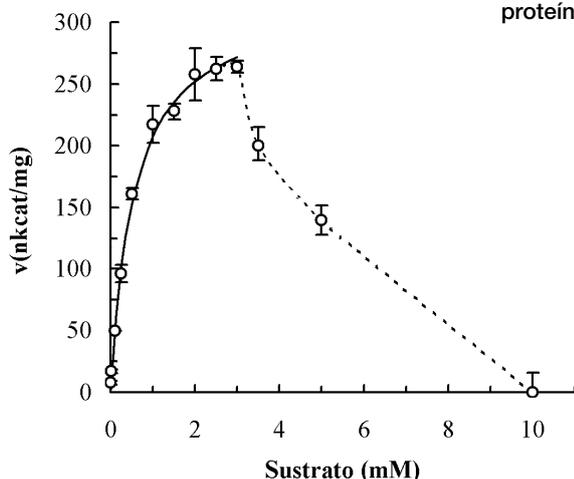


Figura 3. Efecto del (a) pH y (b) la temperatura en la actividad de la enzima producida por *P. expansum* sobre el ácido fítico. Los buffers usados fueron: glicina/HCl (pH 2,5-3,5), acetato de sodio/ácido acético (pH 3,5-5,5), MES/HCl (pH 5,5-7), HEPES/HCl (pH 7-8). La actividad enzimática fue medida a 50 °C. La concentración del sustrato fue de 2,5 mM. 100% de actividad relativa (277 nkat por mg de proteína). La actividad enzimática en los ensayos de temperatura fue medida a pH 4,5 y la concentración de sustrato fue de 2,5 mM. 100% de actividad relativa (265 nkat por mg de proteína) se obtuvo a 40 °C. Las muestras se analizaron en triplicado.

Figura 4. Efecto de la concentración del ácido fítico en la velocidad de reacción de la enzima producida por *P. expansum*. La actividad enzimática fue medida a pH 4,5 y 50 °C. Los símbolos representan los datos experimentales y la línea los valores calculados usando los valores estimados para V_{max} y K_m .

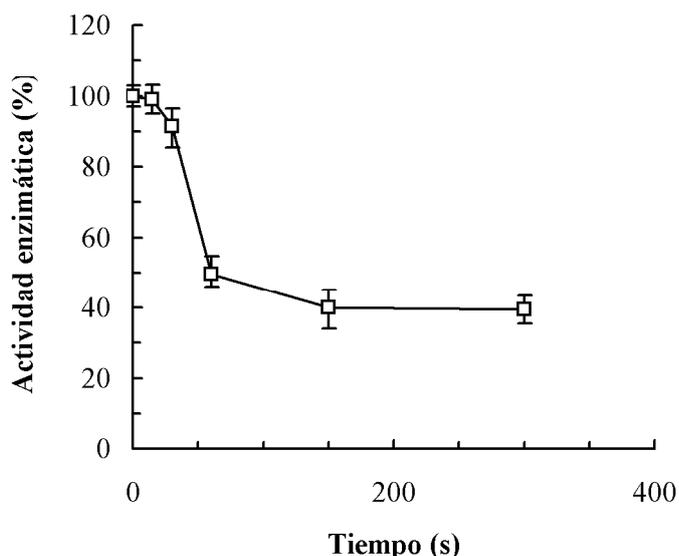


Figura 5. Estabilidad térmica de la enzima de *P. expansum* que hidroliza ácido fítico. La actividad residual de la enzima incubada a 80 °C por distintos tiempos, fue medida a pH 4,5 y 50 °C usando concentración de ácido fítico de 2,5 mM. 100% de actividad relativa corresponden a 262 nkat por mg de proteína.

vamente. Este comportamiento coincide con el de las fitasas industriales obtenidas desde *A. niger*⁽³⁷⁾. Un 25 % de actividad residual ha sido informada para fitasas comerciales (formas purificadas y no purificadas de Natuphos[®]) después de tratamiento térmico a 100 °C por 5 min⁽²⁵⁾. La enzima de *A. fumigatus* se inactiva a elevadas temperaturas^(25, 28) mientras que la fitasa de *A. niger* es capaz de retener un 22 % de actividad residual después de 30 min a 80 °C⁽²¹⁾. Se ha sugerido que la capacidad para retener actividad posterior a un tratamiento térmico se debe a la capacidad de las proteínas para recuperar su estructura, la que estaría relacionada al grado de glicosilación⁽²⁹⁾.

CONCLUSIONES

La cepa de *P. expansum* aislada en este trabajo, produce una enzima extracelular capaz de liberar fósforo desde ácido fítico. La enzima presenta comportamientos frente al pH, temperatura y estabilidad térmica, similares a las de enzimas sintetizadas por cepas de *Aspergillus*, lo que la convierte en una alternativa para ser usada como aditivo en la producción de alimentos. *P. expansum* es un hongo patógeno y la síntesis de enzimas capaces de hidrolizar ácido fítico, podría proporcionarle ventajas para la infección. Los estudios necesarios para probar esta hipótesis, que requieren de la selección de cepas no productoras de la enzima, están siendo realizados.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Dirección de Investigación de la Universidad de La Frontera por el apoyo económico a través de proyecto Didufro 120527.

BIBLIOGRAFÍA

- (1). Wyss, M.; Brugger, R.; Kronenberger, A.; Rémy, R.; Fimbel, R.; Oesterheld, G.; Lehmann, M.; van Loon, A.P.G.M.: Biochemical characterization of fungal phytases (myo-inositol hexakisphosphate phosphohydrolases): Catalytic properties. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 367-373, 1999.
- (2). Ullah, A.H.J.; Dischinger, H.C.: *Aspergillus ficuum* phytase: complete primary structure elucidation by chemical sequencing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 192: 747-753, 1993.
- (3). Kostrewa, D.; Wyss, M.; D'Arcy, A.; van Loon, A.P.G.M.: Crystal structure of *Aspergillus niger* pH 2.5 optimum acid phosphatase at 2.4 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, 288: 965-974, 1999.
- (4). Farr, D.F.; Bills, G.F.; Chamuris, G.P.; Rossmann, A.Y.: Fungi on plants and plant products in the United States. APS Press: St Paul, 1989.
- (5). Yao, C.L.; Conway, W.S.; Sams, C.E.: Purification and characterization of a polygalacturonase produced by *Penicillium expansum* in apple fruit. *Phytopathology*, 86: 1160-1166, 1996.
- (6). Fernandes Salomao, T.M.; Amorim, A.C.R.; Chaves Alves, V.M.; Coelho, J.L.C.; Silva, D.O.; de Araujo, E.F.: Isolation of pectinase hyper-producing mutants of *Penicillium expansum*. *Revista de Microbiología*, 27: 15-18, 1996.
- (7). Brimer, L.; Cicalini, A.R.; Federici, F.; Petruccioli, M.: Production of beta-glycosidases (linamerase and amygdalase) and pectolytic enzymes by *Penicillium ssp.* *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 10: 206-206, 1994.
- (8). Silva, D.O.; Attwood, M.M.; Tempest, D.W.: Partial-purification and properties of pectin lyase from *Penicillium expansum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 9: 574-578, 1993.
- (9). Stocklein, W.; Sztajer, H.; Menge, U.; Schmid, R.D.: Purification and properties of a lipase from *Penicillium expansum*. *Biochimica et Biophys. Acta*, 1168: 181-189, 1993.
- (10). Pitt, J.I.: A laboratory guide to common *Penicillium* species. *Food Science*, Australia, 2000.
- (11). Lund, F.: Differentiating *Penicillium* species by detection of indole metabolites using a filter paper method. *Lett Appl. Microbiol.*, 20: 228-231, 1995.
- (12). Murphy, J.; Riley, J.: A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analyt. Chim. Acta*, 27: 31-36, 1962.
- (13). Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254, 1976.
- (14). Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.
- (15). Wodzinski, R.J.; Ullah, A.H.J.: Phytase. *Adv. Appl. Micro*, 42: 263-301, 1996.
- (16). Han, Y.W.; Gallagher, D.J.: Phosphatase production by *Aspergillus ficuum*. *J. Ind. Micro*, 1: 295-301, 1987.
- (17). Ullah, A.H.J.; Cummins, B.J.: Purification, N-terminal amino acid sequence and characterization of pH 2.5 optimum acid phosphatase (E.C.3.1.3.2) from *Aspergillus ficuum*. *Prep. Biochem.*, 17: 397-422, 1987.
- (18). Ullah, A.H.J.; Gibson, D.M.: Extracellular phytase (E.C.3.1.3.8) from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135: purification and characterization. *Prep. Biochem.*, 17: 63-91, 1987.
- (19). Shimizu, M.: Purification and characterization of phytase and acid phosphatase produced by *Aspergillus oryzae* K1. *Biosci Biotech. Biochem.*, 57: 1364-1365, 1993.

-
- ⁽²⁰⁾. 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 basidiomycete fungi: *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, *Ceriporia sp.*, and *Trametes pubescens*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**: 4701-4707, 2001.
- ⁽²¹⁾. Casey, A.; Walsh, G.: Purification and characterization of extracellular phytase from *Aspergillus niger* ATCC 9142. *Bioresour. Tech.*, **86**: 183-188, 2003.
- ⁽²²⁾. Ullah, A.H.J.: Production, rapid purification and catalytic characterization of extracellular phytase from *Aspergillus ficuum*. *Prep. Biochem.*, **18**: 443-458, 1988.
- ⁽²³⁾. Gargova, S.; Sariyska, M.: Effect of culture conditions on the biosynthesis of *Aspergillus niger* phytase and acid phosphatase. *Enzyme Microbial. Technol.*, **32**: 231-235, 2003.
- ⁽²⁴⁾. Chantasartrasamee, K.; Ayuthaya, D.I.N.; Intarareugsorn, S.; Dharmsthi, S.: Phytase activity from *Aspergillus oryzae* AK9 cultivated on solid state soybean meal medium. *Process Biochem.*, **40**: 2285-2289, 2005.
- ⁽²⁵⁾. Martin, J.A.; Murphy, R.A.; Power, R.F.G.: Purification and physico-chemical characterization of genetically modified phytases expressed in *Aspergillus awamori*. *Bioresour. Tech.*, **97**: 1703-1708, 2006.
- ⁽²⁶⁾. Casey, A.; Walsh, G.: Identification and characterization of a phytase of potential commercial interest. *J. Biotechnol.*, **110**: 313-322, 2004.
- ⁽²⁷⁾. Gibson, K.: The pelleting stability of animal feed enzymes. In: Second European Symposium on Feed Enzymes, Noordwijkerhout, The Netherlands, pp. 157-162, 1995.
- ⁽²⁸⁾. Ullah, A.H.J.; Sethumadhavan, K.; Lei, G.; Mullaney, E.J.: Biochemical characterization of cloned *Aspergillus fumigatus* (phyA). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **275**: 279-285, 2000.
- ⁽²⁹⁾. Wyss, M.; Pasamontes, L.; Remy, R.; Kohler, J.; Kuszniir, E.; Gadeint, M.; Muller, F.; van Loon, A.P.G.M.: Comparison of the thermostability properties of three acid phosphatases from molds: *A. fumigatus* phytase, *A. niger* phytase and *A. niger* pH 2.5 acid phosphatase. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 4446-4451, 1998.