

Use of Comparative Modeling in Structural Determination of *Yersinia's* Phytase

Uso de modelagem comparativa na determinação estrutural de fitase de *Yersinia*

Títulos abreviados:

Structural Determination of *Phytase*

Determinação Estrutural de *Fitase*

Mariane Oliveira Lemuchi^{1§}; Mariana Souza Vieira^{1§}; Paulo Afonso Grangeiro¹; José Antônio da Silva¹; William James Nogueira Lima²; Daniel Bonoto Gonçalves¹; Alexandro Sobreira Galdino¹; Moacyr Comar Jr¹; Alex Gutterres Taranto^{1*}

ABSTRACT

Phytases (EC 3.1.3.8) when mixed into animal feed increases the nutritional quality by increasing the bioavailability of phosphate. However, the use of phytase is restricted due to its low bioavailability by gastric degradation. In order to develop acid-resistant phytase, a model of *Yersinia* phytase was built by comparative modeling. Initially, a search for templates structures following by build model was carried out using SWISS MODEL software. The built model was evaluated in relation of backbone stereochemistry by PROCHEK. Finally, the model was refinement by molecular dynamics simulations for 8 nanoseconds through AMBER software. As a result, the model has the same structural characteristics of template, *Escherichia coli* phytase, PDB: 1DKQ. This model will permit studies of directed mutagenesis *in silico*, allowing the development of phytases with more appropriate physicochemical properties.

Keywords: homology modeling, computational biotechnology, bioinformatics

RESUMO

Fitases (EC 3.1.3.8), quando presentes em rações para animais, aumentam a qualidade nutricional por aumentar a biodisponibilidade de fosfatos. Entretanto, seu uso é restrito, pois sofrem rápida degradação pelo suco gástrico. Com objetivo de desenvolver fitase ácido resistente, um modelo da fitase de *Yersinia* foi construído por modelagem comparativa. Inicialmente, uma busca por estruturas moldes seguida da construção do modelo foi realizada pelo programa SWISS MODEL. O modelo construído foi avaliado quanto a estereoquímica da cadeia principal pelo PROCHECK. Finalmente, o modelo foi refinado simulação de dinâmica molecular por 8 nanosegundos através do programa AMBER. Como resultado, o modelo possui as mesmas características da estrutura molde, fitase de *Escherichia coli*, PDB: 1DKQ. Além disso, o modelo resultante mostra que o resíduo de histidina é capaz de interagir com o grupamento fosfato presente no fitato. Este modelo permitirá realizar estudos de mutagênese dirigida *in silico*, capaz de desenvolver fitases com propriedades físico-químicas mais adequadas.

Palavras-chaves: modelagem por homologia, biotecnologia computacional, bioinformática

¹ Universidade Federal de São João Del-Rei –Campus Centro-Oeste – Bioquímica – 35501-296 Divinópolis – MG

² Universidade Federal de Minas Gerais – Instituto de Ciências Agrárias – Departamento de Ciência de Alimentos – 39404-547 Montes Claros – MG

* Autor para correspondência: proftaranto@hotmail.com

Alexandro Sobreira Galdino - asgaldino@gmail.com

Daniel Bonoto Gonçalves - dbonoto@gmail.com

William James Nogueira Lima - william@ica.ufmg.br

Paulo Afonso Grangeiro - pagranjeiro@gmail.com

José Antonio da Silva - zecsilca@yahoo.com.br

Mariane Oliveira Lemuchi - mariane_olemuchi@hotmail.com

Mariana Sousa Vieira - marianasvieira2@hotmail.com

INTRODUÇÃO

A *fitase* (mio-inositol-hexaquifosfato fosfohidrolase, EC 3.1.3.8) é uma fosfatase que catalisa a liberação do fosfato inorgânico de fitato (mio-inositol hexaquifosfato), que é a forma predominante de fósforo em leguminosas e cereais (REDDY, SATHE, SALUNKHE, 1982). No entanto, os animais monogástricos como aves e suínos, carecem da enzima para a digestão eficiente do fitato nas rações (MAENZ e CLASSEN, 1998; YOON, *et al.*, 2011). O uso de fitase em rações aumenta a qualidade nutricional das mesmas devido ao aumento da biodisponibilidade de fosfatos, inclusive em alimentos vegetais para humanos. Porém, quando em excesso o fitato possui a capacidade de interagir e quelar oligoelementos como ferro e zinco, causando deficiência generalizada desses nutrientes em populações cuja alimentação é baseada em leguminosas (KIM *et al.*, 2006). Além disso, pode interagir com proteínas e formar complexos não funcionais (FIREMAN, FIREMAN, 1998).

Uma grande variedade de fitases pode ser obtida de diferentes organismos, como fungos, bactérias, leveduras e algas (SIMON e IGBASAN, 2002; SHAH, *et al.*, 2009). Fitases capazes de atuar em baixos valores de pH, como no estômago, têm sido alvo de interesse uma vez que possuem potencial de aplicação industrial (BHAVSAR, KUMAR, KHIRE, 2011). Vários genes de fitase foram clonados com sucesso e expressos em diferentes hospedeiros microbianos utilizando tecnologias diferentes de expressão (YOON, *et al.*, 2011). A aplicação de fitases, no entanto, fica restrita devido às características físico-químicas presentes, pois durante a passagem gástrica a fitase ideal deve resistir à desnaturação devido ao baixo pH e à ação de enzimas proteolíticas, além de manter a atividade na temperatura fisiológica (KIM, 2006). As fitases do gênero *Yersinia* possuem propriedades bioquímicas promissoras, tais como: estabilidade em diferentes pHs ácidos, termoestabilidade e resistência à pepsina e à tripsina (HUANG, *et al.*, 2006; FU, *et al.*, 2008). Nesse sentido, o gene correspondente à fitase de *Yersinia intermedia* foi sintetizado com códons preferenciais para expressão em *Escherichia coli* com finalidades industriais. Neste trabalho, a fitase recombinante foi denominada de rPHY1.

As alterações necessárias para a adequação da enzima às necessidades da indústria podem ser realizadas através de estudos de mutagênese dirigida. Entretanto, estas alterações podem ser inicialmente realizadas de forma mais econômica e ambientalmente mais limpas através de análises *in silico*, uma

técnica cujo uso vem crescendo à medida que os resultados teóricos cada vez mais auxiliam na compreensão e direcionamento dos procedimentos experimentais e várias revisões têm sido realizadas sobre o assunto (CONTRERAS-MOREIRA *et al.* 2002; ESPOSITO *et al.* 2006; GINALSKI, 2006; XIANG, 2006).

Como a modelagem comparativa baseia-se no fato de que a estrutura tridimensional e a função das proteínas são mais conservadas do que as suas sequências gênicas (BORTOLI, *et al.*, 2009) e considerando-se que a estrutura tridimensional da rPHY1 não se encontra resolvida experimentalmente, pode-se usar ferramentas de alinhamento estrutural para se obter um modelo tridimensional a partir da sequência primária, empregando uma estrutura similar previamente resolvida por métodos experimentais (ANDRADE, *et al.* 2009; DOS SANTOS JR, *et al.* 2009; SANTOS JUNIOR *et al.*, 2011; DE ANDRADE, *et al.* 2012; PINHEIRO, *et al.*, 2012; SILVA JÚNIOR, J. J. *et al.* 2012). Neste caso, a estrutura terciária da fitase de *E. coli* encontra-se depositada no *Protein Data Bank* (PDB) (BERMAN, *et al.*, 2013) e foi usada como molde para a etapa inicial deste estudo, que foi construir um modelo tridimensional da rPHY1 por métodos *in silico*, como modelagem comparativa.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Síntese do gene *rPHY1*

O gene correspondente à fitase de *Y. intermedia* (GeneBank No. DQ986462.1) foi sintetizado pela empresa Epoch Biolabs (USA) com códons preferenciais para expressão em células de *E. coli*.

2. Alinhamento das sequências de fitases de microrganismos.

Para o alinhamento múltiplo das sequências das fitases foi utilizado o programa ClustalW (LARKIN *et al.*, 2007). As sequências das fitases de *E. coli* (GeneBank no.1DKQ_A), Fitase de *Yersinia intermedia* expressa em *E. coli* (rPHY1, este trabalho), *Aspergillus oryzae* (GeneBank No. AB042805.1) e *Cryptococcus neoformans* (GeneBank No. 571720.1) foram usadas no alinhamento múltiplo.

3. Modelagem Molecular

A obtenção da sequência primária da rPHY1 nos motivou a construir o modelo de fitase por modelagem comparativa usando homologia entre as

sequências de aminoácidos. Inicialmente, uma busca de moldes foi realizada utilizando o módulo automatizado do programa SWISS MODEL seguindo protocolo padrão (BORTOLI *et al.*, 2009). O modelo foi avaliado utilizando o valor de *root-mean-square deviation* (RMSD) e gráfico de Ramachandran, gerado pelo programa Procheck (LASKOWSKI, *et al.*, 1994). A seguir, as coordenadas atômicas do ligante foram transferidas após o alinhamento estrutural entre molde e modelo. Dessa forma, a estrutura resultante foi completamente otimizada utilizando os algoritmos *steep descente* e gradiente conjugado (LEACH, *et al.*, 2001) utilizando o campo de força *ff03* (DUAN, *et al.*, 2003) implementado no programa AMBER 11 (CASE, *et al.* 2011). Finalmente, o programa Discovery Studio 3.1 (ACCELRYS, 2010) foi utilizado para gerar as figuras de inspeção visual do modelo. A movimentação das ligações foram completamente liberadas através do algoritmo SHAKE permitindo que todas as interações sejam levadas em conta. O modelo de solvatação implícito utilizado foi o proposto por Hawkins (HAWKINS *et al.*, 1995; HAWKINS *et al.*, 1996) com parâmetros descritos por Tsui *et al.* (2001) utilizando um raio de corte das interações de longo alcance de 13 Å. Além disso, uma pequena camada de solvatação usando o modelo de água explícita TIP3P (JORGENSEN, *et al.*, 1983) foi adicionada, o que posicionou 2.850 moléculas de água ao redor da proteína. Além disso, onze íons de sódio foram adicionados ao sistema de modo a manter a sua eletroneutralidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foi realizado um alinhamento múltiplo das sequências de fitases de microrganismos com o objetivo de identificar os resíduos de aminoácidos responsáveis pela catálise enzimática. Dessa forma, foi possível identificar a região catalítica em todas as sequências analisadas (Figura 1). De acordo com o alinhamento, a fitase de *E. Coli* apresenta uma alanina (*Motif RAV*) enquanto que na rPHY1 e em outras fitases existe um resíduo de histidina ao invés da alanina. (*Motif RHG*) (Figura 1). Esses resultados corroboram com aqueles encontrados na literatura que mostram que as fitases da classe das fostases ácidas histidínicas compartilham o domínio catalítico RHGXRXP. Fitases nativas do gênero *Bacillus* e *Yersinia* também compartilham esse mesmo domínio catalítico (SIMON e IGBASAN, 2002). O alinhamento múltiplo também foi realizado com o objetivo de construir um modelo tridimensional da fitase recombinante.

Figura 1. Alinhamento múltiplo de fitases de microrganismos. Os aminoácidos envolvidos na catálise estão preenchidos de cor cinza. A mudança de aminoácido dentro do sítio ativo está indicado por um asterisco (*). As sequencias das fitases utilizadas nesse trabalho estão indicadas de acordo com o número de depósito no GeneBank.

		*		GeneBank No.
<i>Escherichia coli</i>	V V I V S	R A G	V R A P T K A T Q L	1DKQ_A
rPHY1	V V I L S	R H G	V R S P T K Q T Q L	esse trabalho
<i>Aspergillus oryzae</i>	A Q V L S	R H G A	R Y P T K S K S E	AB042805.1
<i>Cryptococcus neoformans</i>	H W L Q	R H G A	R Y P T S Y P E G	571720.1

Um modelo foi construído usando como molde a estrutura cristalográfica depositada no PDB sob o código 1DKQ_A (LIM, *et al.* 2000). O alinhamento sequencial mostrou que 1DKQ_A e o modelo compartilham 43% de identidade (dados não mostrados). Dessa forma, o modelo construído tem 10 alfa-hélices e 08 folhas beta (Fig. 2A), bastante similar com a estrutura molde. O limite mínimo aceito para construção de modelos moleculares é de 25-30% de identidade (BORTOLI, *et al.*, 2009). Consequentemente, o valor obtido garantiu a construção do modelo e resultou em um molde de boa qualidade estrutural. Posteriormente, o modelo construído foi submetido a etapas de validação. A primeira etapa consistiu no cálculo de RMSD. A Figura 2B mostra a sobreposição entre as estruturas. Como pode ser observado, não há diferenças estruturais entre as fitases de *E. Coli* e arPHY1. Como resultado, o valor de RMSD obtido foi baixo, 0,25 Å, valor esperado em função do alto grau de similaridade.

O modelo, então, foi submetido à etapa de minimização de energia, que resultou em uma estrutura estável, com pode ser observado pelo Gráfico 1. Observa-se que o sistema alcança a estabilidade estrutural aproximadamente após 5 nanosegundos (ns) de simulação. O valor de RMSD ao redor de 4 Å pode ser explicado como uma acomodação das estruturas a partir de um modelo construído onde as variáveis estruturais estavam distantes de seus valores de equilíbrio. Dessa forma, o modelo obtido após a etapa de minimização pode ser considerado aceitável para reproduzir o sistema da rPHY1 em estudo.

Adicionalmente, a qualidade estereoquímica foi avaliada pelo gráfico de Ramachandran (Fig. 3). Esta análise mostrou que 99,1% dos aminoácidos estão nas regiões energeticamente favoráveis (regiões favoráveis e permitidas), 0,6% de aminoácidos na região aceitável, e 0,3% de aminoácidos na região desfavorável, correspondendo aos resíduos Cys105 e Pro321 e Gln353 e Lys421.

Figura 2 - Modelo tridimensional da rPHY1. A) Estrutura tridimensional mostrando as regiões em alfa-hélice e folhas beta em vermelha e azul, respectivamente; B) superposição da rPHY1 (vermelho) e a 1DKQ_A (amarelo).

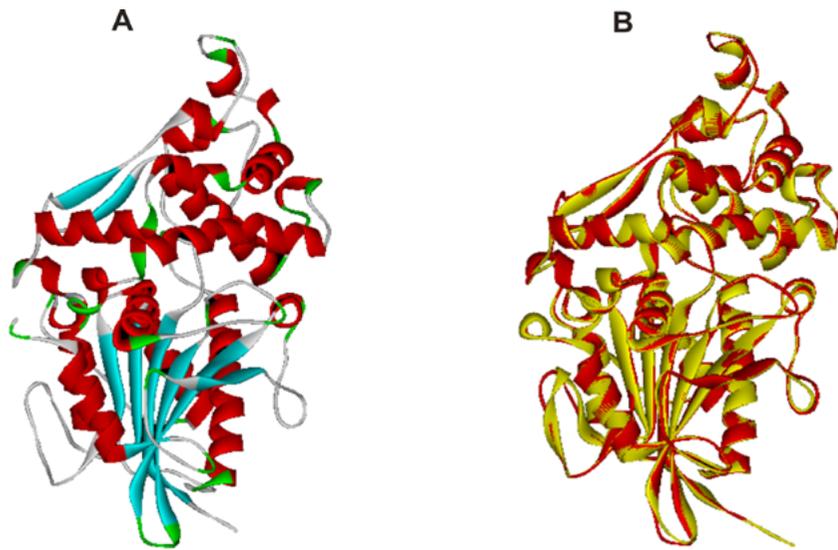
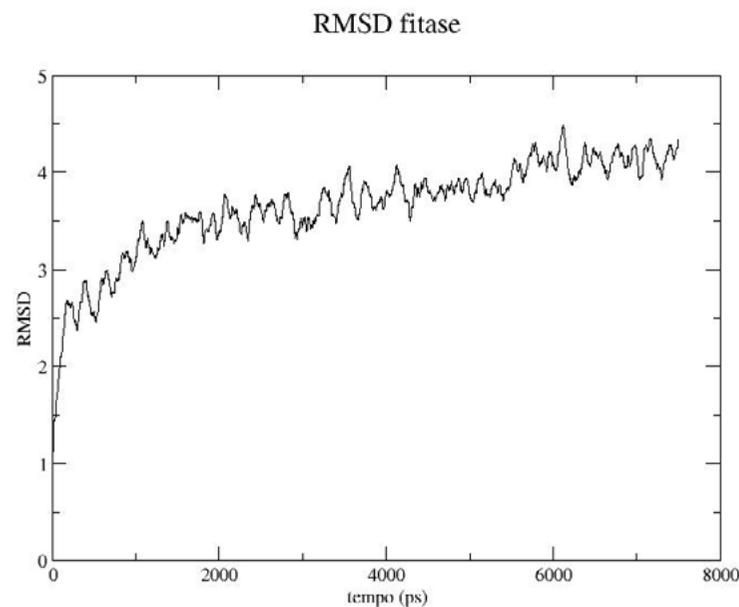


Gráfico 1 – RMSD da rPHY1.



Conforme já foi citado anteriormente, a sequência RHGX_RXP, segundo Ullah *et al.*, (1991) é a região do sítio ativo de fitases com características de fostases

ácidas (VAN ETEN *et al.*, 1991) e as Figuras 4A e B mostram as interações que ocorrem entre o fitato e os aminoácidos presentes no sítio de ligação da fitase. Como pode ser observado, a presença dos grupamentos fosfato cria uma extensa rede de ligações de hidrogênio, que podem ser usadas para servir de ligação ao substrato. A fitase estudada neste trabalho apresentou nesta região a sequência RHGVRSP e a fitase de *E. coli* a região RAGVRAP, que estão representadas nas Figuras 4A e B. Assim, verifica-se que a histidina presente no sítio ativo da rPHY1 está posicionada a uma distância média de 1,931 Å do átomo de fósforo (P) de um dos grupamentos fosfato do fitato, enquanto a menor distância de um átomo de carbono para o mesmo átomo de fósforo (P) no sítio da fitase de *E. coli* é de 4,272 Å. A proximidade entre a histidina (HIS) e o grupo fosfato sugere uma interação mais efetiva entre o sítio catalítico e o substrato, o que pode resultar em uma fitase com propriedades interessantes para finalidades industriais. Estes resultados podem justificar a diferença catalítica existente entre as fitases nativas de *E.coli* e *Y.intermedia*. Segundo Huang *et al.* (2006) a fitase de *Y. Intermedia* apresentou uma atividade específica 1,27 vezes maior do que a fitase de *E.coli*.

Figura 3 - Gráfico de Ramachandran do modelo da rPHY1.

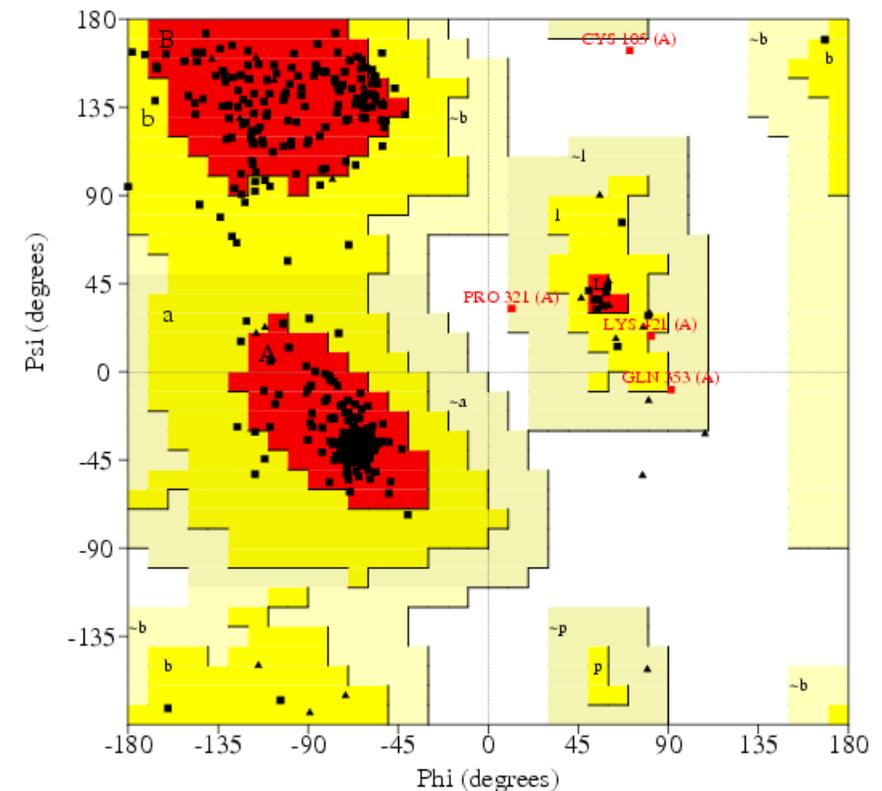
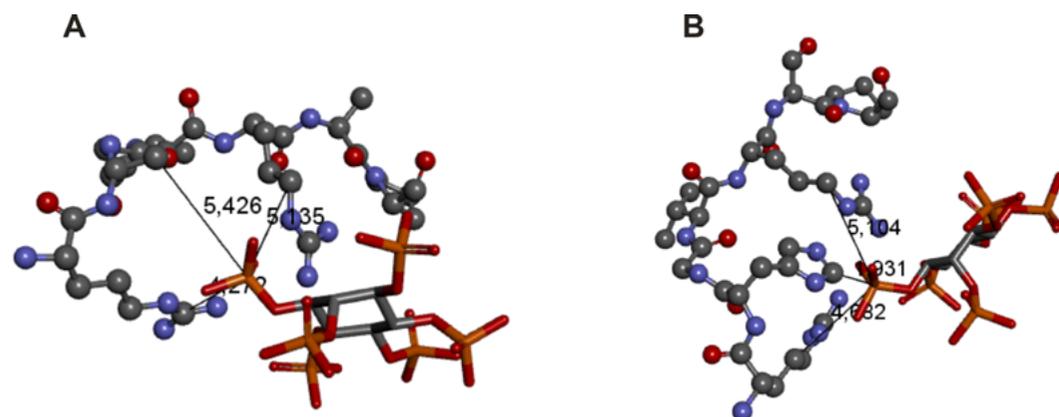


Figura 4 – Região do Sítio ativo das fitases de *Escherichia coli* (GeneBank No. 1DHQ_1) e rPHY1. São mostrados os ângulos de aproximação do fitato com o sítio ativo da 1DHQ_1 (A) e rPHY1 (B), respectivamente.



CONCLUSÃO

A abordagem de modelagem comparativa por homologia pôde prever a estrutura tridimensional da rPHY1 gerando um modelo de qualidade, que foi validado por diferentes métodos. A estrutura modelada mostrou que a presença de um resíduo de histidina (H) no domínio HGXXRP no sítio ativo da rPHY1 pode ter um papel importante na reação, pois tende a interagir fortemente com o grupamento fosfato do fitato. Além disso, o modelo mostrou que se formam várias ligações de hidrogênio entre o substrato e aminoácidos presentes no sítio ativo, formando uma rede para prender o substrato na região.

De posse deste, a próxima etapa do estudo será a geração de estruturas mutantes, as quais serão submetidas a simulações de dinâmica molecular. A simulação destas estruturas pode ser feita em diferentes ambientes químicos mostrando a estabilidade tanto térmica quanto físico-química. A seguir, as estruturas estáveis poderão ser clonadas e expressadas dando continuidade ao trabalho experimental.

AGRADECIMENTOS

Mariana Oliveira Lemuchi e Mariana Sousa Vieira agradecem a Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ) pela concessão de bolsas. Os demais autores agradecem ao Banco do Nordeste do Brasil (BNB), UFSJ, CNPq e FAPEMIG pela concessão de bolsas e pelo financiamento deste projeto de pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCELRYS Software Inc., **Discovery Studio 3.1**, San Diego: Accelrys Software Inc., 2010.
- ANDRADE, B. S.; TARANTO, A. G.; GÓES-NETO, A.; DUARTE, A. A. Comparative Modeling of DNA and RNA Polymerases from *Moniliophthora Perniciosa* Mitochondrial Plasmid. **Theoretical Biology and Medical Modelling** v. 6, p. 1-2, 2009.
- BHAVSAR, K.; KUMAR, V. R.; KHIRE, J. M. High level phytase production by *Aspergillus niger* NCIM 563 in solid state culture: response surface optimization, up-scaling, and its partial characterization. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 1407–1417, 2011.
- BERMAN, H. M.; KLEYWEGT, G. J.; NAKAMURA, H.; MARKLEY, J. L. The future of protein data bank. **Biopolymers**, v. 99, n. 3, p. 218–222, 2013.
- BORTOLI, L.; KIEFER F.; ARNOLD, K.; BENKERT, P.; BATTEY, J.; SCHWEDE, T. Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. **Nature Protocols**, v. 4, p. 1-13, 2009.
- CASE, D. A.; DARDEN, T. A.; CHEATHAM, T. E.; SIMMERLING, C. L.; WANG, J.; DUKE, R. E.; LUO, R.; MERZ, K. M.; WANG, B.; PEARLMAN, D. A.; CROWLEY, M.; BROZELL, S.; TSUI, V.; GOHLKE, H.; MONGAN, J.; HORNAK, V.; CUI, G.; BEROZA, P.; SCHAFMEISTER, C.; CALDWELL, J. W.; ROSS, W.S.; KOLLMAN, P. A. AMBER 9: User manual. University of California, San Francisco, 2011.
- CONTRERAS-MOREIRA, B.; FITZJOHN, P. W.; BATES, P. A. Comparative modelling: an essential methodology for protein structure prediction in the post-genomic era. **Applied Bioinformatics**, v. 1, n. 4, p. 177-190, 2002.
- DE ANDRADE, D. V. G.; GÓES-NETO, A.; COMAR JUNIOR, M.; TARANTO, A. G. Comparative modeling and QM/MM studies of cysteine protease mutant of *Theobroma cacao*. **International Journal of Quantum Chemistry**. v. 112, p. 3164–3168, 2012.
- DOS SANTOS JR, M. C.; TARANTO, A. G.; ASSIS, S. A.; GÓES-NETO, A. Homology Modeling of Pyrophosphorylase, Enzyme involved in Chitin Pathway of *Moniliophthora Perniciosa*. **International Journal of Bioinformatics Research and Applications (IJBRA)**, v. 5, p. 133-153, 2009.
- DUAN, Y.; W. U. C.; CHOWDHURY, S.; LEE, M. C.; XIONG, G.; ZHANG, W.; YANG, R.; CIEPLAK, P.; LUO, R.; LEE, T. A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 24, n. 16, p. 1999-2012, 2003.
- ESPOSITO, E. X.; TOBI, D.; MADURA, J. D. Comparative protein modeling. **Reviews in Computational Chemistry**, v. 22, p. 57-167, 2006.
- FIREMAN, A. K. B. A. T.; FIREMAN, F. A. T. Phytase in feeds for laying hens. **Ciência Rural**, v.28, n.3. p.529-534, 1998.
- FU, D.; HUANG, H.; LUO, H.; WANG, Y.; YANG, P.; MENG, K.; BAI, Y.; WU, N.; YAO, B. A highly pH-stable phytase from *Yersinia kristensenii*: cloning, expression, and characterization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, p. 499–505, 2008.
- GINALSKI, K.; Comparative modeling for protein structure prediction. **Current Opinion in Structural**

Biology, v. 16, n. 2, p. 172-177, 2006.

HAWKINS, G. D.; CRAMMER, C. J.; TRUHLAR, D. G. Parametrized models of aqueous free energies of solvation based on pairwise descreening of solute atomic charges from a dielectric medium. **Journal of Chemical Physics**, v. 100, p. 19824-19839, 1996.

HAWKINS, G. D.; CRAMMER, C. J.; TRUHLAR, D. G. Pairwise descreening of solute charges from a dielectric medium. **Chemical Physics Letters**, v. 246, p. 122-129, 1995.

HUANG, H.; LUO, H.; YANG, P.; MENG, K.; WANG, Y.; YUAN, T.; BAI, Y.; YAO, B. A novel phytase with preferable characteristics from *Yersinia intermedia*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 350, p. 884-889, 2006.

JORGENSEN, W. L.; CHANDRASEKHAR, J.; MADURA, J.; KLEIN, M. L. Comparison of simple potential form simulation liquid water. **Journal Chemical Physics**, v. 79, p. 926-935, 1983.

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

LASKOWSKI, R. A.; MAC-ARTHUR, M. W.; SMITH, D. K.; JONES, D. T.; HUTCHINSON, E. G.; MORRIS, A. L.; NAYLOR, D.; MOSS, D. THORNTON, J. M. **Manual Procheck v.3.0: Programs to check the Stereochemical Quality of Protein Structures**. Australia, 1994.

LEACH, A. R. **Molecular Modelling: principles and applications**, 2nd. Ed. Pearson Education, 2001.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN N.P.; CHENNA, R.; McGETTIGAN, P.A.; McWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R. Clustal W and clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007.

MAENZ, D. D.; CLASSEN, H. L. Phytase activity in the small intestinal brush border membrane of the chicken. **Poultry Science** v. 77, p. 557-563, 1998.

PINHEIRO, A. A. F.; TARANTO, A. G.; DUARTE, A. A.; NETO, A. G.; DA HORA JÚNIOR, B. T.; PEREIRA, G. A. G.; DOS SANTOS JÚNIOR, M. C.; DE ASSIS, S. A. Homology modeling studies of beta(1,3)-D-glucan synthase of *Moniliophthora perniciosa*. **International Journal of Quantum Chemistry** v. 112, n. 20, p. 3356-3363, 2012.

REDDY, N. R.; SATHE, S. K.; SALUNKHE, D. Phytates in cereals and legumes. **Advances in Food Research**. v. 28, p. 1-92, 1982.

SANTOS JUNIOR, M. C.; GONÇALVES, P. A.; TARANTO, A. G.; KOBLITZ, M. G. B.; GÓES-NETO, A.; PIROVANI, C. P.; CASCARDO, J. C. M.; CRUZ, S. H.; ZINGALI, R. B.; PEREIRA, G. A. G.; DIAS, C. V.; ASSIS, A. S. Purification, characterization and structural determination of UDP-N-Acetylglucosamine pyrophosphorylase produced by *Moniliophthora perniciosa*. **Journal of Brazilian Chemical Society**. v. 22, p. 1015-1023, 2011.

SHAH, P.; BHAVSAR, K.; SONI, S. K.; KHIRE, J.M. Strain improvement and up scaling of phytase production by *Aspergillus niger* NCIM 563 under submerged fermentation conditions. **Journal of Industrial**

Microbiology and Biotechnology, v. 36, p.373-380, 2009.

SILVA JÚNIOR, J. J.; COMAR Jr. M.; FERREIRA, B. A.; TARANTO, A. G. Construção do Receptor CysLTR1 por Modelagem Comparativa. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 4, p. 591-596, 2012.

SIMON, O.; IGBASAN, F. *In vitro* properties of phytase from various microbial origins. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 37, p. 813-822, 2002.

TSUI, V.; CASE, D. A. Theory and applications of the generalized Born solvation model in macromolecular simulations. **Biopolymers (Nucl. Acid. Sci.)**, v. 56, p. 275-291, 2001.

XIANG, Z. Advances in homology protein structure modeling. **Current Protein and Peptide Science**, v. 7, n. 3, p. 217-227, 2006.

YOON, S-M; KIM, S.Y.; Li, K.F.; YOON, B.H.; CHOE, S.; KUO, M.M-C. Transgenic microalgae expressing *Escherichia coli* AppA phytase as feed additive to reduce phytate excretion in the manure of young broiler chicks. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 3, p. 553-563, 2011.

Received 27 March 2013
Accepted 23 July 2013