

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL – UFMS
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

JÉSSICA SCHLOSSER DE SA TELES

**PRODUÇÃO DE FITASES E XILANASES POR *ASPERGILLUS* sp. E
THERMOASCUS sp. USANDO FONTE DE CARBONO ALTERNATIVA E
APLICAÇÃO NA RAÇÃO ANIMAL**

CAMPO GRANDE – MS

2022

JÉSSICA SCHLOSSER DE SA TELES

**PRODUÇÃO DE FITASES E XILANASES POR *ASPERGILLUS* sp. E
THERMOASCUS sp. USANDO FONTE DE CARBONO ALTERNATIVA E
APLICAÇÃO NA RAÇÃO ANIMAL**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como
requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel
em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dr^a. Giovana Cristina Giannesi

CAMPO GRANDE – MS

2022

AGRADECIMENTOS

Neste momento do curso, agradecer se torna um exercício de memória, relembrando porque e como cheguei até aqui nesta etapa do curso. Os percursos, encontros e escolhas que foram sendo tecidos até mesmo antes de eu estar neste mundo. O sentimento que me mobilizou até aqui em minha trajetória acadêmica é o de gratidão, aos que vieram antes de mim, abrindo caminho, e aos que virão, fazendo evoluir o conhecimento e o espírito humano.

Agradeço, em primeiro lugar, à minha mãe, Reni, mulher lutadora, fiel de seus princípios, defensora, em toda a sua vida, do bem comum. Agradeço pelo apoio nestes quatro anos de graduação, sem o qual eu não teria conseguido concluir. Amo o seu afinho e perseverança, e admiro sua felicidade em formar seus três filhos no ensino superior, embora sua sabedoria não esteja ligada à títulos, diplomas ou livros.

Agradeço aos meus amigos de alma, cujos caminhos se entrelaçam ao meu, tornando esta trajetória tão mais bela quanto possível. Gratidão ao João Victor, por manter em mim viva a chama de um conhecimento que me conecte às pessoas, sempre me levando a pensar no mundo como um todo, do qual sou parte. Gratidão a Isadora e tantos outros que, com paciência, cuidaram, escutaram e me ajudaram a perseverar.

Agradeço ainda a todos os professores que tive. É maravilhoso como o ato de ensinar pode transformar vidas, e não falo somente por mim, mas vejo isso também pela vida de outras pessoas. Agradeço especialmente à professora Dra. Giovana Cristina Giannesi, pela paciência e escuta na orientação deste trabalho. Uma condução acolhedora e serena, que possibilitou eu conseguir desenvolver e concluir com sucesso, e por ser fonte de motivação, paciência e inspiração.

Agradeço aos membros do LBQ (Laboratório de Bioquímica Geral e de Microrganismos), especialmente a Ana, pela parceria e ao tempo despendido em meu auxílio na realização da pesquisa

E pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, que abriu tantos caminhos.

“Diante da vastidão do tempo e da imensidão do universo, é um imenso
prazer para mim dividir um planeta e uma época com você.”

“Carl Sagan”

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hidrólise do ácido fítico pela enzima fitase, liberando inositol e fosfato inorgânico	19
Figura 2. Sistema xilanolítico e seus pontos de clivagem até a liberação de xilose.	22
Figura 3. Avaliação de diferentes fontes de carbono na produção de fitase.....	33
Figura 4. Avaliação de diferentes fontes de carbono na produção de xilanase.....	35
Figura 5. Avaliação do tempo de crescimento para a produção de fitase.....	37
Figura 6. Avaliação do tempo de crescimento para a produção de xilanase.....	38
Figura 7. Efeito da temperatura na atividade da fitase de (A) <i>Aspergillus</i> sp. (M2) e (B) <i>A. niger</i>.....	39
Figura 8. Efeito da temperatura na atividade da xilanase de <i>Aspergillus</i> sp. (M2).....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Constituição dos componentes presentes na ração.....	30
Tabela 2. Composição nutricional dos alimentos (PNA's), valores em percentagem nos alimentos.....	31
Tabela 3. Avaliação da atividade de fitase de <i>Aspergillus</i> sp. (M2) e fitase comercial aplicadas em ração (alimentos cru).....	41
Tabela 4. Avaliação da atividade de xilanase de <i>Aspergillus</i> sp. (M2). aplicada em rações para animais.....	43

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

µg	micrograma
µmol	micromol
µmoles	micromoles
µL	microlitros
BDA	ágar dextrose batata
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
nm	nanômetro
pH	potencial de hidrogênio iônico rpm rotação por minuto
U	Unidades
DDGS	grãos secos de destilaria solúveis
FAMEZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia MI Milho
ML	Milheto
SMV	Sorgo
FS	Farelo de soja
FT	Farelo de trigo
FA	Farelo de arroz
CS	Casca de soja
DDGS-E	DDGS-etanol
DDGS-S	DDGS-sabugo
MIFS	Milho + farelo de soja
DAF	Dieta alternativa – pura fibra Pi fósforo inorgânico
PB	proteína bruta
PNA	polissacarídeos não amiláceos
FAT	fatores antinutricionais

SUMÁRIO

RESUMO.....	20
0	
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Ração animal.....	14
1.2 Polissacarídeos não amiláceos.....	15
1.3 Enzimas.....	17
1.3.1 Fitase.....	18
1.3.1.1 Ácido fítico.....	19
1.3.1.2 Xilanase.....	21
1.3.2.1 Xilana.....	22
1.4 Fungos produtores destas enzimas.....	23
1.4.1 Gênero <i>Aspergillus</i>	24
1.4.2 Gênero <i>Thermoascus</i>	24
1.5 Aplicação.....	25
2. OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivo geral.....	26
1.1 Objetivos específicos.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1 Microrganismos e manutenção de crescimento.....	27
3.2 Produção de fitase e xilanase em meio sólido (FMS) usando diferentes fontes de carbono.....	27
3.3 Avaliação do tempo de crescimento na produção das enzimas.....	28
3.4 Ensaio de atividade enzimática e proteica.....	28
3.5 Avaliação da temperatura na atividade enzimática.....	29
3.6 Enzimas comerciais.....	29
3.7 Avaliação da hidrólise do alimento cru (ração) <i>in vitro</i> por ação da fitase e xilanase produzidas pelo <i>Aspergillus</i> sp. (M2) e pelas enzimas comerciais.....	29
3.7 Teste estatístico.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 Efeito de diferentes fontes de carbono na produção enzimática.....	31
4.2 Efeito do tempo de crescimento na produção das enzimas.....	36
4.3 Efeito da temperatura na atividade de fitase e xilanase dos melhores produtores.....	39
4.4 Aplicação das enzimas produzidas por <i>Aspergillus</i> sp. (M2) e das enzimas comerciais na ração animal <i>in vitro</i>	40
5. CONCLUSÃO.....	43
6. REFERÊNCIAS.....	43

RESUMO

Os compostos de origem vegetal usados na ração animal apresentam fatores antinutricionais como polissacarídeos não amiláceos, oligossacarídeos e fitatos, que estão presentes na parede celular das células de origem vegetal. Estes elementos modificam a digestibilidade, o tempo de permanência e a viscosidade no trato digestivo. As enzimas exógenas, como xilanases e fitases, produzidas pelos microrganismos, são usadas para promover a degradação de PNA e fitato. Assim, as enzimas exógenas quando adicionadas à ração contribuem para uma melhor digestibilidade, promovendo o crescimento e melhorando o desempenho produtivo dos animais. Portanto, o objetivo desse estudo foi selecionar e caracterizar o fungos com melhor produção de fitase e xilanase, a partir de fonte de carbono alternativa em meio sólido (FMS), para posteriormente aplicar estas enzimas *in vitro* em rações e realizar a comparação com as enzimas comerciais. Foram utilizados sete fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus* sp. e *Thermoascus* sp. em fermentação sólida e testadas em diferentes fontes de carbono. A melhor fonte de carbono para a produção de fitase foi a palha de arroz por *Aspergillus* sp. (M2) ($2,73 \pm 0,007$ U/mg). Para xilanase, foi a palha de arroz por *A. flavus* ($41,45 \pm 13,07$ U/mg). O melhor tempo de crescimento para produção de fitase por *A. niger* foi 96 horas ($1,48 \pm 0,07$ U/mg). Na produção de xilanase, observou-se o pico com *Aspergillus* sp. (M2) em 48 horas ($31,06 \pm 1,50$ U/mg). A temperatura ótima de fitase com *Aspergillus* sp. (M2) e *A. niger* foi 50 e 45 °C, respectivamente. A temperatura ótima para xilanase de *Aspergillus* sp. (M2) foi 55 °C. Considerando que o *Aspergillus* sp. (M2) foi o melhor produtor das enzimas de interesse, foi definido este fungo para aplicação nas rações animais. Para o teste de atividade enzimática *in vitro* foram utilizados 0,05 U de extrato enzimático bruto e da enzima comercial. A fitase de *Aspergillus* sp. (M2) teve capacidade de hidrólise na ração MI ($3,38 \pm 0,85$ μmoles/mL), enquanto a fitase comercial obteve maior capacidade de hidrólise em MIFS ($1,78 \pm 0,11$ μmoles/mL). Os ensaios enzimáticos das xilanases foram realizados em 4, 8 e 24 horas de incubação, utilizando 0,05 U do extrato enzimático e da enzima comercial. A xilanase de *Aspergillus* sp. (M2) obteve maior hidrólise na ração MIFS em 4 horas ($12,67 \pm 0,51$ μmoles/mL), 8 horas ($34,36 \pm 0,66$ μmoles/mL) e em 24 horas ($38,12 \pm 2,27$ μmoles/mL). A xilanase comercial 2, teve maior hidrólise na ração MI em 4 horas de incubação ($8,06 \pm 0,13$ μmoles/mL), já em 8 horas de incubação, teve maior capacidade de hidrólise na ração MIFS

($19,18 \pm 2,37$ $\mu\text{moles/mL}$) e MI em 24 horas ($26,32 \pm 0,67$ $\mu\text{moles/mL}$). Dessa forma, a adição da fitase e xilanase de *Aspergillus* sp. (M2) nas raçoes *in vitro* demonstrou aumento nos açucres e fosfato inorgânico liberados, sendo capazes de melhorar a absorção de nutrientes contribuindo para diminuir gastos de produção.

Palavras-chaves: Fitase, xilanase, *Aspergillus* sp, fonte de carbono alternativa e raço

ABSTRACT

Compounds of plant origin used in animal feed have anti-nutritional factors such as non-starch polysaccharides, oligosaccharides and phytates, which are present in the cell wall of cells of plant origin. These elements modify digestibility, residence time and viscosity in the digestive tract. Exogenous enzymes such as xylanases and phytases, produced by microorganisms, are used to promote the degradation of PNA and phytate. Thus, exogenous enzymes when added to the feed contribute to better digestibility, promoting growth and improving the productive performance of animals. Therefore, the objective of this study was to select and characterize the fungi with the best production of phytase and xylanase, from an alternative carbon source in solid medium (FMS), to later apply these enzymes *in vitro* in rations and perform the comparison with the enzymes commercials. Seven filamentous fungi of the genera *Aspergillus* sp. and *Thermoascus* sp. in solid fermentation and tested on different carbon sources. The best carbon source for phytase production was rice straw by *Aspergillus* sp. (M2) (2.73 ± 0.007 U/mg). For xylanase, it was rice straw by *A. flavus* (41.45 ± 13.07 U/mg). The best growth time for phytase production by *A. niger* was 96 hours (1.48 ± 0.07 U/mg). In the production of xylanase, the peak was observed with *Aspergillus* sp. (M2) in 48 hours (31.06 ± 1.50 U/mg). The optimal temperature of phytase with *Aspergillus* sp. (M2) and *A. niger* was 50 and 45 °C, respectively. The optimal temperature for *Aspergillus* sp. (M2) was 55°C. Whereas *Aspergillus* sp. (M2) was the best producer of the enzymes of interest, this fungus was defined for application in animal feed. For the *in vitro* enzymatic activity test, 0.05 U of crude enzymatic extract and commercial enzyme were used. Phytase from *Aspergillus* sp. (M2) had hydrolysis capacity in MI diet (3.38 ± 0.85 $\mu\text{mol/mL}$), while commercial phytase had greater hydrolysis capacity in MIFS (1.78 ± 0.11 $\mu\text{mol/mL}$). The xylanase enzymatic assays were performed at 4, 8 and 24 hours of incubation, using 100 μL of the enzymatic extract and the commercial enzyme. The xylanase from *Aspergillus* sp. (M2) obtained greater hydrolysis in the MIFS diet at 4 hours (12.67 ± 0.51 $\mu\text{mol/mL}$), 8 hours (34.36 ± 0.66 $\mu\text{mol/mL}$) and at 24 hours ($38.12 \pm 2, 27$ $\mu\text{mol/ml}$). Commercial xylanase 2 had greater hydrolysis in the MI diet at 4 hours of incubation (8.06 ± 0.13 $\mu\text{mol/mL}$), and at 8 hours of incubation it had greater hydrolysis capacity in the MIFS diet ($19.18 \pm 2 .37$ $\mu\text{mol/mL}$) and MI at 24 hours (26.32 ± 0.67 $\mu\text{mol/mL}$). Thus, the addition of phytase and xylanase from *Aspergillus* sp. (M2) *in vitro* diets showed an increase in sugars and inorganic phosphate released, being able to improve the absorption of nutrients, contributing to reducing production costs.

Keywords: Phytase, xylanase, *Aspergillus* sp, alternative carbon source and feed.

1. INTRODUÇÃO

Atividades agroindústrias, como a produção de cereais, geram muitos resíduos, e estes resíduos, por sua parte, são destinados a produção de geração de energia através da queima, na decomposição de material orgânico, na produção da alimentação animal, entre muitos outros. Caso estes resíduos não recebam destinação correta, eles podem se tornar fontes causadoras de problemas ambientais (Pinto et al., 2005).

Muitas fontes de carbono alternativas são utilizadas para a geração de novos produtos, como as fibras vegetais provenientes de resíduos agrícolas. Estas fibras vegetais apresentam alta disponibilidade, custo baixo de obtenção e muitas vezes não apresentam aplicação, e por esta razão podem ser aproveitadas para a produção de novos produtos (Medronho et al., 2012). Os resíduos agrícolas podem ser utilizados como fontes de polissacarídeos ou carboidratos poliméricos, que desempenham a função de reserva energética nos organismos, e realizam a manutenção da integridade celular, sinalizadores e protetores celulares (Persin et al., 2011).

A casca de arroz é um dos resíduos mais abundante gerados pela agricultura, podendo ser a fonte de carbono alternativa empregada desde a produção de cimentos e borrachas, fabricação de eletrônicos, até a aplicação para alimentação animal. A procura pelo desenvolvimento de novos materiais que possam ser utilizados como fontes de carbono alternativas renováveis, através de práticas sustentáveis e que tenham baixo impacto ambiental, têm se mostrado cada vez mais interessante por apresentarem características que une a utilização da fibra vegetal e a produção de novos produtos, apresentando papel importante nesta busca (Bergqvist et al., 2008).

Materiais lignocelulósicos apresentam grande potencial na utilização para diversas aplicações, além disso, são recursos orgânicos abundantes da terra. O material lignocelulósico obtido de fonte de carbono alternativa, como o bagaço de cana-de-açúcar, palha de arroz ou trigo, casca de soja, sabugo de milho, aveia ou arroz, são fontes de materiais lignocelulósicos e que podem ser empregados em processos industriais, biocombustíveis, enzimas, biofertilizantes e na ração animal (Cousin & Damaso, 2021). As fibras vegetais presentes nas fontes de carbono alternativas são constituídas principalmente de polímeros como celulose, hemicelulose e lignina (Menezes et al., 2015).

O desenvolvimento de novos produtos a partir de fibras naturais está sendo cada vez mais obtido de diversas formas e fontes de carbono alternativas (Medronho et al., 2012). As matérias-primas de origem vegetal são provenientes de fontes renováveis e apresentam qualidades como baixa densidade e uma estrutura química que proporciona a sua utilização como precursora de novos compostos (Silvério, 2013 e Taipina et al., 2011).

Existe disponível uma relação dos benefícios em aliar a utilização de resíduos agrícolas para obtenção hidrólise enzimática, onde os microrganismos podem ser utilizados na bioreciclagem desses resíduos e na produção de novos produtos de valor agregado. Além disso, o uso das enzimas promove melhor aproveitamento dos nutrientes contidos nos ingredientes, e redução na excreção dos nutrientes nos dejetos pelos animais, reduzindo o potencial poluente, aspecto importante para o meio ambiente (Correl, 1999; Selle & Raviran, 2007).

1.1 Ração animal

A fabricação de ração animal recentemente passou a utilizar a fonte vegetal, sendo geralmente à base de trigo e outros grãos de cereais que apresentam arabinoxilano na parede celular (Olukosi, 2020). A composição geral de um grão de cereal é composta por germe e endosperma. Além disso, a indústria de ração animal utiliza grãos como arroz, trigo, sorgo, milho e a soja, sendo os cereais as principais fonte de carboidratos e fibras vegetais na alimentação de animais monogástricos e são representados em mais de dois terços da ingestão total de energia (Bach Knudsen et al., 2012).

As fibras em cereais apresentam em sua composição polissacarídeos não amiláceos (PNA), oligossacarídeos, polissacarídeos não carboidratos e outros (Adebowale et al., 2019). Polissacarídeos não-amiláceos (PNAs) são formados por hemicelulose, celulose, gomas, pectinas e mucilagens que não são capazes de serem digeridas por enzimas animal e humana, entretanto, podem ser fermentados por microrganismos que estão presentes no trato gastrointestinal do hospedeiro (Bach Knudsen, 2001; Choct, 1997; Asp, 1996; McDougall et al., 1996). Os cereais são a principal fonte de carboidratos e fibras vegetais nas dietas de animais monogástricos e representam mais de dois terços da causa da ingestão total de energia (Bach Knudsen et al., 2012).

A maioria das rações comerciais fabricadas para animais são formuladas principalmente por milho, farelo de soja e arroz. A maioria dos PNA encontrados no milho e no farelo de soja estão na forma insolúvel o que, por sua vez, não aumenta a viscosidade intestinal, dessa forma, tendo pouca interferência na digestão quando comparados a outros alimentos vegetais mais fibrosos, como trigo, arroz ou cevada (Gracia et al., 2003). O farelo de soja possui cerca de 24% de PNA totais, sendo 6% encontrados na forma solúvel e aproximadamente 18% na forma insolúvel (Bach Knudsen, 1997). Além do milho e da soja, o arroz também é considerado um dos cereais mais consumidos do mundo e sua composição pode variar, geralmente possuindo em média 25% de PNA (Dors et al., 2009).

Portanto, existe a necessidade de conhecimento sobre os efeitos gerados pela presença de PNA nestes componentes, além disso, uma atenção maior deve ser dada à presença do fitato, considerado antinutricional (Zhang et al., 2013). A utilização de alimentos de origem vegetal por animais monogástricos se torna sem eficiência devido a inacessibilidade estrutural do substrato ou por conta da insuficiência enzimática desses animais, e pode resultar em menos de 75% da utilização dos nutrientes alimentares disponíveis (Ugwuanyi, 2016).

A maioria dos ingredientes de origem vegetal apresentam compostos chamados fatores antinutricionais (FAT), que podem diminuir o valor nutricional das dietas (Andrade et al., 2015). Utiliza-se este termo para designar compostos naturais presentes em ingredientes vegetais que ao serem consumidos geram efeitos danosos. Estes elementos são capazes de alterar a digestibilidade, a viscosidade do alimento no trato digestivo e o tempo de permanência, resultando no comprometimento do desempenho animal (Ohja, 2019).

Os FATs podem pertencer a diversas rotas metabólicas e agir como elementos de defesa nos vegetais (Gontzea; Sutzescu, 1968). Contudo, na presença em dietas de animais, estes compostos podem causar efeitos capazes de reduzir a produtividade e acarretar perdas econômicas (Zhang et al., 2013)

Como exemplo de FAT, pode ser citado o fitato, que é a reserva de fósforo dos vegetais (Francis et al., 2001; Sinhá et al., 2011). Esse composto não é digerível e se complexa com outros minerais e proteínas (Fireman e Fireman, 1998 ; Kornegay, 1996), afetando na digestão e absorção desses nutrientes (Selle et al., 2006). Já os polissacarídeos não amiláceos (PNA) são açúcares indigestíveis e que possuem baixa digestibilidade e causam o aumento da viscosidade intestinal, o que diminui a velocidade em que os alimentos fazem sua passagem, dificultando a ação de enzimas endógenas e a produção de muco.

Foi realizada uma revisão pelo Francis et al. (2001) descrevendo sobre o efeito de FAT presentes em dietas e seus respectivos efeitos em animais, posteriormente foram classificados em quatro grupos diferentes: 1) afetam a digestão e uso de proteínas; 2) antivitaminicos; 3) afetam o uso de minerais; 4) polissacarídeos não amiláceos, micotoxinas, cianogênicos, nitratos, saponinas entre outros. Contudo, alguns FATs podem ser eliminados por processamento, como a fermentação ou tratamento enzimático, que são capazes de reduzir o conteúdo ou sua atividade no alimento, entretanto, existem também outros FATs que são mais trabalhosos de serem neutralizados (Krogdahl et al., 2010)

1.2 Polissacarídeos não amiláceos

A composição de todas as plantas apresentam polissacarídeos não-amiláceos (PNA) (Sjöström, 1993), devido a composição da parede celular de suas células vegetais que é formada por arabinoxilanas e beta-glucanos (Paloheimo et al., 2011). Os PNA são classificados em celulósicos, sendo um polímero de cadeia longa composto por um monômero (glicose), ligadas por ligações beta-1-4, e os não-celulósicos, podendo ser arabinoxilanas, xilanas, e que são compostos de xilose, arabinose, manose, galactose, ligadas por ligações beta-1-4 e pectinas (Choct et al, 2004). Contudo, estes compostos são considerados como antinutricionais pois as enzimas endógenas de não ruminantes não são eficientes para hidrolisar as ligações, os tornam compostos indigeríveis.

Os polissacarídeos não amiláceos são definidos como uma grande classe de polissacarídeos, incluindo a celulose, hemicelulose, quitina e pectinas, que estão presentes na parede celular dos alimentos de origem vegetal (Ohja, 2019). Porém, por conta da natureza das cadeias de ligações dos açúcares, esses compostos se tornam resistentes à hidrólise no trato intestinal de animais monogástricos. Além da baixa digestibilidade, as fibras não amiláceas podem causar outros problemas aos animais, pois quando não hidrolisados corretamente, podem aumentar a viscosidade do conteúdo intestinal, diminuindo a velocidade dos alimentos e a ação de enzimas endógenas, o que prejudica a absorção o transporte de nutrientes (Sinha et al., 2011).

Os PNA's são divididos de acordo com a solubilidade, podendo ser classificados em duas categorias: solúvel e insolúvel. PNA's insolúveis possuem capacidade de aumentar e reter água, e isso aumenta o volume e diminui o tempo de trânsito no trato intestinal, dificultando a digestão e absorção de aminoácidos, minerais, carboidratos e conseqüentemente, reduz a digestibilidade da dieta e desempenho animal (Lunn & Buttriss, 2007). Além disso, também apresenta resistência à fermentação intestinal. A fração insolúvel pode encapsular os nutrientes devido a sua estrutura que é indigerível, formando uma barreira física entre a enzima e o nutriente (Wyatt et al., 2008). Sendo assim, quanto maior for a concentração desses compostos, menor será o valor nutritivo do ingrediente (Ugwuanyi, 2016).

A fração solúvel apresenta em sua composição a hemicelulose, que é formada por arabinoxilanas, pentosanas e β -glucanos (Sharma, 2019). Os PNA's solúveis são capazes de aumentar a viscosidade, e isso causa a diminuição da digestibilidade dos nutrientes. Isso ocorre pois estes compostos formam uma superfície de água entre o nutriente e a enzima, e assim, impedem sua atuação. (Bedford e Morgan, 1996). O aumento da viscosidade da digesta ocorre devido a presença das frações solúveis dos PNA's solúveis, determinadas, principalmente, pela hemicelulose, β -glucanos e arabinoxilanas (Kumar et al., 2012).

Adicionar enzimas exógenas que hidrolisam esses compostos pode ser uma potencial alternativa para resolver esse problema com o PNA, pois elas são capazes de liberar os nutrientes necessários e aumentar a digestibilidade. Por esta razão, a indústria de ração animal passou a utilizar as enzimas exógenas, como as fitases e xilanases, produzidas por microrganismos, pois estas enzimas são capazes de promover o aproveitamento de polissacarídeos e outros nutrientes, aumentando a digestibilidade e assim, minimizando os problemas com os fatores antinutricionais das rações e melhorando a produtividade dos animais (Campestrini et al., 2005).

1.3 Enzimas

Na década de 1950, iniciaram-se pesquisas com a aplicação de enzimas na dieta de diversos animais domésticos, e foi observado melhorias na produtividade, visto que atualmente, a adição de enzimas exógenas na alimentação animal é uma área muito estudada e instigadora na nutrição e biotecnologia (Adeola e Cowieson, 2011). A aplicação de enzimas na biotecnológicas possibilita uma variedade de reações bioquímicas, que promovem a rentabilidade de processos e a redução de problemas ambientais (Cousi & Damaso, 2021). Na área de nutrição, as enzimas podem auxiliar no aumento da digestibilidade de nutrientes da ração (Zanella, 1998). Os complexos enzimáticos podem combinar enzimas que atuam de maneira complementar, de forma que algumas carregam a função de eliminar as barreiras para auxiliar a atuação das enzimas exógenas, enquanto as outras vão ter o intuito de complementar quantitativamente as enzimas endógenas (LELIS et al., 2010).

As primeiras enzimas exógenas foram adicionadas nas dietas de animais com intuito de reduzir os efeitos antinutricionais dos PNA's (Philipps-Wiemann, 2018). Foi quando as fitases, que surgiram na década de 90, não só melhoraram a disponibilidade do fósforo fítico, como também conseguiram diminuir sua excreção no meio ambiente (Jatuwong et al., 2020). Toda enzima opera em um substrato, pH e temperatura ideal, sendo assim, se faz necessário que nas produções industriais as enzimas sejam robustas e capazes de atuar em diversas condições (Corrêa et al., 2014). As enzimas industriais são produzidas a partir de processos fermentativos de baixo custo, dessa forma, o meio de cultivo a ser utilizado deve conter fontes de carbono, fontes de nitrogênio e micronutrientes necessários para produção de enzimas usadas (Corrêa et al., 2014). A fermentação sólida promove o crescimento de microrganismos e possui vantagens por ter baixo custo, maior rendimento, estabilidade e possibilidade de aproveitamento utilizando diversos resíduos agroindustriais como substrato (Contesini et al., 2018). A fermentação sólida ocorre pelo processo de fermentação de microrganismos

cultivados em uma superfície de substrato sólido com ausência ou quantidade de água, mas com a umidade o suficiente para o crescimento de microrganismos (Jatuwong et al., 2020).

As enzimas exógenas a partir de fontes microbianas expandiram por todo o mundo, atualmente sendo reconhecidas devido aos seus benefícios alimentares na digestão de nutrientes, além de todas as outras aplicações que elas possuem (Selle e Ravindran, 2007). O mercado de enzimas para alimentação animal está em crescente desenvolvimento devido ao aumento da demanda por produtos de origem animal (Guerrand, 2018). Além da aplicação em dietas de animais, as enzimas possuem aplicabilidade em outros setores industriais, como na fabricação de detergentes, têxteis, amido, panificação, sendo, cerca de 75% produzidas industrialmente (Cousi & Damaso, 2021).

1.3.1 Fitase

As fitases ou mio-inositol hexafosfato fosfohidrolase, realizam a liberação de fosfato do ácido fítico ou fitato, conforme pode ser visto na Figura 1 (Konietzny & Greiner, 2002). O caminho de degradação segue em ordem decrescente com penta-, tetra-, tri-, di- e monoésteres de inositol, gerando como produto final o inositol e seis porções de fósforo (Dersjant-Li et al., 2014) Estas enzimas são classificadas com relação ao ataque a determinado carbono na composição do ácido fítico, pH ótimo e informações estruturais (Singh et al., 2020), baseado em mecanismos de reação enzimática, sequências de aminoácidos, conformação tridimensional e propriedades bioquímicas (Kumar et al., 2016).

Esse elemento está presente nos ingredientes de origem vegetal na forma do fitato e nas plantas ele forma complexos com minerais, proteínas e amido, mas não ficam indisponíveis para animais monogástricos. Dessa forma, a hidrólise desse composto pode aumentar a disponibilidade do fósforo inorgânico e outros minerais nas dietas (Singht e Satyanarayana, 2015).

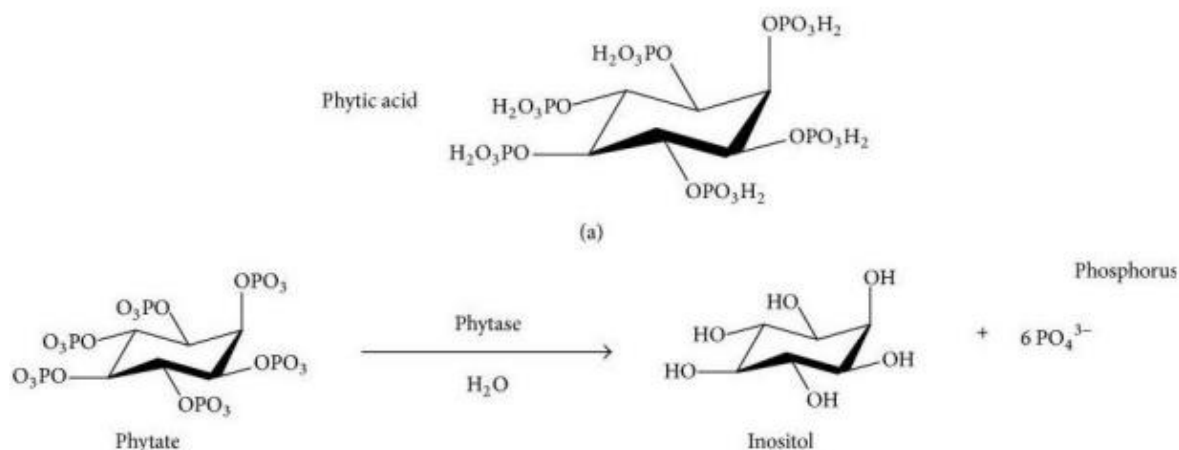


Figura 1. Hidrólise do ácido fítico pela enzima fitase, liberando inositol e fosfato inorgânico (Cangussu et al., 2018).

O primeiro grupo de fitases é classificado com base em sua função e estrutura catalítica, denominado como fosfatases ácidas de histidina, fosfatases ácida púrpura, β -propeller fitases e proteínas fosfatase tirosina (Yao et al., 2011; Kumar et al., 2016; Singh et al., 2020). O maior grupo de fitases está incluído nas 3-fitases (E.C. 3.1.3.8), que são de origem fúngica e bacteriana, agindo no C3 do anel inositol (Singh et al., 2020). As características e as propriedades catalíticas das fitases variam dos fungos utilizados. Portanto, a produção de fitases a partir de fungos depende de temperaturas ótimas e valores de pH específico (Yao et al., 2011; Singh e Satyanarayana, 2015).

Além disso, as fitases são produzidas na natureza em uma gama de tecidos vegetais, animais, bactérias, leveduras e fungos (Vohra e Satyanarayana, 2003). No entanto, tem sido encontrado com mais frequência a atividade da fitase em fungos, especialmente em espécies de *Aspergillus* (Kim et al., 1998), a primeira geração de fitase fúngicas foi obtida de *A. niger*, e comercializada em 1991. Atualmente, grande parte dos trabalhos científicos mantém o foco em fitases obtidas de fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Myceliophthora*, *Mucor*, *Rhizopus* e *Penicillium* (Roopesh et al., 2006; Dailin et al., 2019).

1.3.1.1 Ácido fítico

O substrato da enzima fitase é conhecido como fitato quando em forma de sal, fitina ou ácido fítico. Os fosfatos de inositol correspondem a um anel inositol com 6 grupos fosfato e 12 prótons (Cowieson et al., 2004). O fitato é o sal misto de ácido fítico e cátions (Kumar et al., 2010), e possui a capacidade quelante devido à sua estrutura, apontando uma forte afinidade com cátions polivalentes (Graf & Eaton, 1990). Por ser uma molécula negativamente carregada,

ela possui mais facilidade na formação de sais insolúveis com cátions. Além disso, a carga negativa devido a existência dos seis grupos fosfato em sua molécula, promove alta afinidade por minerais e nutrientes carregados positivamente, ligação direta ou indiretamente ao amido, à proteína e às enzimas, podendo formar complexos e influenciar negativamente na digestão de nutrientes (Vasudevan et al., 2019).

O ácido fítico presente nos vegetais possui como principal função a reserva de grupos fosfatos, promovendo uma fonte de fósforo para as sementes, estoque energético e fonte de cátions (Pandey et al., 2001). O fitato constitui 60 a 97 % do fósforo de um grãos de cereais, (Ravindran, 1994), sendo armazenado na camada de aleurona ou no gérmen da semente. Nas sementes de cereais e leguminosas, ocorre uma via independente de lipídios para a formação do fitato (Feizollahi et al., 2021).

O fitato realiza interações com componentes dos ingredientes no trato digestório do animal, sendo influenciado pelo pH e pelas ligações com outros minerais (Amerah et al., 2014). Entretanto, quando na presença do pH alcalino do intestino dos animais, o fitato fica mais carregado negativamente, o que dificulta a ligação da fitase com o substrato (Shanmugan, 2018), conseqüentemente, diminuem a quantidade de fósforo e outros nutrientes que estão complexados na molécula, além de reduzir a solubilidade de outros nutrientes, conseqüentemente aumentando a excreção de minerais e aminoácidos (Cowieson et al., 2017). Para deixar disponíveis os nutrientes ligados ao fitato, deve-se quebrar o mio-inositol no trato digestório, para assim liberar os grupos fosfatos pelas fitases. Nos animais monogástricos, a produção destas enzimas endógenas é baixa e insuficiente para realizar a hidrólise do fitato de forma eficiente, prejudicando o aproveitamento da dieta (Ingelmann et al. 2018).

A via independente de lipídios para a formação do fitato começa pela formação do inositol-3-fosfato, partindo de glicose-6-fosfato, pela enzima mio-inositol-3-fosfato sintase. Posteriormente, diversas quinases fazer fosforilação dos outros cinco sítios do anel inositol. A última etapa é catalisada por Inositol Pentaquis Fosfato 2-quinase, junto com a produção de IP6 a partir de IP5 (Rasmussen et al., 2010). Estes complexos costumam ser insolúveis e apresentam resistência à ação do trato intestinal, reduzindo, dessa forma, a biodisponibilidade desses nutrientes (Niu et al., 2017). Além disso, o fitato também possui muito potencial para fazer interações com proteínas, carboidratos e lipídios carregados positivamente, o que acaba reduzindo a funcionalidade e digestibilidade destes nutrientes nos alimentos (Duong et al., 2018; Vasudevan et al., 2019).

Caso o fitato fosse hidrolisado pelo animal, seria uma fonte rica em fósforo (Onyango et al., 2005), porém, os monogástricos não apresentam quantidade suficiente de fitase endógena

para conseguir digerir o fitato de forma eficiente (Nelson, 1967). Portanto, existe a necessidade de realizar a suplementação de fonte inorgânica de fósforo na dieta. Além disso, muitas rações são fabricadas com excesso de fósforo inorgânico para suprir as necessidades exigidas pelos animais, porém, este elemento acaba sendo excretado para o ambiente e causando poluição. A introdução de enzimas que degradam o fitato na alimentação dos animais, pode reduzir significativamente a poluição causada pela excreção do fósforo (Bedford, 2000).

1.3.1.2 Xilanase

Atualmente, as xilanases estão classificadas na família glicosil hidrolases (GHs). As GHs são enzimas que hidrolisam a ligação glicosídica entre dois ou mais carboidratos. As xilanases podem ser produzidas por diversos microrganismos, incluindo fungos, bactérias, leveduras, que são classificados nas famílias GH5, 7, 8, 10, 11, 26, 30 e 43 (Chadha et al., 2019). Os grupos mais conhecidos são membros das famílias GH10 e GH11. As xilanases são glicosidases que catalisam a endo hidrólise de ligações 1,4- β -D-xilosídicas em xilana (Collins et al., 2005). As xilanases ocorrem em diversas classes, como endo-1,4- β -xilanase, β -xilosidases, acetilxilano esterase, arabinofuranosidases e α -alucuronidase (Srivastana et al., 2020).

A hidrólise da xilana (figura 3) é realizada pela endoxilanase que cliva a espinha dorsal da β -D-xilopiranosose e libera o xilo-oligômeros e β -xilosidases, que caso sejam decompostos, vão liberar mais xilose ainda (Mohan, 2020). As enzimas são necessárias na degradação das hemiceluloses pois elas são constituídas por muitos polímeros, os quais são formados por resíduos de açúcares (Lopes, 2010). Portanto, na ração animal, o uso de xilanases consegue diminuir os polissacarídeos não amiláceos, além disso, regulam a viscosidade na dieta e a disponibilidade de nutrientes pela hidrólise dos PNA's (Delmaschio, 2018), além de promover a digestão de xilanas (De Barros, 2016), também de acesso a fitase ao fitato armazenado na membrana da parede celular. Assim, os animais conseguem ter maior produtividade, e ter mais ganho de peso (Dourado, 2008).

A suplementação enzimática com xilanase está mais direcionada a dietas com ingredientes que possuem maior quantidade de fibras, dessa forma, a avaliação do consumo é necessária para entender e prever o desempenho. Existem estudos que apontam uma melhora na dieta composta por trigo e farelo de soja com a adição de xilanase, demonstrando melhor metabolização dos nutrientes (Pirgozliev et al., 2010). Em outro trabalho, onde foi adicionado de complexo enzimático com xilanase em uma dieta a base de trigo destinada à poedeiras, também foi obtido bons resultados, com melhor conversão alimentar (Mathlouthi et al., 2003).

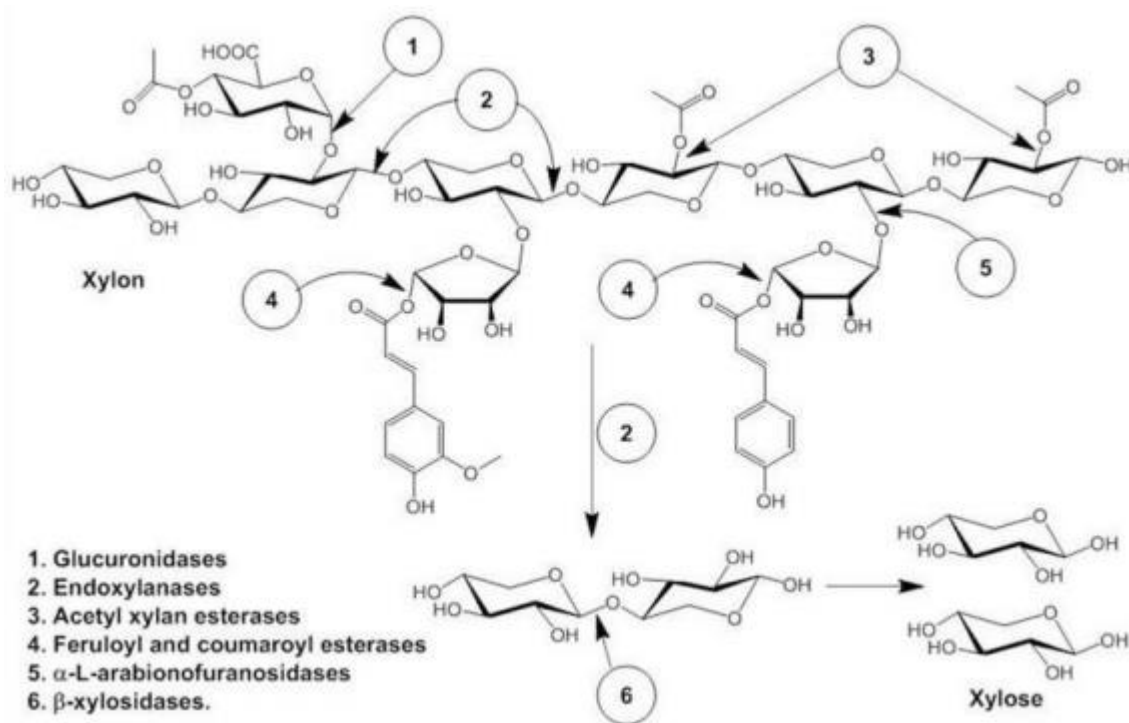


Figura 2. Sistema xilanolítico e seus pontos de clivagem até a liberação de xilose. (Yadav et al., 2018).

Existem diversas enzimas para a degradação de PNA's, cada uma com propriedades diferentes. Contudo, do ponto de vista comercial, as xilanases são o grupo de hidrolases mais relevante, representando cerca de 80 % do mercado global (Adeola e Cowieson, 2011; Castillo e Gatlin, 2015). Xilanases de fungos termofílicos estão sendo destacadas no meio científico devido às suas várias aplicações industriais (Singh et al., 2016). Estudos apontaram alguns exemplos de fungos que produzem de xilanases termofílicas e que merecem destaque como os gêneros *Trichoderma*, *Penicillium*, e *Aspergillus*, e espécies como *Melanocarpus albomyces*, *Cerrena unicolor*, *Thermomyces lanuginosu* e *Rhizopus oryzae* (Thomas et al., 2014). A aplicação de xilanases exógenas às dietas dos animais pode melhorar a absorção dos nutrientes que ficam retidos nas células vegetais, da mesma forma que pode reduzir a viscosidade causada por polissacarídeos não amiláceos no trato digestivo do animal (Pirgozliev et al., 2015), e por fim, facilitando a digestibilidade em rações, proporcionando o aumento do valor nutricional e o ganho de peso corporal em animais monogástricos (Yegin, 2017).

1.3.2.1 Xilana

As xilanas são biopolímeros que podem ser encontrados em grande quantidade na parede celular dos grãos. Apesar das xilanas não serem digeridas por animais monogástricos, as dietas possuem altos valores destes compostos na sua formulação e isso acaba por diminuir

a digestibilidade e aproveitamento dos ingredientes pelos animais. Nesse sentido, a suplementação de dietas com xilanase apresenta grande potencial para auxiliar a combater esses efeitos antinutricionais e melhorar a absorção dos nutrientes (Adeola et al., 2010).

O direcionamento deste componente em processos biotecnológicos é de enorme relevância para o comércio de enzimas industriais, através da aplicação e utilização de complexos enzimáticos utilizando fungos para a produção, além disso, a xilana destaca-se nas áreas alimentícias, de biocombustíveis, de bebidas, indústria têxtil e de papel (Silva, et al., 2015). Arabinogalactana, galactoglicomanana, xiloglicana, glicomanana e xilana, compõem um complexo polimérico gerador das hemiceluloses, destacando o principal polímero, que é a xilana, formada a partir da cadeia principal por D-xilopiranosose em ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4) (Shallom, et al., 2003; Habibi, et al., 2005). Embora o conteúdo e o tipo de xilana possam variar entre diferentes espécies e tipos de tecidos que está sendo analisado (Gírio et al., 2010), geralmente, apenas dois tipos principais são frequentemente encontrados: glicuronoxilana e glicuronoarabinoxilana (Gírio et al., 2010; Vuong & Master, 2022).

É necessário que a xilana passe por um pré-tratamento antes de ser utilizada, devendo ser separada do material lignocelulósico, a partir de técnicas de tratamento enzimático com enzimas nativas de xilanas do material lignocelulósico (Falkoski, 2011). Na literatura já foram relatados diversos tipos de pré-tratamentos, como por exemplo a extrusão mecânica, usando ácidos e alcalinos ou líquidos iônicos, realizando explosão de vapor ou de fibra de amônia, e água quente. Todos são realizados com a finalidade de melhorar a eficiência e diminuir a formação de inibidores e o tempo de processo (Polizeli et al., 2016).

1.4 Fungos produtores destas enzimas

Existe uma variedade de microrganismos que são potenciais produtores de enzimas exógenas, incluindo actinomicetos, fungos e bactérias (Chadha et al., 2019), mas do ponto de vista industrial, os fungos filamentosos são os mais promissores na produção dessas enzimas, pois eles apresentam eficiência de cultivo, altos níveis de produção enzimática e de secreção de enzimas extracelulares, por este motivo, são promissores para inúmeras aplicações industriais e biotecnológicas (Chadha et al., 2019). Os fungos termofílicos são resistentes a ações desnaturantes e possuem alta atividade catalítica, além disso, possuem menores chances de contaminação, sendo considerados como uma das melhores fontes. Muitos processos industriais necessitam de enzimas que suportem altas temperaturas e, por essa razão, as enzimas termofílicas estão ganhando cada vez mais espaço nas indústrias biotecnológicas. O gênero *Aspergillus* se destaca entre os produtores destas enzimas por possuir a capacidade de

sobreviver em diversas condições e produzir enzimas que são eficientes na decomposição de resíduos agroindustriais em produtos (Gusmão et al., 2014).

1.4.1 Gênero *Aspergillus*

Os fungos *Aspergillus* se destacam na produção de proteínas, metabólitos secundários e micotoxinas (Frisvad, 2018). As espécies de fungos que são aplicadas na indústria possuem a capacidade de produzir apenas uma certa quantidade de compostos tóxicos para vertebrados (micotoxinas) e uma variedade de outros compostos que podem apresentar atividade anticarcinogênica, antioxidante e pigmentos (Mushtaq et al., 2018). Por esta razão, os fungos *Aspergillus* são muito usados na biotecnologia industrial. Ao se tornar de maior importância econômica, a taxonomia deste gênero foi estudada várias vezes e atualmente, para descrever uma espécie de *Aspergillus*, é necessário realizar análises fenotípicas, genotípicas e filogenéticas (Arastehfar et al., 2021). As espécies mais conhecidas do gênero são as mais utilizadas na indústria. Alguns dos organismos atuam na deterioração de alimentos, outros podem ser patogênicos para humanos ou contaminantes internos (Frisvad et al., 2019). Além disso, as espécies de *Aspergillus* são bastante utilizadas em fermentações de alimentos, por exemplo o *A. oryzae* ou como o *A. niger*, que produz várias enzimas usadas nas indústrias de alimentos e rações, como glicoamilases, proteases e fitases (Cairns, 2018).

1.4.2 Gênero *Thermoascus*

Apesar dos fungos filamentosos serem microrganismos classificados como mesófilos, existem trabalhos indicando produção de enzimas termoestáveis por algumas espécies do gênero, incluindo *Thermoascus aurantiacus* (Kalogeris et al., 1998). Foi relatado por um estudo a eficiência da aplicação de uma xilanase de *T. aurantiacus* para produção de xilooligossacarídeos, utilizando como substrato o bagaço de cana-de-açúcar (Nascimento et al., 2022). Além disso, outro estudo também obteve resultados apontando que o *T. aurantiacus* é capaz de produzir CMCases, xilanases e β -glicosidases com boa estabilidade ao pH e temperatura (da Silva et al., 2005; Ping et al., 2018; Mól et al., 2019). As espécies *Thermoascus*, por serem termofílicas, conseguem se desenvolver em altas temperaturas (Hosoya, 2014), entre 20 a 62 °C (Wareing, 1997). O gênero *Thermoascus* é composto por seis espécies identificadas até hoje: *Thermoascus verrucosus*, *T. yaguchii*, *T. crustaceus*, *T. thermophilus*, *T. aurantiacus* e *T. aegyptiacus* (Schoch, 2020), sendo a espécie *Thermoascus aurantiacus* a mais estudada do gênero, pois além de ser termofílica, também cresce de maneira eficiente em biomassa lignocelulósica (Leite et al., 2008; Mól et al., 2019).

1.5 Aplicação

A utilização de enzimas na indústria já vem ocorrendo há algumas décadas (Krabbe, 2012). Apesar da grande quantidade de enzimas comerciais disponíveis no mercado, há uma busca por novas enzimas produzidas por fungos filamentosos que preferencialmente sejam de baixo custo e eficientes na produção, para o uso extensivo nas aplicações industriais, assim como na fabricação de rações animais. Desta maneira, torna-se eficiente para a indústria de ração animal o uso de enzimas exógenas, como β -glucanases, celulasas, hemicelulasas, xilanases, pectinases, amilases, proteases, fitases e muitas outras (Ohja, 2019). Estas enzimas exógenas são capazes de potencializar o aproveitamento de polissacarídeos e outros nutrientes, além de aumentar a digestibilidade dos ingredientes, tornando disponíveis os nutrientes necessários para melhorar o desempenho produtivo (Campestrini et al., 2005).

De acordo com a Grand View Research (2020), o mercado global de enzimas em 2019 foi estimado em torno de US\$10,0 bilhões, apontando um crescimento anual de 7,1% e com expectativas de atingir US\$14,9 bilhões no ano de 2025. Esse aumento exponencial é resultado da especificidade da enzima com o substrato, da importância do produto gerado, da evolução de tecnologias enzimáticas, as quais tornam possível a obtenção de enzimas mais eficientes, (Novozymes, 2020). No mercado enzimático, cerca de 60 tipos de enzimas têm aplicação industrial e são utilizadas em detergentes, têxteis, amido, panificação e ração animal, que ao total, usam cerca de 75 % das enzimas produzidas industrialmente (Cousi & Damaso, 2021).

Torna-se importante a utilização de enzimas exógenas pois estas hidrolisam os polissacarídeos não amiláceos que podem ser utilizados pelo animal, para obter o aumento, por exemplo, da utilização de energia. Outra consequência importante desta utilização é a redução do impacto negativo gerados por estes resíduos não digestivos. Ao todo, as aplicações em alimentos e rações representam 60 % do mercado global mercado de enzimas (Guerrand, 2018).

Devido à grande diversidade de microrganismos produtores de enzimas, este trabalho teve como objetivo selecionar e caracterizar entre os fungos no estudo o melhor produtor de fitase e xilanase e, aplicação dessas enzimas na ração animal *in vitro* e comparando com as enzimas comerciais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do estudo foi produzir fitase e xilanase através de fungos filamentosos e aplicar estas enzimas *in vitro* em rações.

1.1 Objetivos específicos

- i. Seleção de fungos filamentosos (*A. flavus* Link, *A. japonicus* Saito, *A. niger* van Tieghem, *A. niveus* Blochwitz, *A. terreus* Thom, *Aspergillus sp.* (M2) e *Thermoascus aurantiacus* Miehe) para produção fitase e xilanase;
- ii. Produção das enzimas usando fontes de carbono alternativas (farelo de trigo, farelo de arroz integral, palha de arroz, palha de milho, farinha de mandioca, farinha de soja e bagaço de cana);
- iii. Avaliação do tempo de crescimento na produção das enzimas;
- iv. Avaliação da temperatura na atividade enzimática;
- v. Aplicação das enzimas obtidas neste estudo com as enzimas comerciais (obtidas em parceria com a FAMEZ) usando 11 alimentos alternativos (milho, milheto, sorgo, farelo de soja, farelo de trigo, farelo de arroz, casca de soja, DDGS-etanol, DDGS-sabugo, milho + farelo de soja e uma dieta alternativa – pura fibra).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos e manutenção de crescimento

Foram utilizados sete fungos filamentosos, *A. flavus* Link, *A. japonicus* Saito, *A. niger* van Tieghem, *A. niveus* Blochwitz, *A. terreus* Thom, *Aspergillus sp.* (M2) e *Thermoascus aurantiacus* Miehe, isolados e mantidos na micoteca da UFMS em Campo Grande – MS para a produção das enzimas. A manutenção dos microrganismos foi feita por repiques em ágar inclinado (BDA – batata, dextrose, ágar), onde os fungos foram mantidos em estufa a 30 °C por um período de 5-8 dias, e posteriormente armazenados em geladeira até o momento de uso.

3.2 Produção de fitase e xilanase em meio sólido (FMS) usando diferentes fontes de carbono

Para a produção das enzimas foram utilizadas fermentação em meio sólido em frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo 5 ml de meio Khanna (Khanna et al., 1995) em pH 6 e suplementado com 2,5 % (p/v) de fonte de carbono (farelo de trigo, farelo de arroz integral, palha de arroz, palha de milho, farinha de mandioca, farinha de soja e bagaço de cana). Os

meios foram esterilizados e, posteriormente inoculados com uma suspensão de esporos (10^6 esporos/ml) usando 5 mL da solução de sais para o inóculo (Martins et al., 2012).

Posteriormente, as culturas em meio sólido foram incubadas sob condição estacionária por 120 horas a 30 °C. Após o crescimento as culturas foram ressuspensas com 20 mL de água destilada estéril, agitadas por 30 minutos, filtradas com auxílio de peneiras para extração das enzimas extracelulares (fitase e xilanase). Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 4 °C a 10.000 rpm, sendo o sobrenadante usado como fonte de enzimas nos ensaios enzimáticos e quantificação de proteínas.

3.3 Avaliação do tempo de crescimento na produção das enzimas

Foram selecionados os melhores produtores das enzimas (*A. niger*, *A. japonicus*, *A. flavus*, *Aspergillus* sp (M2) para avaliação do tempo de crescimento. Os fungos foram crescidos em fermentação em meio sólido (FMS) usando Erlenmeyer de 125 ml contendo 5 ml de meio Khanna (Khanna et al., 1995) em pH 6 e suplementado com 2,5 % (p/v) de palha de arroz como fonte de carbono. Os meios foram esterilizados e, posteriormente inoculados com uma suspensão de esporos (10^6 esporos/ml) usando 5 mL da solução de sais para o inóculo (Martins et al., 2012).

Posteriormente, as culturas em meio sólido foram incubadas em estufa por um período variando de 48 a 192 h a 30 °C. Após o crescimento as culturas foram ressuspensas com 20 mL de água destilada autoclavada, agitadas por 30 minutos, filtradas com auxílio de peneiras para extração das enzimas extracelulares (fitase e xilanase). As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 4 °C a 10.000 rpm, sendo o sobrenadante usado como fonte de enzimas nos ensaios enzimáticos e quantificação de proteínas, conforme descrito no item 3.4.

3.4 Ensaio de atividade enzimática e proteica

A atividade da fitase foi determinada de acordo com o método de Heinonen & Lahti (1981). Foi usado uma solução de parada da reação: molibdato de amônio ($(\text{NH}_4)_6\text{MO}_7\text{O}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (10mM) e H_2SO_4 (5N), dissolvidos em água destilada. A solução colorimétrica foi preparada misturando molibdato de amônio, ácido sulfúrico e acetona na proporção de 1:1:2. Uma solução de KH_2PO_4 a 2 $\mu\text{molar/mL}$ foi usada como padrão. Para reação enzimática foram usados 250 μL de tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5), com ácido fítico a 10 mM, 50 μL de extrato enzimático bruto, colocados em banho-maria por 30 min a 50 °C. Após o tempo de incubação, foram adicionados 1,5 μL da solução de parada e 100 μL de ácido cítrico 1 M. Uma

unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima liberando 1 μmol de produto por minuto. Os resultados foram lidos em espectrofotômetro a 355 nm.

A atividade de xilanase foi realizada com tampão em 500 μL de citrato-fosfato, pH 5, contendo 1,0 % (w/v) de xilana e 500 μL como substrato enzimático, devidamente diluído. As amostras foram incubadas a 50 °C para determinar a atividade da xilanase. A quantidade de açúcar redutor foi determinada usando o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), através da metodologia descrita por Miller (1959), utilizando xilose a 1 mg/mL como padrão. Os resultados foram lidos em espectrofotômetro a 540 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima liberando 1 μmol de açúcar redutor por minuto.

A dosagem de proteína foi realizada segundo o método de Lowry (Lowry et al., 1951) utilizando-se soro albumina bovina (200 $\mu\text{g/mL}$) como padrão. A atividade específica foi definida em unidades por miligrama de proteína (U/mg).

3.5 Avaliação da temperatura na atividade enzimática

Para a avaliação da temperatura na atividade na atividade enzimática, utilizou-se temperaturas variando de 40 a 60°C, com intervalos de 5 °C, seguindo as metodologias de dosagem enzimática descritas anteriormente no item 3.4. As atividades relativas foram calculadas como uma percentagem (%) da atividade máxima.

3.6 Enzimas comerciais

As enzimas comerciais utilizadas foram: xilanases Natugrain ® produzida pela BASF e a xilanase 2 (retirada de *Trichoderma*), que foram cedidas pelo prof^o Dr^o Charles Kiefer (FAMEZ/UFMS), as quais foram diluídas em 0,1 % em água destilada obtendo uma quantidade de 0,1 U; fitase Natuphos ® produzida pela BASF sendo diluída a 1 % em água destilada com 0,005 U. As soluções foram então aplicadas nos alimentos para ração animal obtidas em parceria com a FAMEZ. As dosagens enzimática e proteica foram realizadas conforme descrito no item 3.4.

3.7 Avaliação da hidrólise do alimento cru (ração) in vitro por ação da fitase e xilanase produzidas pelo *Aspergillus sp.* (M2) e pelas enzimas comerciais

Foram utilizadas 11 rações (alimentos cru), cedidas pela FAMEZ, para o teste de atividade enzimática *in vitro*. Para análise de hidrólise destes nutrientes pelas xilanases e fitases de *Aspergillus* (M2) e das comerciais foram utilizadas 0,1 e 0,05 unidades, respectivamente,

adicionando 1 % de ração por reação. As rações usadas foram: milho (MI), milheto (ML), sorgo (SMV), farelo de soja (FS), farelo de trigo (FT), farelo de arroz (FA), casca de soja (CS), DDGS-etanol (DDGS-E), DDGS-sabugo (DDGS-S), milho + farelo de soja (MIFS), e uma dieta alternativa – pura fibra (DAF). A constituição das rações usadas nesse estudo está apresentada nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Constituição dos componentes presentes na ração

Alimento	Ramnose (%)	Fucose (%)	Arabinose (%)	Xilose (%)	Manose (%)	Galactose (%)	Glicose (%)	Ácidos urônicos (%)
Milho	-	-	1,55	2,07	0,24	0,54	2,34	0,09
Milheto	0,01	-	1,3	1,74	0,22	0,35	2,17	0,01
Sorgo	0,03	-	1,32	1,23	0,26	0,32	2,56	0,05
Farelo de soja	0,20	0,17	2,39	1,53	0,97	3,92	4,84	2,44
Farelo de trigo	0,03	0,03	6,49	10,76	0,5	0,85	7,99	0,39
Farelo de arroz	0,01	-	3,49	4,09	0,39	1,13	6,4	0,3
Casca de soja	0,51	0,11	3,99	7,68	4,31	2,27	28,76	7,33
DDGS-Etanol	*	*	*	*	*	*	*	*
DDGS-Sabugo	*	*	*	*	*	*	*	*
Dieta MI+FS**	**	**	**	**	**	**	**	**
Dieta alternativa**	**	**	**	**	**	**	**	**

Fonte: Adaptado de Rostagno et al. (2017). *Esses valores podem ser calculados. Proteína Bruta (PB).

Tabela 2. Composição nutricional dos alimentos (PNA's), valores em percentagem nos alimentos.

Alimento	Ramnose (%)	Fucose (%)	Arabinose (%)	Xilose (%)	Manose (%)	Galactose (%)	Glicose (%)	Ácidos urônicos (%)
Milho	-	-	1,55	2,07	0,24	0,54	2,34	0,09
Milheto	0,01	-	1,3	1,74	0,22	0,35	2,17	0,01
Sorgo	0,03	-	1,32	1,23	0,26	0,32	2,56	0,05
Farelo de soja	0,20	0,17	2,39	1,53	0,97	3,92	4,84	2,44
Farelo de trigo	0,03	0,03	6,49	10,76	0,5	0,85	7,99	0,39
Farelo de arroz	0,01	-	3,49	4,09	0,39	1,13	6,4	0,3
Casca de soja	0,51	0,11	3,99	7,68	4,31	2,27	28,76	7,33
DDGS-Etanol	*	*	*	*	*	*	*	*
DDGS-Sabugo	*	*	*	*	*	*	*	*
Dieta MI+FS**	**	**	**	**	**	**	**	**
Dieta alternativa**	**	**	**	**	**	**	**	**

Fonte: Adaptado de Rostagno et al. (2017). *A tabela não contém informações sobre o DDGS. ** Esses valores podem ser calculados.

3.7 Teste estatístico

Para a análise estatística utilizou-se o teste Tukey a fim de comparar as médias entre os tratamentos. Foi utilizado o programa SISVAR versão 5.6 de análises estatísticas e planejamento de experimentos (Ferreira, 2019). Todos os testes foram feitos em duplicatas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito de diferentes fontes de carbono na produção enzimática

Foram utilizados meios de cultivo sólido (conforme descrito no item 3.2) para produção de fitase e xilanase por *A. flavus*, *A. japonicus*, *A. niger*, *A. niveus*, *A. terreus*, *Aspergillus* sp. (M2) e *T. aurantiacus* em fontes de carbono alternativas. As fontes escolhidas foram baseadas no que a literatura descreve como boas indutoras de produção de fitase e xilanase e também como fontes regionais que são consideradas como boas indutoras.

Analisando os resultados obtidos na produção de fitase (figura 3), observa-se que a melhor fonte de carbono foi a palha de arroz por meio do *Aspergillus* sp. (M2) ($2,73 \pm 0,007$ U/mg), seguido do *A. niveus* com arroz integral ($2,59 \pm 0,17$ U/mg), posteriormente o *A. niger* ($1,89 \pm 0,03$ U/mg), *A. japonicus* ($1,66 \pm 0,29$ U/mg) e o *A. flavus* ($1,42 \pm 0,06$ U/mg) em palha de arroz. Neira-Vielma et al. (2018) usaram SSF para a produção de fitase extracelular por *A. niger* 7A-1, utilizando resíduos de triticale como substrato. Além disso, a utilização de farelo de arroz em *Rhizopus* sp. também obteve produção de fitase com atividade de 4,9 U/g (Suresh et al., 2021). Em outro estudo utilizando *A. niger* e *A. ficuum* em farelo de trigo como fonte de carbono, a atividade de fitase foi de 60,2 e 39,4 U/gds, respectivamente (Shivanna & Venkateswaran, 2014). Além disso, também foi relatado resultados de produção de fitase inferiores em comparação ao presente estudo, utilizando *A. fumigatus*, que obteve atividade ótima de 0,23 U/mg (Sanni et al., 2018). Gaind e Singh (2015) relataram a produção de fitase por *A. flavus* usando um bolo de mostarda em SSF. Em estudo realizado por Kumar et al. (2016), onde utilizaram um substrato misto (bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo), foi obtido alta produção de fitase por *Sporotrichum thermophile*.

Entre as possíveis fontes de carbono alternativas que podem ser utilizados na produção da fitase, o farelo de arroz e a palha de arroz se destacam, devido ao alto teor de ácido fítico na sua composição (Greiner et al., 2012). As pesquisas estão investigando intensivamente a produção de fitases por diferentes microrganismos, porém, em termos de utilização industrial, os fundos do gênero *Aspergillus* apresentam-se como os mais promissores (Pandey et al., 2001). De acordo com Bhavsar et al. (2008), a produção de fitase foi amplamente afetada pela quantidade de Pi presente nas fontes de carbono utilizadas para indução da produção de fitase, como os resíduos agrícolas.

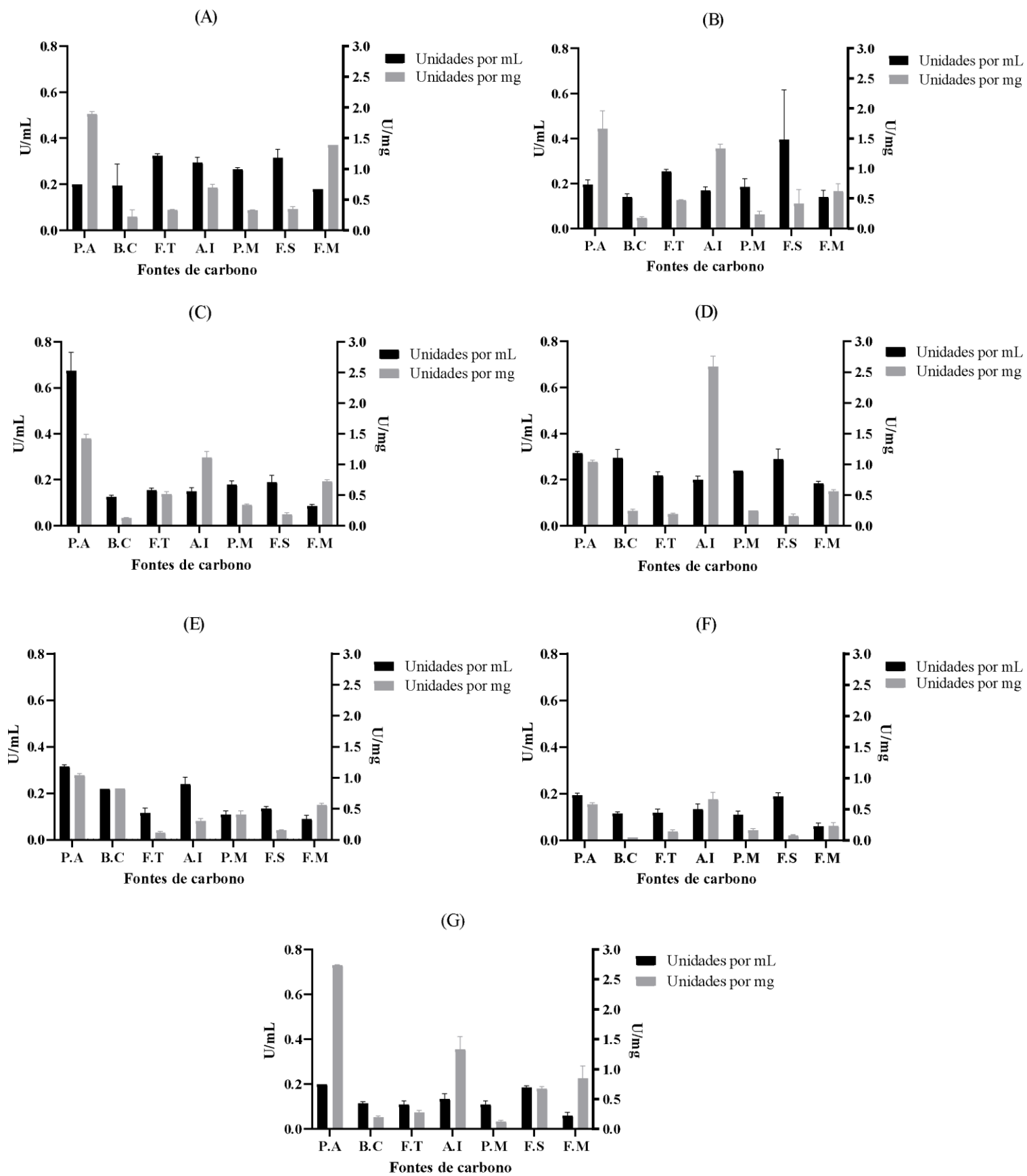


Figura 3. Avaliação de diferentes fontes de carbono na produção de fitase. Foram utilizados os fungos (A) *A. niger*, (B) *A. japonicus*, (C) *A. flavus* (D) *A. niveus*, (E) *A. terreus*, (F) *T. aurantiacus*, d e (G) *Aspergillus* sp. (M2). Os fungos cresceram em meio sólido 2,5% por 120 h a 30 °C. Fontes de carbono: FT (farelo de trigo), AI (arroz integral), FS (farinha de soja), PA (palha de arroz), BC (bagaço de cana), PM (palha de milho) e FM (farinha de mandioca). Os testes foram feitos em duplicata e realizado a média e desvio padrão. A análise estatística foi realizada através do Teste Tukey ($P < 0,05$) usando as atividades específicas (U/mg) obtidas por cada fungo.

A melhor fonte de carbono na produção de xilanase foi a palha de arroz (figura 4), com produção máxima com o *A. flavus* ($41,45 \pm 13,07$ U/mg), seguido do *Aspergillus* sp. (M2) ($39,98 \pm 6,66$ U/mg), posteriormente o *A. japonicus* ($23,37 \pm 5,59$ U/mg), *A. niger* ($22,27 \pm 2,61$ U/mg) e o *A. niveus* ($15,87 \pm 3,46$ U/mg). Muitos fungos filamentosos foram relatados como produtores de xilanase em resíduos agroindustriais, como *Humicola lanuginosa*, que registrou atividade de 171 IU-1 mg de proteína em farelo de arroz (Rajoka et al., 2005). A cepa *A. niger* NFCCI 4113 também foi relatado como produtor de xilanase em fontes de carbono como a casca de arroz ($721,33 \pm 30,65$ IU/gds) (Kumar et al., 2018).

Foi relatado por Sudan e Bajaj (2006) que a casca de arroz é boa indutora de xilanases, assim como, outros autores também relataram a maior produção de xilanase com palha de arroz (Ghanem, Yusef et al., 2000). Em outro estudo com *A. casielus* demonstrou maior produção de xilanase usando bagaço de cevada (9,22 U/mg) como fonte de carbono (Kronbauer et al. 2007). Dessa forma, é possível dizer que os melhores produtores de xilanase do presente estudo, tiveram maior produção quando comparados aos resultados de Kronbauer (2007). A utilização de palha de arroz para a produção de xilanase reduz o custo de produção pois grande parte da palha de arroz é gerada nos campos, sendo o arroz o principal alimento básico na maioria dos países asiáticos e globalmente. Além disso, a produção de arroz na Índia foi cerca de 106,54 milhões de toneladas que geraram cerca de 160 milhões toneladas de palha de arroz na proporção de 1:1,5 (grão de arroz para palha de arroz) sendo a Índia é o 2º maior produtor de arroz (Singh, 2016).

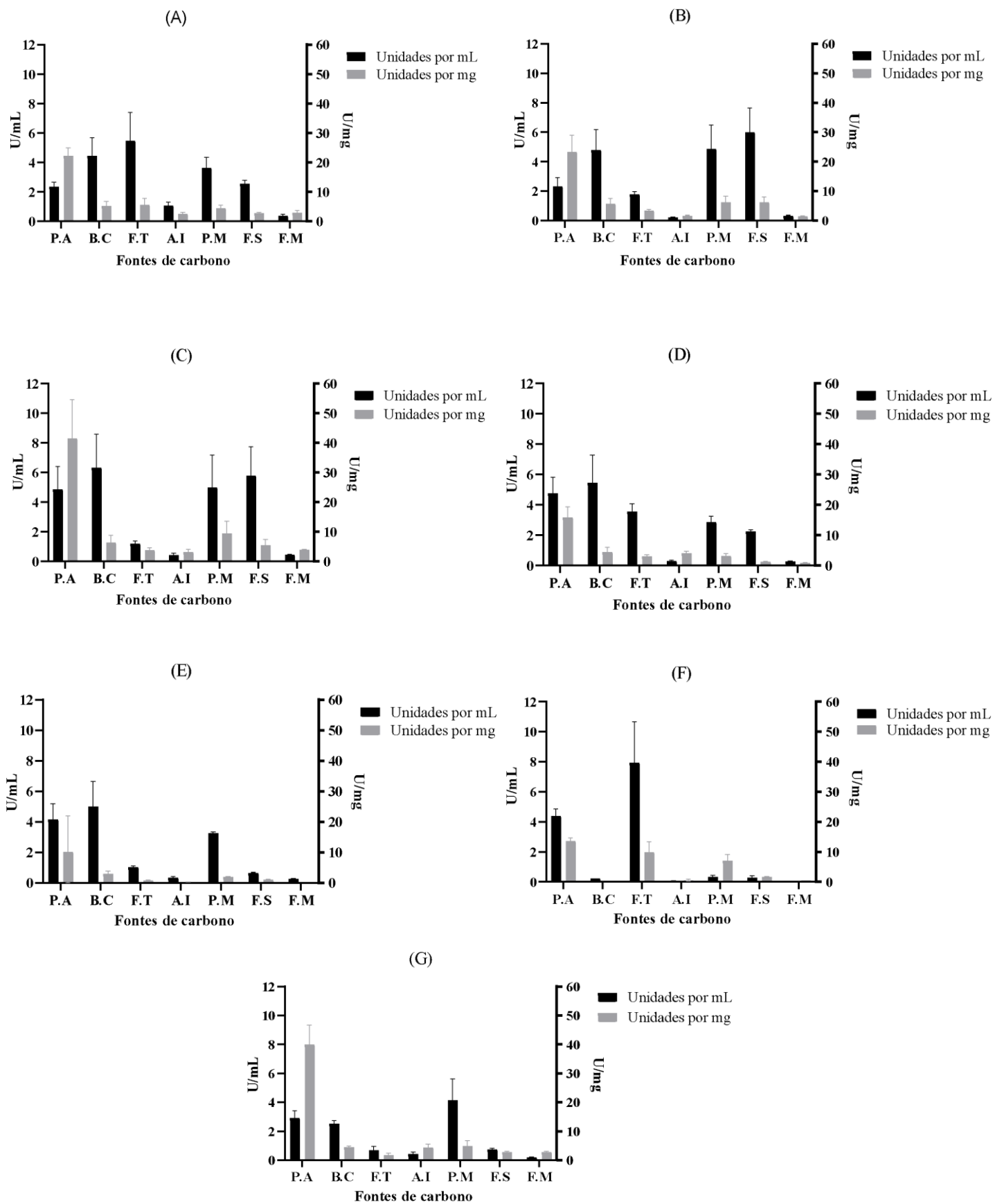


Figura 4. Avaliação de diferentes fontes de carbono na produção de xilanase. Foram utilizados os fungos (A) *A. niger*, (B) *A. japonicus*, (C) *A. flavus* (D) *A. niveus*, (E) *A. terreus*, (F) *T. aurantiacus*, e (G) *Aspergillus* sp. (M2). Os fungos cresceram em meio sólido 2,5% por 120h a 30°C. Fontes de carbono: FT (farelo de trigo), AI (arroz integral), FS (farinha de soja), PA (palha de arroz), BC (bagaço de cana), PM (palha de milho) e FM (farinha de mandioca). Os testes foram feitos em duplicata com média e desvio padrão. Análise estatística foi realizada através do Teste Tukey ($P < 0,05$) usando as atividades específicas (U/mg) obtidas por cada fungo.

4.2 Efeito do tempo de crescimento na produção das enzimas

A literatura realça a importância de avaliar o tempo de cultivo para a eficiência e economia do processo de produção enzimática. Portanto, para o estudo do tempo de crescimento na produção enzimática, foram selecionados os melhores produtores com base no teste utilizando diferentes fontes de carbonos alternativas, sendo eles o *A. niger*, *A. japonicus*, *A. flavus* e *Aspergillus* sp (M2), utilizando a melhor fonte de carbono (palha de arroz) indutora de produção das enzimas de interesse. Na produção de fitase de *A. niger* obteve um pico em 96 horas de crescimento ($1,48 \pm 0,07$ U/mg), seguido por *A. flavus* em 72 horas ($1,42 \pm 0,17$ U/mg) e posteriormente, *Aspergillus* sp. (M2) em 120 horas ($1,42 \pm 0,05$ U/mg) (figura 5).

Em um estudo, *A. oryzae* AK9 sendo cultivado em estado sólido em soja, mostrou pico de produção em 96 horas com atividade de 15 U/g, sendo maior que 72 horas (8,8 U/g) e menor que 120 horas (16 U/g). Silva et al (2010) observou pico de fitase em 96 horas (26,41 FIT) com *A. japonicus* em bagaço de mandioca como substrato. Outro estudo relatou produção máxima de fitase em *A. niger* (1,200 U/g) em 52 horas de crescimento, usando soja como fonte de carbono (Saithi & Tongta 2016). Entretanto, já foi observado produção de fitase com tempo de crescimento maior, como o *A. niger* NCIM 563 que mostrou maior produção com 168 horas de crescimento (50 IU/g) (Bhavsar et al., 2013). Assim como estudo com *A. niger* CFR 335 mostrou produção de fitase de 60,2 U/gds em 144 horas de incubação (Shivanna & Venkateswaran, 2014). O excesso de fosfato nas primeiras horas de fermentação pode reprimir a síntese de fitase por diversos microrganismos, o que poderia explicar a ausência ou baixa atividade relatada nas primeiras horas de crescimento dos fungos (Quan, 2001).

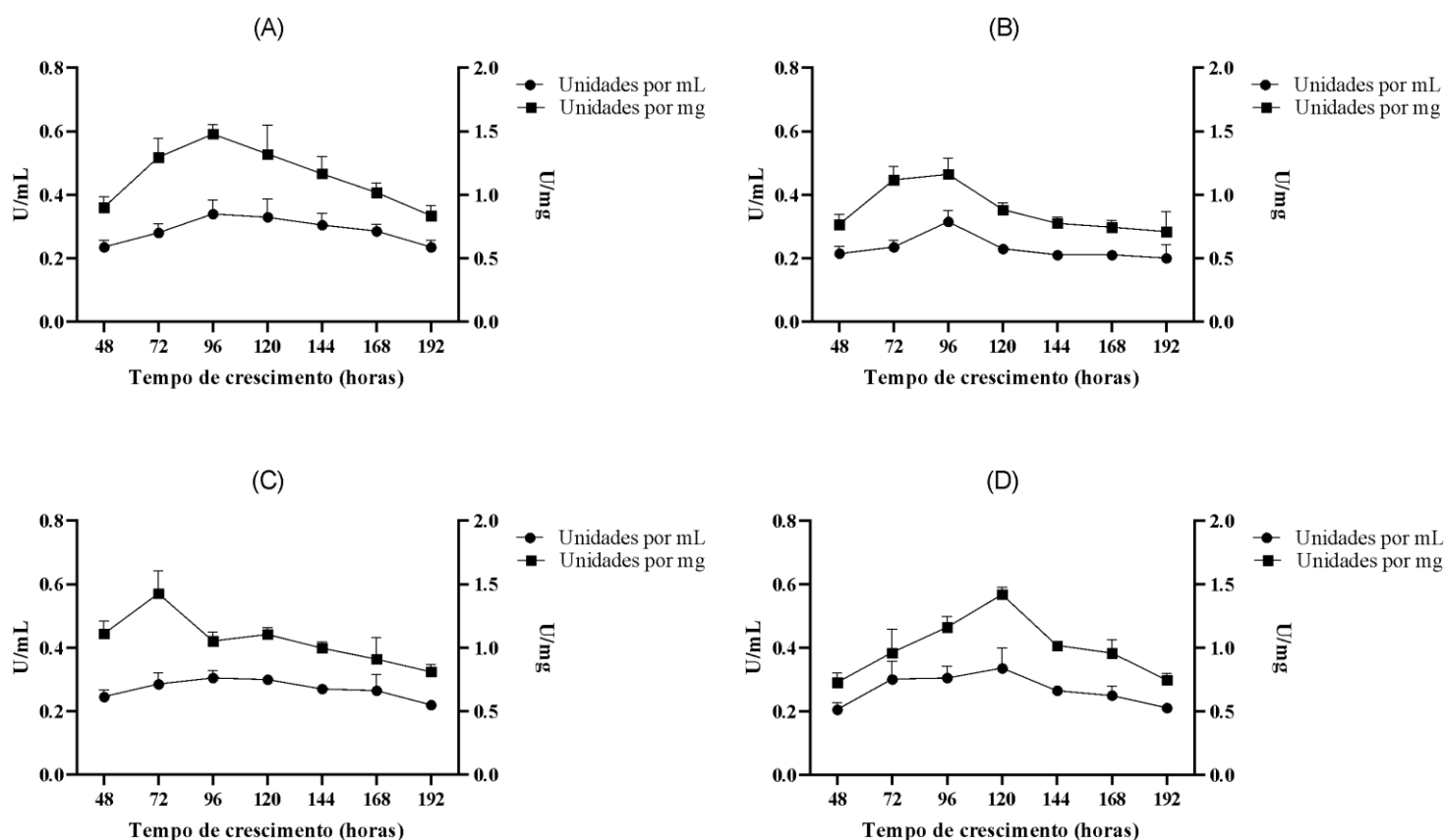


Figura 5. Avaliação do tempo de crescimento para a produção de fitase. Foram utilizados os fungos: (A) *A. niger*, (B) *A. japonicus*, (C) *A. flavus*, (D) *Aspergillus* sp (M2). Os fungos cresceram em FMS usando palha de arroz, por um período variando de 48 a 192 horas a 30 °C. Os testes foram feitos em duplicata com média e desvio padrão.

Na produção de xilanase, observou-se o pico em 48 horas de crescimento com *Aspergillus* sp. (M2) usando palha de arroz como fonte de carbono ($31,06 \pm 1,50$ U/mg). O *A. flavus* teve pico em 72 horas ($30,70 \pm 0,07$ U/mg), seguido do *A. japonicus* em 96 horas ($30,06 \pm 1,18$) (figura 6). Amorim (2016) também encontrou produtividade máxima de xilanase ($1,39$ U/g.h) em 48 horas de FES utilizando *A. awamori* e farelo de cacau como fonte de carbono. Um estudo com *Trichoderma longibrachiatum* relatou maior produção de xilanase depois de 96 horas de fermentação submersa (Azin et al., 2007). Muitos estudos relatam alta atividade de xilanase após 96 horas de crescimento. De acordo com estudos realizados por Kumar et al. (2018), *A. niger* NFCCI 4113 obteve pico de produção de xilanase em 120 horas de fermentação ($836,97 \pm 28,15$ IU/gds). Em *Aspergillus awamori* IOC-3914 foi observado pico de xilanase em 168 horas de crescimento, com atividade de cerca 250 U/g-1 (Castro et al.,

2010). Entretanto, apresentar pico da atividade enzimática em menor tempo de crescimento, como observado no presente trabalho, pode ser considerado um fator relevante, pois é um aspecto econômico importante na produção das enzimas, sendo mais vantajoso em comparação, por exemplo, com o estudo realizado por Delabona et al., 2013, onde o *A. fumigatus* obteve pico de xilanase após 120 horas, utilizando farelo de trigo e soja como fonte (1055,6 U/g e 558,3 U/g, respectivamente)

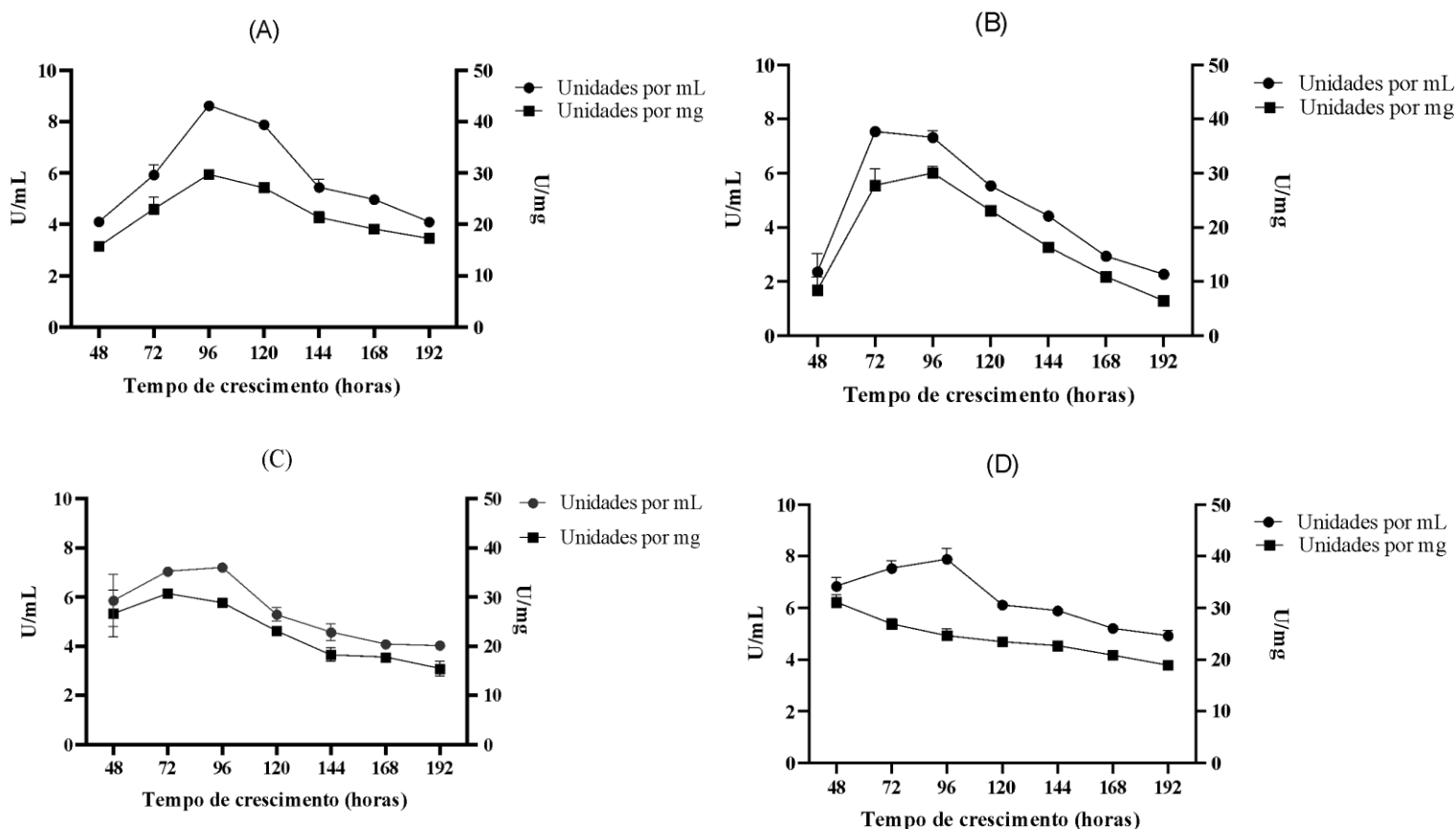


Figura 6. Avaliação do tempo de crescimento para a produção de xilanase. Foram utilizados os fungos: (A) *A. niger*, (B) *A. japonicus*, (C) *A. flavus*, (D) *Aspergillus sp (M2)*. Os fungos cresceram em FMS usando palha de arroz, por um período variando de 48 a 192 horas a 30 °C. Os testes foram feitos em duplicata com média e desvio padrão.

4.3 Efeito da temperatura na atividade de fitase e xilanase dos melhores produtores

A temperatura é um dos principais fatores que influencia na ação das enzimas, aumentando a movimentação das moléculas e a colisão com o substrato. Entretanto, o aumento da temperatura ótima pode causar a desnaturação da enzima e levar a queda da atividade catalítica (Ribeiro; Salgado; Dias, 2008). Sendo assim, foi avaliada a temperatura ótima dos melhores produtores selecionados a partir do teste do tempo de crescimento (*Aspergillus* sp. (M2) e *A. niger*). A fitase de *Aspergillus* sp. (M2) teve um aumento na atividade enzimática entre 30°C e 50°C, atingindo pico em 50°C. Entretanto, ocorreu uma queda de 14,81 % na atividade da enzima entre 50 e 60 °C. Já a fitase de *A. niger*, teve um aumento na atividade entre 40° e 45 °C, atingindo um pico de temperatura ótima a 45 °C e, posteriormente, apresentou uma queda de 12,83% a 60 °C.

Um estudo com *A. fumigatus* a temperatura ótima de atividade foi obtida a 40 °C, mantendo 69 % da atividade a 30 °C. Entretanto, foi observado declínio gradual na atividade enzimática entre 50 °C - 80 °C (Sanni et al., 2018). Com *A. ficuum* NTG-23 a temperatura ótima foi de 67 °C, com queda na atividade conforme o aumento da temperatura de 70 °C a 80 °C (Zhang et al., 2010). Ademais, a fitase de *A. oryzae* SBS50 mostrou atividade ótima a 50 °C, mantendo 50 % de atividade em 55 °C e 60 °C (Sapna, 2017). As fitases fúngicas tendem a se manter ativas entre de 37 °C a 67 °C.

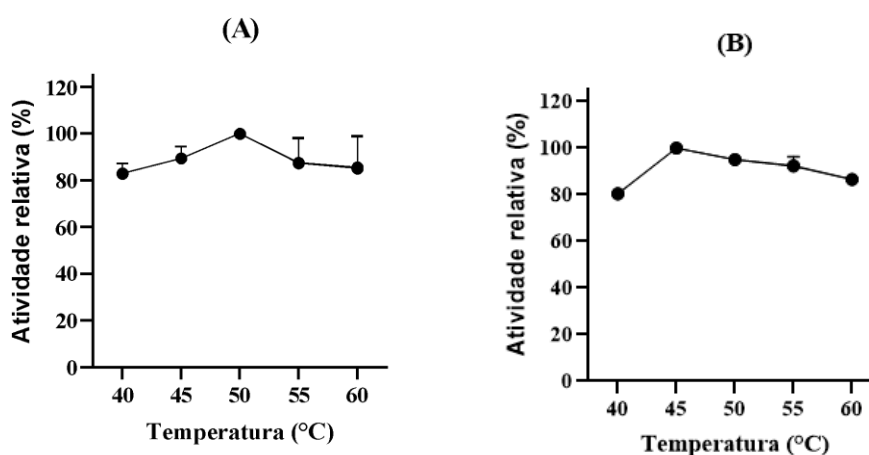


Figura 7. Efeito da temperatura na atividade da fitase de (A) *Aspergillus* sp. (M2) e (B) *A. niger*. A atividade foi avaliada em diferentes temperaturas, variando entre 40 e 60 °C, nas condições ótimas já pré-estabelecidas. As atividades foram calculadas como uma percentagem da atividade máxima. Os testes foram feitos em duplicata com média e desvio padrão.

A atividade enzimática de xilanase com *Aspergillus* sp. (M2) apresentou um aumento na atividade a partir de 40 °C, alcançando o pico ótimo de atividade em 55 °C (Figura 8),

apresentando uma pequena diminuição de 3,73% da atividade entre 55 °C e 60 °C. Em *A. foetidus* MTCC 4898 a temperatura ótima de xilanase foi 50 °C, sendo mantida entre 48 °C e 55 °C (Shah & Madamwar, 2005). Em fungos com atividade termofílicas, como *Thermomyces lanuginosus*, a atividade ótima de xilanase geralmente ocorre a 60 °C (Corrêa et al., 2016). Outros estudos demonstram que a xilanase de *A. casei* apresentou temperatura ótima de 50 °C (Aparecida et al., 2007). Em *Aspergillus phoenicis*, três tipos de xilanases apresentaram temperaturas ótimas entre 45 e 50 °C (Rizzati et al., 2004). Em geral, as xilanases apresentam atividade máxima entre 40 e 80 °C (Corral; Ortega, 2006). Os resultados apontam um forte potencial destas enzimas para a aplicação industrial sob temperaturas relativamente altas.

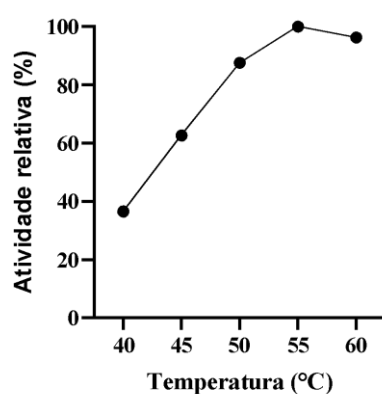


Figura 8. Efeito da temperatura na atividade da xilanase de *Aspergillus* sp. (M2). A atividade foi avaliada em diferentes temperaturas, variando entre 40 e 60 °C, nas condições ótimas já pré-estabelecidas. As atividades foram calculadas como uma porcentagem da atividade máxima. Os testes foram feitos em duplicata com média e desvio padrão.

4.4 Aplicação das enzimas produzidas por *Aspergillus* sp. (M2) e das enzimas comerciais na ração animal *in vitro*

Considerando que o *Aspergillus* sp. (M2) foi o melhor produtor para xilanase e também ficou selecionado entre os dois melhores produtores de fitase (*A. niger* e *Aspergillus* sp. (M2)), foi selecionada para os testes com as rações. As enzimas utilizadas nos testes foram padronizadas para possibilitar a comparação da atividade na ração animal, sendo as fitases de *Aspergillus* sp. (M2) e a enzima comercial (Natuphos ®) com 0,5 µmoles/mL, aproximadamente. As xilanases de *Aspergillus* sp. (M2) e as xilanases comerciais (Natugrain ® e comercial 2) em 3,7 - 5,7 µmoles/mL, aproximadamente.

A fitase de *Aspergillus* sp. (M2) apresentou atividade nas rações de MI ($3,38 \pm 0,85$ µmoles/mL), seguido por FA ($3,19 \pm 0,07$ µmoles/mL) e DDGS-S ($2,90 \pm 0,44$ µmoles/mL).

Já a fitase comercial mostrou melhor atividade em MIFS ($1,78 \pm 0,11$ $\mu\text{moles/mL}$), FA ($1,73 \pm 0,05$ $\mu\text{moles/mL}$), DDGS-E ($1,67 \pm 0,08$) e MI ($1,64 \pm 0,24$ $\mu\text{moles/mL}$), sendo inferior aos resultados obtidos com *Aspergillus* sp. (M2) (tabela 3). Estudos relataram que *R. stolonifer* foi efetiva na hidrólise de fitato e outros compostos fosfatados presentes nas amostras de ração animal. Após 5 horas de tratamento das amostras com a fitase, foram liberados 5,14 μmol de PO_4^{3-} mL^{-1} (Monteiro et al. 2012). Em estudo realizado por Vats et al. (2009) foi utilizado fitase de *A. niger* para a desfosforilação do ácido fítico em ração animal e obtiveram a liberação máxima de 0,048 μmol PO_4^{3-} mL^{-1} , após 48 horas à 55 °C. No presente estudo, a fitase de *Aspergillus* sp. (M2) foi incubada por 30 minutos em 50 °C e pH 5. Na catálise enzimática da fitase de *R. stolonifer* a concentração final de fosfato no meio, após 5 horas, foi de 10,02 μmol de PO_4^{3-} mL^{-1} . Posteriormente, a liberação de fosfato nas amostras foi estabilizada, provavelmente devido à inibição da enzima pela elevada concentração de fosfato no meio. Além disso, estudos avaliaram o efeito da concentração de fosfato inorgânico na atividade enzimática da fitase de *S. thermophile* e observaram que a enzima foi parcialmente inibida na concentração de 5 mM de fosfato no meio de reação (Singh & Satyanarayana, 2009).

Tabela 3. Avaliação da atividade de fitase de *Aspergillus* sp. (M2) e fitase comercial aplicadas em ração (alimentos cru).

Rações	Fitase de <i>Aspergillus</i> sp. (M2)	Fitase comercial (Natuphos®)
MI	3,38±0,85a	1,64±0,24a
SMV	1,43±0,15cd	0,85±0,09bc
ML	0,85±0,32d	0,71±0,28bc
FS	1,11±0,08cd	0,67±0,09c
FT	1,65±0,11bcd	1,17±0,06abc
FA	3,19±0,07a	1,73±0,05a
CS	1,09±0,20cd	0,74±0,30bc
DDGS-E	2,48±0,17abc	1,67±0,08a
DDGS-S	2,90±0,44ab	1,33±0,13ab
MIFS	2,85±0,49ab	1,78±0,11a
DAF	1,17±0,057cd	0,99±0,04bc

Os ensaios foram realizados em pH 5 a 50 °C, por 30 minutos. A atividade enzimática foi definida em $\mu\text{moles/mL}$ de fosfato liberado. Rações: MI (milho); SMV (sorgo); ML (milheto); FS (farelo de soja); FT (farelo de trigo); FA (farelo de arroz); CS (casca de soja); DDGS-E (DDGS-Etanol); DDGS-S (DDGS-Sabugo); MIFS (milho e farelo de soja); DAF (dieta alternativa – pura fibra). Os testes foram feitos em duplicata com média e desvio padrão. A análise estatística foi realizada através do Teste Tukey ($P < 0,05$).

Os ensaios enzimático das xilanases foram realizados em períodos de 4, 8 e 24 horas (tabelas 4). No período de 4 horas de reação, a xilanase de *Aspergillus* sp. (M2) obteve maiores resultados nas rações de MIFS ($12,67 \pm 0,51$ $\mu\text{moles/mL}$), seguido por MI ($12,02 \pm 1,26$ $\mu\text{moles/mL}$) e FT ($10,69 \pm 0,07$ $\mu\text{moles/mL}$). Na reação de 4 horas da xilanase Comercial 2, a maior atividade ocorreu em MI ($8,06 \pm 0,13$ $\mu\text{moles/mL}$), posteriormente em MIFS ($7,83 \pm 0,35$) e FT ($7,83 \pm 0,12$ $\mu\text{moles/mL}$). A incubação de 8 horas das enzimas xilanases de *Aspergillus* sp. (M2) nas rações obteve resultados em MIFS ($34,36 \pm 0,66$ $\mu\text{moles/mL}$), seguido de MI ($29,45 \pm 0,35$ $\mu\text{moles/mL}$) e SMV ($23,85 \pm 0,57$ $\mu\text{moles/mL}$). As atividades da xilanase Comercial 2 mostrou bons resultados com 8 horas de incubação na ração de MIFS ($19,18 \pm 2,37$ $\mu\text{moles/mL}$), posteriormente de MI ($18,93 \pm 0,12$ $\mu\text{moles/mL}$) e de FT ($15,07 \pm 1,53$ $\mu\text{moles/mL}$), entretanto, foram inferiores aos obtidos pela enzimas de *Aspergillus* sp. (M2). Com 24 horas de incubação a xilanase de *Aspergillus* sp. (M2) mostrou níveis maiores de atividade enzimática nas rações de MIFS ($38,12 \pm 2,27$ $\mu\text{moles/mL}$), MI ($37,42 \pm 1,99$ $\mu\text{moles/mL}$) e posteriormente SMV ($31,15 \pm 2,16$ $\mu\text{moles/mL}$). As xilanase Comercial 2, com 24 horas de incubação, se destacou na degradação da ração MI ($26,32 \pm 0,67$ $\mu\text{moles/mL}$), SMV ($23,14 \pm 1$ $\mu\text{moles/mL}$) e da ML ($22,21 \pm 1,08$ $\mu\text{moles/mL}$).

A adição de 30 U/100 g de farinha de xilanase de *Pichia pastoris* melhorou a proteína solúvel na farinha de trigo com um aumento de 58 % nos açúcares redutores. Além disso, a melhoria na qualidade da farinha de trigo foi relatada com base de geração de maior concentração de açúcares redutores (291,9 mg/g substrato) e proteínas solúveis (11,2 mg/mL) após a suplementação com xilanase (350 U/Kg de farinha) de *S. Thermophile* (Bala, 2016) (Karbalaei, 2020). Em um estudo realizado por Ingelmann et al (2018), foi relatada melhoria na digestibilidade da dieta à base de trigo de perus, reduzindo as proporções de inositol pentaquisfosfato e aumentando as proporções de inositol tetraquisfosfato sobre adição de uma mistura de xilanase de *T. Reesei*. Ademais, estudos mostraram que a xilanase de *Myceliophyhora thermophila* em 48 horas de incubação na farinha de trigo obteve 144,51 mg/g de açúcares liberados, enquanto que a farinha de arroz obteve 94,17 mg/g de açúcares liberados, ambos a 60 °C. Em Boonchuay et al. (2016), a xilanase produzida por *Streptomyces thermovulgaris* liberou 115,58 mg/g de açúcares redutores em milho incubado por 12 horas. As enzimas produzidas neste estudo mostraram ser uma alternativa eficiente em relação às enzimas comerciais. Os resultados do presente estudo são importantes e necessários, uma vez que é visado a inclusão das enzimas obtidas em processos nas indústrias de ração animal.

Tabela 4. Avaliação da atividade de xilanase de *Aspergillus* sp. (M2). aplicada em rações para animais.

Rações	Xilanase de <i>Aspergillus</i> sp. (M2)			Xilanase Comercial 2		
	4 horas	8 horas	24 horas	4 horas	8 horas	24 horas
MI	12,02±1,26ab	29,45±0,35ab	37,42±1,99a	8,06±0,13a	18,93±0,12a	26,32±0,67a
SMV	10,06±1,16abc	23,85±0,57bc	31,15±2,16b	5,70±0,19b	14,12±1,24b	23,14±1ab
ML	4,875±0,74e	17,33±2,21cde	27,92±0,56b	2,3±0,42c	13,29±3,29c	22,21±1,08ab
FS	7,07±1,26cde	14,02±3,92de	15,73±0,61d	3,79±1,11c	6,5±0,78c	9,64±2,38ef
FT	10,69±0,07ab	20,18±1,68cd	26,52±0,45bc	7,83±0,12a	15,07±1,53a	19,64±0,66abc
FA	6,38±0,90de	20,39±2,04cd	21,13±1,41cd	3,47±0,57c	6,11±1,17c	17,26±1,54bcd
CS	5,84±1,07de	12,47±0,69e	19,84±0,74d	2,1±0,14c	5,65±0,78c	5,66±0,84f
DDGS-E	5,06±1,04e	16,76±0,69de	30,28±0,84b	3,53±0,44c	3,86±1,06c	10,9±1,01def
DDGS-S	8,77±0,4bcd	17,07±0,57de	17,74±1,53d	7,03±0,01ab	8,7±0,54ab	10,61±0,06def
MIFS	12,67±0,51a	34,36±0,66a	38,12±2,27a	7,83±0,35a	19,18±2,37a	20,71±4,57abc
DAF	9,01±0,37bcd	17,17±1,56cde	18,9±0,16d	6,86±0,06ab	12,94±0,93ab	14,59±2,35cde

Os ensaios foram realizados em pH 5 a 55 °C, por 4, 8 e 24 horas. A atividade enzimática foi definida em µmoles/mL de açúcar liberado. Rações: MI (milho); SMV (sorgo); ML (milheto); FS (farelo de soja); FT (farelo de trigo); FA (farelo de arroz); CS (casca de soja); DDGS-E (DDGS-Etanol); DDGS-S (DDGS-Sabugo); MIFS (milho e farelo de soja); DAF (dieta alternativa – pura fibra). Os testes foram feitos em triplicata com média e desvio padrão. Análise estatística foi realizada através do Teste Tukey ($P < 0,05$).

5. CONCLUSÃO

O melhor fungo produtor de xilanase e fitase foi o *Aspergillus* sp. (M2), no qual apresentou a palha de arroz como melhor fonte de carbono alternativa e pico de crescimento de xilanase em 96 horas e fitase em 120 horas. A temperatura ótima de fitase foi a 45°C e xilanase foi a 55 °C. As fitases e xilanases produzidas por *Aspergillus* sp (M2), quando adicionadas às rações *in vitro*, promoveram maior capacidade de hidrólise de MIFS, MI, FT, SMV, FA, DDGS-S quando comparada com as enzimas comerciais. Portanto, pode-se considerar que as enzimas produzidas nesse estudo, quando adicionadas às rações, poderão melhorar a absorção de nutrientes e a digestibilidade, contribuindo para diminuir os gastos de produção.

6. REFERÊNCIAS

ADEBOWARE, TO.; YAO, K.; OSO, AO.. Major cereal carbohydrates in relation to intestinal health of monogastrics animals: A review. *Animal Nutrition Journal*, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2019.09.001>.

ADEOLA, O., COWIESON, A.J. Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve non-ruminant animal production. *Journal of Animal Science*. 9, 8 3189 – 3218, 2011.

ADEOLA, O., JENDZA, J. A., SOUTHERN, L. L., POWELL, S. & OWUSU-ASIEDU, A. Contribution of exogenous dietary carbohydrases to the metabolizable energy value of corn distillers grains for broiler chickens. *Poultry Science*, v.89, p.1947- 1954, 2010.

AMERAH, A. M.; PLUMSTEAD, P. W.; BARNARD, L. P.; KUMAR, A. Effect of calcium level and phytase addition on ileal phytate degradation and amino acid digestibility of broilers fed corn-based diets. *Poult. Sci.*, v. 93, n. 4, p. 906– 915, 2014.

AMORIM, G.M.; SANTOS, T.C.; PACHECO, C.S.V.; BARRETO, I.M.A.; FREIRE, D.M.G.; FRANCO, M. Fermentação de Farelo de Cacau por *Aspergillus Niger* para Obtenção de Lipase. *Estudos Tecnológicos Em Engenharia*, V. 8, N. 1, P. 24-27, 2012. Doi: 10.4013/ete.2012.81.04.

ANDRADE et al. Efeito de fatores antinutricionais encontrados nos alimentos alternativos e seu impacto na alimentação de não ruminantes – Revisão. *Revista Eletrônica Nutritime*, v.12, n.6, p.4393-4399, 2015.

ARASTEHFAR, A. et al. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis: From basics to clinics. *Studies In Mycology*, 2021.

ASP, N.G. Dietary carbohydrates: classification by chemistry and physiology. *Food Chemistry*. 57, 9 – 14, 1996.

AZIN, M; MORAVEJ, R; ZAREH, D. Production of xylanase by *Trichoderma longibrachiatum* on a mixture of wheat bran and wheat straw: optimization of culture condition by Taguchi method. *Enzyme And Microbial Technology*. v. 40, p. 801-805, 2007.

BACH KNUDSEN, KE. Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. *Animal Feed Science and Technology*. v. 67, p. 319–338, 1997.

BACH KNUDSEN, KE. The nutritional significance of “dietary fibre” analysis. *Animal Feed Science Technology* 90, 3 – 20, 2001.

BACH KNUDSEN, KE.; HEDEMANN, MS.; LAERKE, HN. The role of carbohydrates in the intestinal health of pigs. *Anim Feed Sci Technol*. v. 173, n. 1, p. 41-53, 2012.

BEDFORD, M.R. e MORGAN, A.J. The use of enzymes in poultry diets. *World’s Poult. Sci. J.*, v.52, p.61-68, 1996.

BEDFORD, M.R. Exogenous enzymes in monogastric nutrition - their current value and future benefits. *Animal Feed Science and Technology*. v.86, p.1-13, 2000.

BHAVSAR, K. et al. Phytase isozymes from *Aspergillus niger* NCIM 563 under solid state fermentation: Biochemical characterization and their correlation with submerged phytases. *Process Biochem*, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2013.08.001>

BHAVSAR K, SHAH P, SONI SK, KHIRE J M. Influência do pré-tratamento de resíduos agrícolas na produção de fitase por *Aspergillus niger* NCIM 563 sob condições de fermentação submersa. *Afr J Biotechnol*. 7: 1101-1106, 2008.

BERGQVIST, M. M; WÅRDH, K. S; DAS, A; AHLGREN, E. O. A techno-economic assessment of rice husk-based power generation in the Mekong river delta of Vietnam. WileyInterScience, 65p, ago, 2008.

BOONCHUAY, P.; TAKENAKA, S.; KUNTIYA, A.; TECHAPUN, C.; LEKSAWASDI, N.; SEESURIYACHAN, P.; CHAIYASO, T. Purification, characterization, and molecular cloning of the xylanase from *Streptomyces thermovulgaris* TISTR1948 and its application to xylooligosaccharide production. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. v. 129, p. 61- 68, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.03.014>

B. SINGH, MJ. Poças-Fonseca, BN Johri, T. Satyanarayana, Moldes termofílicos: biologia e aplicações, Crit. Rev. Microbiol. 42 (6) (2016) 985–1006 2016.

B. SINGH, T. SATYANARAYANA, Fungal phytases: characteristics and amelioration of nutritional quality and growth of non-ruminants, J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 99, 646–660, 2015

CAIRNS, TC.; NAI, C.; MEYER, V. How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research. Fungal Biol. Biotechnol, 2018.

CAMPESTRINI, E.; SILVA, VTM.; APPELT, MD. Utilização de enzimas na alimentação animal. Revista Eletrônica Nutritime, v. 2, p. 254-267, 2005.

CANGUSSU, ASR.; AIRES, DA.; AGUIAR, RWS.; BORGIGNON-JUNIOR, SE.; VIANA, KF.; BARBOSA, LCB.; CANGUSSU, EWS.; BRANDI, IV.; PORTELLA, ACF.; SANTOS, GR.; SOBRINHO, EM.; LIMA, WJN. Characterization of the Catalytic Structure of Plant Phytase, Protein Tyrosine Phosphatase-Like Phytase, and Histidine Acid Phytases and Their Biotechnological Applications. Enzyme Research. p. 1–12, 2018. DOI: 10.1155/2018/8240698

CASTILLO, S., GATLIN, D.M. Dietary supplementation of exogenous carbohydrase enzymes in fish nutrition: a review. Aquaculture 435, 286–292, 2015.

CASTRO, AM.; CARVALHO, DF.; FREIRE, DMG.; CASTILHO, LR. Economic Analysis of the Production of Amylases and Other Hydrolases by *Aspergillus awamori* in Solid-State Fermentation of Babassu Cake. Enzyme Research, p. 1–9, 2010. DOI:10.4061/2010/576872

CHADHA, BS.; KAUR, B.; BASOTRA, N.; TSANG, A.; PANDEY, A. Thermostable xylanases from thermophilic fungi and bacteria: current perspective. Bioresource Technology. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.044>, 2019.

CHOCT, M. Feed on non-starch polysaccharides: Chemical structures and nutritional significance. Feed Milling International. June Issue, 13 – 26. 1997.

CHOCT, M. et al. A comparison of three xylanases on the nutritive value of two wheats for broiler chickens. Br. J. Nutr. v.92, p.53-61, 2004.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. FEMS Microbiology Reviews, v. 29, n. 1, p. 3-23. DOI: 10.1016/j.femsre.2004.06.005, 2005.

CORRAL, O.; ORTEGA, F. Xylanases. *Advances In Agricultural And Food Biotechnology*, P. 305- 322, 2006.

CORRÊA, RCG.; RHODEN, SA.; MOTA, TR.; AZEVEDO, JL.; PAMPHILE, JA.; SOUZA, CGM.; POLIZELI, MLTM.; BRACHT, A.; PERALTA, RM. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. *Journal Of Industrial Microbiology And Biotechnology*, v. 41, n. 10, p. 1467-1478, 1 out, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-014-1496-2>.

CORRÊA, JM.; CHRISTI, D.; TORRE, CLD.; HENNC, C.; CONCEIÇÃO-SILVA, JL.; KADOWAKI, MK.; SIMÃO, RCG. High levels of β -xylosidase in *Thermomyces lanuginosus*: potential use of saccharification. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 47, p. 680- 690, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.04.028>

CORRELL, D.L. Phosphorus: a rate limiting nutrient in surface waters. *Poultry Science*, v.78, p.674-682, 1999.

CONTESINI, FJ.; MELO, RR.; SATO, HH. An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Critical Reviews in Biotechnology*. v. 38, n. 3, p. 321-334, 2018. DOI: 10.1080/07388551.2017.1354354

COUSI, S. & DAMASO, MCT. Enzimáticos. Embrapa, 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/tecnologia-dealimentos/processos/tipos-de-processos/enzimaticos>. Acesso em 7 de novembro de 2022.

COWIESON, AJ.; ACAMOVIC, T.; BEDFORD, MR. The effects of phytase and phytic acid on the loss of endogenous aminoacids and minerals from broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* v. 45, p. 101–108, 2004.

COWIESON, A. J.; RUCKEBUSH, J. P.; SORBARA, J. O. B.; WILSON, J. W.; GUGGENBUHL, P.; TANADINI, L.; ROOS, F. F. A systematic view on the effect of microbial phytase on ileal amino acid digestibility in broilers. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v. 231, p. 138–149, 2017

DAILIN, DJ.; HANAPI, SZ.; ELSAVED, E.; SUKMAWATI, D.; WAN AZELEE, NI, EVAHMALAY, J. et al. “Fungal phytases: biotechnological applications in food and feed industries,” in *Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi*. *Fungal Biology*, eds A. Yadav, S. Singh, S. Mishra, and A. Gupta, (Cham: Springer), p. 65–99, 2019. DOI: 10.1007/978-3-030-14846-1_2

DA SILVA, R.; LAGO, ES.; MERHEB, CW.; MACCHIONE, MM.; YONG, KP.; GOMES, E. Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 36, n. 3, p. 235– 241, 2005.

DE BARROS. V.R.S.M. avaliação nutricional da fitase e suas interações para. Frangos de corte. Tese de Doutorado. Universidade federal de viçosa. Minas Gerais, Brasil 2016.

DELABONA, P. et al. Effect of initial moisture content on two Amazon rainforest *Aspergillus strains* cultivated on agro-industrial residues: Biomass-degrading enzymes production and characterization. *Industrial Crops and Products*, v. 42, p. 236-242, 2013.

DELMASCHIO, I. B. Enzimas na alimentação de animais monogástricos - Revisão de literatura. *Revista Científica de Medicina Veterinária-UNORP*, v.2, n.1, p. 06- 20, 2018.

DELSJANT-LI, Y.; AWATI, A.; KROM, C.; EVANS C. A direct fed microbial containing a combination of three-strain *Bacillus* sp. can be used as an alternative to feed antibiotic growth promoters in broiler production. *J Appl Anim Nutr*. v. 2 e11, 2014.

DORS, GC.; PINTO RH.; BADIALE-FURLONG, E. Influência das condições de parboilização na composição química do arroz. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. v. 29, p. 219-224, 2009.

DOURADO, L.R.B. Enzimas exógenas em dietas para frangos de corte. 2008. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2008.

DUONG, QH.; LAPSLEY, KG.; PEGG, RB. Inositol phosphates: health implications, methods of analysis, and occurrence in plants foods. *J. Food Bioact* v.1, p. 41-45, 2018.

FALKOSKI, D. L. Enzimas Lignocelulolíticas de Fungos de Podridão Branca e Fitopatógenos: Produção, Caracterização e Aplicação em Processos de Sacarificação da Biomassa. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Viçosa, Programa de PósGraduação em Bioquímica Agrícola, 2011.

FEIZOLLAHI, E. et al. Review of the beneficial and anti-nutritional qualities of phytic acid, and procedures for removing it from food products. *Food Research International*, v. 143, p. 1-13, 2021.

FERREIRA, DF. SISVAR: A COMPUTER ANALYSIS SYSTEM TO FIXED EFFECTS SPLIT PLOT TYPE DESIGNS. *REVISTA BRASILEIRA DE BIOMETRIA*. v. 37, n. 4, p. 529-535. ISSN 1983-0823, 2019. Available at: . DOI: <https://doi.org/10.28951/rbb.v37i4.450>.

FIREMAN, A.K.B.A.T.; FIREMAN, F.A.T. Fitase na alimentação de poedeiras. *Revista Ciência Rural*, v.28, n.3, p. 529-53, 1998.

FRANCIS, G., MAKKAR, H.P., BECKER, K. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture* 199, 197–227, 2001.

FRISVAD, JC.; MØLLER, LLH.; LARSEN, TO.; KUMAR, R.; ARNAU, J. Safety of the fungal workhorses of industrial biotechnology: update on the mycotoxin and secondary metabolite potential of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology And Biotechnology*, v. 102, p. 9481-9515, 2018.

GAIND, S., AND SINGH, S. Production, purification and characterization of neutral phytase from thermotolerant *Aspergillus flavus* ITCC 6720. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 99, 15–22, 2015.

GHANEM, N. B.; YUSEF, H. H.; MAHROUSE, H. K. Production Of *Aspergillus Terreus* Xylanase In Solid-state Cultures: Application Of The Plackett–burman Experimental Design To Evaluate Nutritional Requirements. *Bioresource Technology*, V. 73, N. 2, P. 113-121, 2000.

GÍRIO, FM.; GÍRIO, C.; FONSECA, F.; CARVALHEIRO, LC.; DUARTE, S.; MARQUES, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. *Bioresour. Technol.* v. 101, n. 13, p. 4775- 4800, 2010. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.01.088.

GRACIA, MI. et al. Alpha-amylase supplementation of broiler diets based on corn. *Poultry Science.* v. 82, p. 436–442, 2003.

GRAF, E. & EATON, JW. Antioxidant Functions of Phytic Acid. *Free Radic. Biol. Med.* v. 8, n. 1, p. 61–69, 1990. DOI: 10.1016/0891-5849(90)90146-A.

GREINER, R., E KONIETZNY, U. “Atualização sobre características de fitases comerciais”, em *Proceedings of the International Phytase Summit*, ed. A. B Vista (Roma: AB Agri Ltd.), 96–107, 2012.

GONTZEA, I., SUTZESCU, P. *Natural anti nutritive substances in feedstuffs and forages.* 3.ed. New York: S. Karger, NY. 356p, 1968.

GUERRAND, D. *Enzymes in Human and Animal Nutrition. Economics of food and feed enzymes: status and perspectives.* p. 487-514, 2018. DOI: 10.1016/B978-0-12-805419-2.00026-5.

GUSMÃO, R. O. Et Al. Produção de Enzimas por *Aspergillus* Spp. Sob Fermentação Em Estado Sólido Em Casca de Café. *Scientia Plena*, V. 10, N. 11, 2014.

HABIBI, Y.; VIGNON, M. R. Isolation and characterization of xylans from seed pericarp of *Argania spinosa* fruit. *Carbohydrate Research*, v. 340, n. 7, p. 1431-1436, 2005.

HEINONEN, JK. & LAHTI, RJ. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Analytical biochemistry*, v. 113, n. 2, p. 313–317, 1981. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90082-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90082-8)

HOSOYA, K.; NAKAYAMA, M.; TOMIYAMA, D.; MATSUZAWA, T.; IMANISHI, Y.; UEDA, S.; YAGUCHI, T. Risk analysis and rapid detection of the genus *Thermoascus*, food spoilage fungi. *Elsevier BV. Food Control*, v. 41, p. 7-12, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.12.021>

INGELMANN, C. J.; WITZIG, M.; MÖHRING, J.; SCHOLLENBERGER, M.; KÜHN, I.; RODEHUTSCORD, M. Effect of supplemental phytase and xylanase in wheat-based diets on prececal phosphorus digestibility and phytate degradation in young turkeys. *Poult. Sci.*, v. 97, p. 2011-2020, 2018.

JATUWONG, K. et al. Bioprocess for Production, Characteristics, and Biotechnological Applications of Fungal Phytases. *Frontiers in Microbiology.* v. 11, p. 1-18, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.0018>

KARBALAEI M, REZAAE SA, FARSIANI H. *PICHIA PASTORIS*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *J Cell Physiol.* 2020 Sep;235(9):5867-5881. doi: 10.1002/jcp.29583.

KHANNA, P.; SUNDARI, SS.; KUMAR, NJ. Production, isolation and partial purification of xylanase from an *Aspergillus* sp. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. v. 11, n. 2, p. 242-243, 1995

KALOGERIS, E. ; CHRISTAKOPOULOS, P. ; KEKOS, D. ; MACRIS, B.J. Studies on the solid-state production of thermostable endoxylanases from *Thermoascus aurantiacus*: Characterization of two isozymes. *Journal of Biotechnology*, 60: 155 – 163, 1998.

KIM, Y. O., LEE, J. K., KIM, H. K., YU, J. H., AND OH, T. K. Cloning of the thermostable phytase gene (phy) from *Bacillus* sp. DS11 and its overexpression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* 162, 185-191, 1998.

KORNEGAY, E. T. Effect of Phytase on the bioavailability of phosphorus, calcium, amino acids, and trace minerals in broilers and turkeys. *BASF Technical Symposium. World Congress Center, Atlanta, Georgia. January 23, p. 39-70, 1996.*

KONIETZNY, U. & GREINER, R. Molecular and catalytic properties of phytate degrading enzymes (phytases). *International Journal of Food and Technology*. v. 37, p. 791- 812, 2002.

KRABBE, E. L. Perspectivas quanto ao desenvolvimento de enzimas para uso na nutrição de aves. In: *Embrapa Suínos e Aves-Artigo em anais de congresso (ALICE)*. In: seminário internacional de aves e suínos-avesui, São Paulo, SP. Anais. Florianópolis: Gessulli, 2012. Disponível em <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/936668/1/AvesuiEvertonKrabbePerspectivasquantoaodesenvolvimentodeenzima.pdf>. Acesso em 7 de novembro de 2022.

KROGDAHL, A., PENN, M., THORSEN, J., REFSTIE, S., BAKKE, A.M. Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recent findings regarding responses in salmonids. *Aquaculture Res.* 41, 333 – 344, 2010.

KRONBAUER, E. A. W.; PERALTA, R. M.; OSAKU, C. A.; KADOWAKI, M. K. Produção de xilanases por *Aspergillus casei* com diferentes fontes de carbono. *B. CEPPA, Curitiba* v. 25, n. 2, p. 207-216 jul/dex. 2007.

KUMAR, A.; CHANDERMAN, A.; MAKOLOMAKWA, M.; PERUMAL, K.; SINGH, S. Microbial production of phytases for combating environmental phosphate pollution and other diverse applications. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. v. 46, n. 6, p. 556-591, 2016. DOI: 10.1080/10643389.2015.1131562

KUMAR, BA. Wheat bran fermentation for the production of cellulase and xylanase by *Aspergillus niger* NFCCI 4113. *Research Journal of Biotechnology*. v. 13, p. 11 –18, 2018.

KUMAR, V.; SINHA, AK.; MAKKAR, HPS.; DE BOECK, G.; BECKER, K. Dietary Roles do Non Starch Polysaccharides in Human Nutrition: a Review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. v. 52, n. 0, p. 899-935, 2012.

KUMAR, V.; SINHA, AK.; MAKKAR, HPS.; BECKER, K. Dietary Roles of Phytate and Phytase in Human Nutrition: A Review. *Food Chem*. v. 120, n. 4, p. 945–959. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.11.052, 2010.

K. SHARMA, A. THAKUR, A. GOYAL, et al., Xylanases for food applications, in: B. Parameswaran (Ed.), *Energy, Environment, and Sustainability*, Springer Nature, Singapore, pp. 99–118, 2019. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3263-0_7 Green Bio-Processes

LEITE, RSR.; ALVES-PRADO, HF.; CABRAL, H.; PAGNOCCA, FC.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Production and characteristics comparison of crude β -glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* and *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. *Enzyme And Microbial Technology*. v. 43, p. 391-395, 2008.

LOPES, F.P. Otimização da produção de xilanase por levedura silvestre. 89f. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2010

LOWRY, H.; ROSEBROUGH, NJ.; FARR, AL.; RANDAL, RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* v. 193, p. 267-275, 1951.

LUNN, J., BUTTRISS, J.L. Carbohydrates and dietary fibre. *British Nutrition Bulletin*. 32, 21 – 64, 2007.

MARTINS, EDS.; LEITE, RSR.; DA SILVA, R.; GOMES, E. Production and characterization of polygalacturonase from thermophilic *Thermoascus aurantiacus* on submerged fermentation. *Annals of Microbiology*, v. 62, p. 1199–1205, 2012.

MATHLOUTHI, N.; MOHAMED, M. A AND LARBIER, M. Effect of enzyme preparation containing xylanase and β -glucanase on performance of laying hens fed wheat/barley- or maize/soybean meal-based diets. *British Poultry Science* 44:60-66, 2003.

MEDRONHO, B. et al. Rationalizing cellulose (in)solubility: Reviewing basic physicochemical aspects and role of hydrophobic interactions. *Cellulose* v. 19, n. 3, p. 581–587, 2012.

MENEZES, C. R.; BARRETO, A. R. Biodegradação de resíduos lignocelulósicos por fungos basidiomicetos: Caracterização dos resíduos e estudo do complexo enzimático fúngico. *Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, e-ISSN 2236 1170 – V. 19, n. 2, p. 1365-1391, mai – ago. 2015.

MILLER, G. Modified DNS method for reducing sugars. *Analytical Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOHAN, A. Hydrolytic xylanases production from fungi An assessment for their production, properties and computational analysis of their gene sequences. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. p. 79–89, 2020. DOI: 10.1016/B978- 0-12-821008-6.00008-6.

MÓL, PCG.; VERÍSSIMO, LAA.; MINIM, LA.; BOSCOLO, M.; GOMES, E.; DA-SILVA, R.. Production and capture of β -glucosidase from *Thermoascus aurantiacus* using a tailor made anionic cryogel. *Process Biochemistry*. Elsevier BV. v. 82, p. 75-83, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2019.03.029>

MONTEIRO, PS. et al. Production optimization, characterization and evaluation of *Rhizopus stolonifer* phytase in the hydrolysis of phytate in animal feed. *R. Bras. Agrociência. Pelotas*. v. 18, n. 2-4, p. 117-132, 2012.

MUSHTAQ, S.; ABBASI, BH.; UZAIR, B.; ABBASI, R. Natural products as reservoirs of novel therapeutic agents. EXCLI J. v. 17, p. 420–451, 2018.

NASCIMENTO, CEO.; SIMÕES, LCO.; PEREIRA, JC.; SILVA, RR.; LIMA, EA.; ALMEIDA, GC.; PENNA, ALB.; BOSCOLO, M.; GOMES, E.; SILVA, R. Application of a recombinant GH10 endoxylanase from *Thermoascus aurantiacus* for xylooligosaccharide 74 production from sugarcane bagasse and probiotic bacterial growth, *Journal of Biotechnology*, v. 347, p. 1-8. ISSN 0168-1656, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.02.003>

NEIRA-VIELMA, AA.; AGUILAR, CN.; ILYINA, A.; CONTRERAS-ESQUIVEL, JC.; CARNEIRO-DA-CUNHA, MG.; MICHELENA-ÁLVAREZ, G.; MARTÍNEZHERNÁNDEZ, JL. Purification and biochemical characterization of an *Aspergillus niger* phytase produced by solid-state fermentation using triticale residues as substrate. *Biotechnology Reports*. v. 17, p. 49–54, 2018. DOI:10.1016/j.btre.2017.12.004

NELSON, T. S. The utilization of phytate phosphorus by poultry—A review. *Poult. Sci.* 46:862–871, 1967.

NIU, C.; YANG, P.; LUO, H.; HUANG, H.; WANG, Y.; YAO, B. Engineering the residual side chains of HAP phytases to improve their pepsin resistance and catalytic efficiency. *Sci Rep.* v. 7, n. 42133, p. 1-14, 2017.

O.A. OLUKOSI, G. GONZALEZ-ORTIZ, H. WHITFIELD, M.R. BEDFORD, Comparative aspects of phytase and xylanase effects on performance, mineral digestibility, and ileal phytate degradation in broilers and turkeys, *Poultry Sci.* 2020, <https://doi.org/10.1016/j.psj.2019.11.018>.

OJHA, BK.; SINGH, PK.; SHRIVASTAVA, N. Enzymes in the Animal Feed Industry. In: *Enzymes in Food Biotechnology*. p. 93-109, 2019.

ONYANGO, E.M.; BEDFORD, M.R.; ADEOLA, O. Efficacy of an evolved *Escherichia coli* phytase in diets of broiler chicks. *Poult. Sci.*, v.84, p.248-255, 2005.

PANDEY, A.; SZAKACS, G.; SOCCOL, CR.; RODRIGUEZ, JAL.; SOCCOL, VT. Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresource Technology*. v. 77, n. 3, p. 203-214, 2001.

PALOHEIMO, M. et al. Xylanases and Cellulases as Feed Additives. In: Bedford, m.r.; partridge, g.g. *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. 2.ed. Cap.2, p.12-53, 2011.

PANDEY, A.; SZAKACS, G.; SOCCOL, CR.; RODRIGUEZ, JAL.; SOCCOL, VT. Production, purification and properties of microbial phytases. *Bioresource Technology*. v. 77, n. 3, p. 203-214, 2001.

PERSIN, Z; et al. Challenges and opportunities in polysaccharides research and technology: The EPNOE views for the next decade in the areas of materials, food and health care. *Carbohydrate Polymers* v. 84, p.22-32, 2011.

PHILIPPS-WIEMANN, P. . Enzymes in Human and Animal Nutrition. In: *Proteases general aspects*. p. 257–266, 2018. DOI: 10.1016/B978-0-12-805419-2.00012-5.

PING, L.; WANG, M.; YUAN, X.; CUI, F.; HUANG, D.; SUN, W.; ZOU, B.; HUO, S.; WANG, H. Production and characterization of a novel acidophilic and thermostable xylanase from *Thermoascus aurantiacus*, International Journal of Biological Macromolecules, 2018.

PINTO, G. A. S; et al. Fermentação em estado sólido: uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. Comunicado Técnico 102. ISSN 1679-6535, Fortaleza – CE, 2005.

PIRGOZLIEV, V.; ACAMOVIC, T. AND BEDFORD, M. Effect of dietary xylanase on energy, amino acid and mineral metabolism, and egg production and quality in laying hens. British Poultry Science 51:639-647, 2010.

QUAN, C. Et Al. Production Of Phytase In a Low Phosphate Medium By a Novel Yeast *Candida Krusei*. Journal Of Bioscience And Bioengineering, V. 92, N. 2, P. 154–160, 2001.

RAJOKA, MI.; TAYYABA HUMA, AM.; KHALID; FL. Kinetics of Enhanced Substrate Consumption and Endo- β -xylanase Production by a Mutant Derivative of *Humicola lanuginosa* in Solid-state Fermentation. v. 21, n. 6-7, p. 869–876, 2005. DOI: 10.1007/s11274-004-6030-7

RASMUSSEN, SK.; INGYARSEN, CR.; & TORP, AM. Mutations in genes controlling the biosynthesis and accumulation of inositol phosphates in seeds. Biochemical Society Transactions. v. 38, p. 689-694, 2010.

RAVINDRAN, V.; RAVINDRAN, G. & SIVALOGAN, S. Total and phytate phosphorus contents of various foods and feedstuffs of plant origin. Food Chemistry. v. 50, n. 2, p. 133-136, 1994.

RIBEIRO, M. A. Z. C.; SALGADO, A. M.; DIAS, B. Tecnologia Enzimática. Editora Ed. Rio de Janeiro: Epub Editora, 2008

ROOPESH, 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*. Bioresour Technol. v. 97, p. 506–511, 2006

ROSTAGNO, HS. et al. Tabelas Brasileiras para Aves e Suínos. 4a ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 448 p, 2017.

SAITHI, S.; TONGTA, A. Phytase Production of *Aspergillus niger* on Soybean Meal by Solid-State Fermentation Using a Rotating Drum Bioreactor. Agriculture and Agricultural Science Procedia. v. 11, p, 2016. 25–30. DOI: 10.1016/j.aaspro.2016.12.005

SAPNA, SB. Phytase production by *Aspergillus oryzae* in solidstate fermentation and its applicability in dephytinization of wheat bran. Appl Biochem Biotechnol. v. 173, p. 1885– 1895, 2014.

SANNI, DM.; LAWAL, OT.; ENUJJUGHA, VN. Purification and Characterization of Phytase from *Aspergillus fumigatus* Isolated from African Giant Snail (*Achatina fulica*). Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.11.017>

SCHOCH, CL.; et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford): baaa062. PubMed: 32761142 PMC: PMC7408187, 2020.

SELLE, P.H.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. Review. Animal Feed Science and Technology. 135. 1-41, 2007.

SELLE, P.H.; RAVINDRAN, V. BRYDEN, W.L.; SCOTT, T.A. Influence of dietary phytate and exogenous phytase on amino acid digestibility in Poultry: A review. Journal of Poultry Science, v.43, p.89-103, 2006.

SELLE, P.H.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. Animal Feed Science and Technology, v.135, p.1-41, 2007

SHAH, A R.; DATTA M. "Xylanase production under solid-state fermentation and its characterization by an isolated strain of *Aspergillus foetidus* in India." World Journal of Microbiology and Biotechnology 21: 233-243, 2005.

SHANMUGAN, G. Characteristics of phytase enzyme and its role in animal nutrition. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci., v. 7, n. 3, p. 1006-1013, 2018.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. Current Opinion in Microbiology, v. 6, n. 3, p. 219-228, 2003.

SHIVANNA, GB.; VENKATESWARAN, G. Phytase Production by *Aspergillus niger* CFR 335 and *Aspergillus ficuum* SGA 01 through Submerged and Solid-State Fermentation. The Scientific World Journal. p. 1–6, 2014. DOI: 10.1155/2014/392615

SILVA, J. B. A.; FRANTZ, S. C.; MARQUES, A. K.; COELHO, C. M.; MORAIS, P. B. Produção de enzimas extracelulares por fungos associados à decomposição de materiais vegetais em riachos. J. Bioen. Food Sci., v. 2, n. 4: p.208-212, eISSN 2359-2710, 2015.

SILVÉRIO, Hudson Alves et al. Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from corncob for application as reinforcing agent in nanocomposites. Industrial Crops and Products v. 44, p. 427–436 , 2013.

SINGH, B. et al. Contribution of microbial phytases to the improvement of plant growth and nutrition: A review. Soil Science Society of China. v. 30, p. 295-313, 2020. DOI: 10.1016/S1002- 0160(20)60010-8.

SINGH, B., & SATYANARAYANA, T. Characterization of a HAP–phytase from a thermophilic mould *Sporotrichum thermophile*. *Bioresource technology*, 100(6), 2046-2051, 2009.

SINGH, B.; SATYANARAYANA, T. Fungal phytases: Characteristics and amelioration of nutritional quality and growth of non-ruminants. J Anim Physiol Anim Nutr. v. 99, p. 646– 660, 2015.

SINGH, R.; KUMAR, M.; MITTAL, A.; MEHTA, PK. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. 3 Biotech. v. 6, p. 174, 2016. DOI: 10.1007/s13205-016-0485-8.

SINGH, B. et al. Contribution of microbial phytases to the improvement of plant growth and nutrition: A review. *Soil Science Society of China*. v. 30, p. 295-313, 2020. DOI: 10.1016/S1002-0160(20)60010-8.

SINHA, A.K., KUMAR, V., MAKKAR, H.P., DE BOECK, G., BECKER, K. Non-starch polysaccharides and their role in fish nutrition—a review. *Food Chem*. 127, 1409–1426, 2011.

SJÖSTRÖM, E. *Wood Chemistry: Fundamentals and Applications*, 2nd edn. Academic Press, New York, p. 63–70., 1993.

SRIVASTANA, N.; MISHRA, PK. & UPADHYAY, SN. Xylanases: For digestion of hemicellulose. *Industrial Enzymes for Biofuels Production*. p. 101–132, 2020. DOI: 10.1016/b978-0-12-821010-9.00006-1.

SUDAN, R.; BAJAJ, B. Production And Biochemical Characterization Of Xylanase From An Alkalitolerant Novel Species *Aspergillus Niveus* Rs2. *World Journal Of Microbiology And Biotechnology*, V. 23, N. 4, P. 491-500, 2007.

SURESH, S.; SIVARAMAKRISHNAN, R.; RADHA, KV. et al. Ultrasound pretreated rice bran for *Rhizopus* sp. phytase production as a feed. *Food Bioscience*. v. 43, 101281, 2021. DOI: 10.1016/j.fbio.2021.101281

THOMAS, L.; USHASREE, MV.; PANDEY, A. An alkali-thermostable xylanase from *Bacillus pumilus* functionally expressed in *Kluyveromyces lactis* and evaluation of its deinking efficiency. *Bioresource Technology*, 2014.

UGWUANYI, JO. Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production. *Enzymes for Nutritional Enrichment of Agro-Residues as Livestock Feed*. p. 233–260. ISBN 978-0-12-802392-1, 2016. DOI: 10.1016/B978-0-12-802392-1.00010-1

VASUDEVAN, UM, JAISWAL, AK, SHYAM, K. E PANDEY, A. Fitase termoestável em indústrias de rações e combustíveis. *Biorecurso. Tecnol.* 278, 400-407, 2019 doi: 10. 1016/j.biortech.2019.01.065

VATS, P.; BHUSHAN, B.; BANERJEE, UC. Studies on the dephosphorylation of phytic acid in livestock feed using phytase from *Aspergillus niger* van Teighem. *Bioresource Technology*. v. 100, n. 1, p. 287-291, 2009.

VOHRA, A., AND SATYANARAYANA, T. Phytases: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications. *Critical Reviews in Biotechnology* 23, 29, 2003.

VUONG, TV.; MASTER, ER. Enzymatic upgrading of heteroxylans for added-value chemicals and polymers. *Curr. Opin. Biotechnol.* v. 73 p. 51-60, 2022. DOI: 10.1016/j.copbio.2021.07.001

WAREING, PW. Incidence and detection of thermotolerant and thermophilic fungi from maize with particular reference to *Thermoascus* species. *International Journal Of Food Microbiology*. Elsevier BV. v. 35, n. 2, p. 137-145, 1997. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605\(96\)01212-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605(96)01212-3).

WYATT, C. et al. Mechanisms of action for supplemental NSP and phytase enzymes in poultry diets. In: *Poult. Nutr. Conf.* 35, 2008. Carolina Feed Ind. Assoc. Raileigh, NC. p.1-11, 2008.

YADAV, P.; MAHARJAN, J.; KORPOLE, S.; PRASAD, GS.; SAHNI, G.; BHATTARAI, T.; SREERAMA, L. Production, Purification, and Characterization of Thermostable Alkaline Xylanase From *Anoxybacillus kamchatkensis* NASTPD13. *Front Bioeng Biotechnol.* v. 15, 2018. DOI: 10.3389/fbioe.2018.00065. PMID: 29868578; PMCID: PMC5962792.

YAO, M-Z.; ZHANG, Y-H.; LU, W-L.; HU, M-Q.; WANG, W.; LIANG, A-H. Phytases: crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applications. *Journal of Applied Microbiology*, v.112, p.1-14, 2011.

YEGIN, S. Single-step purification and characterization of an extreme halophilic, ethanol tolerant and acidophilic xylanase from *Aureobasidium pullulans* NRRL Y-2311-1 with application potential in the food industry. *Food Chem.* v. 221, p. 67–75, 2017.

ZANELLA, I. et al. Effect of enzyme supplementation of broiler diets based on corn and soybeans. *Poultry Science*, v. 78, n. 4, p. 561-568, 1999.

ZHANG, GQ.; DONG, XF.; WANG, ZH.; ZHANG, Q.; WANG, HX.; TONG, JM. Purification, characterization, and cloning of a novel phytase with low pH optimum and strong proteolysis resistance from *Aspergillus ficuum* NTG-23. v. 101, n. 11, p. 4125–4131, 2010. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.01.001

ZHANG, G-O.; WU, Y-Y.; NG, T-B.; CHEN, Q-J.; WANG, H.-X. A phytase characterized by relatively high pH tolerance and thermostability from the shiitake mushroom *Lentinus edodes*. *BioMed Research International*, v. 2013, p. 1-7, 2013.

